



UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

Interacción de hormonas peptídicas e inmunopéptidos del virus de la hepatitis B con modelos de membrana

Yolanda Cajal Visa

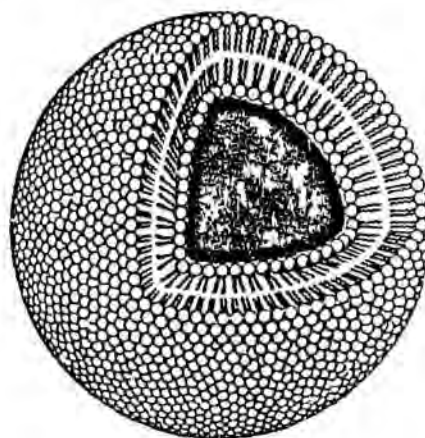


Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**

***INTERACCION DE HORMONAS PEPTIDICAS E INMUNOPEPTIDOS
DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B
CON MODELOS DE MEMBRANA***



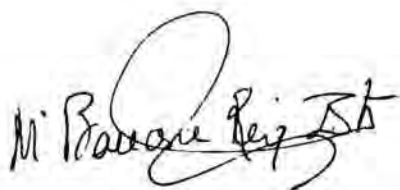
Yolanda Cajal Visa

Dña. Francisca Reig Isart, Doctora en Ciencias Químicas e Investigadora del CSIC, y
Dña. M^a Asunción Alsina Esteller, Doctora en Farmacia y Catedrática de Química
Física de la Universidad de Barcelona,

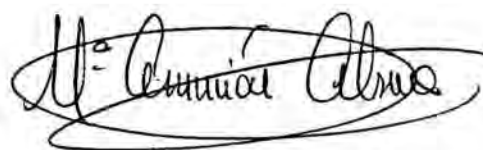
CERTIFICAN:

que Yolanda Cajal Visa ha realizado en el Laboratorio de Péptidos del
Centro de Investigación y Desarrollo del C.S.I.C. y en la Unidad de
Físico-Química del Departamento de Farmacia de la Universidad de
Barcelona, bajo su dirección, la presente memoria para optar al grado de
Doctor en Farmacia, por lo que autorizan su presentación.

Barcelona, enero de 1993.



Dra. Francisca Reig Isart



Dra. M^a Asunción Alsina Esteller

***INTERACCION DE HORMONAS PEPTIDICAS E INMUNOPEPTIDOS
DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B
CON MODELOS DE MEMBRANA***

*Memoria presentada por Yolanda Cajal Visa
para optar al grado de Doctor en Farmacia.*

Barcelona, enero de 1993.

A mis padres

Son muchas las personas que me han ayudado en estos años dedicados al doctorado. Unas me han ofrecido sus conocimientos, y me han enseñado a amar la investigación. Otras me han dado ánimos, ayudándome con su amistad a superar las horas bajas, tan frecuentes en el trabajo de laboratorio. A todos vosotros, y creo que no es necesario nombraros uno a uno, os doy las gracias.

Gracias especialmente a mi familia, por su apoyo incondicional.

ABREVIATURAS

vii

INTRODUCCION

1.	El papel de la membrana lipídica en la interacción péptido-receptor	1
2.	Modelos de membrana	7
2.1.	Liposomas	8
2.1.1.	Composición química de los liposomas	10
2.1.2.	Propiedades fisicoquímicas de los liposomas	15
2.1.3.	Estructura física de los liposomas	18
2.1.4.	Métodos de preparación de liposomas	20
2.1.5.	Métodos de purificación de los liposomas	25
2.1.6.	Caracterización de los liposomas	25
2.1.6.1.	Análisis químico	26
2.1.6.2.	Tamaño de los liposomas	26
2.1.6.3.	Estabilidad de los liposomas	26
2.2.	Capas lipídicas monomoleculares	28
2.2.1.	Monocapas de adsorción	28
2.2.2.	Monocapas de extensión	29
2.2.3.	Presión superficial	29
2.2.4.	Estabilidad de las monocapas	31
2.2.4.1.	Presión de Colapso	31
2.2.5.	Estados de las capas monomoleculares	32
2.2.5.1.	Monocapas gaseosas	32
2.2.5.2.	Monocapas condensadas	32
2.2.5.3.	Monocapas expandidas	33
2.2.6.	Cambios de estado de las monocapas	33
2.2.7.	Estudios en monocapas mixtas	34
2.2.7.1.	Cálculos termodinámicos	36
3.	La fluorescencia en el estudio de la interacción péptido-lípido	38
3.1.	Fluorescencia: principios básicos	42
3.2.	Polarización de fluorescencia	47
4.	Hormonas Peptídicas	49

4.1.	Mecanismos de acción hormonal	49
4.1.1.	Activación del sistema AMP cíclico de las células	49
4.1.2.	Activación de los genes de las células	50
4.2.	Hormona del crecimiento humana (hGH)	51
4.3.	Hormona inhibidora de la liberación de GH o Somatostatina (SRIF)	52
4.4.	Hormona liberadora de GH (GHRH)	52
4.5.	Hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH)	53
5.	Vacunas peptídicas	53
5.1.	Mecanismo de la respuesta inmune	54
5.2.	Péptidos inmunogenos del virus de la Hepatitis B	56

OBJETIVOS	57
------------------	-----------

MATERIALES Y METODOS

1.	Materiales	58
1.1.	Instrumentación	58
1.2.	Disolventes y reactivos	59
1.3.	Lípidos	59
1.4.	Péptidos y aminoácidos	60
1.5.	Soportes cromatográficos	60
1.6.	Soluciones	61
2.	Métodos	61
2.1.	Purificación de la fosfatidilcolina de huevo	61
2.2.	Caracterización de los fosfolípidos por capa fina	62
2.3.	Purificación de la carboxifluoresceína	62

2.4.	Obtención de liposomas	63
2.4.1.	Liposomas unilaminares sonicados (SUV)	63
2.4.2.	Liposomas unilaminares extruídos (SUV)	64
2.4.3.	Liposomas obtenidos por deshidratación-rehidratación (DRV).	
	Encapsulación de CF	65
2.4.3.1.	Cuantificación de la encapsulación de CF	66
2.5.	Determinación cuantitativa de fosfolípido	66
2.6.	Determinación del tamaño de los liposomas	67
2.7.	Observación de los liposomas por microscopía electrónica	68
2.8.	Caracterización de los péptidos	68
2.8.1.	Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)	68
2.8.2.	Análisis de aminoácidos	69
2.9.	Interacción de péptidos con liposomas por fluorescencia y polarización	69
2.9.1.	Instrumentación	69
2.9.2.	Cubetas	72
2.9.3.	Marcadores fluorescentes	72
2.9.3.1.	Marcadores fluorescentes intrínsecos	72
2.9.3.2.	Marcadores fluorescentes extrínsecos	75
2.9.3.2.1.	Saturación de los liposomas con DPH y ANS	75
2.9.3.2.2.	Medida de la variación de la polarización	76
2.9.3.3.	Liberación de carboxifluoresceína	78
2.9.3.3.1.	Liberación a tiempo constante	78
2.9.3.3.2.	Liberación de CF en función del tiempo	79
2.10.	Determinación de la conformación de los péptidos en TFE	79
2.11.	Dicroísmo Circular (CD)	80
2.12.	Monocapas	81
2.12.1.	Instrumento de medida	81
2.12.2.	Cinéticas de penetración a área constante	83
2.12.3.	Isotermas de compresión	83

RESULTADOS**Sección 1: Liposomas.**

1.1.	Tamaño de las preparaciones liposómicas	85
1.2.	Determinación de la cantidad de fosfolípido	86

Sección 2: Interacción de hormonas peptídicas con modelos de membrana.

2.1.	Análisis de pureza de las hormonas	89
2.2.	Interacción de hormonas peptídicas con liposomas: cambios en la fluorescencia de los péptidos	91
2.2.1.	Cambios en la fluorescencia de SRIF en presencia de SUV-DPPC	95
2.2.2.	Fluorescencia de la somatostatina en TFE	99
2.2.3.	Cambios en la fluorescencia de LHRH en presencia de SUV-DPPC	102
2.2.4.	Fluorescencia de LHRH en TFE	105
2.2.5.	Cambios en la fluorescencia de hGH en presencia de SUV-DPPC	107
2.2.6.	Cambios en la fluorescencia de GHRH(1-29) en presencia de SUV-DPPC	110
2.2.7.	Fluorescencia de GHRH(1-29) en TFE	112
2.3.	Cambios en la fluidez de los liposomas inducidos por las hormonas peptídicas	113
2.3.1.	Saturación de los liposomas con ANS	113
2.3.2.	Saturación de los liposomas con DPH	114
2.3.3.	Corrección de la polarización	115
2.3.4.	Ajuste de las curvas de despolarización del DPH	116
2.3.5.	Influencia de SRIF en la fluidez de los liposomas	116
2.3.6.	Influencia de LHRH en la fluidez de los liposomas	119
2.3.7.	Influencia de hGH en la fluidez de los liposomas	121
2.3.8.	Influencia de GHRH(1-29) en la fluidez de los liposomas	123
2.4.	Cambios conformacionales en las hormonas peptídicas en presencia de liposomas y en TFE: espectroscopía de dicroísmo circular (CD)	126
2.4.1.	Análisis conformacional de la somatostatina por CD	129
2.4.2.	Análisis conformacional de LHRH por CD	130
2.4.3.	Análisis conformacional de GHRH(1-29) por CD	132
2.4.4.	Análisis conformacional de hGH por CD	133

2.5.	Perturbación de la estructura de los liposomas inducida por las hormonas peptídicas: liberación de carboxifluoresceína	135
2.5.1.	Latencia de CF	135
2.5.2.	Encapsulación de CF	136
2.5.3.	Liberación de CF a tiempo constante	136
2.5.4.	Liberación de CF en función del tiempo	140
2.6.	Interacción de las hormonas peptídicas con capas lipídicas monomoleculares	143
2.6.1.	Cinéticas de penetración a área constante	143
2.6.1.1.	Cinéticas de penetración de somatostatina en monocapas	143
2.6.1.2.	Cinéticas de penetración de LHRH en monocapas	144
2.6.1.3.	Cinéticas de penetración de GHRH(1-29) en monocapas	144
2.6.1.4.	Cinéticas de penetración de hGH en monocapas	145
2.6.2.	Isotermas de compresión de monocapas mixtas de hormonas peptídicas con DPPC	149
2.6.2.1.	Isotermas de compresión de monocapas mixtas somatostatina/DPPC	149
2.6.2.2.	Isotermas de compresión de monocapas mixtas LHRH/DPPC	152
2.6.2.3.	Isotermas de compresión de monocapas mixtas GHRH(1-29)/DPPC	155
2.6.2.4.	isotermas de compresión de monocapas mixtas hGH/DPPC	157

Sección 3: Interacción de inmunógenos peptídicos del virus de la hepatitis B con modelos de membrana.

3.1.	Análisis de pureza de péptidos y lipopéptidos	159
3.2.	Interacción del inmunopéptido preS(120-145) con liposomas de DPPC: cambios en la fluorescencia del péptido	162
3.2.1.	Interacción con liposomas en estado de gel	162
3.2.2.	Interacción con liposomas en estado de cristal líquido	166
3.2.3.	Fluorescencia de preS(120-145) en TFE	166
3.3.	Efecto del péptido preS(120-145) y sus derivados lipopeptídicos en el comportamiento termotrópico de los liposomas	169
3.3.1.	Influencia de preS(120-145) en la fluidez de los liposomas	169
3.3.2.	Influencia de Estearoil-preS(120-145) en la fluidez de los liposomas	172
3.3.3.	Influencia de Colanoil-preS(120-145) en la fluidez de los liposomas	174
3.3.4.	Influencia de Pam ₃ CSS-preS(120-145) en la fluidez de los liposomas	176
3.4.	Cambios conformacionales en preS(120-145) en presencia de liposomas y en TFE: espectroscopía de Dicroísmo Circular	178
3.5.	Perturbación de la estructura de los liposomas inducida por los péptidos y lipopéptidos. Liberación de carboxifluoresceína.	180

3.6.	Interacción de preS(120-145), estearoil-preS(120-145), colanoil-preS(120-145) y Pam ₃ CSS-PreS(120-145) con monocapas	182
3.6.1.	Isotermas de compresión de los péptidos puros	182
3.6.2.	Isotermas de compresión de monocapas de DPPC extendidas sobre soluciones de péptidos	184
3.6.3.	Isotermas de compresión de monocapas mixtas de preS(120-145) y lipopéptidos derivados con DPPC	186
3.6.3.1.	Isotermas de compresión de monocapas mixtas preS(120-145)/DPPC	186
3.6.3.2.	Isotermas de compresión de monocapas mixtas Estearoil-preS(120-145)/DPPC	189
3.6.3.3.	Isotermas de compresión de monocapas mixtas Colanoil-preS(120-145)/DPPC	191
3.6.3.4.	Isotermas de compresión de monocapas mixtas Pam ₃ CSS-preS(120-145)/DPPC	194

DISCUSION 197

1.	Interacción de la somatostatina con modelos de membrana	200
2.	Interacción de LHRH con modelos de membrana	209
3.	Interacción de GHRH(1-29) con modelos de membrana	216
4.	Interacción de hGH con modelos de membrana	228
5.	Interacción de preS(120-145) con modelos de membrana	238
6.	Interacción de los lipospéptidos estearoil-preS(120-145), colanoil-preS(120-145) y Pam ₃ CSS-preS(120-145) con modelos de membrana	246
6.1.	Interacción de estearoil-preS(120-145) con modelos de membrana	246
6.2.	Interacción de colanoil-preS(120-145) con modelos de membrana	249
6.3.	Interacción de Pam ₃ CSS-preS(120-145) con modelos de membrana	251

CONCLUSIONES 254

BIBLIOGRAFIA 259

ABREVIATURAS

α	Parámetro de interacción
aa	Aminoácido
AFC	Células formadoras de anticuerpos
ANS	Acido 8-anilino-1-naftalensulfónico
A.S.	Indice de anfipaticidad
CCF	Cromatografía en capa fina
CD	Dicroísmo Circular
CF	Carboxifluoresceína
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
COL	Colesterol
DMPC	Dimiristoilfosfatidilcolina
DMS	Dimetilsulfóxido
DPH	1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina
DRV	Liposomas obtenidos por deshidratación-rehidratación
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
DSPC	Diestearoilfosfatidilcolina
F	Fluorescencia
FATMLV	Vesículas multilaminares sometidas a varios ciclos de congelación-descongelación
G	Gangliósidos
GHRH	Hormona liberadora de GH
ΔG_M^E	Incremento de energía de la mezcla en exceso
GS	Gramicidina S
h	Estructura de hélice α
HBV	Virus de la hepatitis B
hGH	Hormona del crecimiento humana
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana
HPC	Fosfolípidos neutros hidrogenados
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
IUV	Vesículas unilaminares de tamaño intermedio
λ	Longitud de onda
LH	Hormona luteinizante
LHRH	Hormona liberadora de LH
LUV	Vesículas unilaminares de tamaño grande
LUVET	Vesículas unilaminares grandes obtenidas por extrusión
MEL	Liposomas obtenidos por microemulsificación
MLV	Vesículas multilaminares
$[\Theta]_{MRW}$	Elipticidad molar por residuo aminoácido
P	Polarización
PA	Acido fosfatídico
PBS	Solución tampón fosfato, pH=7.4
PC	Fosfatidilcolina
PCS	Espectroscopía de correlación fotónica
PE	Fosfatidiletanolamina
PG	Fosfatidilglicerol

< Ph >	Probabilidad de estructura de hélice α (Chou y Fasman, 1978)
PI	Fosfatidilinositol
PS	Fosfatidilserina
< Ps >	Probabilidad de estructura de hoja β (Chou y Fasman, 1978)
PTH	Hormona paratiroidea
π	Presión superficial
π_m	Presión máxima o de saturación
R	Constante de los gases
r	Estructura aperiódica
REV	Vesículas obtenidas por evaporación en fase reversa
RMN	Resonancia magnética nuclear
s	Estructura de hoja β
SA	Estearilamina
SM	Esfingomielina
SRIF	Somatostatina
SUV	Vesículas unilaminares de pequeño tamaño
t	Estructura de giro β
Tc	Temperatura de transición de fase de gel a cristal líquido
TEAP	Solución tampón de fosfato/trietilamina, pH=2.3
TFE	Trifluoroetanol
UV	Ultravioleta

Aminoácidos

A	Ala	Alanina
C	Cys	Cisteína
D	Asp	Acido aspártico
E	Glu	Acido glutámico
F	Phe	Fenilalanina
G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
K	Lys	Lisina
L	Leu	Leucina
M	Met	Metionina
N	Asn	Asparagina
P	Pro	Prolina
Q	Gln	Glutamina
R	Arg	Arginina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
W	Trp	Triptófano
Y	Tyr	Tirosina

INTRODUCCION

1. EL PAPEL DE LA MEMBRANA LIPIDICA EN LA INTERACCION PEPTIDO - RECEPTOR

La asociación de fosfolípidos con proteínas, péptidos y aminoácidos determina cambios en la conformación y capacidad de asociación de estas moléculas, lo que conduce muchas veces a una modificación de su actividad biológica (para revisión de los últimos avances en este tema, ver Cserhati y Szögyi, 1991). Un estudio profundo de estas interacciones puede ser de gran ayuda para la comprensión de muchos de los procesos que tienen lugar en bioquímica, biofísica, medicina, biología, biotecnología, etc.

A pesar de que el concepto de receptor fue introducido a principios del siglo XX y que desde entonces ha sido objeto de intensas y constantes investigaciones, los mecanismos por los que un péptido biológicamente activo se une a las células y desencadena unas respuestas biológicas determinadas continúa planteando muchos enigmas.

En el caso de las hormonas peptídicas, las curvas de unión al receptor muestran a menudo un comportamiento no lineal en la representación de Scatchard. Este hecho se había justificado como debido a la existencia de sitios de alta y baja afinidad por el receptor o a fenómenos de tipo cooperativo. Sin embargo, estas explicaciones no resultaban satisfactorias en muchos casos.

Sargent y Schwyzer (1986), propusieron un modelo de interacción de un péptido biológicamente activo con la membrana como paso previo a la unión al receptor. Según estos autores, la membrana lipídica de las células diana actúa como "catalizador" de la unión del péptido con su receptor específico.

Esta teoría se fundamenta en las observaciones realizadas con dos hormonas peptídicas, ACTH₁₋₂₄ y Dinorfina₁₋₁₃ (Gremlich et al., 1983; Lang et al., 1974). Estos autores observaron que existía una fuerte interacción de ambas hormonas con liposomas neutros o con un 10% de fosfolípido cargado negativamente. Asimismo, los resultados farmacológicos de unión con el receptor de estas hormonas realizados por Lang (1974), podían explicarse

satisfactoriamente basándose en esta teoría, según la cual las conformaciones y orientaciones que la membrana impone a los péptidos que interaccionan con ella presentan una afinidad por el receptor muy superior que la de las estructuras al azar. Esta hipótesis estaría apoyada por las correlaciones existentes entre la unión a la membrana y la potencia biológica (Gremlich et al., 1983).

En el caso concreto de las hormonas peptídicas, los receptores hormonales ocupan una pequeña fracción de la superficie celular total. Por ello, cuando una molécula de hormona se aproxima a la célula, es más probable que el primer contacto tenga lugar con la fase lipídica que con uno de sus receptores específicos. Estas interacciones, que pueden conocerse trabajando con modelos de membrana como son los liposomas e incluso las monocapas, representan las etapas iniciales del contacto péptido-célula.

Sargent y Schwyzer postulan además que el receptor reaccionará predominantemente con las moléculas de péptido que se encuentren asociadas a la membrana, en lugar de unirse a las que se encuentran libres en solución.

En resumen, y según este modelo, la unión péptido-receptor tiene lugar en etapas, y no en un solo paso como defiende el modelo "llave-cerradura", y la energía total de unión es el resultado de las energías de unión correspondientes a cada paso individual.

El modelo más simple de interacción propuesto es la acumulación electrostática de la hormona peptídica en la superficie de la membrana, seguida de la unión a la misma y por último la interacción con el receptor. La ecuación que describe esta acumulación es:

$$H_a = H_f \cdot \exp (-z_h FV/RT)$$

donde H_a es la concentración de péptido (hormona en este caso), en la zona de acumulación, H_f la concentración de péptido libre, V el potencial de membrana, z_h la carga del péptido, F la constante de Faraday, R la constante de los gases y T la temperatura.

De hecho, la acumulación de un péptido en la superficie de la membrana por atracción

electrostática es un método muy efectivo para aumentar la unión al receptor de moléculas con múltiples cargas. Cuando esto se combina con una posterior unión al lípido de la membrana, la unión final al receptor precisa muy poca energía adicional para producirse. Esto es lo que se conoce como *catálisis de membrana*. Si bien este modelo fue inicialmente postulado para hormonas peptídicas, es extensible en sus líneas básicas a cualquier sustancia activa a nivel de membrana (Sargent, 1986). Concretamente, en la presente Tesis se estudiarán hormonas peptídicas y péptidos inmunógenos del virus de la Hepatitis B, puesto que como se describirá más adelante, tanto en el mecanismo de acción hormonal como en el mecanismo de la respuesta inmune tiene lugar la interacción del péptido con un receptor situado en la membrana celular.

La acumulación electrostática tiene lugar en cualquier molécula con carga, y las interacciones con la fase lipídica, ya sea en la superficie o en el interior hidrófobo, son muchas veces de gran importancia. El modelo propuesto se representa en la figura 1.

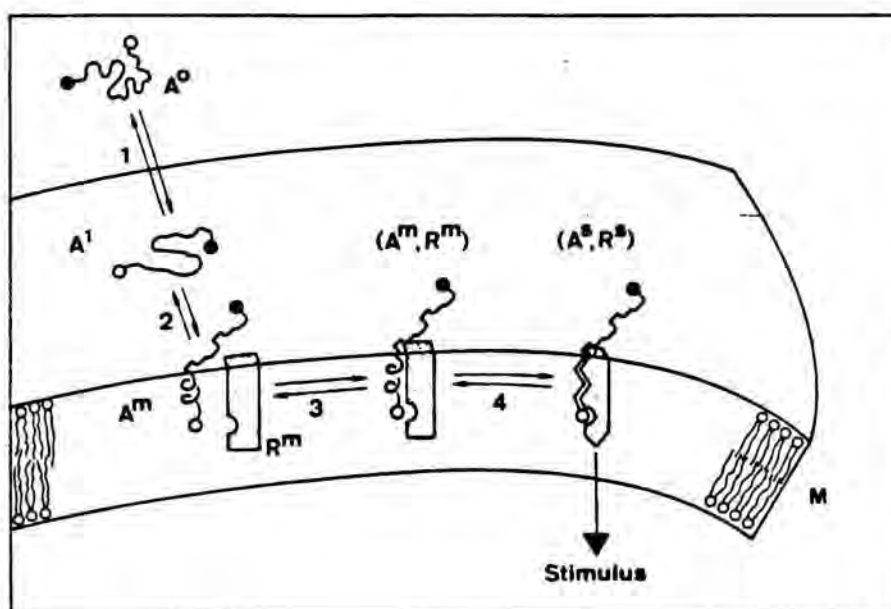


Figura 1. Modelo de interacción de un péptido con su receptor. El péptido en el fluido extracelular, medio acuoso, se encuentra desestructurado (A^0); en contacto la bicapa lipídica (M) aumenta su actividad superficial por difusión y fenómenos electrostáticos (A^1). El paso 2 incluye rotaciones internas del péptido e inserción en la bicapa, de manera que el primero adopta unas conformaciones y orientaciones termodinámicamente preferentes en la interfase lípido-agua (A^m). En la etapa 3 se forma el complejo entre el péptido A^m y el receptor en su conformación no estimulada (R^m), y la etapa 4 es la reorganización de las conformaciones de péptido y receptor formando un complejo entre el péptido en su forma activa y el receptor en forma estimulada (A^s , R^s). Según Sargent y Schwyzer (1986).

Según Segrest et al (1990), en las hormonas peptídicas pueden existir dos dominios funcionales: uno, generalmente el N-terminal, que contendría el centro activo, donde cada residuo sería esencial para conservar la actividad biológica y que no presentaría afinidad por la membrana, y una porción de hélice anfipática, situada generalmente en el extremo C-terminal respecto al centro activo. Se cree que es esta última zona la que incrementa la unión al receptor de una manera relativamente inespecífica.

Una implicación adicional de la presencia de esta hélice anfipática es que las hormonas peptídicas que la poseen pueden unirse a un tipo común de receptor. Esto puede explicarse por el hecho de que los dominios de hélice anfipática se unen a lípidos y a receptores, por lo que podrían unirse a lugares hidrófobos del receptor. Por ejemplo, una porción del lugar de unión del receptor β -adrenérgico está localizada en un dominio transmembranar altamente hidrófobo (Dohlman et al. 1988).

Es importante remarcar que los péptidos biológicamente activos, que generalmente se componen de 10 a 50 aminoácidos, normalmente carecen de una estructura definida cuando se encuentran en solución, y su conformación depende totalmente del entorno, es decir que pueden adoptar estructuras secundarias completamente diferentes según el medio en el que se encuentren. La interacción de estos péptidos con membranas biológicas, descrita en el modelo de Sargent y Schwyzer, induce conformaciones preferentes en los mismos, y posiblemente estas conformaciones inducidas, al presentar un grado de ordenación más elevado, son más fácilmente reconocidas por el receptor (Kaiser y Kézdy, 1984). Ya ha sido demostrado para péptidos opiáceos y taquiquininas que los parámetros estructurales de la interacción entre péptidos individuales y modelos artificiales de membrana pueden utilizarse para la predicción cuantitativa de potencia y selectividad por el receptor (Schwyzer, 1986).

De una manera muy simplificada, dada la naturaleza anfifílica de la bicapa lipídica de las membranas, las estructuras secundarias impuestas en los péptidos se caracterizarían por una distribución también anfifílica de las cadenas laterales de los aminoácidos, de forma que una cara del péptido estaría ocupada mayoritariamente por residuos con cadenas laterales lipófilas, como Ile, Leu, Val, Phe, Trp, Tyr y Met, mientras que los residuos hidrófilos como Arg, Glu, Asp y Lys, se encontrarían en la cara opuesta. Por tanto, hipotéticamente, las

conformaciones biológicamente activas de los péptidos tendrían caracter anfipático y podrían ser cualquiera de las siguientes: hélice α , hoja plegada β o hélice π (Kaiser y Kézdy, 1984; Kimura et al., 1992).

La predicción de la estructura secundaria de un péptido o proteína puede hacerse de forma teórica aplicando métodos semiempíricos como el de Chou y Fasman (1978). El caracter anfipático de la estructura del péptido puede predecirse mediante el método de De Lisi y Berzofsky (1985). Una vez los métodos teóricos apuntan a la posibilidad de formación de una estructura secundaria anfipática, existen otros métodos para comprobarlo, algunos de ellos indirectos, como que el péptido se asocie fácilmente a liposomas SUV o forme monocapas estables en la interfase aire-agua (Kroon et al., 1978). Existen también métodos directos, como el dicroísmo circular, la resonancia magnética nuclear o la dispersión óptica rotatoria.

Teniendo en cuenta la hipótesis precedente, el estudio de las interacciones entre péptidos o proteínas y lípidos ha experimentado un desarrollo espectacular en los últimos años, coincidiendo con la puesta a punto de nuevos métodos fisicoquímicos. Este tipo de estudios puede clasificarse a efectos de una mayor claridad, atendiendo a dos aspectos:

1) Sistemas lipídicos modelo:

- a) Monocapas
- b) Bicapas planas (*black membrane*)
- c) Liposomas

2) Propiedades de los lípidos y proteínas o péptidos cuya comportamiento se estudia.

Según cual sea la propiedad cuyo comportamiento se quiere determinar, se elegirá una técnica u otra:

- a) Fluidez lipídica y/o separaciones de fase: DSC, difracción de rayos X, microscopía electrónica, marcadores fluorescentes, resonancia magnética nuclear, espectroscopía de infrarrojos, *spin labelling*, etc.
- b) Conformación de los péptidos: dicroísmo circular, fluorescencia intrínseca, espectroscopía de infrarojo (IR) y resonancia magnética nuclear (RMN).

Existen numerosos precedentes en la literatura de estudios de interacción péptido-lípido aplicando estas técnicas, algunos de los cuales se citan a continuación.

Basándose en la variación de la fluorescencia intrínseca del péptido al interaccionar con

bicapas lipídicas (liposomas), pueden encontrarse experiencias con péptidos pequeños específicamente diseñados para poner de manifiesto un determinado tipo de interacción (De Kroon et al., 1990; Jain et al., 1985; Uemura et al., 1983; Dufourcq et al., 1981), con péptidos biológicamente activos, como la pentagastrina y péptidos relacionados (Surewicz y Epand, 1984), la melitina (Mollay y Kreil, 1973), el glucagon y la dinorfina(1-13) (Kimura et al., 1992), un análogo cíclico de la somatostatina denominado SMS 201-995 (Beschiaschvili y Seelig, 1991), un fragmento peptídico de la proteína extrínseca de membrana PhoE perteneciente a *Escherichia coli* (Killian, J. A., 1990), y con proteínas, como la espectrina de la membrana de los eritrocitos (Sikorski et al., 1987), la α -lactalbúmina (Hanssens et al., 1980), y la fosfolipasa A2 (Jain et al., 1982), por citar algunos ejemplos.

Asimismo, se pueden encontrar en la literatura gran número de estudios que determinan la influencia de los péptidos y otras moléculas en la fluidez de los liposomas, utilizando para ello marcadores fluorescentes unidos selectivamente a regiones concretas de estos últimos. Algunos péptidos así estudiados son: promotores tumorales peptídicos (Nam et al., 1989), poli(γ -bencil-L-glutamato) (Tamura et al., 1988), análogos de la Gramicidina S (Yagi et al., 1990), proteolípidos de la mielina (Houbre et al., 1990), histona H1 (Gavilanes et al., 1985), la proteína con actividad antitumoral α -sarcina (Gasset et al., 1989) y el Compuesto 48/80, producto que causa liberación de histamina de las células cebadas (Katsu et al. 1984) entre otros.

Otra técnica ampliamente utilizada en el estudio de la interacción lípido-péptido empleando los liposomas como modelo de membrana, es el difracción circular. Esta técnica fue empleada por Epand (1983) para la calcitonina, por Gavilanes (1990) para el antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B, y por Mc Lean (1991) para péptidos con estructura de hélice α anfipática, entre otros.

Existen también estudios por resonancia magnética nuclear (Fujisawa et al., 1988; Seelig y MacDonald, 1987), por espectroscopía de infrarojos (Cabiaux et al., 1989) y por DSC (Bach et al., 1988).

Empleando monocapas lipídicas como modelo de membrana, se ha profundizado en la

interacción de lípidos con diversos péptidos y proteínas como el fragmento N-terminal de la proteína de superficie gp41 de determinadas cepas del virus del síndrome de inmunodeficiencia adquirida humana (Rafalski et al., 1990), el análogo cíclico de la somatostatina SMS 201-995 (Beschiasvilli y Seelig, 1990), la colicina A (Frenette et al., 1989), polipéptidos de pequeño peso molecular (Williams y Weiner, 1989) y lipopéptidos pertenecientes al extremo N-terminal de la lipoproteína de la membrana externa de *Escherichia coli* (Prass et al., 1987)

En el presente trabajo se han empleado básicamente liposomas y monocapas como modelos de membrana, y fluorescencia, polarización y dicroísmo circular como técnicas de estudio. En cuanto a los péptidos biológicamente activos cuya interacción con modelos de membrana se ha analizado, pueden agruparse en dos grupos: hormonas peptídicas y péptidos inmunógenos del virus de la hepatitis B. A continuación se describen con más detalle cada uno de estos puntos.

2. MODELOS DE MEMBRANA

Un gran número de reacciones biológicas tienen lugar en interfases. Estas interfases, constituidas fundamentalmente por lípidos y proteínas, son de gran interés no sólo en el funcionamiento de las membranas biológicas, sino que también intervienen en una gran variedad de procesos biológicos como la digestión de grasa en el intestino, el metabolismo de lipoproteínas, la respuesta hormonal, etc (Verger et al., 1982). La importancia de la bicapa lipídica que constituye la membrana celular como superficie que favorece o posibilita la acción de diversas moléculas biológicamente activas (hormonas, enzimas, péptidos opiáceos, etc) ha sido destacada por diversos autores (Jacobs y White, 1990; Kimura et al., 1992; Sargent y Schwyzer, 1986), y se ha comentado en el apartado anterior. A fin de conocer el funcionamiento de estos procesos tan complejos, se han desarrollado diversos sistemas modelo, de los cuales hay que destacar los liposomas o vesículas lipídicas, y las capas lipídicas monomoleculares (monocapas), modelos que han sido utilizados en este trabajo para profundizar en el conocimiento de la interacción de péptidos biológicamente activos con la membrana celular.

2.1. LIPOSOMAS

Los liposomas fueron descritos por primera vez por Bangham y Horne (1964) al observar por microscopía electrónica que una suspensión de fosfolípidos de origen celular aislados y purificados formaban de manera espontánea vesículas cerradas.

Los liposomas son vesículas constituidas por una o varias bicapas compuestas por moléculas lipídicas (generalmente fosfolípidos), que encierran un volumen acuoso en su interior. Los fosfolípidos, debido a su carácter anfifílico, se orientan con la parte hidrófila a ambos lados de la bicapa, de manera que esté siempre en contacto con el agua, mientras que la parte hidrófoba constituida por las cadenas apolares de los ácidos grasos, se sitúa en el interior (figura 2).

Desde un punto de vista práctico, los liposomas tienen un elevado interés como elementos de transporte de fármacos u otras sustancias. Las moléculas de carácter lipófilo son incorporadas con facilidad en el interior de las bicapas a una concentración que oscila entre el 1 y el 10% en peso, o incluso superior en determinados casos (α -tocoferol), sin alterar la estructura del liposoma. Las moléculas anfipáticas se sitúan junto a los fosfolípidos entre la fase acuosa y el interior de la membrana, mientras que las moléculas solubles en agua son encapsuladas en el interior acuoso del liposoma.

Por otra parte, puesto que están preparados a partir de componentes naturales, los liposomas son modelos de membrana ampliamente aceptados, ya que la bicapa lipídica que se forma es equiparable a la porción lipídica de las membranas celulares, es decir al "mar de fosfolípidos" en el modelo de Singer y Nicholson (1972). Esta similitud entre liposomas y membranas biológicas permite administrarlos sin que se produzcan efectos secundarios de importancia (Sculier et al., 1989).

Las propiedades de superficie de los liposomas pueden modificarse. Por ejemplo, liposomas cargados positivamente se han utilizado como formas de liberación retardada de fármacos, debido a su carácter bioadhesivo (Guo, 1990). También se han unido macromoléculas, como anticuerpos y polisacáridos, a la superficie liposómica, con el fin de controlar la interacción

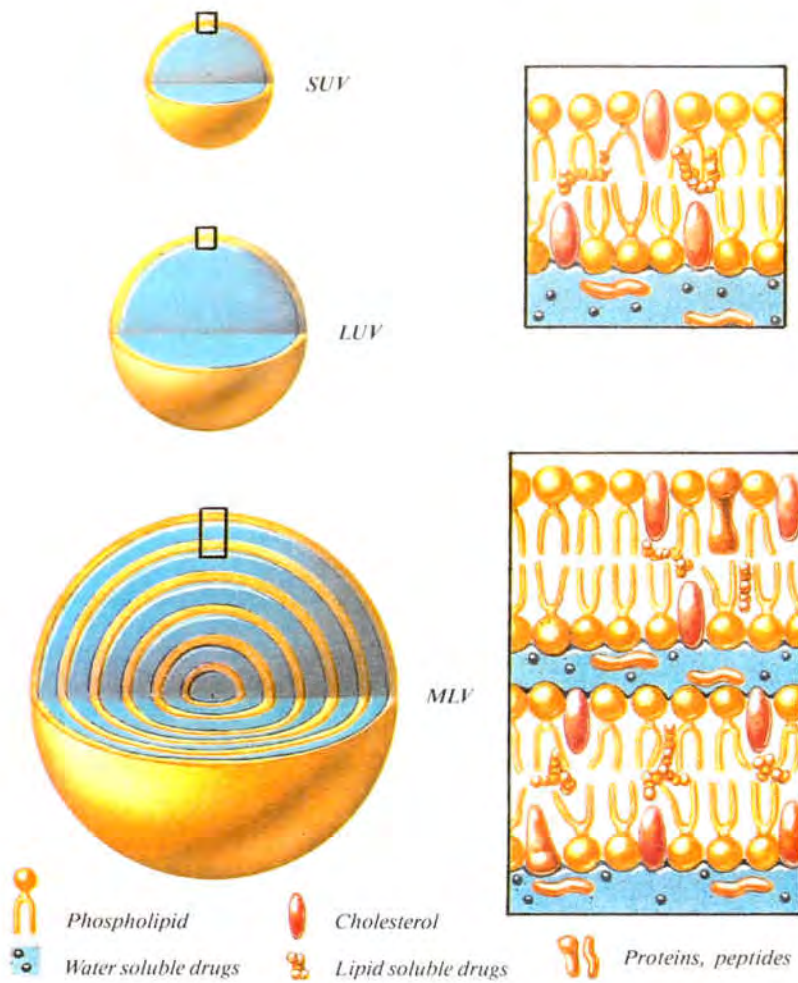


Figura 2: Estructura básica de un liposoma y localización de las sustancias encapsuladas. SUV: liposoma unilaminar pequeño; LUV: liposoma unilaminar grande; MLV: liposoma multilaminar.

de los liposomas con células y de favorecer o evitar la captación de los mismos por tejidos específicos del organismo (*drug targeting*).

2.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS LIPOSOMAS

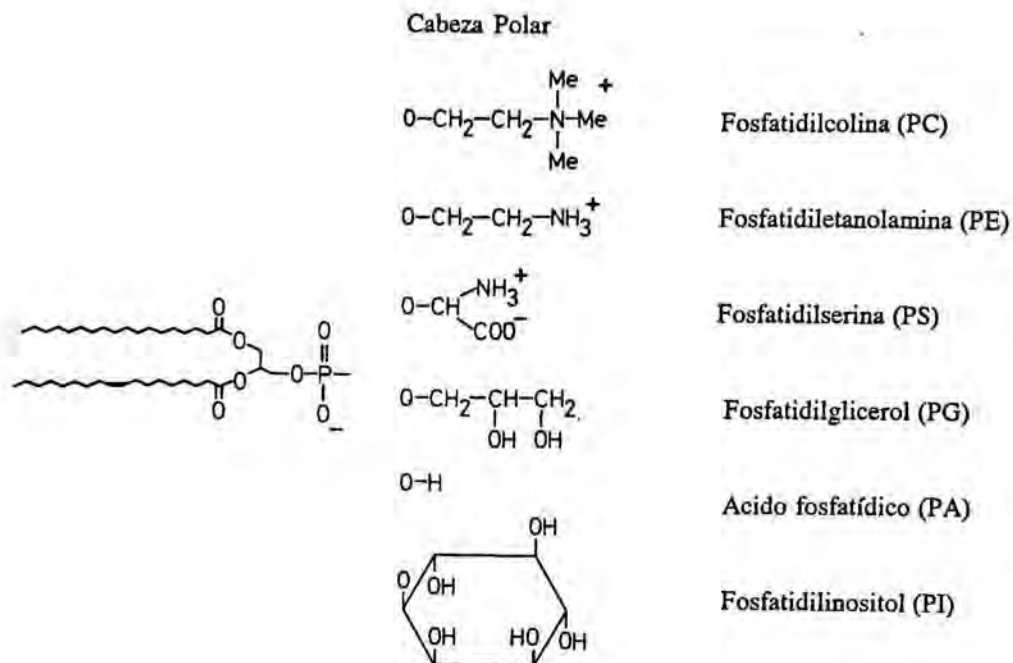
Los liposomas pueden prepararse a partir de una gran variedad de lípidos anfifílicos, tanto sintéticos como de origen natural. Los más empleados son los fosfolípidos y el colesterol, ya que son los componentes mayoritarios de las membranas biológicas.

a) Fosfolípidos: Son los principales componentes de los liposomas. Se trata de moléculas de carácter anfipático que pueden clasificarse en dos grupos: los fosfoglicéridos y los esfingolípidos (figura 3).

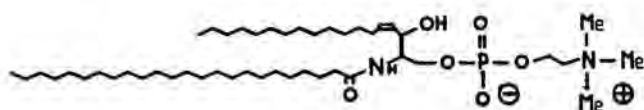
Dentro de los fosfoglicéridos encuentra la fosfatidilcolina o lecitina (PC), que es el fosfolípido más abundante en la naturaleza y el componente lipídico principal de las membranas biológicas. Consta de un esqueleto de glicerol que une dos moléculas de ácido graso con una fosforilcolina. Por convenio, se dice que los ácidos grasos ocupan las posiciones 1 y 2 del esqueleto de glicerol, mientras que en posición 3 se encuentra la cabeza polar. Los fosfolípidos naturales pueden presentar una gran variedad de ácidos grasos conjugados en las posiciones 1 y 2. Los más importantes se muestran en la tabla 1.

Las fosfatidilcolinas pueden ser de origen natural o sintético. Las de origen natural son en realidad mezclas de fosfatidilcolinas con ácidos grasos de diferente longitud y grado de insaturación. La lecitina de origen vegetal presenta un alto nivel de insaturación en los ácidos grasos, mientras que la de origen animal contiene mayor proporción de cadenas de ácido graso saturado. Se extraen principalmente de la yema de huevo y de la semilla de soja, así como del corazón y médula espinal de buey.

a) Fosfolípidos:



Esfingomielina



b) Colesterol

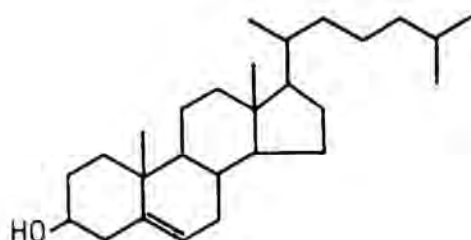


Figura 3: Principales componentes de los liposomas. a) fosfolípidos; b) colesterol

Abrev.	Nombre sistemático	Nombre común	Abundancia en fuentes naturales de PC(%)		
			PC de soja	PC de huevo	Rata
C10:0	decanoico	cáprico			
C12:0	dodecanoico	láurico			
C14:0	tetradecanoico	mirístico			
C16:0	hexadecanoico	palmítico	17.2	35.3	28.8
C16:1	cis-9-hexadecenoico	palmitoleico			
C18:0	octadecanoico	esteárico	3.8	13.5	18.0
C18:1	cis-9-octadecenoico	oleico	22.6	26.8	8.4
C18:2	cis,cis-9,12-octadecadienoico	linoleico	47.8		
C18:2	cis,cis-6,9-octadecadienoico			5.7	19.4
C18:3	todo cis-9,12,15-octadecatrienoico	α -linolenico	8.6		
C18:3	todo cis-6,9,12-octadecatrienoico	γ -linolenico		0.2	
C20:0	eicosanoico	araquídico			
C20:4	todo cis-5,8,11,14-eicosatetraenoico	araquidónico			
C22:0	docosanoico	behenico		1.0	17.0
C24:0	tetracosanoico	lignocerico			

Tabla 1: Principales ácidos grasos que forman parte de los fosfolípidos naturales.

Otro fosfolípido abundante en las membranas biológicas es la esfingomielina (figura 3); la porción lipídica sin la cabeza polar de este fosfolípido se denomina ceramido, y se encuentra también en gangliósidos y cerebrósidos, moléculas ambas que contienen polisacáridos en lugar de fosforilcolina y que pueden formar parte de la membrana celular.

Se ha postulado que la estructura de una dispersión de un lípido anfifílico en agua depende principalmente de la configuración dinámica de las moléculas individuales (Cullis, 1979). Esto se esquematiza en la figura 4.

En contacto con el agua, las moléculas de fosfolípidos como PC, PS, PG y SA se ordenan formando bicapas planas a fin de minimizar las interacciones desfavorables entre la fase acuosa y las largas cadenas de ácido graso. Estas interacciones desaparecen totalmente cuando las bicapas se doblan sobre si mismas formando vesículas cerradas. Ello es debido a que la doble cadena de ácidos grasos confiere a la molécula una forma tubular, más adecuada para la agregación en estructuras planares, mientras que los detergentes y los lisofosfolípidos compuestos de una cabeza polar y una única cadena apolar, presentan una forma de cono invertido que facilita la agregación molecular en forma de micelas. Los surfactantes como el

cloruro de octadecilamonio, que contiene dos cadenas hidrocarbonadas, pueden adoptar estructuras vesiculares en determinadas condiciones. Finalmente, las moléculas lipídicas con una cabeza polar relativamente pequeña (cardiolipina y ácido fosfatídico en presencia de iones calcio, o PE insaturada) tienen una forma de cono que es compatible con una ordenación hexagonal.

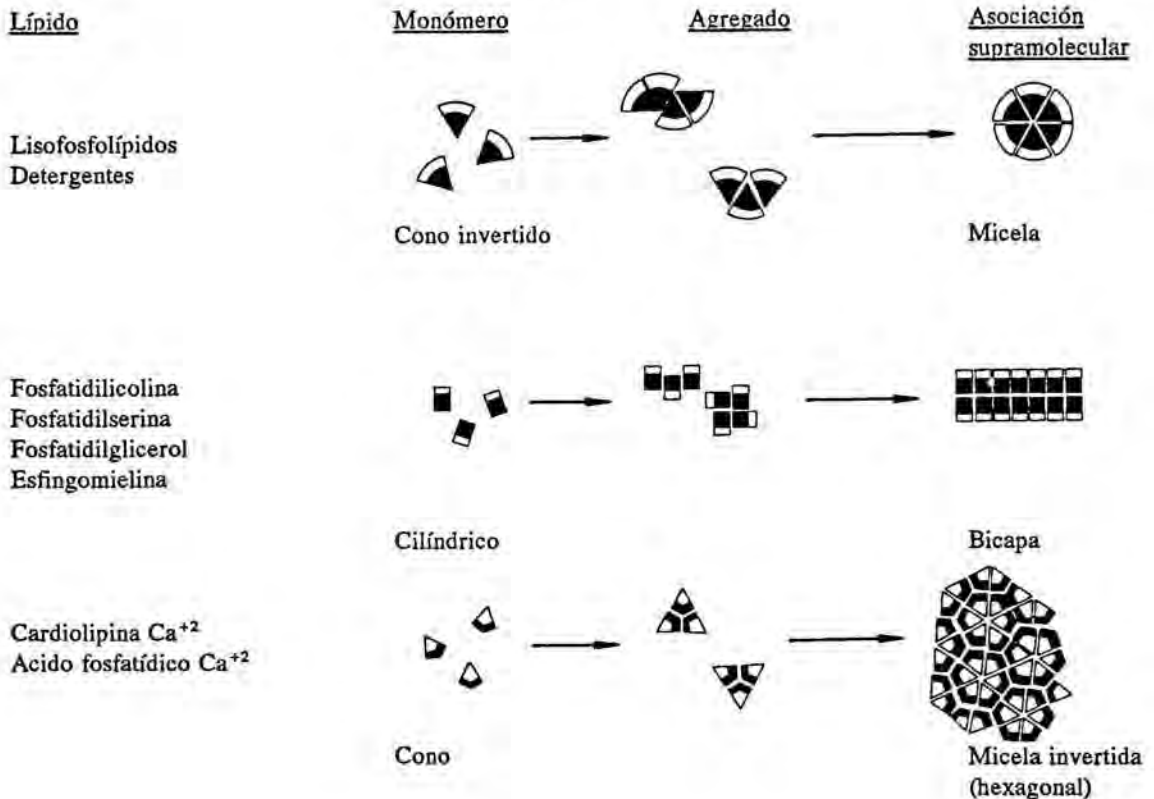


Figura 4: Formas de asociación de las moléculas anfifílicas. Relación entre forma molecular y estructura de los agregados.

b) Colesterol: Los esteroides son componentes importantes de la mayoría de las membranas naturales cuya incorporación en liposomas ocasiona cambios de interés en las propiedades de estas vesículas. En los mamíferos, el esteroide predominante es el colesterol (figura 3), mientras que en las plantas se encuentra fundamentalmente el estigmasterol y el sitosterol. En levaduras, hongos y algunos protozoos el esteroide endógeno es el ergosterol. Todos estas moléculas tienen en común un grupo hidroxilo en posición 3β , un núcleo esteroideo planar y una cadena lateral alifática, características todas ellas necesarias para el comportamiento característico de los esteroides en las membranas.

El colesterol no forma estructuras de tipo bicapa por si mismo, pero puede incorporarse en membranas fosfolipídicas a concentraciones muy elevadas (relaciones molares colesterol/PC de 1:1 e incluso 2:1). En membranas naturales, la relación molar colesterol/PC varía de 0.1 a 1. Debido a su caracter anfipático, se inserta en la bicapa lipídica con el grupo hidroxilo orientado hacia la superficie acuosa y la cadena alifática alineada paralelamente a las cadenas de ácido graso en el centro de la bicapa. El grupo 3 β -hidroxilo queda situado al mismo nivel que el carboxilo de los enlaces tipo ester de los fosfolípidos, con muy poca libertad de movimiento en el plano vertical. Asimismo, la presencia del núcleo esteroideo a lo largo de aproximadamente los primeros 10 carbonos de la cadena de fosfolípido reduce la libertad de movimiento de los mismos, a la vez que crea un espacio que facilita la movilidad de la parte final de la cadena (figura 5). Cuando el colesterol forma parte del lípido en proporciones bajas (inferiores a 20 mol %), no se distribuye de manera homogénea, sino que se forman dos fases: una rica en colesterol y otra con una baja proporción de esta molécula; este comportamiento se explica por la atracción existente entre los monómeros de colesterol como ocurre en las micelas. Sin embargo, cuando la relación molar PC/colesterol es 1:1, ambos componentes se disponen alternadamente.

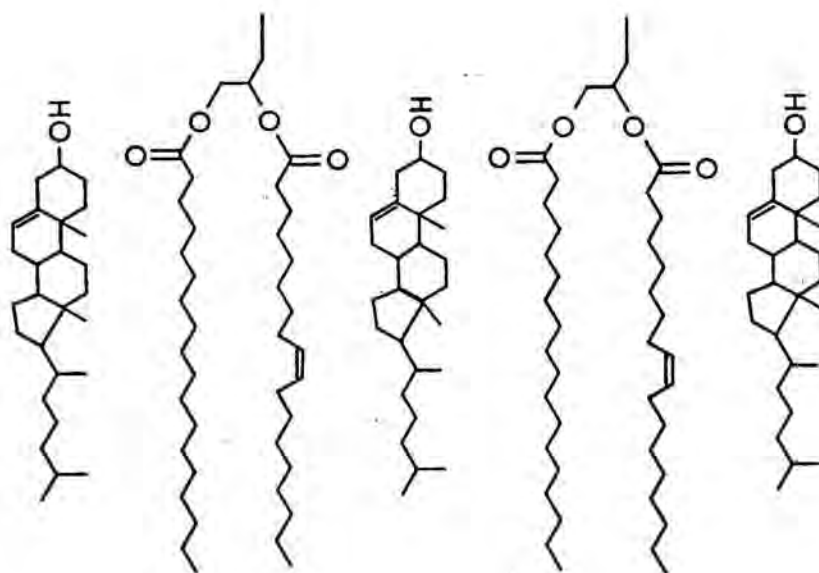


Figura 5: Posición del colesterol en la bicapa lipídica.

2.1.2. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LOS LIPOSOMAS

Al incrementarse la temperatura, los lípidos constituyentes de las bicapas liposómicas pasan de un estado relativamente ordenado, denominado *gel*, a un estado desordenado o fluido, denominado *cristal líquido* (Chapman, 1975). La transición de gel a cristal líquido es un proceso endotérmico que tiene lugar en un intervalo estrecho de temperaturas alrededor de una característica, denominada *temperatura de transición* (T_c).

El comportamiento de los liposomas en este proceso de cambio de fase determina importantes propiedades de los mismos, como permeabilidad, fusión, agregación y unión a las proteínas. Todas estas propiedades afectan a la estabilidad de los liposomas y su comportamiento en sistemas biológicos.

Por debajo de la T_c las moléculas de fosfatidilcolina se orientan con el esqueleto de glicerol perpendicular al plano de la membrana y la cabeza polar en paralelo a la superficie de la misma, de manera que se reducen al máximo las distancias entre las cargas positivas y negativas presentes en la molécula. La cabeza polar ocupa un área de $42 \text{ \AA}^2$, mientras que las dos cadenas de ácidos grasos sólo ocupan $39 \text{ \AA}^2$ (New, 1990). Por este motivo, las cadenas hidrocarbonadas no se disponen en perpendicular, sino inclinadas 30° respecto al plano de la membrana, para contrarrestar así el mayor espacio ocupado por las cabezas polares (*chain tilt*). Algunos fosfolípidos, como la PE, no sufren este fenómeno. En esta conformación, denominada *todo-trans*, las cadenas hidrocarbonadas se encuentran estrechamente empaquetadas y su libertad de movimiento está restringida. Al aumentar la temperatura por encima de la T_c , las cadenas de ácido graso adoptan la conformación *gauche* que les permite mayor movilidad, con lo cual se expande el área ocupada por las cadenas, a la vez que disminuye su longitud. Esto conlleva una reducción del espesor de la bicapa (figura 6).

En el caso de la PC, además de la transición principal que se acaba de describir, existe una pre-transición, mucho menos energética, en la que tiene lugar un cambio en la orientación de las cabezas polares. En el rango de temperaturas comprendido entre las dos transiciones, la membrana adopta una estructura ondulada.

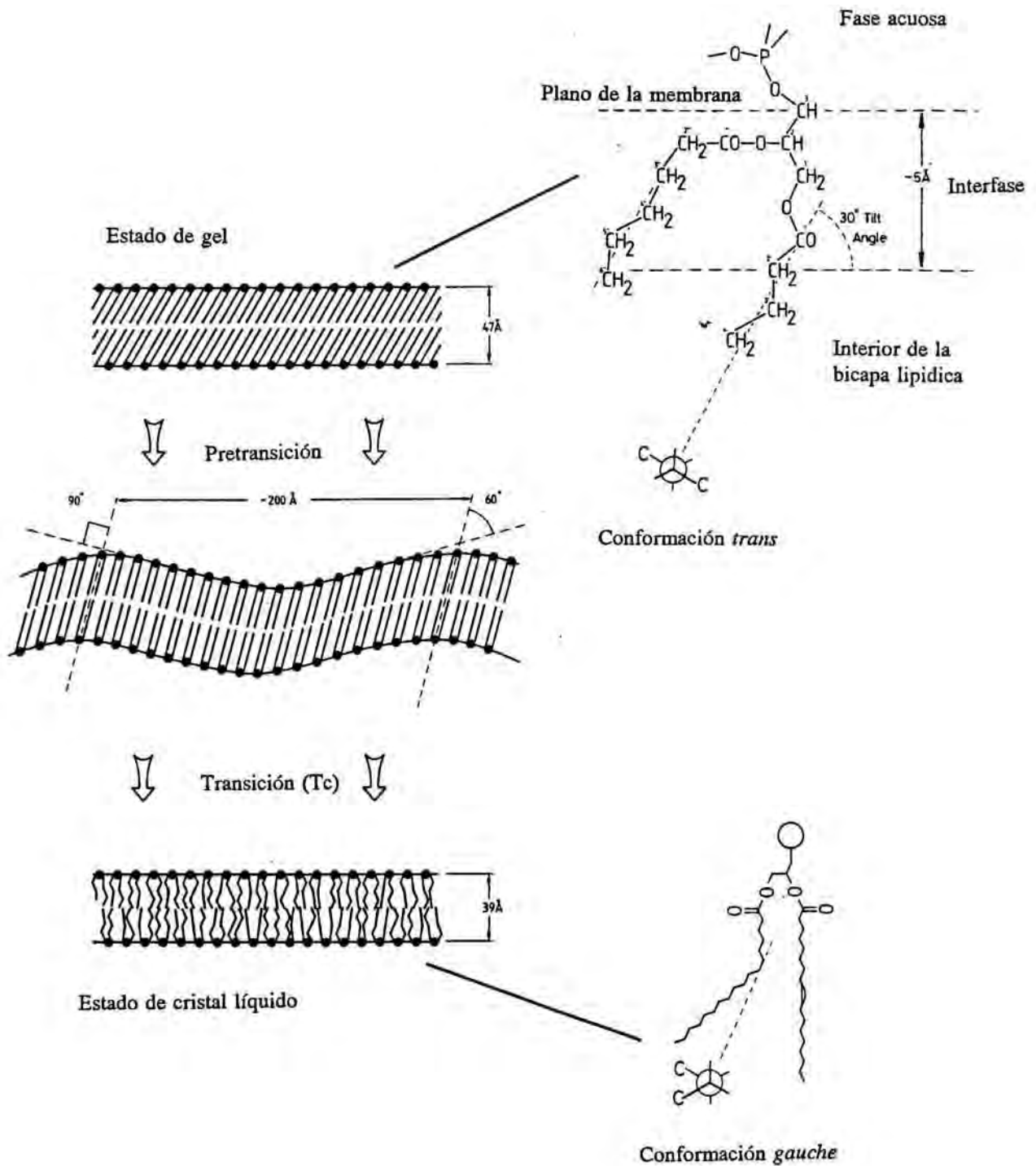


Figura 6: Transición de fase en una bicapa fosfolipídica. Cambios en la fluidez de la bicapa y en la disposición de las cadenas de ácidos grasos que forman parte de los fosfolípidos.

La Tc viene determinada por la naturaleza de las cadenas de ácido graso y de la cabeza polar del fosfolípido. En general, para una misma cabeza polar, la Tc aumenta con la longitud de las cadenas o al incrementarse su grado de saturación. Los fosfolípidos que confieren carga negativa al liposoma, como PS, PG, dicetilfosfato o ácidos fosfatídicos, también influyen de manera importante en la Tc, y este valor puede modularse por adición de cationes divalentes (Hauser, 1983).

Las PC naturales están formadas por mezclas de diferentes cadenas de ácidos grasos, lo que explica que la Tc sea menos definida y más baja que la correspondiente a las PC sintéticas, de composición perfectamente definida (DPPC, DMPC o DSPC entre otras). También factores extrínsecos, como la interacción con proteínas, péptidos u otras moléculas, pueden modificar esta temperatura (Katsu, 1984; Hitzemann, 1987).

En la preparación de liposomas, es muy importante tener en cuenta la Tc de los fosfolípidos utilizados. En la práctica, es conveniente hidratar los lípidos con la fase acuosa a una temperatura superior a la de transición.

El hecho de que la permeabilidad de los liposomas sea máxima cuando la temperatura se aproxima a la de transición tiene una importante aplicación terapéutica, principalmente en el tratamiento de tumores, ya que pueden diseñarse liposomas encapsulando agentes quimioterápicos con una Tc definida, de manera que liberen el producto encapsulado en los lugares del organismo que superen esta temperatura, como pueden ser tumores u otros tejidos en los que se provoca una hipertermia local (Weinstein, 1979; Khoobehi, 1988). De esta manera se logra aumentar la selectividad del tratamiento con una menor toxicidad (*drug targeting*).

El **colesterol** es fundamental en la estabilidad física de los liposomas, influyendo de manera sustancial en la transición de fase de los mismos. Al incrementarse la proporción de colesterol, la temperatura de transición (Tc) disminuye. Cuando el contenido en colesterol alcanza el 50%, no se detecta transición de fase.

El colesterol actúa alterando la fluidez de la membrana tanto antes de la transición de fase como por encima de la T_c . A temperaturas inferiores a la de transición, la presencia de colesterol hace que los fosfolípidos se separen unos de otros, el empaquetamiento de las cabezas polares es menor y por consiguiente la fluidez de la fase de gel aumenta. Por encima de una determinada concentración de colesterol, el área ocupada por las cadenas de ácido graso combinadas con el colesterol es mayor o igual que la correspondiente a la cabeza polar de fosfatidilcolina, por lo que desaparece el efecto de *chain tilt* existente en las bicapas de PC pura en estado de gel. Por el contrario, por encima de la T_c , la restricción de la libertad de movimiento de las cadenas de ácidos grasos hace que la membrana "condense", produciéndose una reducción del área, un mayor empaquetamiento y consecuentemente una menor fluidez respecto a la fase de cristal líquido en ausencia de colesterol. Esto hace que la permeabilidad de la membrana aumente por debajo de la T_c y disminuya por encima de esta temperatura (Oldfield, 1972).

Por otra parte, el colesterol reduce la posibilidad de que las lipoproteínas de alta densidad (HDL) penetren en los liposomas, lo que se traduce en una mayor estabilidad de los mismos tanto *in vivo* como *in vitro* (Senior, 1982).

2.1.3. ESTRUCTURA FISICA DE LOS LIPOSOMAS

Los liposomas pueden clasificarse en varios grupos en función de su tamaño y forma. El diámetro puede oscilar desde unos 25 nm (determinado por la máxima curvatura que pueden tolerar las cabezas polares de fosfolípido ya que la curvatura de la bicapa más interna aumenta al reducirse el radio), hasta liposomas de tamaño similar al de las células vivas (unos 1000 nm). Por otra parte, pueden estar constituidos por una sola bicapa o por varias de ellas, situadas concéntricamente.

Clasificación de los liposomas según su tamaño

a) *Vesículas multilaminares (MLVs)*: En este grupo se incluyen poblaciones heterogéneas de liposomas de diámetro comprendido entre 100 y 1000 nm, constituidos generalmente por 5 o más bicapas concéntricas. Cuando constan de pocas bicapas, también se denominan liposomas oligolaminares.

b) *Vesículas Unilaminares Pequeñas (SUVs)*: Son liposomas de pequeño tamaño constituidos por una sola bicapa de lípido (Huang, 1969). Recientemente se ha dividido este grupo en dos subgrupos: los liposomas unilaminares de tamaño intermedio (IUVs), con diámetros alrededor de los 100 nm, y liposomas unilaminares del menor diámetro posible (el límite de tamaño varía ligeramente en función del tipo de fosfolípido y de la fuerza iónica del medio, siendo de unos 15 nm para la lecitina de huevo pura y de 25 nm para la DPPC). La inclusión de fosfolípidos con carga negativa facilita la reducción del tamaño de las vesículas, mientras que la presencia de colesterol lo aumenta (Forge, 1978). Debido a su elevado radio de curvatura, estos liposomas tienen una elevada proporción de fosfolípido (60-70%) en su monocapa lipídica externa. Esta característica puede ocasionar una distribución asimétrica de los fosfolípidos cuando se utiliza una mezcla lipídica.

c) *Vesículas Unilaminares Grandes (LUVs)*: Son liposomas de diámetro del orden de los 1000 nm y constituidos por una sola bicapa lipídica.

El tipo de liposoma más adecuado para cada caso debe seleccionarse teniendo en cuenta las características de la molécula a encapsular y la finalidad del estudio. Por ejemplo, cuando se trata de encapsular una molécula apolar, la cantidad incorporada en los liposomas será directamente proporcional a la cantidad de componentes de membrana, independientemente del tamaño del liposoma, por lo tanto en principio cualquier tipo de liposoma sería adecuado. Sin embargo, resulta aconsejable reducir en lo posible el área externa de los mismos para evitar pérdidas del producto encapsulado antes de alcanzar el área donde debe actuar debido a colisiones con otras membranas o proteínas. Por todo ello, los liposomas de elección en estos casos serían los MLVs. Si por el contrario lo que se busca es una rápida liberación de la sustancia lipídica encapsulada, los liposomas adecuados son los SUVs de diámetro muy

pequeño, ya que la elevada tensión generada por la curvatura de los fosfolípidos favorece su degradación en presencia de moléculas biológicas.

En el caso de moléculas polares, donde la finalidad suele ser una elevada eficacia de encapsulación, los liposomas LUV o IUV son los más apropiados. Sin embargo la única membrana que constituye los LUVs se rompe con relativa facilidad, liberando el material encapsulado. Este inconveniente se puede solventar en la práctica, ya que existen métodos de preparación de LUVs que producen una población de liposomas oligolaminares con un gran compartimento central rodeado por 2 ó 3 bicapas lipídicas.

2.1.4. MÉTODOS DE PREPARACION DE LIPOSOMAS

Existen en la bibliografía un gran número de métodos de obtención de liposomas. En líneas generales, estos métodos pueden clasificarse en tres grandes grupos:

- Métodos basados en la dispersión mecánica del lípido
- Métodos basados en la dispersión del solvente
- Métodos basados en la eliminación del detergente

En la tabla 2 se muestran de manera esquemática los más importantes, así como sus principales ventajas e inconvenientes.

METODOS BASADOS EN LA DISPERSION MECANICA DEL LIPIDO					
Método	Tipo liposoma	Eficacia encapsulación	Ventajas	Inconvenientes	Referencias
Dispersión mecánica del lípido	MLV 100-1000 nm	5-15 %	*Método sencillo	*Bajo rendimiento de encapsulación *Tamaño heterogéneo	Bangham, 1965 Bangham, 1974
Ciclos de congelación y descongelación de MLV	FATMLV 50-200 nm	10-30 %	*Menor tamaño y mayor homogeneidad que MLV. *Mejor rendimiento encapsulación que MLV	*El tamaño y la eficacia de encapsulación dependen críticamernte de la fuerza iónica del medio	Mayer, 1985
Formación de proliposomas	MLV menores que los convencionales	5-15 %	*Tamaño más homogéneo y menor diámetro que MLV *Producción escalable a nivel industrial. *Posibilidad de almacenamiento en estado seco	*Bajos rendimientos de encapsulación	Payne, 1986
Microemulsificación	MLV (MEL) 100-200 nm	Hasta el 70 %	*Pequeño tamaño (según nº ciclos) *Tamaño homogéneo *Pueden procesarse muestras con alta proporción de lípido *Pueden prepararse grandes volúmenes en poco tiempo		Mayhew, 1984
Sonicación con sonda o baño ultrasónico	SUV 25-100 nm	0.5-1 %	*Sonda: Tamaño muy pequeño y poblaciones homogeneas *Baño: Método suave y reproducible	*Bajos % encapsulación *Sonda: Contaminación con titanio, riesgo degradación fosfolípido por la temperatura, formación aerosoles, mala distribución de la energía.	Huang, 1969

Tabla 2: Métodos de preparación de liposomas

METODOS BASADOS EN LA DISPERSION MECANICA DEL LIPOIDO (II)					
Método	Tipo liposoma	Eficacia encapsulación	Ventajas	Inconvenientes	Referencias
Extrusión por una French Press	SUV (FPL) 30-80 nm	10-30%	*Método suave, apto para moléculas lábiles *Poblaciones homogeneas *Mayor estabilidad que los SUV sonicados *Aplicación:reconstitución de proteínas de membrana	*Equipo de elevado precio	Barenholz, 1979
Extrusión a través de membranas	SUV o LUV (LUVET) 25-500 nm	≤30%	*Tamaño homogéneo inferior o igual al poro de membrana *Método sencillo		Olson, 1980
Deshidratación y rehidratación	DRV ≤1000nm	20-70%	*Elevados rendimientos de encapsulación	*Se parte de una preparación de SUV sonicados. *Riesgo de ruptura en medios de diferente osmolalidad.	Kirby, 1986
Fusión inducida por calcio	LUV 200-1000 nm	10-30%	*Método simple *Altos rendimientos de encapsulación *Adecuado para encapsular macromoléculas y virus	*Limitado a fosfolípidos ácidos *Presencia de iones calcio y EDTA incluso tras la diálisis *Poblaciones de tamaño heterogéneo	Papahadjopoulos 1975

FATMLV: Frozen and Thawed MLVs
 MEL: Micro-Emulsification Liposomes
 FPL: French Pressed Liposomes
 LUVET: Large Unilamellar Vesicles by Extrusion Techniques

Tabla 2: Métodos de preparación de liposomas (cont.)

METODOS BASADOS EN LA DISPERSION DEL SOLVENTE						
Método	Tipo liposoma	Eficacia encapsulación	Ventajas	Inconvenientes	Referencias	
Inyección de etanol	SUV 25-100 nm	0.4-1.5 %	*Mínimo riesgo de degradación del lípido *No se forman aerosoles *Método muy sencillo	*Dilución de los liposomas *Baja eficacia de encapsulación *Restringido a lípidos solubles en etanol y absorción de éste en la bicapas	Batzri, 1973	
Vaporización de éter	LUV 100-500 nm	1 %	*Util para encapsulación de macromoléculas *No se produce oxidación de los lípidos siempre que se use éter libre de peróxidos.	*No aplicable a sustancias lábiles en éter o a la temperatura empleada. *Baja eficacia de encapsulación *Los liposomas neutros presentan tendencia a agregarse	Deamer, 1976 Szoka, 1980	
Doble emulsión	Unilaminares desde 100 nm a tamaño celular (1000nm)	40-80 %	*Elevados rendimientos de encapsulación	*Tendencia a la agregación	Kim, 1981	
Evaporación en fase reversa	LUV (REV) 120-500 nm	20-65 %	*Eficacia de encapsulación reproducible y elevada *Permite emplear gran variedad de fosfolípidos *Adaptable a producción a gran escala *Apto para encapsulación de macromoléculas	*Condiciones severas para moléculas lábiles a disolvente orgánico y a las altas temperaturas empleadas	Szoka, 1980a Szoka, 1980b	

Tabla 2: Métodos de preparación de liposomas (cont.)

METODOS BASADOS EN LA ELIMINACION DE DETERGENTE					
Método	Tipo de liposoma	Eficacia de encapsulación	Ventajas	Inconvenientes	Referencias
Formación de micelas mixtas y eliminación del detergente	SUV 25-100 nm		*Apto para la reconstitución de proteínas de membrana *Poblaciones de vesículas de tamaño homogéneo *Adecuado para encapsular moléculas lábiles	*Bajos rendimientos de encapsulación por pérdida de material durante la eliminación del detergente (por diálisis, centrifugación o gel-filtración) *Residuos de detergente	Kagawa, 1971 Warren, 1974 Brunner, 1976 Zumbuehl, 1981

Tabla 2: Métodos de preparación de liposomas (cont.)

2.1.5. METODOS DE PURIFICACION DE LOS LIPOSOMAS

Una vez preparados los liposomas, debe procederse a la separación del material no encapsulado. Para ello existen varios procedimientos que se basan en el mayor tamaño de los liposomas o en su mayor densidad frente a la molécula encapsulada:

a) Cromatografía en columna con relleno de Sephadex. Para SUVs es válido cualquier tamaño de partícula, mientras que para los MLVs es preferible un tamaño intermedio o grueso (de 50 a 150 μm). Una variación de este método, muy útil cuando se tienen pequeñas cantidades de muestra, es la centrifugación en mini-columnas (Fry, 1978), consistente en utilizar como columna cromatográfica jeringas de plástico rellenas con Sephadex. Una vez depositada la muestra de liposomas en la parte superior, la separación se fuerza por centrifugación.

b) Diálisis: La preparación de liposomas se introduce en un saco de diálisis cerrado por ambos extremos que se sumerge en un recipiente conteniendo un determinado volumen del mismo tampón empleado en la preparación de los liposomas. El material no encapsulado pasa al exterior del saco de diálisis por ósmosis.

c) Centrifugación: La densidad de las bicapas de PC es de 1.0135 g ml^{-1} (Johnson y Buttress, 1973), y la de bicapas de PC/COL (relación molar 1:1) de 1.0142 g ml^{-1} . El valor será algo mayor en el caso de fosfolípidos saturados, sobre todo por debajo de la T_c . Por ello, los liposomas en suspensión sedimentan al ser centrifugados en las condiciones adecuadas. Los SUV con un radio de alrededor de 20 nm sedimentan cuando se centrifugan a 200.000 g durante 10-20 horas, según su composición. Los MLVs precipitan mucho más fácilmente, dada su mayor densidad.

2.1.6. CARACTERIZACION DE LOS LIPOSOMAS

El comportamiento de los liposomas tanto *in vivo* como *in vitro* depende en gran parte de factores como tamaño, composición química, permeabilidad de la membrana, cantidad de soluto encapsulado o pureza de los materiales de partida, por lo que es necesario conocer todos estos parámetros.

2.1.6.1. *Análisis químico*

La pureza de los lípidos utilizados puede determinarse por cromatografía en capa fina (CCF), técnica que puede proporcionar información tanto de la pureza como de la concentración de lípido. La lisolecitina, producto mayoritario de hidrólisis de la lecitina, puede cuantificarse por análisis de fósforo separándola previamente de la lecitina por CCF preparativa. La oxidación de las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos puede detectarse simplemente por lectura al UV. En cuanto a la concentración real de fosfolípido, se puede determinar por métodos indirectos, en los que se determina el contenido en fósforo (Barlett, 1959).

2.1.6.2. *Tamaño de los liposomas*

Existen diferentes técnicas que permiten determinar el tamaño de los liposomas, sin embargo las más comunes son dos: la observación por microscopía electrónica (Szoka, 1980a) y la basada en la dispersión de la luz o *quasi-elastic laser light scattering* (Wu, 1981). La primera es la más precisa, ya que se basa en la observación directa de las vesículas. Sin embargo, la técnica de dispersión de la luz es más simple y rápida. Si el objetivo no es conocer el tamaño exacto de una preparación liposómica, sino comparar dos poblaciones de igual composición y concentración y obtener valores relativos, puede utilizarse el método de la densidad óptica, determinando la turbidez.

2.1.6.3. *Estabilidad de los liposomas*

Una de las técnicas más utilizadas para conocer la estabilidad de los liposomas, entendida ésta como la pérdida de producto encapsulado, es la determinación de la salida de un marcador fluorescente soluble en agua de su interior. Esta técnica permite conocer los efectos de moléculas biológicamente activas en las propiedades de la membrana liposómica, como permeabilidad y fluidez, obteniendo así información que puede extrapolarse a la interacción de estas moléculas con membranas biológicas (Lee et al., 1986; Milhaud et al., 1989). Las características ideales que debe cumplir el marcador fluorescente seleccionado son, básicamente, que no atraviese las membranas intactas, que sea muy soluble en agua y muy poco en medio orgánico, que no desestabilice o provoque la agregación de las membranas y

que se pueda separar fácilmente de los liposomas. Algunos de estos marcadores son la carboxifluoresceína, la calceína, la fluoresceína y la fluoresceína-dextrano. Los dos primeros presentan la particularidad de que la concentración extra-liposómica puede medirse sin necesidad de separar los liposomas. A continuación se discute el fundamento del proceso para la carboxifluoresceína (CF), por ser el marcador utilizado en esta Tesis.

La CF presenta una propiedad denominada *quenching* o amortiguación de la fluorescencia, que consiste en que, a elevadas concentraciones, la fluorescencia que presenta es menor que en soluciones diluídas, probablemente debido a interacciones intermoleculares. Este método consiste en preparar liposomas encapsulando CF a una concentración elevada, suficiente para presentar *quenching* de fluorescencia (usualmente 100 mM). Para determinar la cantidad de CF que no está encapsulada, basta con diluir la suspensión unas 10.000 veces, de manera que pueda medirse la fluorescencia de la CF extra-liposómica, mientras que la que está encapsulada no interfiere en la lectura debido a su elevada concentración (figura 7). Finalmente, para conocer el porcentaje de CF liberada al medio, ya sea a causa de la interacción de los liposomas con moléculas biológicamente activas o bien por agregación u otros procesos de degradación de los liposomas, se provoca su ruptura por adición de un detergente, generalmente Tritón, midiéndose la fluorescencia correspondiente a la totalidad de CF.

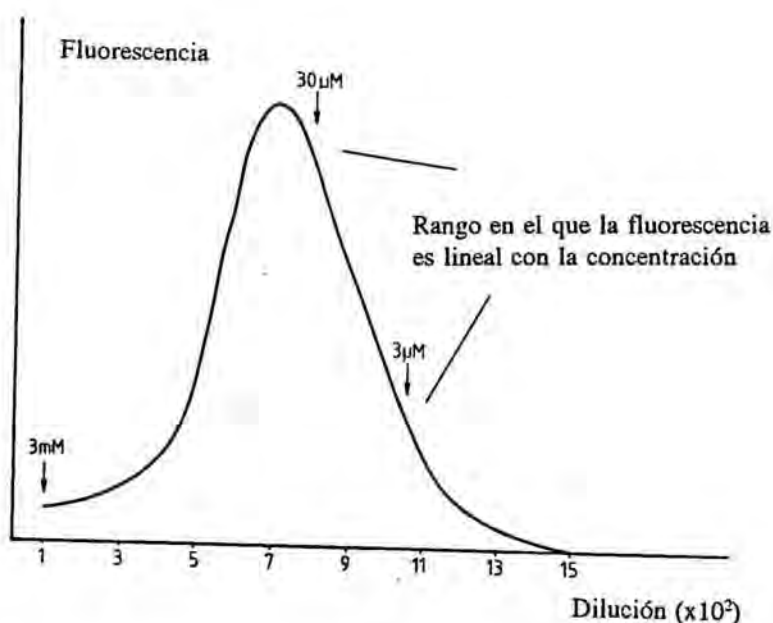


Figura 7: Variación de la fluorescencia de la carboxifluoresceína en función de la concentración. La amortiguación de la fluorescencia (*quenching*) desaparece a concentraciones inferiores a 30 µM.

2.2. CAPAS LIPIDICAS MONOMOLECULARES

Las monocapas o capas monomoleculares de lípidos constituyen un modelo de membrana sencillo ampliamente utilizado en el estudio del comportamiento de los lípidos en la interfase agua-aire así como en la investigación de las interacciones de los lípidos entre sí o con otras moléculas farmacológicamente activas. Concretamente, los experimentos de penetración en monocapas permiten determinar las interacciones existentes entre monocapas lipídicas y péptidos o proteínas, proporcionando información que se puede extrapolar, con las debidas limitaciones, a las interacciones que tendrían lugar entre estos péptidos o proteínas con bicapas lipídicas, como los liposomas y las membranas celulares (Williams y Weiner, 1989). Los experimentos llevados a cabo en la interfase aire-agua proporcionan información sobre la flexibilidad y el caracter tensioactivo de las moléculas que se estudian. La principal ventaja de este modelo de membrana sobre los otros dos principales modelos existentes (bicapas planas y liposomas), es la posibilidad de controlar de una manera sencilla la disposición de las moléculas, cambiando el área molecular y la presión superficial de la monocapa. Los datos obtenidos a partir de la variación de estos parámetros dan una información única acerca de las interacciones lípido-lípido, lípido-subfase o lípido-molécula activa (Verger y Pattus, 1982).

2.2.1. MONOCAPAS DE ADSORCION

Muchas sustancias, cuando se encuentran en solución, presentan la propiedad de adsorberse en la interfase aire-agua causando una disminución de la tensión superficial del solvente. La relación entre la concentración de la sustancia en la interfase (Γ) y en el seno del líquido (c) se representa en la ecuación de Gibbs:

$$\Gamma = \frac{-c}{RT} \frac{d\gamma}{dc}$$

donde $d\gamma$ es la variación de la tensión superficial, dc la variación de la concentración, R la constante de los gases y T la temperatura absoluta. A partir de esta ecuación, Langmuir (1917) llegó a la conclusión de que las moléculas adsorbidas en la interfase agua-aire se comportan en cierto modo como las moléculas de los gases perfectos y adquieren un cierto

grado de orientación.

2.2.2. MONOCAPAS DE EXTENSION

Cuando se extiende sobre una solución soporte, una sustancia insoluble en este medio y no volátil (ya sea depositándola en forma pura o en solución diluida con un disolvente volátil que se elimine fácilmente), se forma una *película superficial* o monocapa de extensión.

Cuando una gota de un líquido A se deposita sobre la superficie de otro líquido B, siendo estos dos líquidos inmiscibles entre sí, pueden ocurrir dos cosas: que la gota A se extienda espontáneamente sobre B, o que permanezca sobre la superficie en forma de gota. En el primer caso, el trabajo de adhesión entre los dos líquidos (W_{AB}) es superior al de cohesión entre las moléculas del líquido A (W_C). La diferencia entre ambos valores se denomina *coeficiente de extensión* de A sobre B (K), que se define termodinámicamente como la relación entre la disminución de la *entalpía libre* del sistema (G) y el aumento del área de la monocapa (S) a presión (P) y temperatura (T) constantes:

$$K = W_{A,B} - W_C = - \left[\frac{\delta G}{\delta S} \right]_{P,T}$$

Los trabajos de adhesión y cohesión de los líquidos están íntimamente relacionados con las energías superficiales de los mismos. La extensión tendrá lugar cuando la tensión superficial del líquido soporte B sea elevada y la correspondiente al líquido a extender A sea baja. La capa monomolecular formada de esta manera será estable si existe un equilibrio adecuado entre los grupos apolar y polar en las moléculas que la constituyen, de manera que el carácter hidrófobo de los primeros sea suficiente para contrarrestar la atracción que experimenta la parte hidrófila hacia el soporte acuoso.

2.2.3. PRESION SUPERFICIAL

Las capas monomoleculares presentan una tendencia natural a ocupar la mayor superficie disponible, por lo que ejercen una fuerza determinada sobre cualquier obstáculo que se

oponga a su extensión. En un principio, a esta fuerza se le atribuyó un origen análogo al que ocasiona la presión gaseosa, considerándose como una consecuencia de la agitación térmica de las moléculas que forman la monocapa. Estas moléculas, al chocar con una barrera que se oponga a sus desplazamientos, ejercen una determinada presión sobre la misma. La relación entre la fuerza de empuje y la longitud de la barrera es lo que se denomina **presión superficial**.

La presión superficial está íntimamente ligada a la tensión superficial. Si se tiene una cubeta con un líquido soporte, dividida en dos compartimentos separados entre sí por una barrera móvil, y se extiende en uno de ellos una monocapa, ésta ejercerá una fuerza contra la barrera. En estas condiciones, a presión y temperatura constantes, si se hace avanzar la barrera de manera que se comprima la monocapa, se producirá una variación del potencial termodinámico de Gibbs o entalpía libre (dG). Esta variación viene dada por la ecuación:

$$dG = \left[\frac{\delta G}{\delta S_m} \right]_{PT} \cdot dS_m + \left[\frac{\delta G}{\delta S_a} \right]_{PT} \cdot dS_a \quad (1)$$

siendo dS_m y dS_a las variaciones de la superficie ocupada y la superficie libre, respectivamente. Puesto que la superficie total se mantiene constante, es evidente que:

$$dS_a = -dS_m \quad (2)$$

Sustituyendo la expresión (2) en la (1), resulta:

$$dG = \left[\left[\frac{\delta G}{\delta S_m} \right]_{PT} - \left[\frac{\delta G}{\delta S_a} \right]_{PT} \right] \cdot dS_m \quad (3)$$

En el transcurso de esta variación, la presión superficial ha efectuado un trabajo, por lo que la variación de entalpía libre, calculada a partir del trabajo realizado por el sistema, será:

$$dG = -\pi dS_m \quad (4)$$

Igualando las expresiones (3) y (4) resulta:

$$\pi = \left[\frac{\delta G}{\delta S_a} \right]_{PT} - \left[\frac{\delta G}{\delta S_m} \right]_{PT}$$

Teniendo en cuenta que la variación de entalpía libre por unidad de superficie a presión y temperatura constantes es, por definición, la tensión superficial, la expresión anterior puede escribirse como sigue:

$$\pi = \gamma_a - \gamma_m$$

en la que γ_a y γ_m son las tensiones superficiales del agua y de ésta tras la extensión de la monocapa.

Según este razonamiento termodinámico, la presión superficial representa la variación de la tensión superficial que se produce en el líquido soporte al extender una capa monomolecular sobre el mismo.

2.2.4. ESTABILIDAD DE LAS MONOCAPAS

La estabilidad de una monocapa viene condicionada tanto por la presión de colapso como por la disolución y la evaporación de las moléculas que la forman.

2.2.4.1. *Presión de colapso*

Al comprimir una capa monomolecular mediante una barrera móvil, llega un momento en el que se produce una expulsión considerable de moléculas de la monocapa. Si la presión se mantiene constante, el área de la monocapa disminuye, y si es el área lo que permanece constante, disminuye la presión: es lo que se conoce como *punto de colapso*, y varía según las condiciones experimentales.

La *presión de colapso* es la mayor presión a la que es posible comprimir una monocapa sin que se produzca una expulsión apreciable de las moléculas que la integran. La presión de

colapso depende de las condiciones en que se realiza la experiencia (temperatura, tipo de sustancia, velocidad de compresión, etc). Cuando la presión en la monocapa sobrepasa este valor, la monocapa se destruye (Ries y Kimbal, 1959).

2.2.4.2. *Disolución y evaporación*

Las moléculas que forman la monocapa de extensión pueden ser extraídas de la misma por disolución o por evaporación. En estos casos, la cinética del proceso total de pérdida de materia puede resultar muy compleja. En los sistemas formados por monocapas que no estén firmemente empaquetadas, la barrera de energía que impide que se produzca el proceso de disolución es pequeña, y la velocidad de destrucción de la monocapa viene determinada fundamentalmente por la difusión de las moléculas hacia el soporte.

2.2.5. ESTADOS DE LAS CAPAS MONOMOLECULARES

Una capa monomolecular puede presentar diversos estados de condensación, análogos a los estados de la materia: sólido, líquido y gaseoso (Devaux, 1912). Estos estados presentan distintos grados de libertad u ordenación molecular, en función de las fuerzas que actúan en la propia película y entre ésta y la subfase.

2.2.5.1. *Monocapas gaseosas*

En el estado gaseoso, las moléculas que constituyen la monocapa se encuentran lo suficientemente separadas como para que las fuerzas de interacción entre ellas sean muy pequeñas. La viscosidad es muy baja, así como la presión superficial, que se acerca asintóticamente a cero a medida que aumenta la superficie ocupada por la monocapa. Por otra parte, el potencial superficial permanece constante.

2.2.5.2. *Monocapas condensadas*

En una monocapa en el estado condensado, las moléculas se encuentran alineadas y fuertemente empaquetadas, de manera que existe una gran fuerza de atracción entre ellas.

En las monocapas condensadas de ácidos grasos de larga cadena, alcoholes de elevado peso molecular y glicéridos, las moléculas se orientan de manera que los grupos polares permanecen en el soporte acuoso y los grupos apolares en el exterior. En las representaciones gráficas de presión superficial (mN.m^{-1}) respecto a área molecular ($\text{nm}^2 \cdot \text{molécula}^{-1}$) a temperatura constante (lo que se conoce como **isotermas de compresión**), se observa que una importante variación de presión superficial va acompañada de una pequeña variación del área molecular, lo que es indicativo de la baja compresibilidad de estas monocapas. Este fenómeno refleja la existencia de fuertes interacciones entre los grupos hidrófobos de las moléculas, de gran importancia en este tipo de monocapas, dando lugar a una disposición de las moléculas fuertemente empaquetadas y poco dependiente de la presión superficial.

2.2.5.3. Monocapas expandidas

Las monocapas en estado expandido presentan un área molecular intermedia entre las correspondientes al estado gaseoso y el condensado. En las isotermas de compresión de este tipo de monocapas, la variación de la presión superficial con respecto al área es menor que en las monocapas condensadas.

2.2.6. CAMBIOS DE ESTADO DE LAS MONOCAPAS

Cuando se obtiene la isoterma de compresión de una monocapa ideal que se supone estable para las diferentes zonas de presiones superficiales y áreas ocupadas por molécula, al iniciar la compresión, la presión superficial aumenta proporcionalmente con el incremento de la concentración en superficie, dando lugar a una representación hiperbólica. Este tipo de isoterma corresponde a la de una monocapa en estado gaseoso. Al continuar comprimiendo la monocapa, aparece una zona en la cual la presión se mantiene constante a pesar de disminuir el área disponible, como sucede en la condensación de los gases. La medida del potencial superficial en distintos puntos de la monocapa pone de manifiesto la coexistencia de dos fases. Esta zona de transición (horizontal) no se observa en muchos casos. Seguidamente aparece el estado líquido poco compresible pero fluido. Según Dervichian (1939), entre el estado líquido y el sólido existe un estado intermedio que, por su analogía con los cristales líquidos, se denomina *estado mesomorfo*. En este estado las moléculas están

tan próximas como en el estado sólido, pero libres de girar alrededor de su eje. Por último se alcanza el estado sólido, apenas compresible. Esta es la fase más comprimida y de mayor viscosidad. Si se continua la compresión, se alcanza el colapso. En la figura 8 se representan varios tipos de isothermas de compresión así como la disposición de las moléculas en los diferentes estados.

2.2.7. ESTUDIOS EN MONOCAPAS MIXTAS

Las monocapas mixtas, es decir aquellas que están formadas por dos o más componentes, constituyen un interesante modelo para el estudio de las interacciones moleculares en un sistema bidimensional orientado, similar a las membranas biológicas.

En este tipo de sistemas, existen tres posibilidades: i) que los componentes constituyentes de la monocapa mixta sean totalmente inmiscibles superficialmente, ii) que sean totalmente miscibles superficialmente (solución superficial ideal), o iii) que sean parcialmente miscibles superficialmente.

En el primer caso, y cuando la monocapa está formada por dos componentes, el problema podrá ser tratado como si la película monomolecular mixta estuviera formada por dos películas monomoleculares en equilibrio. Si el parámetro en estudio es el área ocupada por molécula, las monocapas formadas por dos componentes obedecen a la *regla de la aditividad*, según la cual:

$$A_{1,2} = X_1 \cdot A_1 + X_2 \cdot A_2$$

siendo $A_{1,2}$ el área molecular media de la monocapa mixta, X_1 y X_2 las fracciones molares de los dos componentes, y A_1 y A_2 las áreas moleculares de ambos componentes en estado puro. La misma regla es aplicable al potencial de superficie y a la viscosidad superficial.

Cualquier desviación al cumplimiento de la *regla de la aditividad*, se ha interpretado como un indicativo de la existencia de interacciones intermoleculares o *miscibilidad* entre los componentes (Gaines, 1966).

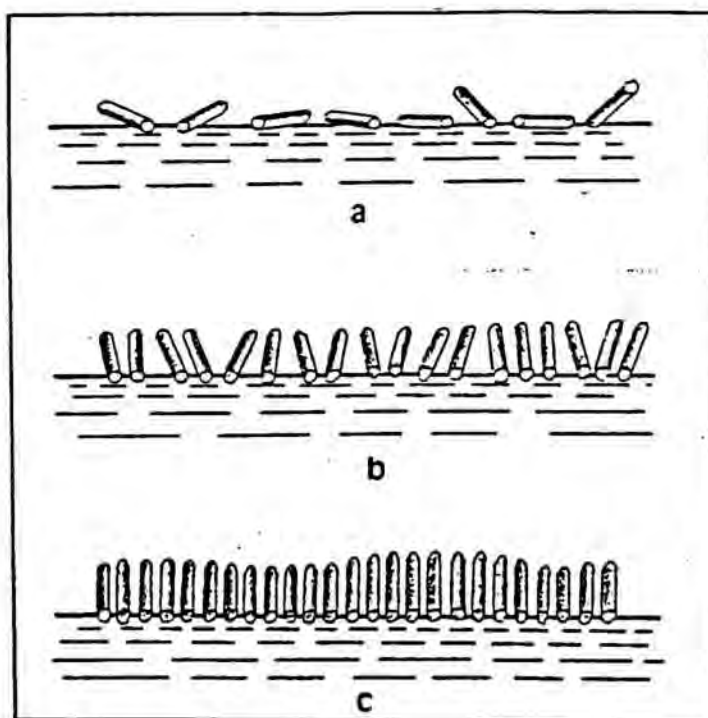
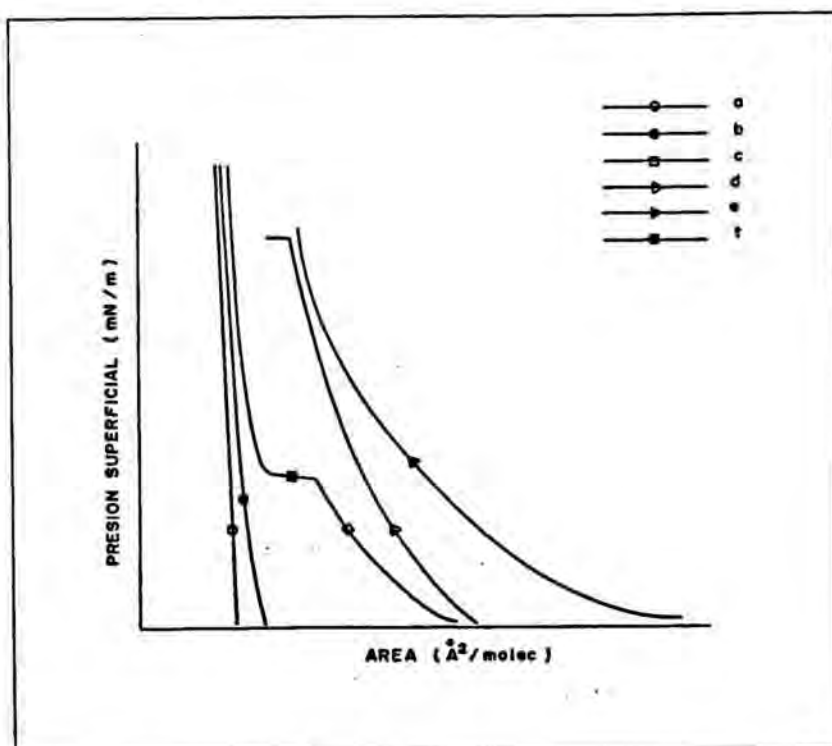


Figura 8: Trazado de isotermas de compresión en distintos estados: a) monocapa sólida, b) estado mesomorfo, c) monocapa que pasa de estado líquido a sólido por compresión, pasando por un estado de transformación t , d) monocapa en estado líquido, y e) monocapa en estado gaseoso. En la parte inferior se muestra de manera esquemática la disposición de las moléculas en los diferentes estados: a) gaseoso, b) líquido y c) sólido.

2.2.7.1. Cálculos termodinámicos

Para determinar si los componentes de una monocapa mixta presentan un comportamiento ideal desde el punto de vista de su miscibilidad, puede desarrollarse un estudio termodinámico del sistema, como por ejemplo el tratamiento de Goodrich (1957), que se describe a continuación.

La variación de la energía libre de Gibbs de un sistema que contenga una monocapa viene dada por la ecuación:

$$\gamma = \left[\frac{\delta G}{\delta S} \right]_{P, T, n}$$

siendo γ la tensión superficial y S el área interfacial. Por otra parte, la relación entre las variaciones de energía libre de Gibbs (δG) y de la presión superficial ($d\pi$), a presión y temperatura constantes, es la siguiente:

$$dG = -S.d\pi$$

Consideremos el caso particular de dos monocapas simples, formadas por dos componentes distintos (1 y 2), sometidas a la misma presión superficial y separadas por una barrera móvil. Al levantar la barrera de separación para favorecer el proceso de mezcla superficial, la variación de energía libre de Gibbs por mol a una presión determinada (ΔG_m^*) vendrá dada por la ecuación:

$$\Delta G_m^* = G_{1,2}^* - X_1 G_1^* - X_2 G_2^*$$

donde $G_{1,2}$, G_1 , G_2 son los valores de energía de Gibbs en las películas mixta, y formada por los componentes 1 y 2 respectivamente. A su vez, X_1 y X_2 son las fracciones molares de ambos componentes.

En el caso de que se forme una *monocapa mixta ideal*, el potencial químico de cada componente (μ_i) vendrá determinado por:

$$\mu_i = \mu_i^\circ + RT \ln X_i$$

y el incremento de la energía libre por mol de la mezcla (ΔG_m^I) vendrá dado por:

$$\Delta G_m^I = RT \sum_i X_i \ln X_i$$

Si consideramos una monocapa mixta cualquiera formada por dos componentes, y asumimos que existe un valor de presión superficial suficientemente bajo ($\pi \rightarrow 0$) para el cual tiene lugar la mezcla superficial "ideal", podemos escribir que a esta presión superficial límite se cumple que:

$$\Delta G_m^I = RT (X_1 \ln X_1 + X_2 \ln X_2)$$

Puede entonces demostrarse, según Goodrich (1957), que por debajo de la *presión de extensión de equilibrio* (ESP o π^e), la ecuación anterior puede escribirse:

$$\Delta G_m^\pi = \int_{\pi=0}^{\pi} (A_{1,2} - X_1 A_1 - X_2 A_2) d\pi + RT (X_1 \ln X_1 + X_2 \ln X_2)$$

donde A_1 y A_2 son las áreas moleculares de las dos capas monomoleculares puras, y $A_{1,2}$ el área molecular media de la monocapa mixta. La ecuación permite calcular la energía libre de la mezcla a partir de las isotermas de compresión de los componentes en estado puro y en la monocapa mixta.

El *exceso de energía libre de la mezcla* por mol (ΔG_M^E) viene dado por:

$$\Delta G_M^E = G_M^\pi - G_M^I = \int_0^{\pi} (A_{1,2} - X_1 A_1 - X_2 A_2) d\pi$$

Si la capa monomolecular mixta presenta un comportamiento ideal, se deberá cumplir la regla de la aditividad:

$$A_{1,2} = X_1 A_1 + X_2 A_2$$

Esta regla también se cumple si la monocapa está formada por componentes totalmente miscibles entre sí.

A partir de las ideas de Joos et al. (1969), referentes al cálculo de los parámetros de interacción (α) en el punto de colapso, se llega a una expresión que relaciona el parámetro de interacción con el valor de la variable en exceso (ΔG_M^E) para una monocapa con una composición determinada. Así, para el caso de monocapas mixtas de dos componentes:

$$\alpha = \frac{\Delta G_M^E}{RT (X_1^2 X_2 + X_2^2 X_1)}$$

3. LA FLUORESCENCIA EN EL ESTUDIO DE LA INTERACCION PEPTIDO-LIPIDO

La fluorescencia es una técnica muy sensible y no destructiva ampliamente utilizada para el estudio de la interacción entre péptidos y liposomas.

En este tipo de estudios, se determinan las variaciones que tienen lugar en las propiedades de fluorescencia de un fluoróforo debido a la interacción péptido-lípido. Este fluoróforo puede ser de dos tipos: intrínseco o extrínseco.

a) **Fluoróforos intrínsecos:** La fluorescencia de péptidos y proteínas viene determinada por unos cromóforos naturales que son los aminoácidos aromáticos fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr) y triptófano (Trp). En la mayoría de los casos, predomina la fluorescencia debida al triptófano. Este dominio de la fluorescencia del triptófano es debido a su elevado coeficiente de extinción. Además, el máximo de absorción del triptófano se encuentra a 280 nm, valor más elevado que el de la tirosina (275 nm) y la fenilalanina (255 nm), lo que significa que el triptófano es el aceptor último de energía en las proteínas por la cascada fenilalanina → tirosina → triptófano (Chen, 1990).

La escasa contribución de la tirosina a la fluorescencia de péptidos y proteínas no se explica solamente por la transferencia energética al triptófano, sino que existen otros factores, como el *quenching* o amortiguación de la fluorescencia causada por grupos carboxilo o amino próximos (Lakowicz, 1983). Sin embargo, en ausencia de Trp, en la mayoría de los casos aumenta la fluorescencia debida a Tyr.

La fluorescencia de triptófano y tirosina es sensible a la polaridad del entorno, y varía al unirse el péptido o proteína a un ligando, como puede ser la bicapa lipídica de liposomas o membranas biológicas. Estos cambios que tienen lugar en la fluorescencia intrínseca de los péptidos permiten seguir la interacción péptido-lípido.

En el caso del triptófano, el máximo de emisión de fluorescencia (λ_{em}) al excitar el péptido o proteína a 280 nm (máximo de absorción de Trp) se desplaza hacia valores menores de

longitud de onda, lo que se conoce como *blue shift*, al transferirse el grupo indólico a un entorno más apolar (Cowgill, 1967), como pueden ser las cadenas hidrocarbonadas de ácidos grasos en las bicapas lipídicas. En el caso contrario, es decir si los residuos de Trp están más expuestos al medio exterior acuoso, como por ejemplo al desnaturalizarse una proteína, el máximo de emisión se desplaza hacia longitudes de onda mayores (*red shift*). Estos cambios en λ_{em} van acompañados de cambios en la intensidad de fluorescencia; generalmente, aunque no siempre, un desplazamiento hacia λ_{em} menor va ligado a un incremento de intensidad de fluorescencia, mientras que un aumento en λ_{em} conlleva una disminución de este valor (Lakovicz, 1983). Según Cowgill, la intensidad de fluorescencia del triptófano resulta reducida por la presencia de grupos carbonilo cuando la molécula se encuentra solvatada por un disolvente formador de puentes de hidrógeno, como el agua o un alcohol. En un medio apolar, este efecto de *quenching* desaparece, ya que los puentes de hidrógeno que existían entre el agua y las cadenas laterales de los aminoácidos son sustituidos por puentes de hidrógeno intracatenarios, generándose estructuras altamente ordenadas (Popot y Engelman, 1990). Por ejemplo, la calcitonina es una hormona peptídica que al unirse a liposomas pasa de una estructura mayoritariamente desordenada a una estructura predominantemente de tipo hélice α (Epand et al., 1983). Otra posibilidad es que se formen puentes de hidrógeno con el agua de hidratación de las cabezas polares de los fosfolípidos, como ocurre con el análogo cíclico de la somatostatina SMS 201-995 (Beschiaschvili y Seelig, 1990).

La intensidad de fluorescencia de la tirosina es sensible al entorno, sin embargo el máximo de emisión permanece invariable (Dufourcq et al., 1981).

b) Fluoróforos extrínsecos: Frecuentemente, las propiedades de fluorescencia naturales de las moléculas no son adecuadas para la experimentación que se desea realizar. En estos casos se recurre al uso de fluoróforos ajenos al sistema que se investiga, algunos de los cuales se muestran en la figura 9. Estos fluoróforos, que en general son moléculas aromáticas muy conjugadas, deben reunir básicamente las siguientes características:

- (i) Deben ser moléculas altamente fluorescentes, y su espectro de emisión no debe solaparse a los correspondientes al sistema de membrana en estudio.
- (ii) Deben situarse en el interior, o unirse mayoritariamente, al liposoma.

- (iii) Han de ser sensibles a la propiedad de membrana que se quiera medir.
- (iv) No deben alterar la estructura, ni causar agregación o fusión de los liposomas.
- (v) Su pureza debe ser elevada, ya que si están contaminados con otras especies fluorescentes pueden obtenerse resultados erróneos.
- (vi) Siempre que sea posible, deben elegirse fluoróforos que no sufran cambios fotoquímicos (fotodegradación, fotodimerización) al ser excitados.
- (vii) Es preferible que tengan afinidad o se unan preferentemente a un componente concreto de la membrana, por ejemplo a los ácidos grasos. De esta manera puede obtenerse información de una zona concreta de la bicapa.

Su incorporación en liposomas puede hacerse mezclándolos con los lípidos o bien con los liposomas ya formados, pero siempre por encima de la temperatura de transición, es decir con los lípidos en estado de cristal líquido.

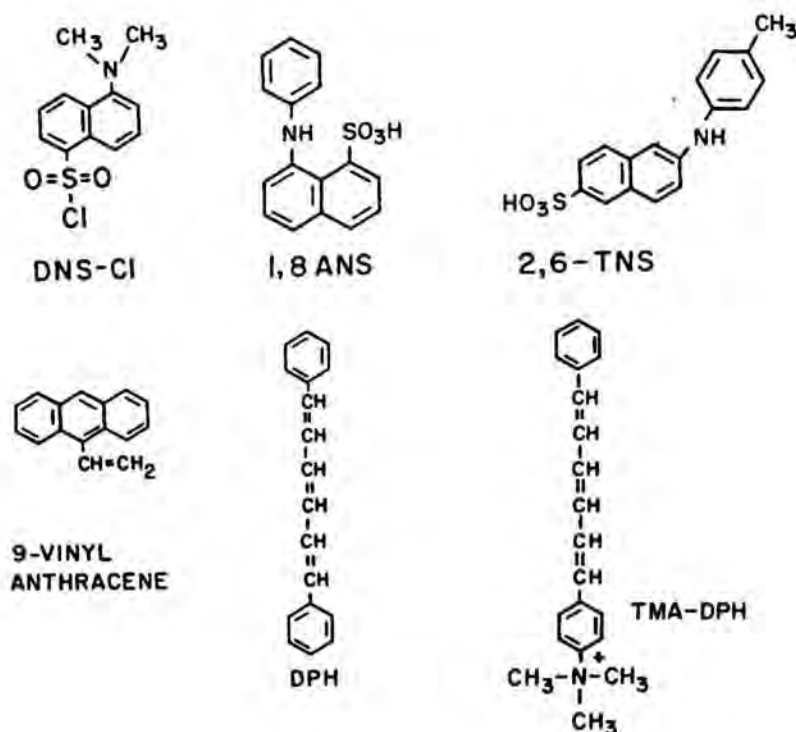


Figura 9: Estructura química de algunos marcadores fluorescentes empleados habitualmente.

En este trabajo se han empleado dos fluoróforos extrínsecos en el marcaje de los liposomas: 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) y ácido 8-anilino-1-naftalensulfónico (ANS). Ambos marcadores no presentan fluorescencia en agua, pero son altamente fluorescentes cuando se unen a membranas lipídicas o liposomas. Su principal aplicación es determinar los cambios en la fluidez de los liposomas al interaccionar con otras moléculas, como pueden ser péptidos o proteínas.

La técnica usada en este caso es la polarización de fluorescencia, en la que se determina la emisión de polarización o la anisotropía de los fluoróforos ligados a la membrana. De esta manera se tiene idea de la oscilación del marcador durante el estado excitado (unos 10^{-8} segundos), y puesto que la oscilación o movilidad del fluoróforo está limitada por el grado de ordenación y la movilidad de las moléculas que constituyen su entorno, la polarización da una medida directa del grado de ordenación de la bicapa lipídica en la zona en la que se acumula el marcador (figura 10).

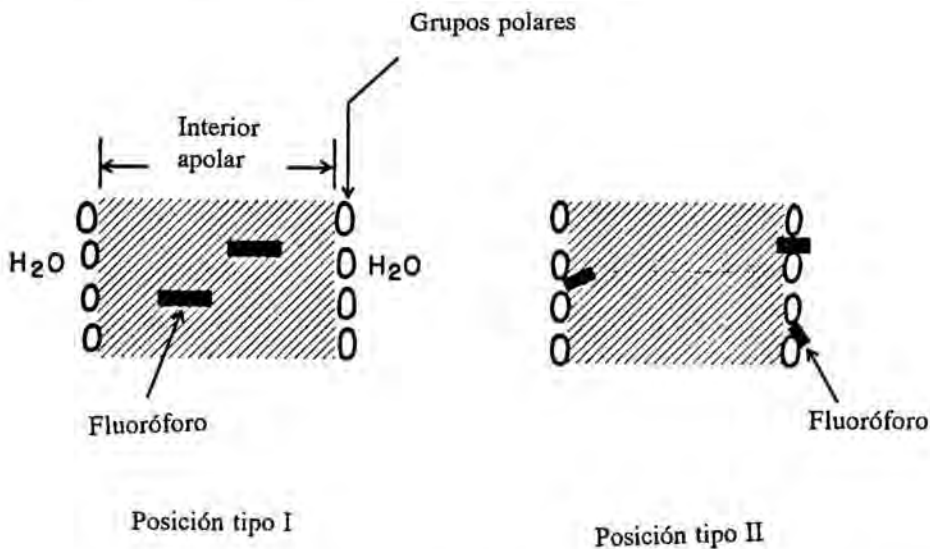


Figura 10: Disposiciones posibles de los marcadores fluorescentes en las bicapas lipídicas. La posición I es característica del DPH, y la de tipo II la presenta el ANS.

El DPH, debido a su carácter hidrófobo, se une específicamente a la zona apolar de los liposomas (Araiso y Koyama, 1989; Nam et al., 1989). Cambios en la polarización de DPH reflejan cambios en la movilidad de las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos (Tamura et al., 1988), permitiendo observar el comportamiento de cambio de fase de gel a cristal

líquido y la temperatura de transición (T_c), ya que por debajo de esta temperatura la polarización es alta, lo que indica que el DPH no tiene libertad de movimiento durante el estado excitado, mientras que por encima de la T_c la mayor movilidad de las cadenas de ácidos grasos permite también una mayor oscilación en el DPH, y por tanto disminuye la polarización.

El ANS es un marcador fluorescente que interacciona con la región hidrófila de los liposomas (Badley, 1976; Joshi et al., 1989), permitiendo evaluar cambios en la fluidez de la membrana a nivel de la superficie formada por las cabezas polares de los fosfolípidos (Nam et al., 1989). La polarización de fluorescencia del ANS ligado a liposomas es también dependiente de la temperatura, si bien el proceso de depolarización se produce de un modo más suave, sin los cambios bruscos observados para el DPH en las proximidades de la T_c (Bashford, 1976).

3.1. FLUORESCENCIA: PRINCIPIOS BASICOS

Al incidir una radiación electromagnética de longitud de onda adecuada sobre una molécula orgánica, se puede producir una absorción de energía que origina una transición desde el estado electrónico fundamental hasta un estado electrónico excitado. Los estados excitados son inestables; por tanto existe en las moléculas una tendencia a retornar al estado electrónico fundamental de mínima energía. Para perder este exceso de energía, existen varias posibilidades:

- a) Desactivación no radiante: pérdida del exceso de energía por colisiones con las moléculas de solvente, disipación en forma de calor, etc.
- b) Fluorescencia: emisión de un fotón resultante al volver al orbital fundamental un electrón apareado (con spin opuesto al del electrón que permanece en el orbital de baja energía).
- c) Fosforescencia: emisión de un fotón resultante de la transición entre dos estados de diferente multiplicidad, generalmente de un triplete a un singulete.

Las sustancias susceptibles de presentar fluorescencia o fluoróforos poseen generalmente electrones deslocalizados situados en dobles enlaces conjugados.

Los procesos de absorción y emisión de luz que tienen lugar cuando una molécula adquiere una energía de excitación, pueden ser representados mediante un diagrama de Jablonski (figura 11a). Cuando un fotón, con energía adecuada, es absorbido por la molécula, se promueve un electrón desde el nivel vibracional más bajo del estado singlete fundamental (S_0) a cualquier nivel vibracional del primer estado singlete excitado (S_1). El tiempo transcurrido en este proceso es de 10^{-15} segundos. Desde el primer estado singlete excitado, existen dos opciones para retornar al estado singlete fundamental devolviendo el exceso de energía: emitir un fotón desde el mismo nivel vibracional que se alcanzó al ser excitada la molécula, lo que sólo es posible en gases a muy baja presión, o bien, si las moléculas se encuentran en disolución, perder el exceso de energía vibracional por transferencia a las moléculas de solvente. Así pues, la molécula ha retornado al nivel más bajo de energía vibracional dentro del primer estado singlete excitado. Este proceso se denomina *relajación vibracional*, y tiene lugar entre 10^{-11} y 10^{-13} segundos. Si la molécula se encontrase en un estado electrónico superior al primero, es necesario un proceso previo de *conversión interna*, en el que se pasa desde el nivel vibracional inferior del segundo estado electrónico excitado (S_2), a un nivel vibracional elevado dentro del primer estado electrónico excitado. Tras la conversión interna, la molécula pierde el exceso de energía por relajación vibracional, colisionando con las moléculas de solvente, retornando al nivel de energía vibracional más bajo posible dentro del primer estado singlete excitado. La molécula, en estado singlete excitado, posee propiedades químicas y físicas bastante distintas a las que tiene en estado singlete fundamental.

Si la molécula regresa al estado singlete fundamental emitiendo un fotón cuya longitud de onda de emisión (λ_{em}) es superior a la de excitación (λ_{ex}) (ley de Stokes), la emisión se denomina **fluorescencia**. Esta diferencia en λ de excitación y emisión fue observada por primera vez por Stokes en 1892, y es debida a las pérdidas de energía que tienen lugar en la relajación vibracional, aunque también pueden influir los procesos de relajación del solvente y reacciones que se producen en el estado excitado.

También puede producirse un *cruce entre sistemas*, a través de un estado triplete excitado ($S_1 \rightarrow T_1$). En este caso, los electrones apareados cambian sus espines, tornándose paralelos, lo cual conlleva un cambio en su multiplicidad. Esto es la base de la **emisión fosforescente**,

cuya duración es de 10^{-4} a 10^2 segundos, frente a los 10^{-9} a 10^{-6} segundos de la fluorescencia.

Además de las características descritas, hay dos propiedades que distinguen la fluorescencia de otros tipos de emisión:

a) La estructura vibracional del espectro de fluorescencia (o espectro de emisión) es, en la mayor parte de los casos, la imagen especular del de absorción (o espectro de excitación) (figura 11b) (Lakowicz, 1983b).

b) Dado que la absorción y la fluorescencia son propiedades específicas de los orbitales moleculares de una sustancia concreta, la forma y la posición del espectro de fluorescencia son independientes de la longitud de onda de excitación.

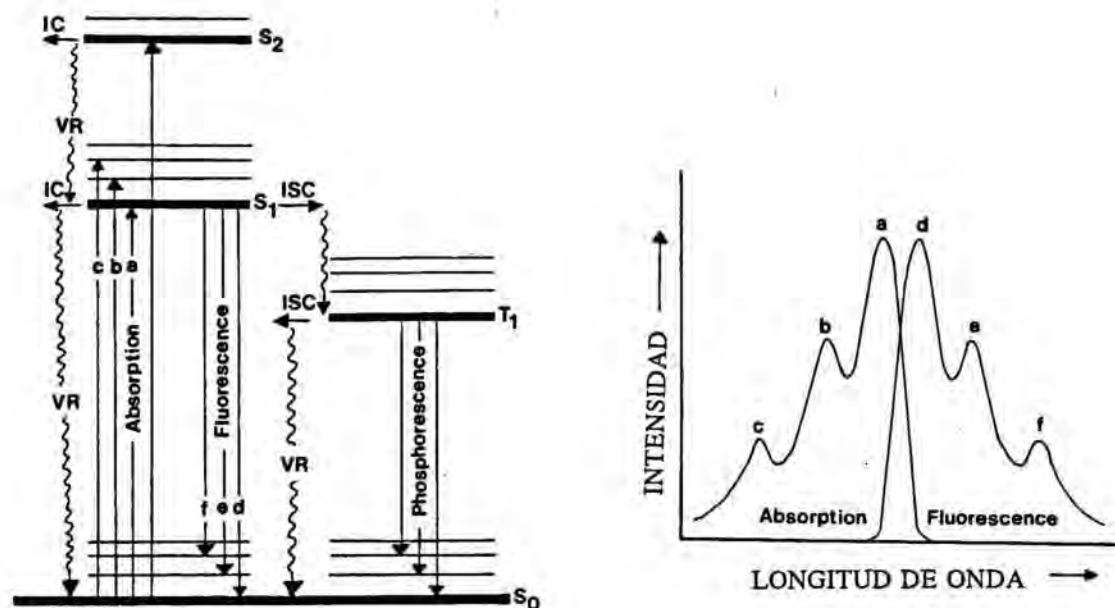


Figura 11: Izquierda: Diagrama de Jablonski: transiciones electrónicas provocadas por la absorción de un fotón. La absorción y la emisión de fotones está indicada por las líneas rectas. Las transiciones no radiantes se representan como líneas onduladas. S_0 : estado singlete fundamental; S_1 , S_2 : primer y segundo estado singlete excitado; T : triplete; VR: relajación vibracional; IC: conversión interna; ISC: cruce entre sistemas.

Derecha: Estructura vibracional de los espectros de absorción y emisión fluorescente.

El **rendimiento cuántico de fluorescencia** (*quantum yield*, Φ_f) es la relación entre el número de fotones emitidos por fluorescencia y el número de fotones absorbidos por la molécula, y se puede expresar como:

$$\Phi_f = \frac{k_f}{k_f + k_n}$$

Donde k_f es la probabilidad por unidad de tiempo de que el electrón retorne al estado fundamental produciendo emisión, y k_n la probabilidad de que vuelva al estado fundamental por procesos no radiantes (conversión interna, cruce entre sistemas, etc.). En el caso ideal, en el que $k_n = 0$, el rendimiento cuántico de fluorescencia sería la unidad.

A pesar de que el concepto de rendimiento cuántico es muy sencillo, es un parámetro muy difícil de determinar experimentalmente.

El **tiempo de vida de fluorescencia** puede definirse como el tiempo que la molécula permanece en estado excitado. En condiciones ideales, es decir en ausencia de procesos no-radiantes, el tiempo de vida de fluorescencia es τ_0 , y es el recíproco de k_f . Si no se tiene en cuenta las condiciones ideales, el tiempo de vida de fluorescencia se denomina τ , y viene determinado por la relación:

$$\tau = \frac{1}{k_f + k_n}$$

De aquí se deduce la relación existente entre Φ_f y τ :

$$\Phi_f = \frac{\tau}{\tau_0}$$

La relación teórica existente entre fluorescencia y concentración puede derivarse directamente de la ley de Lambert-Beer:

$$I_t = I_0 \cdot 10^{-\epsilon \cdot s \cdot l}$$

donde I_0 y I_t son las intensidades de la luz incidente y transmitida, ϵ la absorbilidad molar, s la concentración molar de soluto y l la longitud de la cubeta o paso de luz. La intensidad de luz absorbida (I_a) es:

$$I_a = I_0 - I_t$$

combinando ambas ecuaciones:

$$I_a = I_0 \cdot (1 - 10^{-\epsilon \cdot s \cdot I})$$

dado que la intensidad de fluorescencia (I_f) viene dada por la ecuación:

$$I_f = I_a \cdot \Phi_f$$

Sustituyendo I_a por su valor, desarrollando el término exponencial y despreciando los términos de orden superior (es decir que $\epsilon \cdot s \cdot I < 0.05$), obtenemos:

$$I_f = 2.303 \cdot I_0 \cdot \Phi_f \cdot \epsilon \cdot s \cdot I$$

Por lo tanto, en soluciones diluidas, la fluorescencia es proporcional a: (i) la intensidad de la luz incidente; (ii) la absorbilidad y (iii) el rendimiento cuántico (Bashford, 1988). En estas condiciones, existe una relación lineal entre fluorescencia y concentración de soluto (s).

Sin embargo frecuentemente se producen desviaciones a la ley de Lambert-Beer, ya sea por motivos instrumentales o por características propias de la muestra:

a) *Dispersión de la luz*: Muchas veces, las muestras biológicas son turbias debido a que macromoléculas o agregados de gran tamaño dispersan la luz incidente. Esta dispersión de la luz interfiere en las medidas de intensidad de fluorescencia, y por este motivo, es esencial examinar un blanco idéntico a la muestra pero sin el fluoróforo previamente a la realización de cualquier experimento basado en la fluorescencia. La intensidad de la dispersión es proporcional a $1/\lambda^4$ (dispersión de Rayleigh), y se reconoce fácilmente como una absorción basal que aumenta al disminuir la longitud de onda.

b) *Agregación*: Si la molécula fluorescente es parcialmente soluble, puede agregarse en soluciones muy concentradas. El espectro de absorción de los agregados puede ser muy diferente al de los monómeros (Lacowicz, 1983c).

c) *Efecto de filtro interno*: Este efecto tiene lugar cuando la luz de excitación es fuertemente absorbida por la solución conteniendo el fluoróforo o bien, más raramente, cuando es la luz emitida la que resulta absorbida. En consecuencia, la intensidad de fluorescencia resultante es anormalmente baja. La importancia de este efecto depende de la densidad óptica de la muestra a las longitudes de onda de excitación y de emisión (A_{ex} y A_{em} respectivamente). Estas densidades ópticas, si son significativas, atenúan la excitación y la emisión por $10^{-A_{ex}/2}$

y $10^{-A_{em}/2}$, respectivamente. La intensidad de fluorescencia corregida vendrá dada por la ecuación:

$$F_{corr} = F_{obs} \text{ antilog } [(A_{ex} + A_{em})/2]$$

3.2. POLARIZACION DE FLUORESCENCIA

Cuando un determinado fluoróforo en solución es excitado con luz polarizada, se excitarán preferentemente aquellas moléculas cuyos momentos de absorción sean paralelos al plano de polarización de la luz. Esta excitación selectiva de una parte de la población de fluoróforos (fotoselección) conduce a una emisión de fluorescencia también polarizada siempre y cuando las moléculas permanezcan inmóviles durante el intervalo comprendido entre la absorción y la emisión de la luz (10^{-8} segundos) (figura 12).

La polarización (P) y la anisotropía (r) se definen como:

$$P = \frac{I_{vv} - I_{vh}}{I_{vv} + I_{vh}}$$

$$r = \frac{I_{vv} - I_{vh}}{I_{vv} + 2I_{vh}}$$

La muestra es excitada con luz polarizada en el plano vertical, y la intensidad de emisión se mide paralela (I_{vv}) y perpendicularmente (I_{vh}) al plano vertical de polarización de la luz de excitación.

En algunos instrumentos es necesario aplicar un factor de corrección ($G = I_{Hv}/I_{Hh}$) para compensar la polarización causada por componentes como el monocromador o el espejo de emisión (Bashford, 1987).

En estado normal, las moléculas presentan diversas orientaciones debidas principalmente a rotaciones difusionales y/o movimiento Browniano, lo que se traduce en una disminución de

la polarización de la luz emitida o despolarización. Por lo tanto, la polarización de la emisión de fluorescencia depende de la polarización de la excitación, el tiempo de vida del estado excitado y la movilidad del fluoróforo.

Muchas moléculas no presentan polarización en medio acuoso, y sin embargo emiten luz polarizada cuando se encuentran suspendidas en un medio más viscoso. Esta propiedad ha permitido desarrollar técnicas para determinar la desnaturalización de las proteínas, las reacciones de asociación proteína-ligando, la unión de haptenos a anticuerpos y la microviscosidad de membranas biológicas durante la transición de fase mediante el uso de marcadores fluorescentes (Houbre et al, 1990; Yagi et al, 1990; Joshi et al, 1989; Nam et al, 1989; Tamura et al, 1988; Papahadjopoulos et al, 1973), tal como se ha indicado en el apartado 3 de este capítulo.

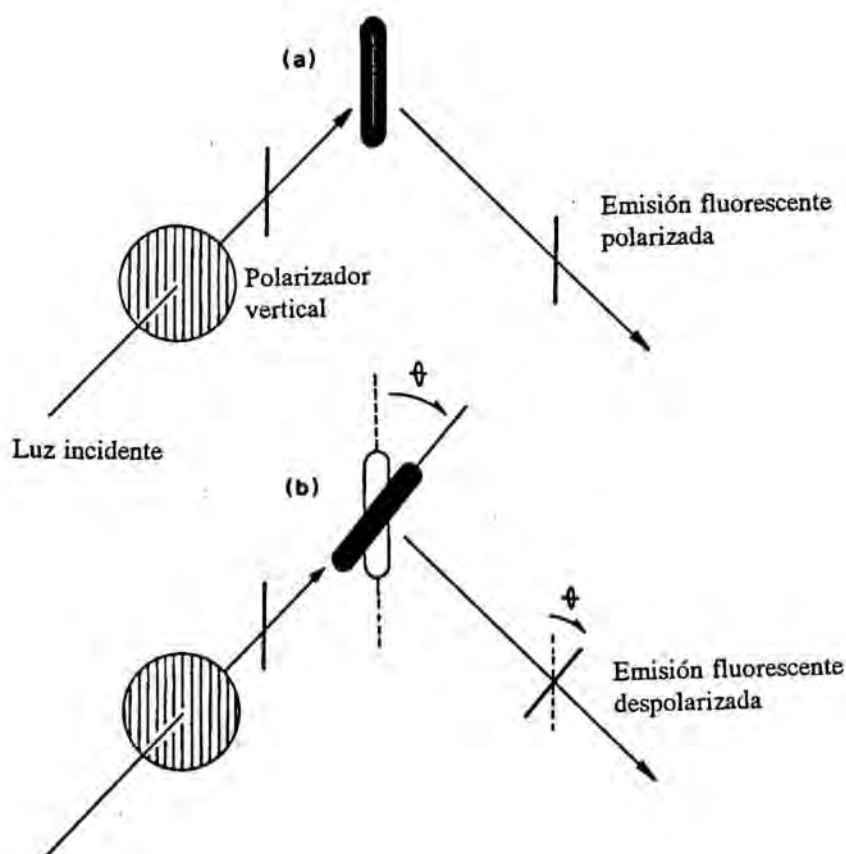


Figura 12: Principio de la espectroscopía de polarización de fluorescencia. Al excitar un fluoróforo con luz polarizada, si el fluoróforo permanece inmóvil en el estado excitado (10^{-8} seg.), la emisión de fluorescencia estará también altamente polarizada (a); si por el contrario, el fluoróforo en estado excitado se encuentra en movimiento, la fluorescencia resultante estará menos polarizada (b).

4. HORMONAS PEPTIDICAS

Las hormonas son mensajeros químicos que coordinan actividades de diferentes células en los organismos pluricelulares. El término hormona fue utilizado por primera vez por Bayliss y Starling (1902) para describir la acción de la secretina, una molécula secretada por el duodeno que estimula el flujo de jugo pancreático. De este trabajo surgieron importantes conceptos: (i) las hormonas son moléculas sintetizadas en tejidos específicos (*glándulas*), (ii) se secretan directamente a la sangre, que las transporta a sus lugares de acción, y (iii) alteran específicamente las actividades de ciertos tejidos susceptibles (*órganos o células blanco*).

Químicamente, las hormonas pueden ser de tres tipos:

- (i) moléculas pequeñas derivadas de aminoácidos, como la adrenalina y la tiroxina.
- (ii) péptidos o proteínas, como la somatostatina, la hormona del crecimiento, la oxitocina, la insulina y la hormona estimulante del tiroides entre otras. A este grupo pertenecen las hormonas estudiadas en esta Tesis.
- (iii) esteroides, como estradiol, progesterona y cortisona.

5.1. MECANISMOS DE ACCION HORMONAL

La función de las hormonas estriba en controlar el nivel de actividad de los tejidos sobre los que actúan (tejidos blanco o diana). Para efectuar esta función de control, la hormona puede modificar diversas reacciones químicas dentro de las células, alterar la permeabilidad de la membrana celular para sustancias específicas, o activar algún otro mecanismo celular específico. Las diferentes hormonas logran estos efectos de distintas maneras. Sin embargo, hay dos mecanismos generales gracias a los cuales funcionan las hormonas (Sutherland, 1972):

4.1.1. ACTIVACIÓN DEL SISTEMA AMP CÍCLICO DE LAS CELULAS

Este mecanismo de acción es propio de las hormonas peptídicas. La hormona estimulante actúa a nivel de la membrana de la célula diana, probablemente uniéndose a un receptor

específico. Esta unión hormona-receptor está precedida por la interacción de la hormona con la membrana lipídica, interacción que induce en la hormona unas conformaciones y orientaciones preferentes que facilitan la unión al receptor (Sargent y Schwyzer, 1986). La asociación de la hormona con su receptor activa el enzima adenilato ciclasa en la membrana, enzima que cataliza la transformación del ATP en AMP cíclico en el interior de la célula. La activación de la adenilato ciclasa no es directa, sino que el efecto está mediado por una proteína, llamada *proteína G* porque enlaza guanil-nucleótido. Esta proteína pasa de su forma inactiva (complejo con GDP) a su forma activa (complejo con GTP) al unirse la hormona al receptor. Es esta forma activa de la proteína G la que a su vez activa la adenilato ciclasa (figura 13). El AMP cíclico desencadena un determinado número de funciones celulares, ya sea activando enzimas, modificando la permeabilidad celular, iniciando la síntesis de proteínas intracelulares específicas, etc. Algunas hormonas que estimulan sus tejidos diana por este mecanismo son: factores de liberación hipotalámica (SRIF, GHRH, LHRH entre otros), LH, FSH, vasopresina, secretina, glucagón, adrenocorticotropina, hormona estimulante del tiroides, adrenalina, noradrenalina, calcitonina, hormona paratiroidea, hormona estimulante de los melanocitos, etc.

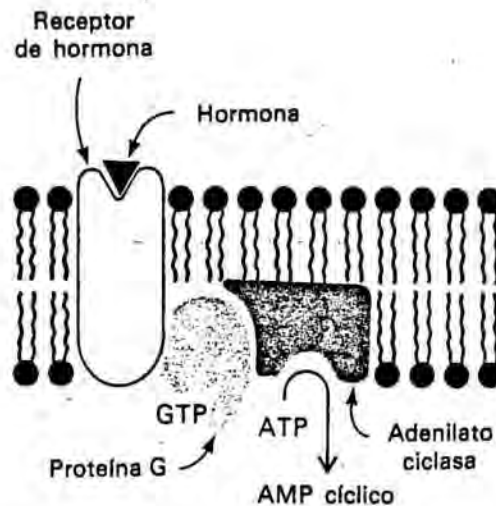


Figura 13: Mecanismo de acción de las hormonas peptídicas: flujo de información en la activación de la adenilato ciclasa por la unión de una hormona a su receptor específico.

4.1.2. ACTIVACION DE LOS GENES DE LAS CELULAS

Al activar los genes de las células las hormonas provocan la formación de las proteínas intracelulares que inician funciones celulares específicas. Este mecanismo de acción es característico de las hormonas esteroideas.

En este trabajo se ha estudiado la interacción de cuatro hormonas peptídicas con modelos de membrana: la hormona del crecimiento humana (hGH), los factores hipotalámicos que regulan su liberación: hormona liberadora de hGH (GHRH), y hormona inhibidora de la liberación de hGH o somatostatina (SRIF), y la hormona liberadora de LH (LHRH). A continuación se resumen las características principales de cada una de ellas.

4.2. HORMONA DEL CRECIMIENTO HUMANA (hGH)

La hormona del crecimiento fue aislada por primera vez a partir de pituitaria anterior de buey en 1945. La secuencia primaria de hGH fue determinada años más tarde, en 1966. Se trata de una sola cadena polipeptídica de 191 aminoácidos (peso molecular 22005), que contiene dos puentes disulfuro (figura 14). hGH tiene la propiedad de conservar su actividad hormonal incluso si los dos puentes de hidrógeno son reducidos y alquilados con yodoacetamida; Brems et al. (1990) comprobaron que la forma reducida y S-alquilada de hGH presentaba una conformación idéntica a la de la hormona nativa por CD.

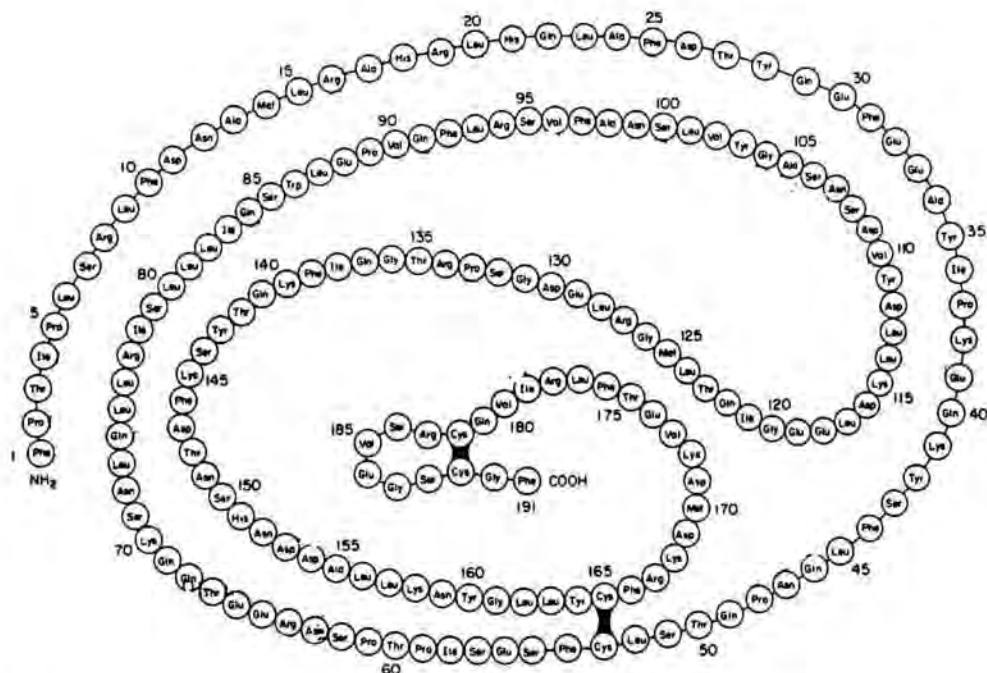


Figura 14: Secuencia de aminoácidos de hGH.

La hGH se secreta en la hipófisis anterior, y estimula el crecimiento modificando varios aspectos del metabolismo: 1) aumenta la síntesis de proteínas en todas las células del organismo, 2) causa una mayor liberación de ácidos grasos del tejido adiposo, incrementando su aprovechamiento para proporcionar energía, y 3) disminuye el índice de utilización de la glucosa en todo el organismo. Se administra hGH para el tratamiento del enanismo hipofisario.

4.3. HORMONA INHIBIDORA DE LA LIBERACION DE GH O SOMATOSTATINA (SRIF)

La somatostatina, aislada de hipotálamo bobino por Brazeau et al (1973), es una hormona peptídica cíclica de 14 aminoácidos, cuya secuencia es la siguiente:



Es biológicamente activa tanto en forma linear (reducida) como cíclica (oxidada).

Esta hormona se secreta en el hipotálamo y en las células delta de los islotes de Langerhans del páncreas, y tiene un efecto antisecretorio en diversos órganos, inhibiendo la secreción de GH y de hormona estimulante del tiroides a nivel hipofisario y suprimiendo la secreción de glucagón e insulina, así como de varias hormonas gastrointestinales.

Se utiliza en el tratamiento de la cetoacidosis del diabético (Harano, 1979), en el tratamiento de la acromegalia, en el control de la úlcera gástrica sangrante en el hombre (Limberg y Kommerell, 1979), así como de la úlcera por estrés en animales.

4.4. HORMONA LIBERADORA DE GH (GHRH)

La GHRH humana es una hormona secretada en el hipotálamo y que actúa provocando la liberación de GH en la hipófisis. Es un péptido lineal de 44 aminoácidos con función amida terminal:

H-Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Ser-Asn-Gln-Glu-Arg-Gly-Ala-Arg-Ala-Arg-Leu-NH₂.

Diversos estudios de estructura-actividad han demostrado que si bien la secuencia amino terminal es esencial para la actividad biológica (Guillemin et al., 1982), no ocurre lo mismo con el extremo C-terminal: la eliminación de residuos dejando la secuencia reducida a 29 aminoácidos no ocasiona una pérdida significativa de actividad. En esta Tesis, el análogo estudiado es la GHRH(1-29).

4.5. HORMONA LIBERADORA DE HORMONA LUTEINIZANTE (LHRH)

La LHRH, también conocida como hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), es un péptido de 10 aminoácidos cuya secuencia en la especie humana es:

pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂

Esta estructura fue determinada por el grupo de Schally en 1971 (Matsuo, 1971), tras 15 años de trabajo, y le supuso la concesión del premio Nobel de Medicina en el año 1977.

Esta hormona hipotalámica estimula la secreción de LH y FSH a nivel de la hipófisis anterior. Su interés terapéutico radica en el tratamiento de ciertas formas de cáncer (Bailey, 1990), así como del hipogonadismo hipogonadotrópico y de la pubertad precoz. Por otra parte, la administración de análogos de carácter antagonista capaces de unirse al receptor de la LHRH sin desencadenar su actividad, podría tener un efecto anti-fertilizante (Cetel, 1983).

5. VACUNAS PEPTIDICAS

La vacunación es el proceso por el cual se administra un antígeno a un huésped vivo con el fin de inducir en él una respuesta inmune protectora. Las vacunas son instrumentos de profilaxis para prevenir enfermedades causadas por diferentes agentes causales, sean virus, bacterias o parásitos.

Las vacunas pueden ser: a) de origen natural (inactivadas o atenuadas), b) obtenidas por manipulación genética, o c) vacunas peptídicas.

Las vacunas peptídicas se componen de fragmentos peptídicos sintéticos correspondientes a proteínas del agente patógeno. Los péptidos suelen ser inmunógenos de carácter débil, en comparación a la proteína intacta o al agente patógeno. Para solventar esta baja respuesta inmune, pueden utilizarse inmunoadyuvantes, entre los que cabe destacar los liposomas (Melnick, 1989; Reddy et al., 1992).

5.1. MECANISMO DE LA RESPUESTA INMUNE

El mecanismo por el cual un determinado antígeno induce la formación de anticuerpos específicos es muy complejo y no totalmente conocido. De manera simplificada se representa en la figura 15.

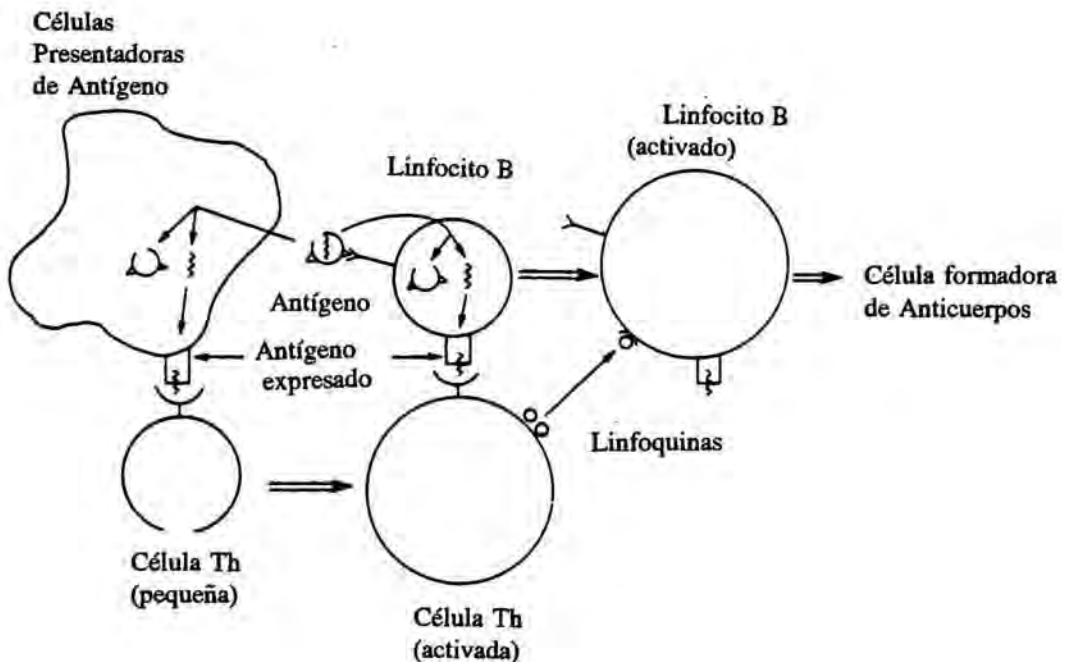


Figura 15: Mecanismo de la respuesta inmune: colaboración entre células B y T para la producción de anticuerpos.

El antígeno es captado por las células presentadoras de antígeno (macrófagos, células dendríticas, etc.), ya sea por endocitosis, fagocitosis o pinocitosis. Al mismo tiempo que el

antígeno es procesado, es reconocido por los **linfocitos B** por medio de su receptor Ig (inmunoglobulina específica), e igualmente procesado. Los fragmentos inmunogénicos son expresados en la membrana celular de las células presentadoras de antígeno asociados a polipéptidos codificados por el **complejo principal de histocompatibilidad**. Sólo entonces son reconocidos por las **células T_h o cooperadoras**, que seguidamente se diferencian en linfocitos T_h activados. Cuando estos últimos reconocen el mismo complejo en las células B, liberan **linfoquinas** que, una vez reconocidas por el receptor de las propias células B, les inducen a proliferar clónicamente y diferenciarse en **células formadoras de anticuerpos (AFC)**, es decir, secretan inmunoglobulinas contra el antígeno que reconoció el receptor de membrana Ig.

De aquí se deduce que en la primera etapa de la respuesta inmune, el antígeno interacciona con un receptor situado en la membrana celular, como ocurre en el caso de las hormonas peptídicas. Tal como se indica en el apartado 1 de este capítulo, los péptidos biológicamente activos, y concretamente los antígenos peptídicos, se encuentran totalmente desestructurados en solución. Sin embargo, recientes estudios de RMN han detectado ciertos estados conformacionales estructurados en algunos péptidos inmunogénicos en presencia de fosfolípidos, como en el caso del fragmento C-terminal de la miohemeritrina, de 19 residuos (Dyson et al., 1990). Además, al añadir trifluoroetanol, también se detecta un incremento en la estructuración de los péptidos. Estas evidencias han permitido postular un mecanismo de inducción de anticuerpos antipéptido capaces de unirse a las proteínas de las cuales provienen los péptidos antigénicos:

1. Los mejores inmunógenos son probablemente propensos a plegarse (*folding propensity*).
2. La conformación preferente puede quedar estabilizada o bien por efecto de la proteína portadora inmunoadyuvante o bien cuando el péptido interacciona con el receptor del linfocito B. En este caso, la membrana lipídica podría inducir estructuras preferentes en el péptido de manera que éste fuera reconocido por el receptor.

5.2. PEPTIDOS INMUNOGENOS DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B

El virus de la hepatitis B (HBV) pertenece al grupo de los virus ADN hepatotróficos (hepadnavirus). Es el agente causal de la hepatitis B, enfermedad endémica en numerosas áreas del planeta.

De las cuatro grandes pautas de lectura abierta del ADN vírico, (S, P, C y X), la S codifica las tres proteínas principales que forman parte de la cubierta vírica y de las partículas subvíticas que aparecen en los individuos infectados: la proteína principal (226 aa, región S) se encuentra como p24, la proteína mediana o gp33 (S + preS, 281 aa) y la proteína grande (p29 o gp42), constituida por las regiones S + preS₂ + preS₁, con unos 400 aa, según la cepa. La región preS no contiene cisteínas, y por lo tanto no depende conformacionalmente de los puentes disulfuro. Por este motivo, se ha sugerido que esta región posee principalmente epítomos de carácter continuo, lo que la hace más prometedora para la preparación de una vacuna peptídica.

Diversos grupos de investigadores han estudiado la respuesta inmune inducida por fragmentos sintéticos que comprenden la totalidad de la secuencia peptídica de las diferentes proteínas de la cubierta del virus. Los resultados más esperanzadores se han obtenidos con las secuencias siguientes:

- Aminoácidos 141-146 de la región S, y concretamente el fragmento 139-147.
- Péptidos cíclicos S(117-137) y S(122-137)
- Péptidos preS(120-145) y preS(133-151) (región preS₂) (Neurath et al., 1984).

Diferentes estudios realizados utilizando péptidos truncados de estas secuencias y anticuerpos monoclonales, han localizado el determinante antigénico dominante entre los residuos 133-143. Por otra parte, examinando la respuesta de las células T, se ha localizado un epítomo principal T entre los aminoácidos 120-132. Esto explica la elevada inmunogenicidad del péptido preS(120-145).

OBJETIVOS

La interacción de péptidos y proteínas con lípidos determina gran parte de las propiedades estructurales y funcionales de las membranas biológicas. Concretamente, como ya se ha expuesto detalladamente en el capítulo de Introducción, la interacción de un péptido biológicamente activo con la fracción lipídica de la membrana celular facilita energéticamente su posterior unión al receptor.

Partiendo de esta base, el objetivo de la presente memoria es profundizar en los mecanismos de la interacción péptido/lípido utilizando dos modelos de membrana simples y bien definidos: liposomas y monocapas lipídicas.

Los péptidos estudiados pertenecen a dos grupos, en función de su actividad biológica. El primer grupo está constituido por hormonas peptídicas, concretamente LHRH, SRIF, GHRH(1-29) y hGH, mientras que en el segundo se incluyen inmunógenos peptídicos del virus de la hepatitis B: preS(120-145) y tres lipopéptidos derivados: estearoil-preS(120-145), colanoil-preS(120-145) y Pam₃CSS-preS(120-145).

Para lograr este objetivo, se han empleado varios criterios de afinidad complementarios, incluyendo: (1) cambios en la fluorescencia intrínseca de los péptidos al ser incubados con vesículas lipídicas, (2) cambios en la fluidez de los liposomas, diferenciando entre la zona polar (marcada con ANS), y la hidrófoba (marcada con DPH); (3) alteración de la permeabilidad de las vesículas como consecuencia de la interacción, determinada a partir de la liberación de CF encapsulada; (4) cambios en la estructura secundaria de los péptidos como consecuencia de la interacción, determinados por CD; (5) interacción con monocapas lipídicas de diferentes composiciones, determinando la miscibilidad mediante cálculos termodinámicos y la penetración de los péptidos.

Asimismo, se han aplicado métodos empíricos de predicción de estructura secundaria, anfipaticidad e hidrofília a partir de la estructura primaria de los péptidos; estos datos ayudan a discernir la conformación activa más probable del péptido, es decir aquella con la que se une al receptor y desencadena la respuesta biológica.

MATERIALES Y METODOS

1. MATERIALES

1.1 INSTRUMENTACION

Las medidas de pH se hicieron en un pHímetro *Crison*, modelo *micropH 2001*.

La conductividad se midió en un *Conductimeter 522 Crison* con célula Ingold R. 3796.

Las muestras se pesaron en balanzas *Sartorius* de precisión 10^{-4} ó 10^{-5} gramos.

Las preparaciones liposómicas se sonicaron en un baño ultrasónico *Selecta* o bien con una sonda de ultrasonidos *Vibracell* (Sonics & Materials, Inc.) provista de una sonda de titanio de 10 mm de diámetro.

La extrusión de las preparaciones liposómicas se llevó a cabo con un *Extruder™* de Lipex Biomembranes Inc. (Vancouver, Canadá) conectado a una ampolla de nitrógeno purísimo (Abelló) mediante un regulador de alta presión. Se utilizaron filtros de policarbonato *Nucleopore* de 0.1 μm de diámetro de poro.

La centrifugación se llevó a cabo en una centrífuga *Beckman J2-21* empleando un rotor *JA-20.1* (*Beckman*).

Para la diálisis de las preparaciones liposómicas se emplearon membranas de celulosa regenerada *Visking Dialysis Tubings* (Medicell Int. Ltd.) con un radio de poro promedio de 24 Å y un límite de exclusión de 8000-1500 daltons.

Se ha empleado una liofilizadora Telstar modelo *Lioalfa*.

Para las medidas de absorbancia al UV se empleó un espectrofotómetro *Ultrospec II* (LKB-Biochrom).

Los tamaños de los liposomas se determinaron con un espectrómetro de correlación fotónica *Malvern II-C Autosizer* (Malvern Instruments Ltd., GB) constituido por una unidad óptica equipada con un rayo láser de 5 mW de He-Ne que produce una radiación de una longitud de onda de 232.8 nm; un correlador de 8 bites, Multi-8 de 72 canales tipo 7032 y una impresora y ordenador IBM compatible.

Las determinaciones de fluorescencia y polarización se llevaron a cabo en un espectrómetro *Perkin-Elmer modelo LS 50* conectado a un baño termostatzado *Techne* compuesto de una unidad termorreguladora *Tempette TE-8A* y una unidad de refrigeración modelo *RB-5*.

Los estudios de dicroísmo circular se han realizado en un dicrógrafo *Jobin-Ivon Mark III* equipado con un arco de Xenon de 250 W.

La cromatografía líquida de alta eficacia se realizó en dos aparatos: a) un sistema *Perkin-Elmer* consistente en una bomba binaria LC 250, un detector de fotodiodos LC 235, un integrador LCI-100 y un inyector *Rheodyne 7125* con "loop" de 20 μ l, y b) un sistema *Merck-Hitachi L-6200 intelligent pump* con detector de UV *Merck L 4000* y provisto de inyector *Rheodyne 7125*; el registro e integración de las señales cromatográficas se realizó por medio de un integrador cromatográfico *Merck-Hitachi D-2000*.

Los experimentos con monocapas se llevaron a cabo en un aparato diseñado en el laboratorio de Fisicoquímica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona (Valls, 1981) según el modelo propuesto por Verger y De Haas (1973).

El análisis de aminoácidos se realizó en un sistema Pico-Tag (*Waters*)

1.2. DISOLVENTES Y REACTIVOS

Los eluyentes para la cromatografía líquida de alta eficacia fueron: acetonitrilo y ácido trifluoroacético (*Merck, gradient grade*). Los disolventes utilizados en los estudios de fluorescencia fueron trifluoroetanol y dimetilsulfóxido (*Merck*), calidad *para espectroscopía*. El agua desionizada se purificó por un sistema *Milli-Q* (*Millipore*) hasta que su resistividad fue superior a 18 M Ω .cm.

Los productos químicos de uso general que se utilizaron fueron todos *para análisis* y de la casa Panreac excepto los siguientes: acetato sódico y ácido acético glacial 100% (*Merck*), molibdato amónico calidad *reactivo especial (RS)* (*Carlo Erba*), vitamina C o ácido ascórbico *purísimo para análisis* (*Fluka*), Tritón[®] X-100 (*Fluka*). Los marcadores fluorescentes fueron: Carboxifluoresceína (*Eastman Kodak*), 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH), pureza > 99% (*Fluka*) y ácido 8-anilino-1-naftalensulfónico (*Sigma*).

1.3. LIPIDOS

Se utilizaron los siguientes lípidos: Lecitina de huevo (PC) (*Merck*) purificada según el método descrito en el apartado 2.1 de Métodos; Lecitina hidrogenada tipo V (HPC) (*Asahi*) que se usó sin purificar; Dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) (*Deltapharma*); L- α -fosfatidilserina (PS), esfingomielina (SM), gangliósidos (G) y colesterol (COL) fueron de la

casa comercial Sigma y se utilizaron sin purificación previa.

1.4. PEPTIDOS Y AMINOACIDOS

Los péptidos estudiados se pueden clasificar en dos grupos en función de su actividad biológica y método de obtención:

a) Hormonas peptídicas: LHRH (Factor liberador de hormona luteinizante), SRIF (somatostatina o factor inhibidor de la liberación de hormona del crecimiento) y GHRH(1-29) (fragmento del factor liberador de hormona de crecimiento) fueron suministrados por Bachem, mientras que la hormona del crecimiento humana o hGH fue suministrada por Boehringer-Mannheim.

b) Inmunógenos del virus de la Hepatitis B: fueron sintetizados en nuestro laboratorio (Rabanal et al., 1990, 1991). En primer lugar se sintetizó el péptido preS(120-145) y a continuación se prepararon los derivados lipopeptídicos colanoil-preS(120-145), estearoil-preS(120-145) y Pam₃CSS-preS(120-145).

Los aminoácidos empleados como referencia en los estudios de fluorescencia fueron N-acetil-L-triptofanamida y N-acetil-L-tirosinamida (Sigma).



ARMAC

1.5. SOPORTES CROMATOGRAFICOS

Como soportes cromatográficos para la cromatografía en capa fina (CCF) se utilizaron placas con gel de sílice *DC-Alufolien Kiessigel 60* con indicador de fluorescencia F₂₅₄ (Merck).

Para la cromatografía líquida de alta eficacia se empleó una columna de fase reversa de octadecilsilano *Spherisorb ODS-2* de 250 x 4.6 mm con un tamaño de partícula de 10 µm.

Cromatografías de exclusión molecular: en la purificación de la carboxifluoresceína se empleó un relleno de Sephadex LH20 (Pharmacia), y en la purificación de la PC uno de alúmina neutra de tamaño de poro 70-230 Mesh-Atsm (Merck).

1.6. SOLUCIONES

Solución tampón acetato (pH=7.4): Acetato sódico (0.25 M)/ácido acético (0.1 M)

Solución tampón fosfato (PBS): Cloruro sódico (136 mM), cloruro potásico (2.68 mM), fosfato disódico undecahidrato (0.13 mM) y fosfato monosódico dihidrato (0.32 mM); el pH se ajustó a 7.4 con hidróxido sódico 0.1 M

Soluciones para la cuantificación del fósforo: Solución A: 1 g molibdato amónico y 8 ml de ácido perclórico 70% llevado a 60 ml con agua; solución B: 1 g. de ácido ascórbico en 40 ml de agua. Estas soluciones se mezclaron equivolumétricamente en el momento de su utilización.

TEAP: Acido fosfórico 0.1M llevado a pH 2.3 con trietilamina.

2. METODOS

2.1. PURIFICACION DE LA FOSFATIDILCOLINA DE HUEVO

La fosfatidilcolina (PC) o lecitina comercial proviene de la yema de huevo, y contiene una cierta proporción de impurezas que le confieren un color marrón intenso. Previamente a su utilización en la preparación de liposomas y monocapas se procedió a su purificación por cromatografía en columna según el método descrito por Singleton (1965) con algunas modificaciones.

(i) Soporte cromatográfico: se suspendieron 100 g de alúmina neutra, grado de actividad I, en 100 ml de cloroformo y se introdujeron en una columna de vidrio (25 x 2.8 cm) con lana de vidrio en el fondo.

(ii) Se eliminó el exceso de cloroformo, y se compactó la columna.

(iii) Se introdujeron 6 ml de una solución clorofórmica de lecitina (0.5 % p/v).

(iv) Se eluyó con cloroformo, recogándose cuatro fracciones de 50 ml. A continuación se eluyó con una mezcla de cloroformo/metanol (9:1 v/v), con lo que se extrajo la PC, recogándose fracciones de 50 ml.

(v) Cada una de las fracciones obtenidas se analizó por CCF, tal como se indica en el siguiente apartado, a fin de determinar cuales contenían PC.

(vi) Se evaporó el disolvente de las fracciones que contenían PC pura y se

conservaron estas muestras en atmósfera inerte de N_2 y a $-20^\circ C$, para impedir la oxidación.

2.2. CARACTERIZACION DE LOS FOSFOLIPIDOS POR CAPA FINA

La pureza de los fosfolípidos empleados en la preparación de liposomas y monocapas se determinó por CCF. Como fase estacionaria se emplearon placas de sílica gel, material moderadamente higroscópico que consiste en gránulos que en condiciones normales están recubiertos en su superficie con una capa de agua. La fase móvil era una mezcla de cloroformo/metanol/agua (65:25:4). Los lípidos se disolvieron en cloroformo y se depositaron en la placa. Una vez eluida la misma, se visualizaron los fosfolípidos: en primer lugar se observó la placa a 254 nm, aprovechando que contenían un indicador de fluorescencia incorporado en la fase sólida; a continuación se pulverizaron con ácido perclórico al 40% y se carbonizó la materia orgánica.

Todos los lípidos utilizados proporcionaron manchas únicas, por lo cual no fue necesaria su purificación con la única excepción de la PC de huevo, que se purificó según el método descrito en el apartado anterior. En el caso de la lecitina hidrogenada (HPC), que es una mezcla de fosfolípidos neutros hidrogenados (75% fosfatidilcolina y 20% fosfatidiletanolamina), no se consideró necesaria su separación dado que su composición estaba perfectamente establecida.

2.3. PURIFICACION DE LA CARBOXIFLUORESCEINA

Para la purificación de la carboxifluoresceína (CF) se siguió el método descrito por Ralston (1981) de purificación en columna, tal como se describe a continuación:

- (i) Soporte cromatográfico: columna de 40 x 2 cm con relleno de Sephadex LH20.
- (ii) Se preparó una disolución 0.25 M de CF en agua con ayuda de NaOH sólido, en agitación continua, y finalmente se ajustó a $pH=7.4$ con HCl 6M.
- (iii) Se introdujo en la parte superior de la columna la disolución de CF 0.25 M y se eluyó con tampón $pH=7.4$. En el momento en que empezaron a eluir muestras coloreadas se recogieron fracciones de 10 ml. La primera fracción recogida, con un color entre marrón

oscuro y verde oscuro, contiene un contaminante polar no fluorescente que se desprecia. En las fracciones siguientes, fácilmente identificables por su color, entre naranja y rojo, se encontraba la CF pura. Las impurezas hidrofóbicas quedaron retenidas en la parte superior de la columna como un residuo amarronado no fluorescente.

(iv) Las fracciones que contenían CF pura se liofilizaron y guardaron a -20°C y protegidas de la luz. Cuando fue necesario se prepararon disoluciones de la concentración deseada, generalmente 100 mM, ya que esta concentración es la más adecuada en los experimentos con liposomas por ser iso-osmótica en tampones fisiológicos.

2.4. OBTENCION DE LIPOSOMAS

2.4.1. LIPOSOMAS UNILAMINARES SONICADOS (SUV)

Para la obtención de SUVs debe partirse de una preparación de liposomas multilaminares (MLV), que se obtienen fácilmente siguiendo el método descrito por Bangham (1965), tal como se describe a continuación. Se pesaron 40 mg de DPPC o bien 40 mg de DPPC y 20.5 mg de colesterol (relación molar DPPC/COL 1:1) y se disolvieron en cloroformo. Estas soluciones se evaporaron en un rotavapor con la ayuda de un baño termostatzado a 50°C , temperatura superior a la de transición (T_c) para la DPPC, que es de 41°C . El balón conteniendo el lípido o mezcla de lípidos se hizo girar, de manera que al evaporarse el disolvente se formó una fina película de lípido seco pegado a las paredes del balón. Para eliminar las posibles trazas de disolvente se introdujo el balón en una liofilizadora durante 1 h. Una vez completamente secas las muestras se pasó corriente de N_2 para asegurar su correcta conservación.

A continuación se hidrató el lípido o mezcla de lípidos con 2 ml de tampón acetato $\text{pH}=7.4$ y se homogeneizó con ayuda de un baño de ultrasonidos, trabajando siempre a temperaturas superiores a la T_c (en el caso de los liposomas compuestos de DPPC/COL en relación equimolar, esto no es estrictamente necesario, dado que cuando la proporción de colesterol supera el 33%, la T_c desaparece por completo). De esta forma se obtuvo una suspensión de MLV, de aspecto blanco lechoso y libre de partículas visibles que se dejó en reposo durante una hora por encima de la T_c .

Esta suspensión de MLV se sometió a irradiación ultrasónica con una sonda de titanio de 10 mm de diámetro, de manera que los liposomas multilaminares se rompieron formando vesículas de menor tamaño y más homogéneas. Para ello se sumergió la punta de titanio de la sonda en la suspensión de liposomas, la cual se mantuvo refrigerada mediante un baño de agua a la temperatura adecuada para mantener los liposomas por encima de la T_c de los fosfolípidos, pero sin alcanzar valores demasiado elevados que podrían conducir a la degradación de los fosfolípidos y formación de lisofosfatidilcolina. Las muestras se sonicarón por períodos de 2 minutos a una potencia de 20 W, dejando 1 min de reposo en atmósfera de N_2 después de cada período de sonicación. El proceso se repitió hasta conseguir una preparación transparente (usualmente 16 minutos). Tras la sonicación, se dejaron los liposomas en reposo un mínimo de 30 minutos de manera que se completase el proceso de formación de las bicapas (*annealing process*). Por último, para eliminar las partículas de titanio liberadas por la sonda y sedimentar los MLV que pudieran permanecer en la preparación, se centrifugó la misma a 14000 g durante 75 min.

2.4.2. LIPOSOMAS UNILAMINARES EXTRUIDOS

Se preparó una suspensión de liposomas multilaminares (MLV) de DPPC o DPPC/COL (1:1) tal como se indica en el apartado anterior y se hicieron pasar a través de filtros de policarbonato del diámetro de poro equivalente al tamaño de liposomas que se quería obtener.

Preparación del aparato (ExtruderTM): encima del soporte metálico que constituye la base del aparato se colocó por este orden: un disco soporte, una rejilla metálica, un disco de 25 mm denominado "drain disc" (Nucleopore #230600) y 2 filtros de policarbonato de 25 mm de diámetro y 0.1 μm de diámetro de poro, que se humedecieron con unas gotas de tampón para facilitar se colocación. Una vez cerrado el cilindro central de acero, se conectó a una bombona de N_2 puro, se introdujo una pequeña cantidad de tampón y se abrió el paso de N_2 de manera que éste eluyese. Después se extruyeron los liposomas, aplicando una presión de 12 bar. Los liposomas que salían del aparato se recogían cuidadosamente y se introducían de nuevo.

El proceso de extrusión se repitió un total de 10 veces, y de cada ciclo se guardó una alícuota

para estudiar el tamaño de los liposomas. La extrusión se llevó a cabo a temperaturas superiores a la de transición del fosfolípido; cuando fue necesario se termostató el Extruder conectándolo a un baño de circulación de agua.

2.4.3. LIPOSOMAS OBTENIDOS POR DESHIDRATACION-REHIDRATACION (DRV). ENCAPSULACION DE CF.

Se siguió el procedimiento descrito por Kirby y Gregoriadis (1986) de preparación de DRV. Se prepararon siempre por triplicado lotes de fosfolípidos de las siguientes composiciones: PC (25 mg); DPPC (25 mg), PC/COL 1:1 (25mg y 12.5 mg); DPPC/COL (25 mg y 12.8 mg); PC/X/COL 0.5:0.5:1 (12.5 mg: X mg: 12.5 mg) siendo X= PS (12.5 mg), PI (12.5 mg), SM (12.5 mg) o G (20 mg); las mismas composiciones se prepararon sustituyendo PC por HPC.

Se siguió el proceso de preparación de MLV tal como se especifica en el apartado 2.4.1, con la única diferencia de que los lípidos se rehidrataron con agua. A continuación las preparaciones se sonicaron con una sonda de ultrasonidos tal como se hizo para la preparación de SUV. Los SUV así obtenidos se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 min. a fin de separar las partículas de titanio. A 1 ml del sobrenadante anterior se le añadió 1 ml de solución de CF purificada de concentración 100 mM; se homogeneizó la mezcla y se congeló en un baño refrigerante de nieve carbónica y metanol (-50°C). Las muestras se liofilizaron y rehidrataron con 0.1 ml de agua destilada y 0.9 ml de tampón agitando hasta su completa homogenización. Por último se diluyeron con tampón acetato (pH=7.4) hasta un volumen final de 8 ml y se dejaron en reposo durante 1 hora. Todo el proceso se llevó a cabo por encima de la T_c de los fosfolípidos.

La CF no encapsulada se separó por centrifugación de los DRV a 25000 g (14000 rpm) a 4°C durante 25 min, proceso que se repitió 3 veces resuspendiendo cada vez el pellet de liposomas con tampón acetato. Por último se enrasaron los liposomas lavados a 5 ml con tampón (concentración final de fosfolípido $6.8 \cdot 10^{-3}$ M). Para asegurar una mayor eliminación de CF no encapsulada, sobre todo cuando los liposomas no se utilizaron inmediatamente después de ser preparados, se sometieron a diálisis durante toda la noche. Para ello se introdujeron los

liposomas en membranas de diálisis en forma de tubo que se cerraron por ambos extremos, y estos tubos se sumergieron en un volumen adecuado del mismo tampón empleado en la preparación de los liposomas (para 2 ml de DRV bastan 250 ml de tampón), y se dejó dializar con agitación magnética constante durante 10-12 horas.

2.4.3.1. Cuantificación de la encapsulación de CF

Para conocer el tanto por ciento de encapsulación de CF en liposomas DRV se tomaron 25 μ l de liposomas y se diluyeron hasta 5 ml con tampón conteniendo un 1 % de Tritón X-100. A continuación se leyó la absorbancia de las preparaciones a 490 nm (A_{490}).

Teniendo en cuenta que el coeficiente de extinción molar de la CF es 70000 $M^{-1}.cm^{-1}$ a 490 nm, y que se utilizaron cubetas de 1 cm de paso de luz, la concentración de CF en los liposomas (C) se podría calcular aplicando la ecuación de Lambert-Beer:

$$C = \frac{A_{490}}{70000 \times 1}$$

El % de encapsulación se calculó considerando las diluciones y refiriendo la concentración así calculada a la de partida:

$$\% \text{ encapsulación} = \frac{n^{\circ} \text{ moles CF encapsulada}}{n^{\circ} \text{ moles CF totales}}$$

También se calcularon los moles de CF encapsulados por mol de fosfolípido.

2.5. DETERMINACION CUANTITATIVA DE FOSFOLIPIDO

Durante el proceso de preparación de liposomas se producen irremediablemente pérdidas de fosfolípido por diversas causas: pequeños aerosoles que pueden ocurrir durante la sonicación, pérdidas al trasvasar los contenidos, al lavar los liposomas por centrifugación o diálisis, etc. Por ello es necesario conocer la cantidad de lípido que realmente forma parte de los liposomas una vez preparados. La valoración se llevó a cabo según el método de Mc Clare (1971). La cuantificación de fosfolípidos por este método se efectúa de manera indirecta a

partir del contenido en fósforo valorado colorimétricamente.

(i) Reactivo: Soluciones A y B mezcladas isovolumétricamente (ver preparación en apartado 1.6. de este capítulo).

(ii) Solución patrón de fosfatos: como patrón inorgánico se utilizó Na_2HPO_4 secado hasta peso constante a 110°C . Se preparó una disolución de $14.48 \mu\text{g/ml}$ en agua (equivalente a $3.16 \mu\text{g/ml}$ de fósforo).

(iii) Procedimiento: en primer lugar se prepararon las disoluciones necesarias de la solución patrón de fosfato para obtener una recta de calibrado. Para ello se pipetearon en tubos de Pyrex 0.25, 0.50, 0.75, 1.0 y 1.5 ml de la solución estándar (correspondientes a $2.55 \cdot 10^{-2}$, $5.1 \cdot 10^{-2}$, $7.65 \cdot 10^{-2}$, $10.2 \cdot 10^{-2}$ y $15.3 \cdot 10^{-2} \mu\text{mol}$ de P respectivamente).

Por otra parte se prepararon las muestras de liposomas a valorar pipeteando en tubos del mismo tipo empleado para las soluciones estándar, el volumen de liposomas necesario para una concentración aproximada de $50 \mu\text{g}$ de fosfolípido/tubo. Todas las muestras se prepararon por triplicado. A continuación se liofilizaron todos los tubos, se añadieron 0.5 ml de ácido perclórico (70 %) y se dejaron digerir las muestras a reflujo durante 30 minutos en un bloque termostatzado a 210°C . Transcurrido este tiempo, se dejaron enfriar y se añadió a cada tubo 9.5 ml del reactivo recién preparado (solución A+B), mezclando a continuación. Los tubos se calentaron a 50°C durante 1 hora, con lo cual se desarrolló color azul. Una vez enfriadas las muestras, se leyó la absorbancia a 825 nm. Como blanco se empleó un tubo que sólo contenía reactivos, y que fue sometido exactamente al mismo proceso.

2.6. DETERMINACION DEL TAMAÑO DE LOS LIPOSOMAS

Se determinó el tamaño medio de las preparaciones de liposomas mediante la técnica de espectroscopía de correlación fotónica o PCS (*photon correlation spectroscopy*). Esta técnica se basa en el análisis de las fluctuaciones de la intensidad de la luz dispersada de un rayo láser que se hace incidir en la muestra problema; estas fluctuaciones son debidas al movimiento Browniano de las partículas en suspensión. Cuanto menor es el tamaño de las partículas, más rápidamente difunden, lo que se refleja en la fluctuación de la luz dispersada. A partir del coeficiente de difusión traslacional (D), que puede medirse directamente, es posible determinar el radio hidrodinámico medio de las partículas (R_h) aplicando la ecuación de Stokes-Einstein:

$$D = K.T/6.\pi.\eta.R_h$$

donde K es la constante de Boltzman, T la temperatura absoluta y η la viscosidad del medio. Se hizo incidir un láser de helio-neón en una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso de luz que contenía la muestra de liposomas convenientemente diluida. La temperatura se mantuvo constante a 25 °C para evitar fluctuaciones en la viscosidad de la suspensión, que en caso de producirse darían lugar a errores de medición. La luz dispersada por la muestra es recogida por un fotomultiplicador situado en un ángulo de 90° respecto a la luz incidente del láser.

2.7. OBSERVACION DE LOS LIPOSOMAS POR MICROSCOPIA ELECTRONICA

La microscopía electrónica es una de las técnicas más empleadas para caracterizar las preparaciones liposómicas, puesto que permite determinar de manera aproximada la lamellaridad y el tamaño de las vesículas. Existen dos métodos de observación posibles, en función del tipo de material en estudio: la microscopía electrónica de barrido y la de transmisión. Para la observación de liposomas en este trabajo se utilizó el método de transmisión.

Las muestras de liposomas se trataron por la técnica de tinción negativa; para ello se depositó una gota de la preparación liposómica sobre una rejilla metálica cubierta con un soporte transparente a los electrones. Una vez fijados parte de los liposomas, se eliminó el exceso de tampón y se lavó la muestra. A continuación se dispuso la rejilla sobre una gota de solución de molibdato amónico 2%. Una vez fijado el colorante, se eliminó el exceso, dejando secar la muestra. Las bicapas de fosfolípido, compuestas principalmente de carbono e hidrógeno, producirán la dispersión elástica de un número bajo de electrones, por lo que aparecerán en contraste negativo (oscuras).

2.8. CARACTERIZACION DE LOS PEPTIDOS

2.8.1. CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICACIA (HPLC)

La pureza de los péptidos y lipopéptidos con los que se trabajó fue comprobada por HPLC. Como fase estacionaria se utilizó una columna de fase reversa de octadecilsilano Spherisorb

ODS 2 (250 x 4.6 mm) con un tamaño de partícula de 10 μm . Como fase móvil se emplearon diferentes mezclas según el péptido a analizar, tal como se especifica en los apartados 2.1 y 3.1 de Resultados. En todos los casos, el eluyente se filtró por membranas de 0.22 μm de diámetro de poro y se desgasó al vacío y con corriente de helio. Generalmente se trabajó en régimen de gradiente.

Se utilizó detector de UV convencional o bien detector de fotodiodos.

2.8.2. ANALISIS DE AMINOACIDOS

Los péptidos se hidrolizaron con HCl 6N con 0.1% de fenol (24 h.-110°C). Se evaporó a sequedad y los aminoácidos se derivatizaron con 20 μl de trietilamina:etanol:H₂O:feniltioisocianato (1:7:1:1). Seguidamente se inyectó la muestra en un sistema Pico-Tag (Waters). Debido al tratamiento de hidrólisis con ácidos minerales fuertes, algunos aminoácidos pueden ser destruidos, ya sea de manera parcial (Ser, Thr) o total (Trp). Por ello, la cuantificación se realizó a partir de los aminoácidos Gly, Ala, Ile y Val.

2.9. INTERACCION DE PEPTIDOS CON LIPOSOMAS POR FLUORESCENCIA Y POLARIZACION

2.9.1. INSTRUMENTACION

Las medidas de fluorescencia se realizaron con un espectrómetro modelo LS 50 (Perkin Elmer) conectado a un ordenador personal. La fuente de excitación es un tubo de Xenon especial que produce un intenso pulso de radiación de corta duración a lo largo del espectro de longitudes de onda del instrumento. Las posibles oscilaciones en la emisión del tubo de Xe son eliminadas gracias a una pequeña lámpara próxima a la fuente de excitación. Tal como se indica en la figura 16, la energía procedente de la fuente de excitación (1) es enfocada por un espejo toroidal (2), de manera que pasa a través de la rendija del monocromador de excitación (3) e incide en una rejilla de 1440 líneas por mm (4). El ángulo de esta rejilla se controla mediante un motor, seleccionando así una determinada longitud de onda en el haz de excitación. Este haz pasa a través de la rendija de salida de excitación (5)

y en su mayor parte incide sobre la muestra (7) a través de un espejo toroidal (6); sin embargo una pequeña parte del haz de excitación es desviado por el *beam splitter* hacia un fotomultiplicador de referencia (8). De esta forma se controla la sensibilidad del detector principal, de manera que si la intensidad de la luz disminuye se incrementa la sensibilidad del detector, y *vice versa*. Este tipo de corrección se conoce con el nombre de *ratio mode*, y los espectros así obtenidos son más próximos a los *corregidos* (son espectros corregidos de la no linealidad del fotodetector, y se suelen obtener indirectamente por comparación con fluoróforos estándar). Para corregir la respuesta del fotomultiplicador de referencia, el instrumento tiene almacenada en memoria una curva de corrección de Rhodamina. La energía emitida por la muestra es dirigida por otro espejo toroidal (9) a la rendija de entrada del monocromador de emisión (10), y mediante una serie de espejos se hace incidir en una rejilla de 1200 líneas por mm (11), de forma que a través de la rendija de salida (12) pasa una estrecha banda de longitudes de onda, y la central está determinada por el ángulo en que se disponga la rejilla. Los rangos espectrales de los monocromadores van de 200 a 800 nm para el de excitación y de 200 a 900 nm para el de emisión.

Las señales producidas cuando no incide luz en el fotomultiplicador (*dark current*) se sustraen digitalmente tanto de la señal de referencia como de la señal emitida por la muestra, de manera que se obtiene un cero real.

Las medidas de polarización de fluorescencia se realizaron en el mismo instrumento gracias al accesorio de polarización que tiene instalado y que se opera desde el PC. Comprende dos polarizadores (fig. 16), uno de ellos situado entre el monocromador de excitación y la muestra (P_1), y el otro entre ésta y el monocromador de emisión (P_2). Cada polarizador tiene dos posiciones posibles: vertical y horizontal respecto al plano de propagación de la luz.

Polarizador de excitación	Polarizador de emisión	Componente evaluado
Horizontal	Horizontal	I_{HH}
Horizontal	Vertical	I_{HV}
Vertical	Horizontal	I_{VH}
Vertical	Vertical	I_{VV}

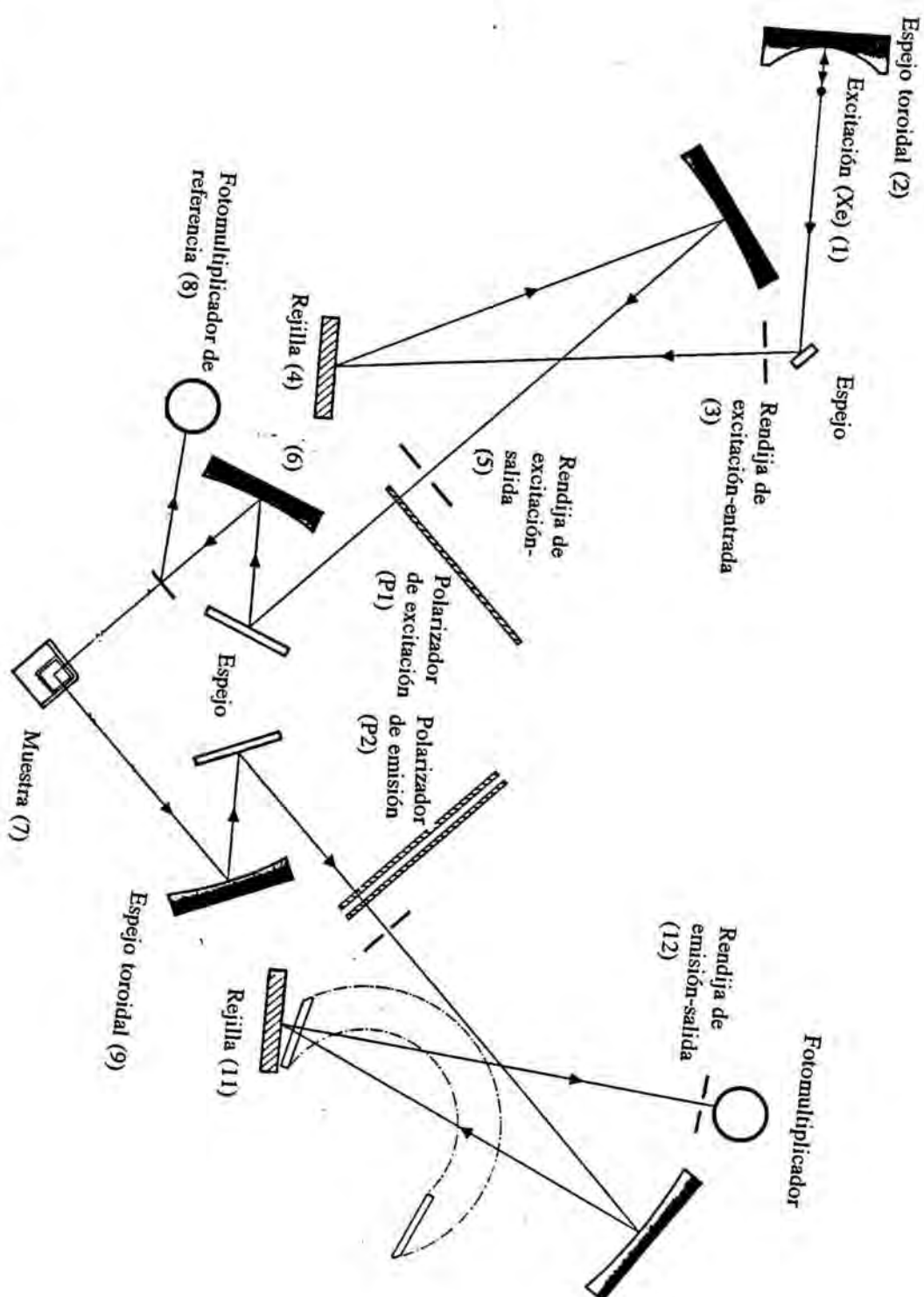


Figura 16: Esquema de funcionamiento del espectrofluorímetro I S50 G-4.

La polarización de fluorescencia (P) se calcula con la siguiente ecuación:

$$P = \frac{I_{Vv} - G \cdot I_{Vh}}{I_{Vv} + G \cdot I_{Vh}}$$

La muestra es excitada con luz polarizada en el plano vertical, y la intensidad de emisión se mide paralela (I_{Vv}) y perpendicularmente (I_{Vh}) al plano vertical de polarización de la luz de excitación. G (I_{Hv}/I_{Hh}) es un factor de corrección de la eficiencia del detector respecto a la luz polarizada vertical y horizontalmente. Se obtiene excitando la muestra con luz polarizada en el plano horizontal y midiendo los componentes paralelo y perpendicular.

2.9.2. CUBETAS

Se utilizaron cubetas de cuarzo de 10 mm de paso óptico, y se trabajó con volúmenes de muestra entre 2 y 3 ml. Inmediatamente después de su uso las cubetas se vaciaron y se lavaron siempre con mezcla crómica, aclarándose luego con agua destilada, etanol y finalmente con agua purificada por el sistema Millipore.

2.9.3. MARCADORES FLUORESCENTES

2.9.3.1. *Marcadores fluorescentes intrínsecos*

Las proteínas y péptidos que contienen los aminoácidos tirosina y/o triptófano son fluorescentes en el espectro de UV, por lo que estos aminoácidos pueden ser utilizados como marcadores fluorescentes intrínsecos. En este trabajo se ha estudiado la asociación de distintos péptidos a liposomas unilaminares pequeños (SUV) de DPPC monitorizando los cambios que se producían en las propiedades de fluorescencia de los residuos de tirosina y/o triptófano, según la composición del péptido:

Aminoácido	SRIF	LHRH	hGH	GHRH(1-29)	preS(120-145)
Tyr	0	1	8	2	1
Trp	1	1	1	0	1

En los péptidos que contenían triptófano, se estudiaron las variaciones en la fluorescencia de este aminoácido, ya que la intensidad es mucho mayor que la debida a la tirosina. En el caso de los derivados lipopeptídicos no se pudo efectuar este estudio, ya que no se obtenía el espectro típico del triptófano al excitar a 280 nm; esto podría ser debido al incremento del *light scattering* o dispersión de la luz causado por la mayor turbidez de la muestra, o bien al efecto de filtro interno.

En cuatro cubetas de cuarzo se añadieron 3 ml de una disolución $1.4 \cdot 10^{-6}$ M del péptido a estudiar disuelto en tampón acetato pH=7.4, en cada una. Por otra parte se prepararon otras dos cubetas con 3 ml de este mismo tampón cada una. Se añadieron volúmenes crecientes de liposomas SUV-DPPC (0.027 M) (concretamente 5, 10, 15, 20, 25, 35, 50, 75 y 100 μ l) tanto a las cubetas con tampón (blancos de liposomas) como a dos de las cubetas que contenían la solución de péptido, obteniéndose unas proporciones molares lípido/péptido de 0 a 500. En el caso de hGH, se añadieron además de las cantidades anteriores, 125, 175, 225 y 275 μ l de liposomas, lo que corresponde a relaciones molares DPPC/hGH de 625, 875, 1125 y 1375. A las otras dos cubetas que contenían péptido se les añadieron los mismos volúmenes de tampón acetato, a fin de corregir el efecto de dilución causada por la adición de liposomas, ya que la fluorescencia del péptido para cada volumen de liposomas añadido (F) se refirió siempre al correspondiente valor de fluorescencia del mismo péptido igualmente diluido con tampón (F_0). Tras cada adición de liposomas, se dejaron equilibrar las cubetas durante 15 minutos con agitación magnética constante antes de efectuar la lectura. Transcurrido este tiempo, se suspendió la agitación y se obtuvieron los espectros de fluorescencia de todas las cubetas.

Las condiciones de lectura fueron las siguientes: longitud de onda de excitación 280 nm; barrido de emisión desde 285 nm hasta 500 nm; rendija de excitación de 10 nm para LHRH, SRIF, preS(120-145), hGH y de 5 nm para GHRH(1-29); rendija de emisión de 10 nm para LHRH, SRIF, preS(120-145), 6 nm para hGH y 8 nm para GHRH(1-29).

Al mismo tiempo se leyó la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro UV-visible; de cada cubeta se determinó la absorbancia a 280 nm (longitud de onda de excitación de

fluorescencia) y a 340 nm para los péptidos que contenían triptófano (LHRH, SRIF, hGH y preS(120-145)) o a 305 nm para el péptido sin triptófano GHRH(1-29).

En los espectros de fluorescencia obtenidos se determinó la longitud de onda de máxima emisión (λ_{em}). Para ello se procedió al "suavizado" (*smooth*) de espectro y a continuación se obtuvo la primera derivada. El valor de longitud de onda donde la primera derivada es cero corresponde a el máximo de emisión de fluorescencia (λ_{em}).

La intensidad de fluorescencia se leyó a 340 nm en todos los casos excepto para la GHRH(1-29), en que la lectura se efectuó a 305 nm.

Estas lecturas se corrigieron:

- (i) de la dispersión de la luz causada por los liposomas (*light scattering*), restando a los espectros correspondientes al péptido con liposomas el espectro del blanco de liposomas de igual concentración obtenido en las mismas condiciones.
- (ii) de la dilución causada por la adición de liposomas
- (iii) del efecto de filtro interno (*inner filter effect*). Este efecto es una de las causas de que la intensidad de fluorescencia no sea lineal a la concentración, y puede producirse cuando el haz de excitación es fuertemente absorbido por la solución que contiene el fluoróforo o, más raramente, cuando la luz emitida por éste es absorbida. La corrección de este efecto se hizo aplicando la fórmula siguiente:

$$F = F_m \cdot \text{antilog} [(A_{ex} + A_{em})/2]$$

donde F es la intensidad de fluorescencia corregida, F_m es la fluorescencia medida y corregida del efecto de dispersión de la luz según (i), y A_{ex} y A_{em} son las absorbancias medidas a las longitudes de onda de excitación y emisión respectivamente.

La validez de estas correcciones se comprobó efectuando el mismo experimento con los aminoácidos N-acetiltryptofanamida y N-acetyltyrosinamida, ya que estos aminoácidos no interaccionan con liposomas.

Todos los experimentos se realizaron a dos temperaturas: una por debajo de la T_c de los liposomas de DPPC (20 °C) y otra claramente superior (50 °C).

2.9.3.2. *Marcadores fluorescentes extrínsecos*

Se utilizaron dos marcadores fluorescentes diferentes según la zona del liposoma que se quería marcar: ANS para la zona polar del liposoma y DPH para la apolar.

2.9.3.2.1. Saturación de los liposomas con DPH y ANS

Para los estudios de interacción de péptidos con DPPC-SUV marcados es preferible trabajar con liposomas saturados de ANS ó DPH. De esta manera se reduce el riesgo de error que se produciría si se trabajase por debajo de la zona de saturación, donde pequeñas oscilaciones en la relación molar DPPC/marcador podrían conducir a grandes variaciones en la intensidad de fluorescencia, lo que haría que los resultados no fuesen reproducibles.

SATURACIÓN CON DPH

Se preparó un lote de liposomas SUV de DPPC 0.027 M. Por otra parte, se preparó una disolución $1 \cdot 10^{-2}$ M de DPH en tetrahidrofurano (THF) disolviendo 11.61 mg de DPH en 5 ml de THF; esta disolución se conservó protegida de la luz y a 4 °C. Inmediatamente antes de su uso, se prepararon diluciones $5 \cdot 10^{-5}$ M en tampón acetato pH 7.4, agitando vigorosamente durante 1 min. y dejando en agitación magnética protegido de la luz durante 10 minutos más.

Se prepararon mezclas de distintos volúmenes de liposomas y DPH $5 \cdot 10^{-5}$ M, de manera que las relaciones molares DPPC/DPH resultantes fueron las siguientes: 16800, 1680, 840, 560 y 420. Cada una de ellas se preparó por triplicado y se incubó durante 1 h. a 50 °C (por encima de la T_c del fosfolípido), ya que la incorporación del DPH se ve dificultada si el liposoma se encuentra en estado de gel. Seguidamente se tomaron 50 μ l de liposomas marcados, se diluyeron con 3 ml de tampón acetato y se leyó la intensidad de fluorescencia.

Las longitudes de onda de excitación y emisión se fijaron en 365 nm y 425 nm respectivamente, y las rendijas de excitación y emisión fueron de 5 nm.

Paralelamente se prepararon blancos con liposomas a los que en lugar de DPH se les había añadido el mismo volumen de tampón y se habían incubado de la misma manera.

SATURACION CON ANS

Se prepararon liposomas DPPC-SUV igual que los utilizados en el estudio de saturación de DPH. El ANS es soluble en agua, por lo que se preparó una disolución $2.1 \cdot 10^{-3}$ M directamente en tampón acetato (pH=7.4) disolviendo 6.34 mg de ANS en 10 ml de tampón, y esta disolución se diluyó hasta obtener una concentración $9 \cdot 10^{-5}$ M. Con esta disolución se marcaron los liposomas, preparándose por triplicado las siguientes relaciones molares DPPC/ANS: 5250, 1313, 525, 262.5 y 233.

Los blancos se obtuvieron incubando los liposomas con volúmenes de tampón iguales a los de ANS añadidos a los otros lotes de liposomas.

Las muestras se mantuvieron a 50 °C durante 1 h., y transcurrido este tiempo se diluyeron 50 µl en 3 ml de tampón y se leyó la fluorescencia emitida a 480 nm excitando a 380 nm. Las rendijas óptimas se fijaron en 5 nm la de excitación y 7 nm la de emisión.

2.9.3.2.2. Medida de la variación de la polarización

DESPOLARIZACION DE DPH

Se mezclaron volúmenes iguales de liposomas SUV de DPPC (0.027 M) y DPH ($5 \cdot 10^{-5}$ M), incubando la mezcla 1 h a 50 °C (relación molar DPPC/DPH = 420); a esta relación molar los liposomas se encuentran saturados de DPH.

Los péptidos se disolvieron en tampón (pH 7.4), preparándose dos concentraciones: $1.4 \cdot 10^{-6}$ M y $4 \cdot 10^{-6}$ M. Los derivados lipopeptídicos de preS(120-145) no eran solubles en tampón,

dado su caracter predominantemente hidrófobo. Por ello se prepararon disoluciones madre $1.5 \cdot 10^{-4}$ M en dimetilsulfóxido (DMSO) y diluyéndolas con tampón se obtuvieron las disoluciones $4 \cdot 10^{-6}$ M, que eran completamente transparentes. El contenido en DMSO en la disolución final se mantuvo inferior al 3 %. En esta proporción, el DMSO no alteraba la estructura de los liposomas.

Se prepararon tres cubetas de cuarzo con 3 ml de solución de péptido de una concentración determinada en cada una, y otras tres cubetas con 3 ml de tampón. Todas las cubetas se llevaron a una temperatura de 17-18 °C y se añadieron 50 μ l de liposomas DPPC-DPH (la relación molar DPPC/péptido era 44:1 cuando la concentración de péptido era $4 \cdot 10^{-6}$ M y 125:1 cuando era de $1.4 \cdot 10^{-6}$ M). Las muestras se dejaron equilibrar durante 10 minutos con agitación magnética constante. Transcurrido este tiempo se determinó la polarización de fluorescencia (P) ($\lambda_{ex} = 365$ nm, $\lambda_{em} = 425$ nm, rendijas excitación y emisión = 5 nm). P era calculada directamente por el instrumento*.

Se determinó la disminución de P (despolarización) al ir aumentando la temperatura desde 17-18 °C hasta 55-60 °C. Se hicieron lecturas aproximadamente cada 2-3 °C, dejándo equilibrar las muestras 10 min cada vez que se aumentó la temperatura. De esta manera se obtuvieron dos gráficas de despolarización: una correspondiente al control de liposomas en tampón y otra de liposomas en presencia de péptido. Ambas gráficas se ajustaron matemáticamente por regresión no lineal a una sigmoide (escala logarítmica) utilizando el programa informático *Graphpad*. Esto permitió conocer el valor de la Tc de los liposomas de DPPC con y sin péptido en el medio. El ajuste se juzgó (i) a partir del valor $\sqrt{(SS/df)}$, siendo SS la suma de cuadrados y df los grados de libertad y (ii) por el análisis de las gráficas de valores residuales. A partir de las gráficas ajustadas, se obtuvieron las curvas de primera derivada.

DESPOLARIZACIÓN DE ANS

La variación de polarización de los liposomas marcados con ANS en función de la temperatura y en presencia de tampón pH 7.4 (control) o de péptido se hizo igual que se ha

*La polarización se calculó según la fórmula $P = (I_v - G \cdot I_{vh}) / (I_v + G \cdot I_{vh})$

descrito anteriormente para el DPH, con la única diferencia de que la relación molar que se utilizó fue DPPC/ANS = 233.

Se incubaron volúmenes iguales de liposomas (0.027 M DPPC) y ANS ($9 \cdot 10^{-5}$ M) durante 1 h a 50 °C. La relación molar DPPC/péptido fue siempre de 44:1, y las condiciones de lectura $\lambda_{\text{ex}} = 380$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 480$ nm, rendija excitación = 5 nm y rendija emisión = 7 nm.

2.9.3.3. Liberación de carboxifluoresceína

2.9.3.3.1. Liberación a tiempo constante

Se prepararon liposomas DRV de diferentes composiciones lipídicas (método descrito en el apartado 2.4.3 de este capítulo): PC, HPC, PC/COL (1:1), HPC/COL (1:1), PC/X/COL (0.5:0.5:1) y HPC/X/COL (0.5:0.5:1) con X = PS, PI, SM y G, todos ellos encapsulando CF; la concentración de fosfolípido era $6.8 \cdot 10^{-3}$ M. Previamente se eliminó la CF libre por centrifugación y diálisis.

Se mezclaron 1200 μl de solución tampón acetato (pH=7.4) con 5 μl de liposomas DRV conteniendo CF 100 mM encapsulada, y 100 μl de una solución $3 \cdot 10^{-4}$ M del péptido (LHRH, SRIF, GHRH(1-29), hGH) en el mismo tampón. La relación molar lípido/péptido resultante fue 1:1. Todas las muestras se prepararon por triplicado. Las suspensiones se incubaron durante 30 min. a temperatura ambiente y a continuación se tomaron alícuotas de 10 μl que se diluyeron con 2.5 ml de tampón. Se determinó la intensidad de fluorescencia (F) a $\lambda_{\text{ex}} = 490$ nm y $\lambda_{\text{em}} = 520$ nm, empleando unas rendijas de excitación y emisión de 7 nm. Una vez determinado F, y con el fin de romper los liposomas, se añadieron 50 μl de Tritón X-100 al 10%, se agitó la mezcla vigorosamente y se leyó de nuevo la fluorescencia.

Por otra parte se preparó un control o blanco añadiendo 100 μl de tampón en lugar de péptido, y se determinó la fluorescencia antes (F_0) y después de añadir el tritón (F_t). El porcentaje de CF cuya liberación de los liposomas ha sido inducida por el péptido presente en el medio (%CF) se evaluó aplicando la ecuación (Lee et al., 1986):

$$\%CF = \frac{F - F_o}{F_t - F_o} \times 100$$

2.9.3.3.2. Liberación de CF en función del tiempo

Se tomaron 5 μ l de liposomas DRV de DPPC o DPPC/COL 1:1 (concentración de fosfolípido $6.8 \cdot 10^{-3}$ M), y se mezclaron en viales *ependorf* con 1.4 ml de una disolución de preS(120-145) o lipopéptido (estearoil-preS(120-145), colanoil-preS(120-145), Pam₃CSS-preS(120-145)), en tampón acetato pH=7.4 de la concentración necesaria para una relación molar DPPC/péptido de 1:1 o de 44:1. En el caso de los lipopéptidos, estos se disolvieron primero en DMSO y se diluyeron con tampón acetato hasta la concentración deseada (concentración final de DMSO inferior al 3%).

Se prepararon blancos sin péptido para corregir de la fluorescencia residual debida a la CF no encapsulada que no hubiera sido eliminada por la diálisis. Todas las muestras se prepararon por triplicado.

Puesto que la DPPC es un fosfolípido puro de Tc perfectamente conocida (41 °C), se estudió la liberación de CF con los liposomas en estado de gel (a 20 °C) y en estado de cristal líquido (50 °C).

A distintos intervalos de tiempo (entre 10 minutos y 4 horas), se tomaron alícuotas de 25 μ l de los viales y se añadieron a una cubeta que contenía 2.5 ml de tampón; se agitó y se leyó la intensidad de fluorescencia (tanto antes como después de romper los liposomas añadiendo tritón) en las mismas condiciones indicadas en el apartado anterior, aplicando la misma fórmula para calcular el porcentaje de CF liberada a causa de la interacción péptido-lípido.

2.10. DETERMINACION DE LA FLUORESCENCIA DE LOS PEPTIDOS EN TRIFLUOROETANOL (TFE)

Se prepararon disoluciones de los péptidos en tampón acetato (pH 7.4), en TFE y en mezclas conteniendo proporciones intermedias de ambos disolventes, de tal manera que la

concentración final de péptido siempre fué $1.4 \cdot 10^{-6}$ M. Todas las proporciones se prepararon por duplicado. Las lecturas se corrigieron con blancos preparados con las mismas proporciones de disolventes (tampón/TFE).

Se hicieron espectros de fluorescencia de cada muestra, siendo λ_{ex} de 280 nm. La λ_{em} se detectó desde 285 nm hasta 500 nm, y las rendijas se fijaron en 10 nm. El experimento se llevó a cabo a 21 °C. Una vez obtenidos los espectros corregidos (restando a cada uno de ellos el blanco de disolvente), se les aplicó la función de "suavizado" (*smooth*) con un factor 5. Seguidamente se obtuvo la primera derivada del espectro de emisión para determinar λ_{em} (ver apartado 2.9.3.1).

2.11. DICROISMO CIRCULAR (CD)

Los estudios de dicroísmo circular se han realizado en un dicrógrafo Jobin Yvon Mark III equipado con un arco de Xenon de 250 W, a una velocidad de barrido de 0.5 nm/s. Se emplearon cubetas de 0.1 cm de paso óptico. El espectro se registró en el UV lejano a partir de 250 nm hasta 200 nm, siendo la sensibilidad $5 \cdot 10^{-6}$ ó $10 \cdot 10^{-6}$.

La elipticidad a cada longitud de onda se expresó como elipticidad molar por residuo de aminoácido ($[\Theta]_{MRW}$) en unidades de $\text{grado} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$, y se calculó a partir del registro obtenido en el dicrógrafo según la fórmula:

$$[\Theta]_{MRW} = \frac{3300 \cdot S \cdot MRW \cdot h}{OP \cdot C}$$

Siendo S la sensibilidad, MRW el peso molecular medio por residuo de aminoácido, OP el paso óptico de la cubeta (0.1 cm), C la concentración (mg/ml) y h la expansión en mm del espectro de dicroísmo circular del péptido respecto a la línea de base para cada longitud de onda.

Se prepararon disoluciones de 0.2 mg/ml de los péptidos en agua, ya que tanto el PBS como el tampón acetato interferían en el espectro. Para determinar la conformación en presencia de liposomas DPPC-SUV (0.027 M), se prepararon mezclas a una relación molar lípido/péptido de 30:1. Por último, se prepararon disoluciones de los péptidos en TFE (0.2 mg/ml). Cada espectro se repitió de 3 a 4 veces. Como blanco se registró el espectro del agua, agua con la misma proporción de liposomas existente en los problemas, o TFE.

2.12. MONOCAPAS

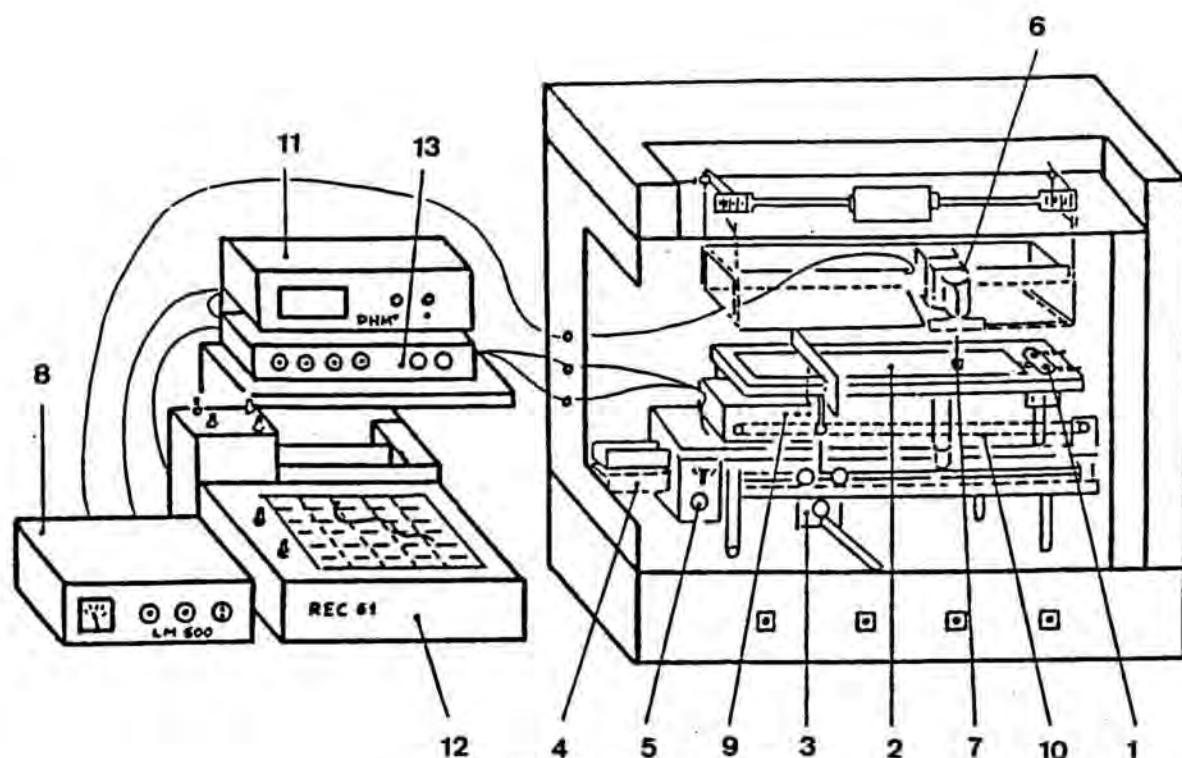
2.12.1. INSTRUMENTO DE MEDIDA

El instrumento utilizado, cuyo esquema se muestra en la figura 17, permite realizar dos tipos de estudios:

1. Medida y registro continuo de la tensión superficial en función del área ocupada por la monocapa (isotermas de compresión o curvas presión-área).
2. Registro de procesos cinéticos en superficie a área y presión superficial constante.

La tensión ejercida por la lámina de Wilhelmy sobre la electrobalanza se transforma en impulsos eléctricos en la unidad de control de la misma. El valor de la tensión eléctrica obtenido es proporcional a la tensión superficial del líquido, y se transmite con la sensibilidad adecuada a la entrada de electrodo de un potenciómetro de lectura digital, el cual está a su vez conectado a un registrador gráfico.

En resumen, este dispositivo permite registrar gráficamente y en función del tiempo los valores de tensión eléctrica (mV) procedentes de la electrobalanza que, a su vez, son proporcionales a los valores de tensión superficial del líquido problema.



- 1 Compartimento menor de la cubeta o compartimento reaccional: se utiliza para procesos cinéticos. Dimensiones: superficie: 124 cm², profundidad: 1.825 cm, volumen: 237 cm³.
- 2 Compartimento mayor de la cubeta o compartimento reservorio: se utiliza para las isotermas de compresión, y mide 28.4 cm de largo, 17.45 cm de ancho y 0.625 cm de profundidad. Sobre sus bordes se desliza una barrera móvil de teflón de 0.9 cm de ancho, 22.0 cm de largo y 3.1 cm de alto.
- 3 Mecanismo de avance manual de la barrera
- 4 Motor de avance de la barrera.
- 5 Conmutador del motor de avance de la barrera
- 6 Microelectrobalanza Beckman RIIC Ltd. LM 600
- 7 Lámina de Wilhelmy *Prolabo*
- 8 Unidad de electrocontrol de la electrobalanza
- 9 Indicador óptico del accionamiento del motor de avance de la barrera
- 10 Cadena de transmisión
- 11 Potenciómetro de lectura digital *Radiometer Copenhagen PHM 62 standar pH-meter*.
- 12 Registrador gráfico *Radiometer Copenhagen REC 61 Servograph*
- 13 Módulos *REA 160 TITRIGRAPH Module* y *REA 260 Derivation Unit*.

Figura 17: Esquema del instrumento de medida empleado en los estudios con monocapas.

2.12.2. CINETICAS DE PENETRACION A AREA CONSTANTE

Se prepararon disoluciones de los lípidos en cloroformo con las mismas composiciones que las utilizadas en la preparación de liposomas DRV para el estudio de liberación de CF (apartado 2.9.3.3.): PC, HPC, PC/COL (1:1), HPC/COL (1:1), PC/X/COL (0.5:0.5:1) y HPC/X/COL (0.5:0.5:1), siendo X = PS, PI, SM, G.

En las experiencias a área constante, se registra el incremento de presión superficial producido por la absorción de sustancias disueltas previamente en el soporte, frente al tiempo. Para este tipo de estudios, se siguió el procedimiento siguiente: en primer lugar se vertieron 50 ml de solución soporte (tampón acetato, pH=7.4), en el compartimento menor de la cubeta, y se introdujo la lámina de Wilhelmy, anotando la lectura del potenciómetro (mV).

A continuación, se extendió la monocapa con una microjeringa de modo que la presión superficial inicial (π_i) alcanzase el valor deseado: 5 ó 20 mN.m⁻¹. En este momento, se accionaron los agitadores magnéticos e inmediatamente se procedió simultáneamente a la inyección en la subfase de 25 μ l de solución de péptido en tampón acetato (SRIF: 3.1 10⁻⁴ M, LHRH: 3.1 10⁻⁴ M, GHRH(1-29): 1.1 10⁻⁴ M, y hGH: 1.0 10⁻⁴ M), y al accionamiento del mecanismo de avance del papel.

2.12.3. ISOTERMAS DE COMPRESION

En primer lugar, se prepararon mezclas de fosfolípido y péptido en cloroformo a distintas fracciones molares de ambos componentes: 100:0, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80 y 0:100 ó 100:0, 75:25, 50:50, 25:75 y 0:100.

Se llenó el compartimento reservorio con solución tampón pH=7.4 (PBS o acetato), de manera que ésta formase menisco. A continuación se colocó la barrera en un extremo y se procedió al lavado superficial, consistente en succionar la superficie mediante una pipeta Pasteur conectada a un sistema de vacío mientras se desplaza manualmente la barrera de un extremo a otro de la cubeta. Esta operación se efectuó por triplicado y en distintos sentidos de avance de la barrera. Accionando el mecanismo de desplazamiento vertical de la

microelectrobalanza, se puso la lámina de Wilhelmy en contacto con la superficie de la solución tampón.

Una vez equilibrada la balanza, es decir cuando se alcanzó un valor fijo de mV en el potenciómetro, se procedió a situar la pluma del registrador en el punto que corresponde a una presión superficial nula del papel de registro. Seguidamente se extendió un volumen exactamente medido (generalmente 50 ó 100 μ l) de la solución de péptido o mezcla lípido/péptido a estudiar, depositándolo sobre la superficie de la solución soporte. Para ello se utilizaron microjeringas de precisión, con una sensibilidad de 0.1 μ l.

En principio, cualquier monocapa podrá estar en forma gaseosa si la cantidad de sustancia extendida es lo suficientemente baja. Por ello, se ha de determinar en cada caso particular la concentración de la solución de extensión necesaria para mantener la monocapa en la fase gaseosa, ya que de esta manera, a lo largo de la compresión, se podrán observar los diferentes estados en que puede encontrarse la monocapa.

Transcurrido el tiempo necesario para la estabilización de la monocapa (5 minutos), se puso en marcha simultáneamente el motor de avance de la barrera móvil y el papel de registro, obteniéndose un registro de variación de mV procedentes de la electrobalanza frente al tiempo. Las variaciones de mV fueron luego transformadas en valores de presión superficial (π) en unidades de mN.m^{-1} , y el tiempo en área molecular en unidades de $\text{nm}^2.\text{molécula}^{-1}$, obteniéndose así las curvas de presión-área o isothermas de compresión.

La velocidad de avance del papel de registro era de 2 cm/min. La sensibilidad de la electrobalanza fue tal que la variación de 1 mN.m^{-1} correspondía a 4.02 mV.

RESULTADOS

1. LIPOSOMAS

1.1. TAMAÑO DE LAS PREPARACIONES LIPOSOMICAS

En el presente trabajo se han utilizado dos tipos de liposomas en función de la finalidad del estudio. Cuando se estudiaron las interacciones péptido-lípido mediante técnicas de fluorescencia o polarización, se emplearon liposomas unilaminares pequeños o SUV (*small unilamellar vesicles*), ya que de esta manera se minimizaba el efecto de dispersión de la luz o *light scattering* causado por la turbidez. Cuando se trataba de determinar la capacidad de los distintos péptidos para inducir la liberación de carboxifluoresceína encapsulada en liposomas, los SUV no eran adecuados, ya que su eficacia de encapsulación de CF era muy reducida. Por ello se seleccionó otro tipo de liposomas de mayor tamaño, concretamente los obtenidos por deshidratación y rehidratación o DRV; estos liposomas no interferían en las determinaciones a las longitudes de onda de lectura de fluorescencia de CF ($\lambda_{ex}=490\text{ nm}$).

El tamaño medio de los lotes de liposomas preparados se determinó mediante la técnica de espectroscopía de correlación fotónica o PCS. Un ejemplo representativo de la distribución de tamaños en una preparación de liposomas SUV ó DRV se muestra en la figura 18. Los liposomas fueron observados por microscopía electrónica de transmisión; en la figura 19 se recogen fotografías características de liposomas SUV y DRV. Las bicapas de fosfolípido, compuestas principalmente de carbono e hidrógeno, producen la dispersión elástica de un número bajo de electrones, por lo que aparecen en contraste negativo (oscuras). Es importante tener en cuenta que, aunque la muestra a observar esté correctamente preparada, es decir que se haya formado una monocapa de liposomas sobre la rejilla, pueden generarse agregados de liposomas; este artefacto es difícilmente evitable (New, 1990b).

En el caso de los liposomas unilaminares pequeños, se disponía de dos técnicas de preparación: la extrusión a presión elevada a través de membranas de policarbonato del diámetro de poro adecuado y la sonicación. Con el fin de seleccionar la más adecuada se prepararon seis lotes de liposomas SUV de igual composición lipídica (40 mg DPPC en 2 ml de tampón acetato pH 7.4), tres de ellos por extrusión a través de filtros de $0.1\text{ }\mu\text{m}$ de diámetro de poro, y los tres restantes por sonicación. A continuación se determinó el tamaño

medio de los liposomas de cada lote. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 3.

A partir de estos resultados se optó por obtener los liposomas SUV por sonicación, ya que a pesar de que los liposomas extruídos de tamaño medio equivalente presentaban una mayor homogeneidad (menor polidispersión), eran necesarios unos 7-8 procesos de extrusión para alcanzar este diámetro óptimo (entre 110 y 120 nm), lo que alargaba considerablemente el proceso. Por otra parte, de la observación de la turbidez de los lotes obtenidos se dedujo también una mayor tendencia a la agregación en los liposomas extruídos.

Liposomas obtenidos por extrusión			Liposomas obtenidos por sonicación	
Extrusión número	Diámetro medio (nm)	Polidispersión	Diámetro medio (nm)	Polidispersión
0	421.8±42.1	0.487±0.08	111.6±13.4	0.262±0.06
1	186.8±28.6	0.172±0.05		
2	154.3±33.5	0.162±0.06		
3	142.8±28.2	0.177±0.06		
4	134.9±21.1	0.132±0.04		
5	129.8±24.3	0.128±0.03		
6	123.9±14.5	0.101±0.03		
7	121.5±21.3	0.085±0.04		
8	120.6±15.4	0.187±0.05		
9	121.3±18.8	0.111±0.03		
10	116.1±12.1	0.084±0.01		

Tabla 3: Diámetro (nm) y polidispersión de liposomas SUV-DPPC (0.027M) en función del método de preparación empleado (extrusión ó sonicación). Los resultados son la media ±SD de tres lotes de liposomas.

1.2. DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE FOSFOLÍPIDO

Se determinó la concentración en fosfolípido de cada lote de liposomas preparado a partir del contenido en fósforo determinado por el método de Mc Clare (1971). Para cada determinación se preparó una recta de calibrado con solución estándar de Na_2HPO_4 en el mismo día. Las pérdidas de fosfolípido en el caso de los SUV se mantuvieron siempre inferiores al 20%, mientras que en los DRV, debido a la mayor complejidad del proceso de obtención, podían alcanzar el 30%.

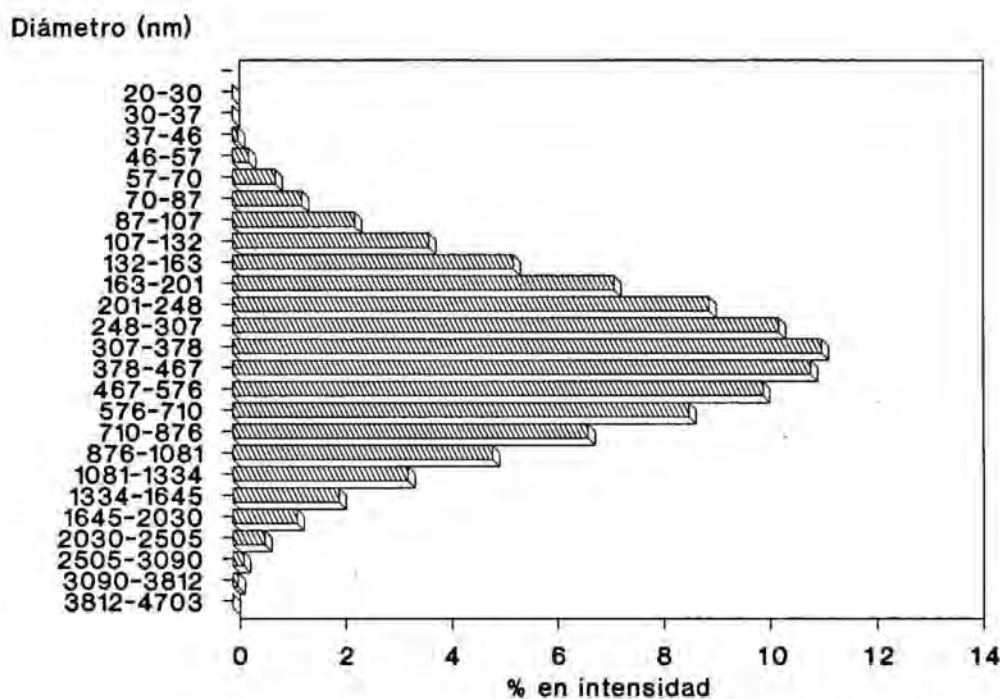
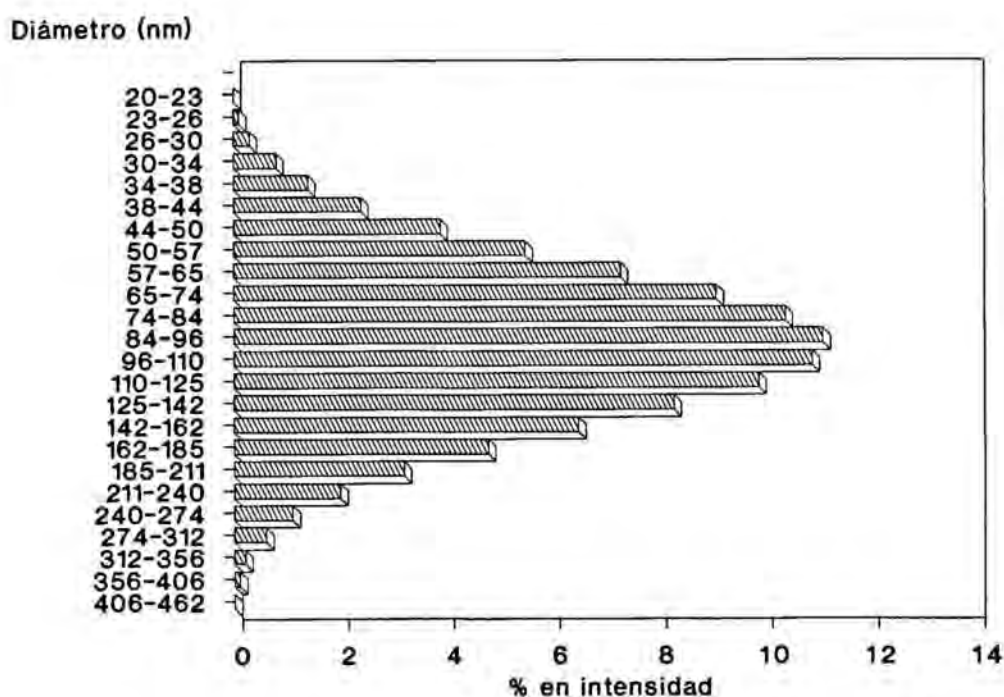


Figura 18: Distribución de tamaños representativa de una preparación de liposomas SUV de DPPC en función del método de obtención. El tamaño se determinó por la técnica de espectroscopía de correlación fotónica. *Arriba:* liposomas obtenidos por sonicación (SUV); *Abajo:* liposomas obtenidos por deshidratación-rehidratación (DRV).

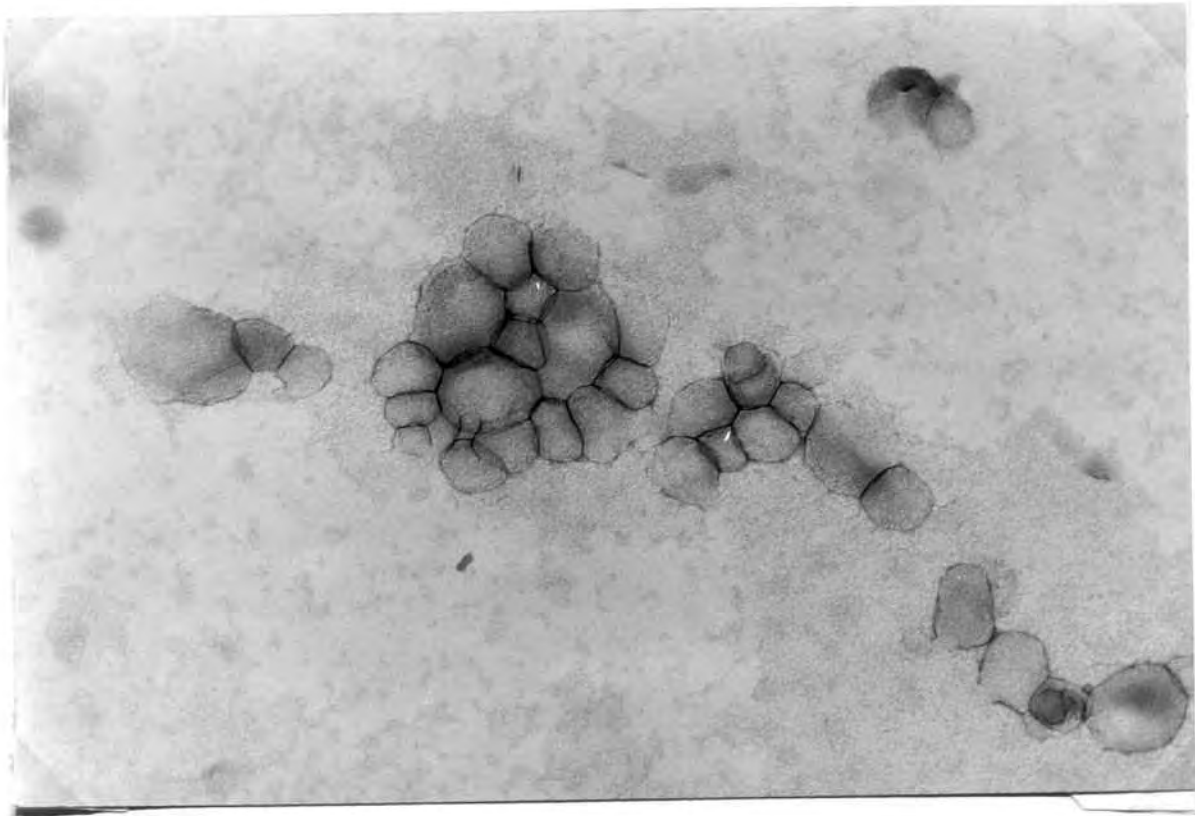
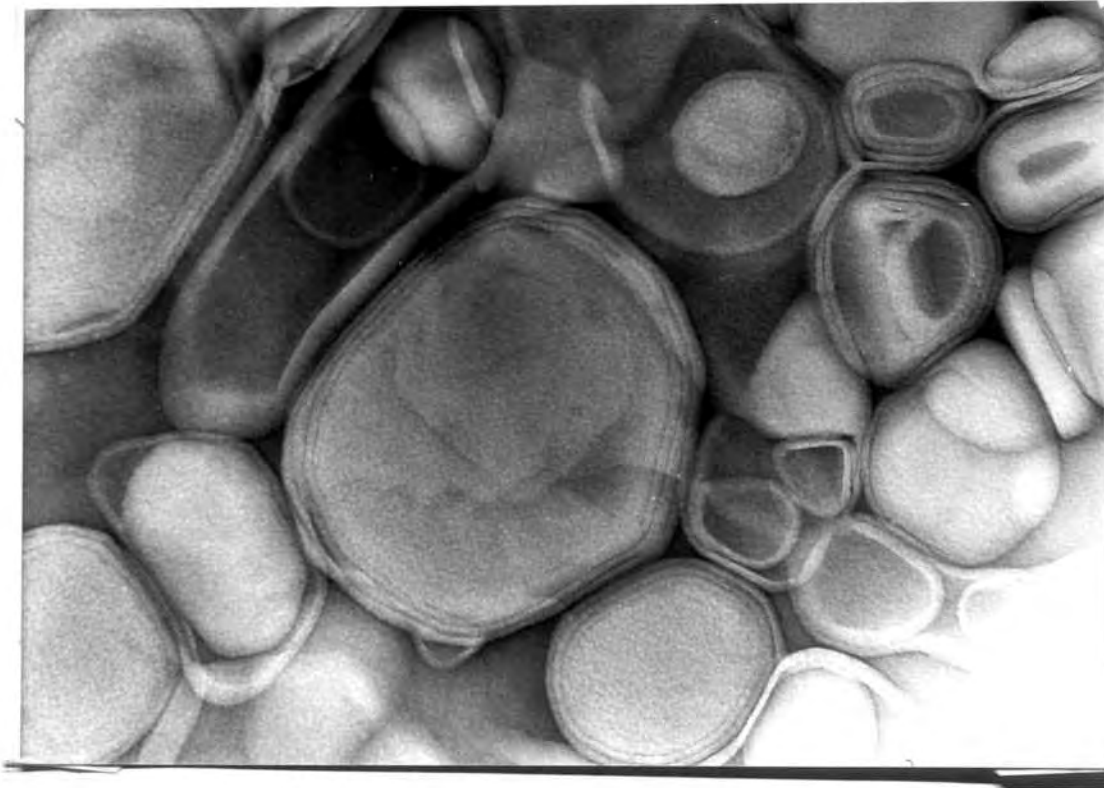


Figura 19: Micrografía de microscopía electrónica con tinción negativa de una preparación de liposomas de DPPC de tipo DRV (arriba) y SUV (abajo).

2. INTERACCION DE HORMONAS PEPTIDICAS CON MODELOS DE MEMBRANA

2.1. ANALISIS DE PUREZA DE LOS PEPTIDOS

En el presente trabajo se ha estudiado la interacción de cuatro hormonas peptídicas con modelos de membrana (liposomas y monocapas). Estas hormonas son: LHRH o factor liberador de hormona luteinizante, GHRH(1-29), que es un fragmento biológicamente activo de GHRH o factor de liberación de la hormona del crecimiento, SRIF o somatostatina (factor inhibidor de la liberación de hormona del crecimiento), y hGH o hormona del crecimiento humana.

Las estructuras primarias de estas hormonas se muestran en el apartado 5 de la Introducción. Puesto que todas ellas se obtuvieron comercialmente, se contaba con la garantía de que su composición era la correcta y su pureza >99%. Esta elevada pureza fue corroborada por HPLC. En todos los casos se empleó la misma fase estacionaria, consistente en una columna analítica de fase reversa C18 de 25x0.4 cm y con un tamaño de partícula de 10 μ m. Los análisis se realizaron a temperatura ambiente, y el volumen inyectado fue de 25 μ l. Los componentes de la fase móvil fueron acetonitrilo y TEAP. El TEAP es un tampón ampliamente utilizado en HPLC de hormonas peptídicas (Gröningsson y Abrahamsson, 1984) debido a su transparencia a longitudes de onda inferiores a 195 nm, a su compatibilidad con bioensayos tanto "in vitro" como "in vivo", así como a su elevado poder de resolución. Los cromatogramas se muestran en la figura 20.

En el caso de LHRH se realizó un gradiente de acetonitrilo/TEAP desde 13% a 22% de acetonitrilo en un tiempo de 15 minutos y con flujo de 1.5 ml/min. La detección se llevó a cabo al UV a 226 nm. De esta manera se pudo comprobar la elevada pureza de la LHRH, que eluyó como un pico único con un t_R de 8.4 min.

Para el análisis de SRIF se utilizó la misma composición para la fase móvil pero el gradiente fue de 10% a 40% de acetonitrilo en 25 minutos con un flujo de 1.5 ml/min y detección UV a 215 nm [SRIF presenta tres máximos de absorción: alrededor de 210 nm debido al enlace

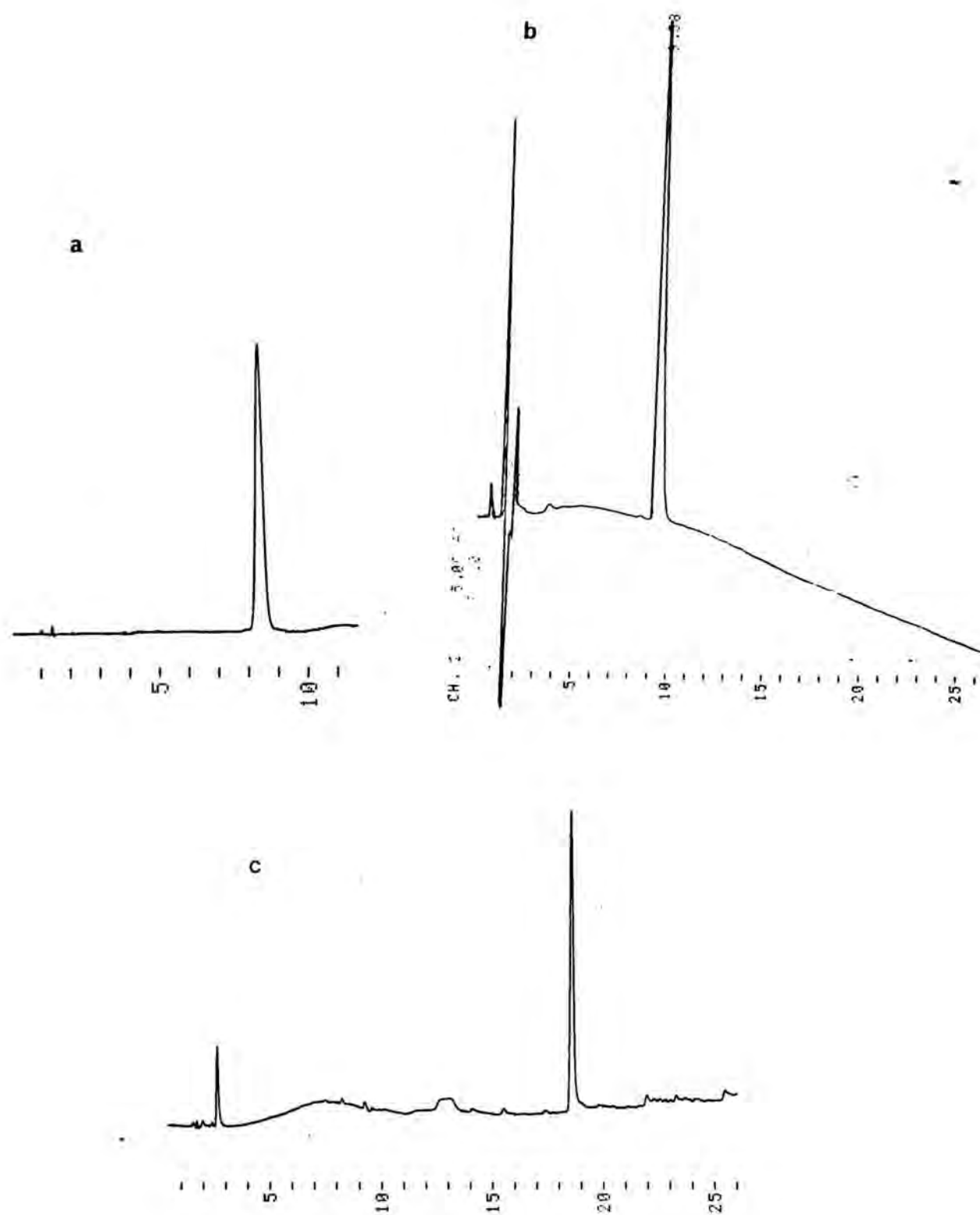


Figura 20: Perfiles cromatográficos de las hormonas peptídicas: a) LHRH, b) SRIF y c) GHRH(1-29). Condiciones descritas en el texto.

peptídico, 280 nm y 287 nm debido al triptófano, siendo la sensibilidad a 210 nm ($\epsilon_{210} \approx 7 \cdot 10^4$) unas 10 veces superior a la que presenta a 280 nm ($\epsilon_{280} \approx 5 \cdot 10^3$). De este modo se obtuvo un pico único a t_R de 9.58 min.

Las condiciones de elución óptimas para GHRH(1-29) se establecieron como un gradiente de acetonitrilo/TEAP (10:90) a (90:10) en 25 minutos, y con flujo de 1 ml/min. Detección: UV a 226 nm. Apareció un pico mayoritario de pureza superior al 95% en función del área integrada a un t_R entre 18 y 19 min.

La pureza de hGH se determinó por análisis de aminoácidos de una solución de la hormona en agua de concentración conocida (0.5 mg/ml). A partir de los picomoles de los aminoácidos Gly, Ala, Ile y Val se calculó la concentración real de hGH en la solución, resultando una pureza del 88%.

2.2. INTERACCION DE HORMONAS PEPTIDICAS CON LIPOSOMAS: CAMBIOS EN LA FLUORESCENCIA DE LOS PEPTIDOS

Una primera aproximación al estudio de la interacción de las hormonas peptídicas con liposomas consistió en determinar de que forma variaba el espectro de emisión de fluorescencia de éstas en presencia de diferentes concentraciones de liposomas.

La fluorescencia de péptidos y proteínas viene determinada fundamentalmente por tres fluoróforos naturales: fenilalanina, tirosina y triptófano; sin embargo, al excitar a 280 nm la fenilalanina no presenta fluorescencia, ya que el máximo de absorción UV de este aminoácido está en 255 nm, por lo que en estas condiciones la fluorescencia viene dominada por tirosina y triptófano. Cuando estos dos aminoácidos coinciden en un péptido o proteína, como es el caso de hGH y SRIF, es el triptófano el que domina la emisión de fluorescencia, mientras que la fluorescencia de la tirosina es prácticamente indetectable a pesar de la elevada absorción de este aminoácido a 280 nm y su alto rendimiento cuántico (*quantum yield*) en solución acuosa. La razón de este fenómeno puede ser una transferencia energética de tirosina a triptófano, o bien una amortiguación de la fluorescencia (*quenching*) por parte de los grupos

próximos a la tirosina en la cadena peptídica, como por ejemplo grupos carboxilo y amino.

Por ello, en el estudio de la interacción de liposomas con LHRH, SRIF y hGH, todas ellas hormonas peptídicas que contienen triptófano en su estructura, se estudiaron los cambios conformacionales a partir de las variaciones en las propiedades de fluorescencia de este aminoácido, puesto que, tal como se describe en el apartado 3 de la Introducción, la fluorescencia del triptófano varía en función de la polaridad del entorno, permitiendo así determinar si existe algún tipo de interacción con los liposomas. En el caso de la GHRH(1-29), al no contener triptófano, la fluorescencia debida a la tirosina es más manifiesta, ya que no puede haber transferencia energética tirosina→triptófano; por otra parte, cambios en las características de fluorescencia de este aminoácido reflejan también cambios en la polaridad de su entorno.

Los liposomas empleados fueron SUV de DPPC 0.027 M. Se eligió este fosfolípido por ser uno de los componentes mayoritarios de la membrana celular de los mamíferos; por otro lado, al tener una composición definida puede conocerse exactamente su temperatura de transición de fase (T_c), que es de 41 °C como veremos más adelante en los estudios de polarización del DPH.

Antes de pasar a estudiar las interacciones de los péptidos con liposomas, se comprobó la validez del método de corrección de la fluorescencia*. Diversos estudios muestran que los aminoácidos tirosina y triptófano aislados no interaccionan con liposomas (London, 1986; De Kroon, 1990), por ello se pensó utilizarlos como patrones para comprobar si las correcciones anteriormente indicadas eran adecuadas.

Al añadir liposomas de DPPC 0.027 M ya sea en estado de gel (20 °C) o de cristal líquido (50 °C) a N-acetiltryptofanamida $1.4 \cdot 10^{-6}$ M en tampón acetato (pH 7.4), no se produjo variación alguna en la longitud de onda de máxima emisión (λ_{em}), que era de 360 nm tanto en presencia de liposomas como en tampón sin liposomas (fig. 21). Esto confirma el hecho

* Como se indica en el apartado 2.9.3. de Materiales y Métodos, la emisión de fluorescencia de los péptidos fue corregida 1) del efecto de dispersión de la luz (*light scattering*) restando a cada espectro el correspondiente al blanco de liposomas de igual concentración en DPPC, 2) de la dilución causada por la adición de liposomas y 3) del efecto de filtro interno multiplicando la fluorescencia corregida de 1) por el factor de corrección: $\text{antilog} [(A_{488} + A_{490})/2]$

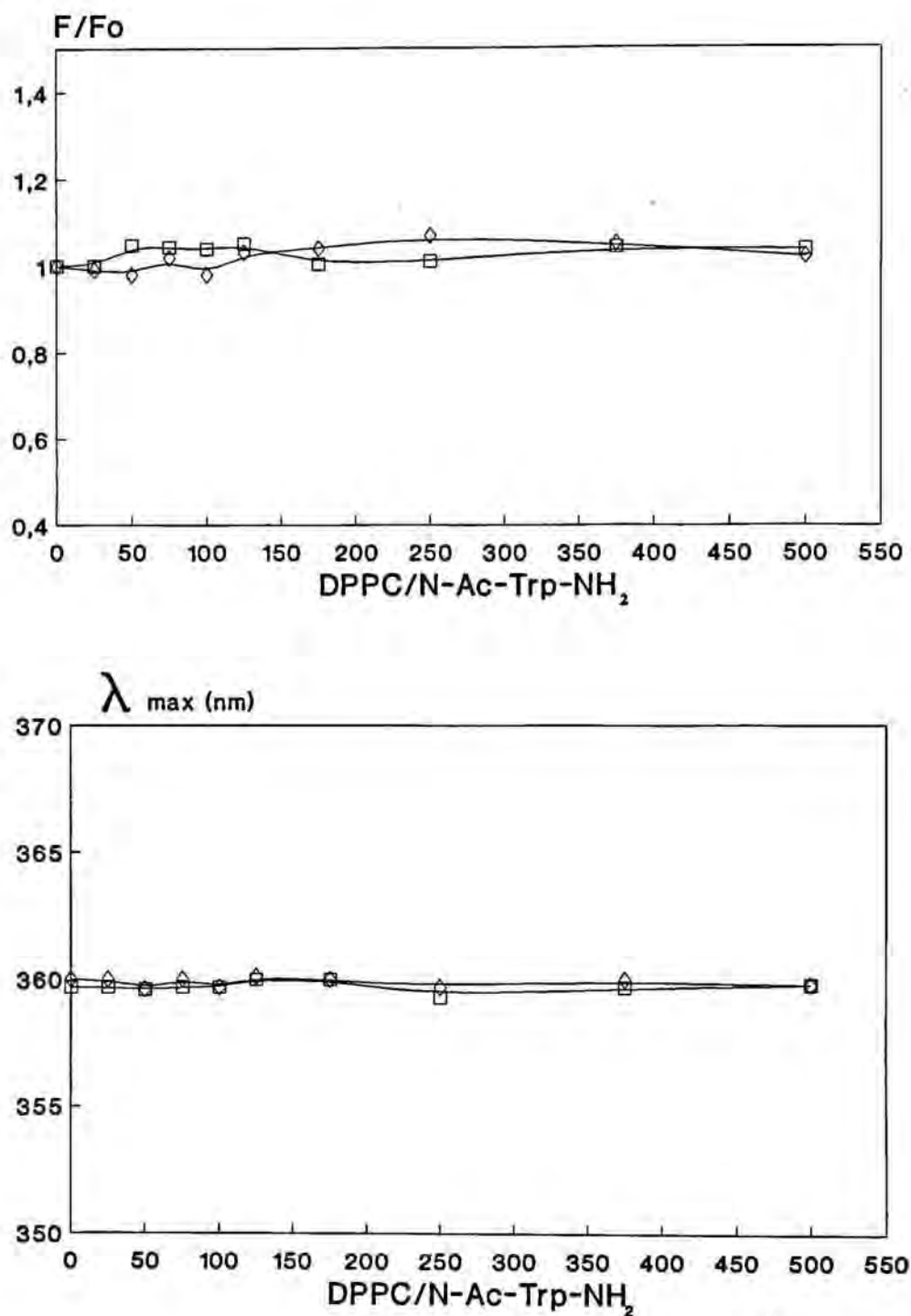


Figura 21: Propiedades de fluorescencia de N-acetiltryptofanamida ($1.4 \cdot 10^{-6}$ M) en presencia de liposomas SUV-DPPC en función de la concentración de lípido. *Arriba:* F/Fo es la variación de la intensidad de fluorescencia a 340 nm. *Abajo:* variación de la longitud de onda del máximo de emisión. (□) experimento realizado a 20 °C; (◇) experimento realizado a 50 °C. Cada punto es la media de dos determinaciones.

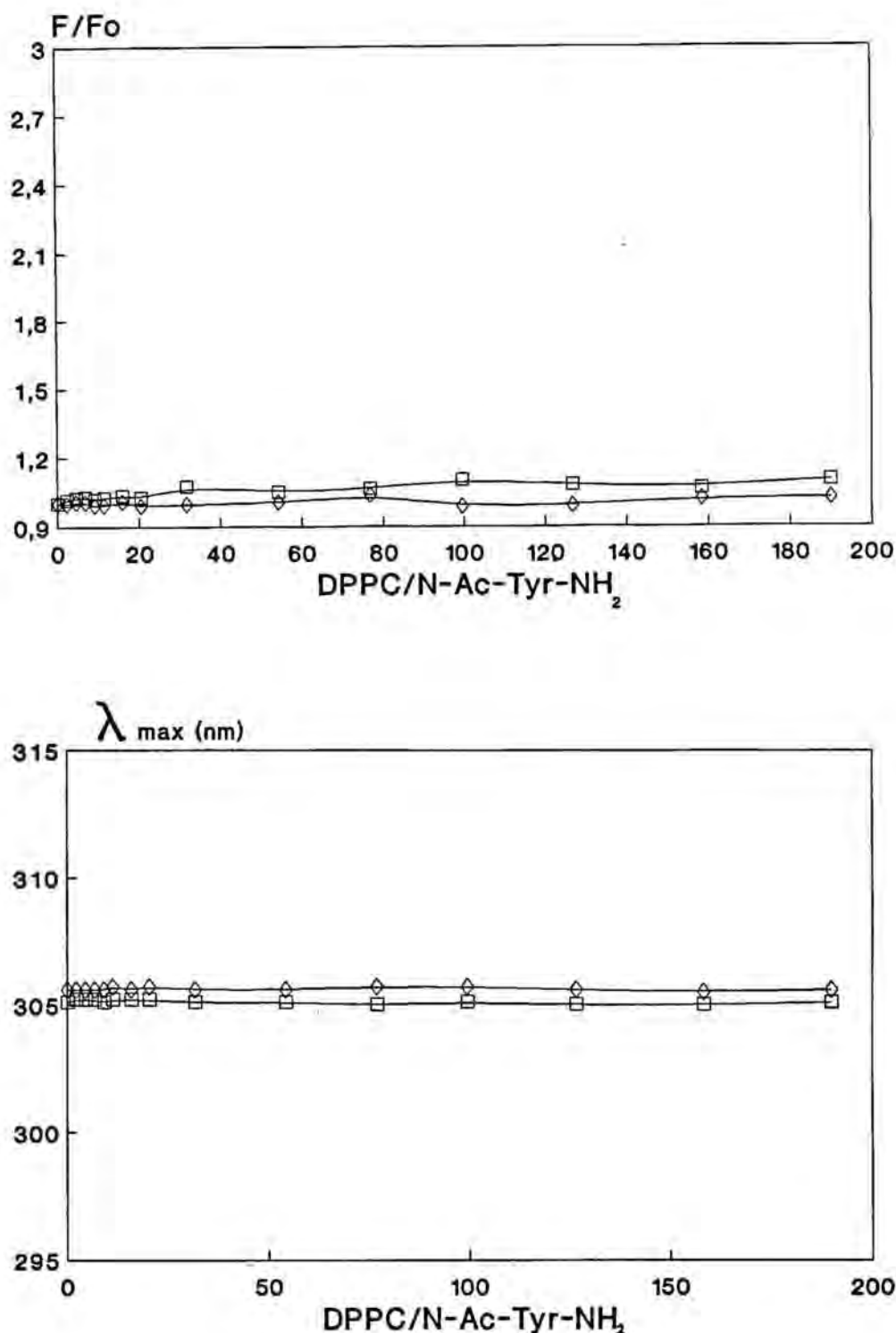


Figura 22: Propiedades de fluorescencia de N-acetil tirosinamida ($2.8 \cdot 10^{-6}$ M) en presencia de liposomas SUV-DPPC en función de la concentración de lípido. *Arriba:* F/F_o es la variación de la intensidad de fluorescencia a 305 nm. A fines comparativos, se ha representado empleando la misma escala que para GHRH(1-29), apartado 2.2.6. *Abajo:* variación de la longitud de onda del máximo de emisión (λ_{max}). (□) experimento realizado a 20 °C; (◇) experimento realizado a 50 °C. Cada punto es la media de dos determinaciones.

de que este aminoácido no interaccionaba con los liposomas. La disminución de la fluorescencia a 340 nm de la N-acetiltryptofanamida una vez corregida del efecto de dispersión de la luz restando el blanco de liposomas, alcanzó un 23 % respecto al valor inicial cuando la relación molar DPPC/aminoácido era de 500:1, debido al efecto de filtro interno de las muestras. Una vez multiplicados estos valores de fluorescencia (F) por el factor de corrección (calculado a partir de A_{280} y A_{340}), se obtuvo una fluorescencia corregida constante para cualquier relación molar ensayada. Las ligeras oscilaciones entraban dentro del error instrumental, y no superaban el 5 %

En el caso de la N-acetiltryptosinamida, se preparó una disolución en tampón acetato de concentración $2.8 \cdot 10^{-6}$ M, equivalente a la de GHRH(1-29) $1.4 \cdot 10^{-6}$ M que se utilizó en los estudios de fluorescencia, como se verá más adelante, ya que ésta hormona contiene dos tirosinas por molécula. Se estudió la interacción con DPPC-SUV tanto a 20 °C como a 50 °C. El máximo de emisión se mantuvo siempre invariable a 305 nm, característico para la tirosina (fig. 22); la fluorescencia a 305 nm se corrigió tal como se ha indicado anteriormente para el triptófano con la única diferencia de que para calcular el factor de corrección del efecto de filtro interno la absorbancia se leyó a 280 nm (A_{ex}) y a 305 nm (A_{em}). La fluorescencia así calculada permanecía constante independientemente de la concentración de liposomas y de la temperatura.

A la vista de los resultados obtenidos, se empleó este tipo de corrección de fluorescencia en los estudios de interacción con péptidos y proteínas.

2.2.1. CAMBIOS EN LA FLUORESCENCIA DE SRIF EN PRESENCIA DE LIPOSOMAS UNILAMINARES DE DPPC

El máximo de emisión de fluorescencia de SRIF en solución tamponada de acetato (pH=7.4) resultó ser de 355.4 nm (figura 23), lo que indica un entorno altamente polar para el residuo de triptófano presente en este péptido. Según este valor, el triptófano se encontraba bastante expuesto al solvente, sin embargo, dado que el máximo de emisión de la N-acetiltryptofanamida en las mismas condiciones es de 360 nm, este desplazamiento de λ_{em} hacia longitudes de onda más cortas indica que el triptófano de SRIF, aun estando en un

entorno polar, no se encontraba totalmente expuesto al medio acuoso, sino que la hormona adoptaba una determinada conformación que permitía al triptófano un entorno más apolar que el que presentaría si la hormona no tuviese una estructura secundaria definida.

También la intensidad de fluorescencia de SRIF era superior a la de la N-acetiltryptofanamida de igual concentración; esto es un fenómeno común a todos los péptidos y que ya había sido observado por Cowgill en 1967. Cowgill realizó un interesante trabajo en el que logró demostrar que la fluorescencia de triptófano y tirosina en los péptidos resultaba disminuida (*quenching*) por los grupos carbonilo, y este *quenching* era potenciado por los grupos α -amino contiguos a los carbonilo y las cadenas laterales de carboxamida. Es decir que los enlaces peptídicos hacían disminuir la fluorescencia de los péptidos siempre y cuando se encontrasen solvatados por un disolvente formador de puentes de hidrógeno, como el agua. Si por el contrario, el péptido se encontraba en un medio apolar, como un disolvente orgánico, los grupos carboxamida no podían formar puentes de hidrógeno con el agua, con lo que desaparecía el *quenching* y aumentaba la fluorescencia. Además, otros investigadores (Uemura et al., 1983; Dufourq et al, 1981) y el propio Cowgill observaron un desplazamiento de la longitud de onda del máximo de emisión a longitudes de onda más cortas (*blue shift*) en medios apolares. En resumen, y en la mayoría de los casos, en un entorno apolar, ya se trate de una zona hidrófoba en la estructura secundaria o terciaria de una proteína, o bien a causa de la penetración en el interior hidrófobo de un liposoma o de la membrana celular, la intensidad de fluorescencia del triptófano en los péptidos aumenta y la longitud de onda de máxima emisión se desplaza a valores menores.

Interacción con liposomas en estado de gel

Al añadir liposomas de DPPC en estado de gel (20 °C) a la solución $1.4 \cdot 10^{-6}$ M de SRIF en tampón acetato pH 7.4 a esta misma temperatura, se alteraron marcadamente las propiedades de fluorescencia de la hormona. A medida que iba aumentando la relación molar DPPC/SRIF, se producía un incremento de la intensidad de fluorescencia del péptido, con $F/F_o^* = 1.36$ (medido a 340 nm) cuando la relación molar era de 500:1. La representación gráfica de F/F_o

* F es la fluorescencia del péptido en presencia de liposomas y corregida del *scattering* y del efecto de filtro interno; F_o es la fluorescencia del péptido en tampón diluido con la misma cantidad de tampón que de liposomas se han añadido en las otras muestras.

respecto a la relación molar DPPC/SRIF describía una curva que se saturaba a $\text{DPPC/SRIF}=375:1$; a esta relación molar, el incremento de fluorescencia alcanzaba un 35 % sobre el valor inicial en ausencia de liposomas (fig. 24). Además, a medida que aumentaba la cantidad de lípido presente en el medio, el máximo de emisión se desplazaba a λ menores (figura 23): de 355.4 nm en ausencia de liposomas pasó a 344 nm cuando $\text{DPPC/SRIF}=500$, es decir que se produjo un *blue shift* de casi 12 nm. Estos cambios son indicativos de que el entorno del triptófano era más apolar en presencia de DPPC-SUV, y por tanto que SRIF había penetrado en la bicapa fosfolipídica.

Por otra parte, la intensidad de fluorescencia de SRIF en tampón a 340 nm (F_0) permaneció constante durante todo el experimento, y los valores de absorbancia A_{280} y A_{340} también, lo que prueba que el péptido no se agregaba en solución acuosa.

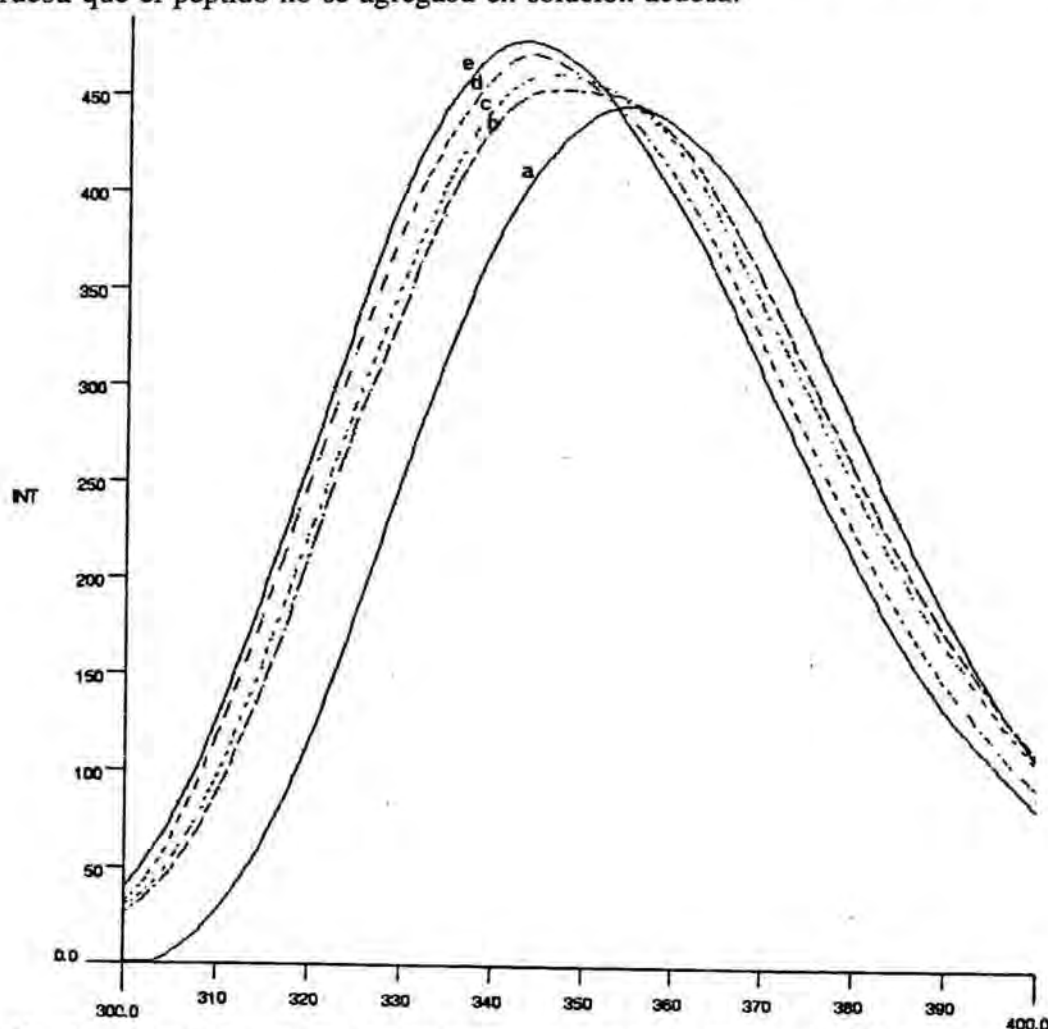


Figura 23: Espectros de fluorescencia representativos (sin corregir) de SRIF ($1.4 \cdot 10^{-6}$ M) en ausencia (a) y en presencia de DPPC-SUV a las relaciones molares DPPC/SRIF: 100:1 (b), 125:1 (c), 250:1 (d) y 500:1 (e). $\lambda_{ex}=280$ nm; temperatura 20°C .

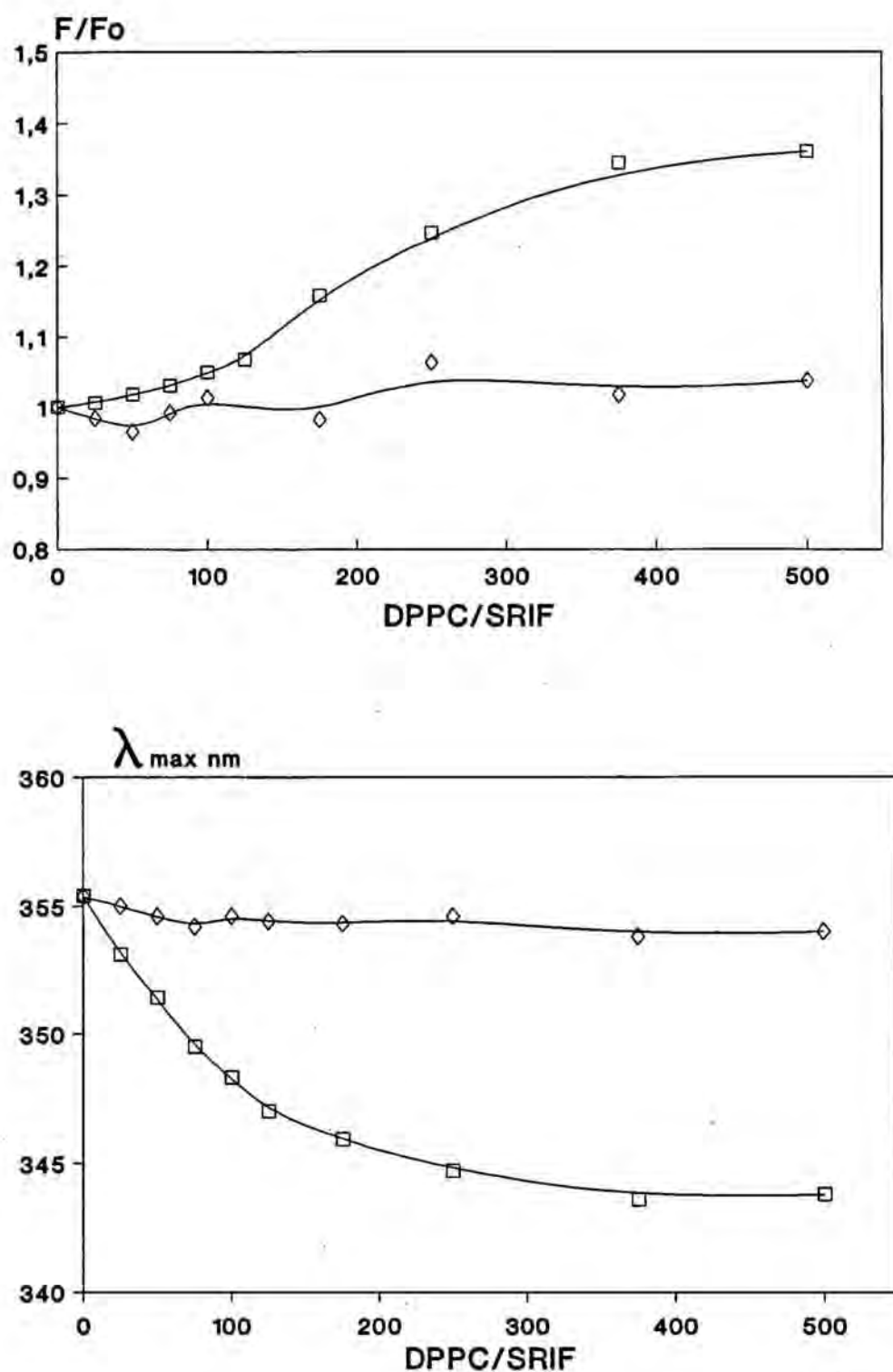


Figura 24: Arriba: Cambios en la intensidad de fluorescencia (F/F_0) de SRIF a 340 nm en función de la relación molar lípido/péptido. Abajo: Cambios en la longitud de onda del máximo de emisión (λ_{em}). Excitación a 280 nm. Concentración de péptido: $1.4 \cdot 10^{-6}$ M. ($\square$) temperatura 20 °C; ($\diamond$) temperatura 50 °C. Cada punto es la media de dos determinaciones.

Interacción con liposomas en estado de cristal líquido

El mismo estudio se llevó a cabo con los liposomas en estado de cristal líquido, realizando el experimento a 50 °C, y los resultados fueron totalmente diferentes. La λ_{em} de SRIF en tampón pH 7.4 a esta temperatura era la misma que a 20 °C (355.6 nm); sin embargo la intensidad de fluorescencia fué menor, hecho que se repitió en todos los péptidos con los que se trabajó y que constituye un fenómeno bastante general (Bashford, 1987).

La adición de liposomas de DPPC a esta temperatura no se tradujo en ninguna modificación en λ_{em} ni en la fluorescencia relativa F/Fo (figura 24).

Para cada adición de liposomas, los incrementos de absorbancia a 280 nm y 340 nm tanto de las cubetas conteniendo tampón acetato y liposomas como de las que además contenían SRIF eran aproximadamente iguales, lo que demuestra que el péptido no inducía agregación de liposomas ni a 20 °C ni a 50 °C.

2.2.2. FLUORESCENCIA DE LA SOMATOSTATINA EN TFE

Para obtener información adicional de los cambios conformacionales inducidos en SRIF al interaccionar con liposomas, se determinaron las propiedades de fluorescencia de este péptido al ir pasando de una solución acuosa a una solución en TFE.

Las mezclas que se emplearon como disolvente fueron tampón acetato pH=7.4/TFE en las proporciones siguientes: 100:0, 75:25, 63:37, 50:50, 22:78 y 3:97. La concentración final de SRIF era siempre de $1.4 \cdot 10^{-6}$ M.

A medida que la proporción de TFE aumentaba, descendía la intensidad de emisión (figuras 25 y 26), de manera que en la mezcla con 97% TFE la fluorescencia era solamente un 45% de la correspondiente a la disolución acuosa. Paralelamente la longitud de onda λ_{em} se desplazaba a valores menores, pasando de 355.6 nm en tampón acetato a 345 nm en solución

al 97% TFE, lo que representa un *blue shift* de 10.6 nm; este desplazamiento se correspondía con el observado en presencia de liposomas DPPC-SUV a una relación molar DPPC/SRIF de 175:1.

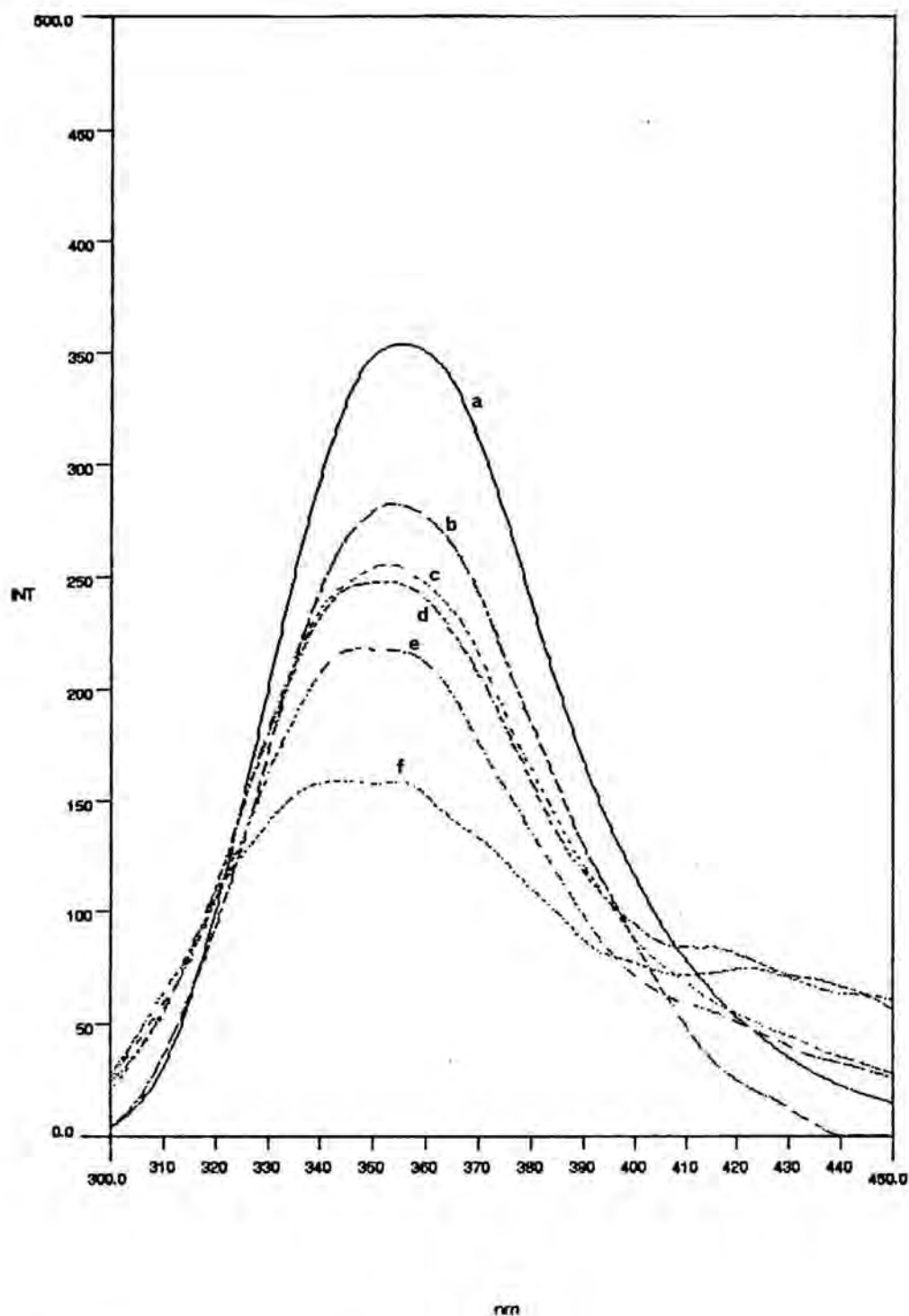


Figura 25: Espectro de fluorescencia de SRIF $1.4 \cdot 10^{-6}$ M en tampón acetato (pH 7.4) (a) y en mezclas de este con diferentes proporciones de TFE: 25% (b), 50% (c), 56% (d), 78% (e) y 97% (f). Excitación 280 nm.

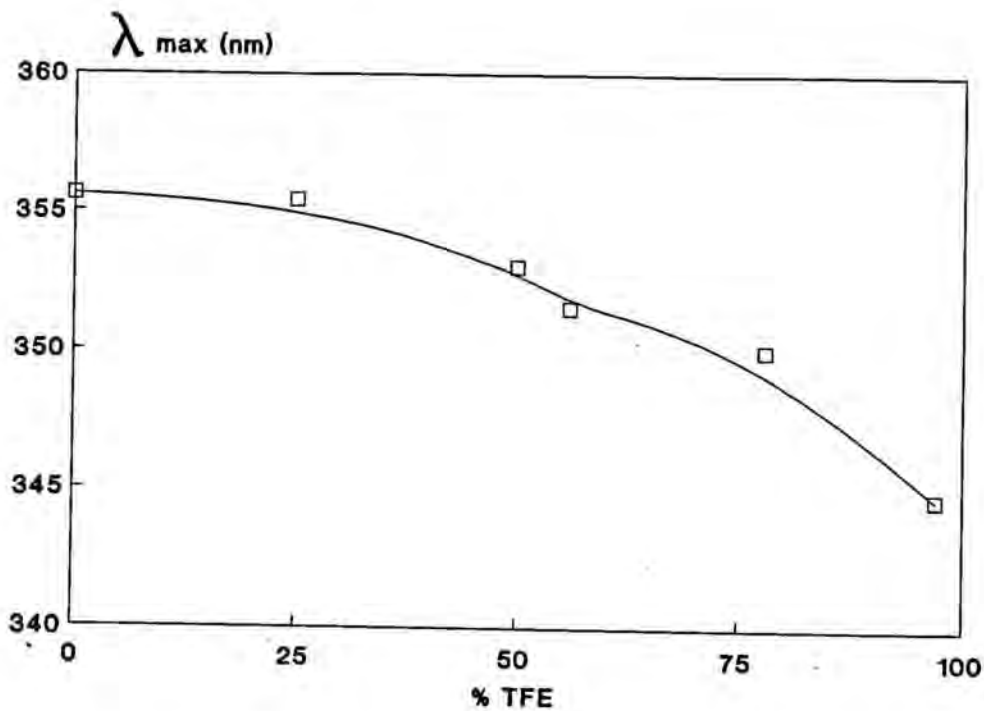
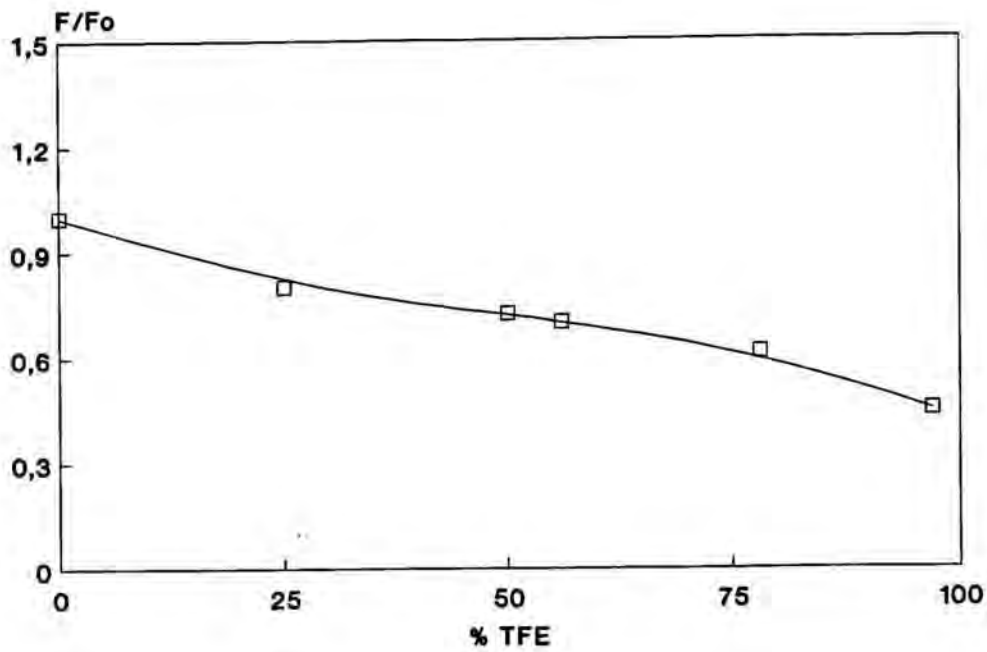


Figura 26: Arriba: Cambios en la intensidad de fluorescencia (F/F_0) de SRIF a 340 nm en función de la proporción de TFE. Abajo: Cambios en la longitud de onda del máximo de emisión (λ_{em}). Excitación a 280 nm. Concentración de péptido: $1.4 \cdot 10^{-6}$ M. Temperatura $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Cada punto es la media de dos determinaciones.

2.2.3. CAMBIOS EN LA FLUORESCENCIA DE LHRH EN PRESENCIA DE LIPOSOMAS UNILAMINARES DE DPPC

Interacción con liposomas en estado de gel

Cuando se adicionaron DPPC-SUVs a una disolución $1.4 \cdot 10^{-6}$ M de LHRH en tampón acetato (pH 7.4) a 20 °C, los valores de fluorescencia relativa F/F_0 a 340 nm fueron muy elevados, incluso superiores a los obtenidos con SRIF ($F/F_0=1.39$ para DPPC/LHRH=500:1). Sin embargo, este valor tan alto de F/F_0 , que en condiciones normales indicaría una importante penetración del péptido en la zona hidrófoba del liposoma, no se encontraba correspondido con un desplazamiento igualmente importante de λ_{em} , ya que éste sólo fue de 2.7 nm como máximo (figura 27). La observación de la fluorescencia de LHRH en tampón (F_0) durante el experimento permitió explicar esta aparente contradicción, ya que F_0 no se mantenía constante, sino que se producía una caída de la intensidad de fluorescencia de hasta un 30% respecto a la inicial al empezar el experimento. Por ello, aunque los valores de fluorescencia en presencia de liposomas corregidos (F) se mantenían constantes, la relación F/F_0 era cada vez mayor. La disminución de F_0 podría ser debida a la agregación de LHRH en solución acuosa. Además, los valores de A_{280} y A_{340} cuando DPPC/LHRH $\geq 125:1$ fueron anormalmente altos si los comparábamos con el blanco de liposomas o los del péptido sólo en tampón acetato, lo que indica que LHRH inducía también la agregación de los liposomas. La λ_{em} de LHRH en tampón fue de 355.4 nm, igual que para la SRIF, es decir que el triptófano se situaba en un entorno polar pero no totalmente expuesto al medio acuoso. Al interaccionar con los liposomas se observó un *blue shift*, siendo λ_{em} de 353 nm cuando DPPC/LHRH=500:1, lo que indica la transferencia del triptófano a un entorno más hidrófobo.

Interacción con liposomas en estado de cristal líquido

A 50 °C los resultados obtenidos fueron sorprendentes (figura 27). En primer lugar, λ_{em} de LHRH en presencia de DPPC-SUV se desplazó a longitudes de onda superiores, lo que se conoce como *red shift*, pasando de 355.6 nm a 360.6 nm (correspondiente al máximo de emisión de la N-acetiltryptofanamida) a DPPC/LHRH=375:1. La variación de λ_{em} respecto

a la relación molar lípido/péptido describía una curva que se saturaba a $\text{DPPC/LHRH} \geq 175:1$.

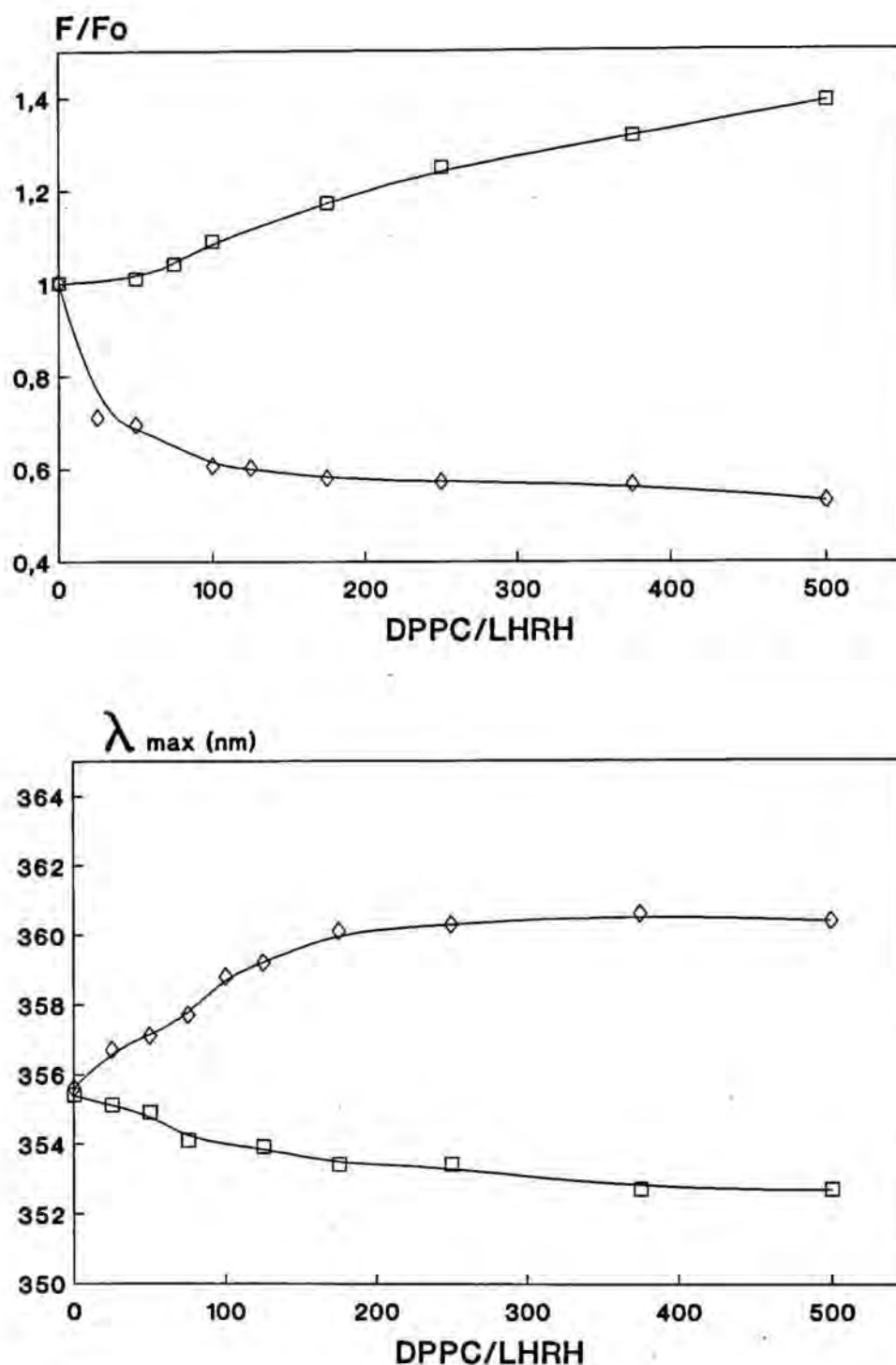


Figura 27: Arriba: Cambios en la intensidad de fluorescencia (F/F_0) de LHRH a 340 nm en función de la relación molar lípido/péptido. Abajo: Cambios en la longitud de onda del máximo de emisión (λ_{em}). Excitación a 280 nm. Concentración de péptido: $1.4 \cdot 10^{-6}$ M. ($\square$) temperatura 20 °C; ($\diamond$) temperatura 50 °C. Cada punto es la media de dos determinaciones.

La variación de λ_{cm} iba acompañada de un importante descenso de la fluorescencia a 340 nm, de manera que F/F_0 llegaba a 0.53 para la relación molar DPPC/LHRH=500:1; la curva descrita se saturaba de forma paralela a la de λ_{cm} . En la figura 28 se muestran algunos espectros representativos. Al contrario de lo que ocurría a 20 °C, los valores de F_0 se mantuvieron constantes, es decir que las moléculas de LHRH no se agregaban, y los aumentos de absorbancia al ir añadiendo liposomas eran similares en los complejos DPPC-LHRH y en los liposomas de la misma concentración en tampón, por lo que tampoco se agregaban los liposomas.

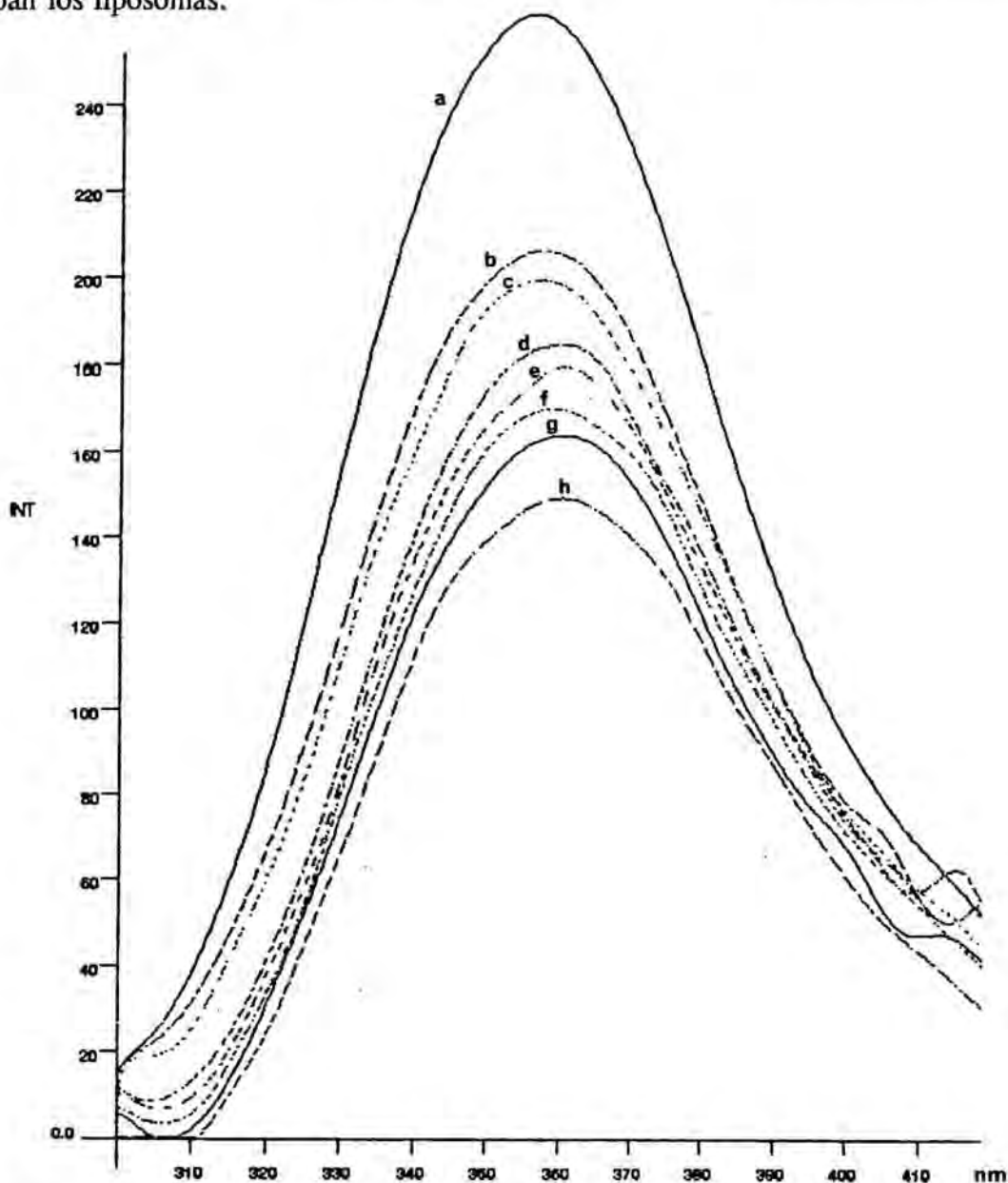


Figura 28: Espectros de fluorescencia de (a) LHRH ($1.4 \cdot 10^{-6}$ M) en tampón acetato pH 7.4, y LHRH incubada con DPPC-SUV (0.027 M) a diferentes relaciones molares DPPC/LHRH: 25:1 (b), 50:1 (c), 100:1 (d), 125:1 (e), 175:1 (f), 250:1 (g), 500:1 (h). Temperatura 50 °C. $\lambda_{ex} = 280$ nm.

2.2.4. FLUORESCENCIA DE LHRH EN TFE

La adición de 2,2,2-trifluoroetanol (TFE), disolvente que mimetiza el entorno lipídico, a una solución acuosa de LHRH de manera que la concentración final de péptido fuese siempre $1.4 \cdot 10^{-6}$ M, inducía la estructuración de la hormona. Como se observa en las figuras 29 y 30, al aumentar la proporción de TFE, el máximo de emisión de fluorescencia del péptido se desplazaba a λ más cortas (*blue shift*), pasando de 355.4 nm en tampón acetato pH 7.4 a 336.5 nm en TFE. Este desplazamiento del máximo de emisión sugiere que en LHRH el residuo de triptófano se situaba en un entorno más hidrófobo.

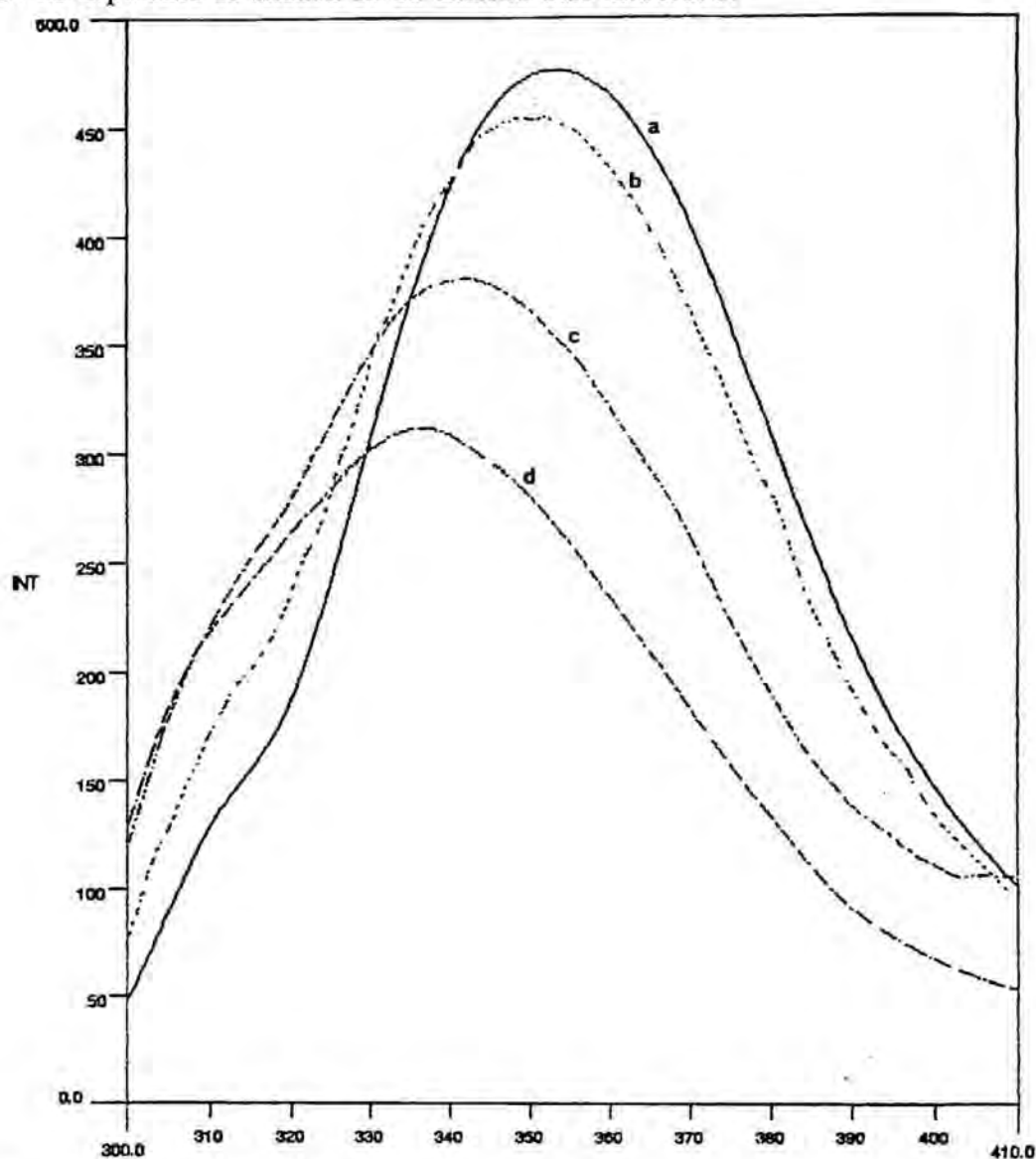


Figura 29: Espectro de fluorescencia de LHRH $1.4 \cdot 10^{-6}$ M en tampón acetato (pH 7.4) (a), en TFE (d), y en mezclas de ambos disolventes con una proporción de TFE de: 25 % (b), 75 % (c). Excitación 280 nm. Temperatura 20 ± 1 °C.

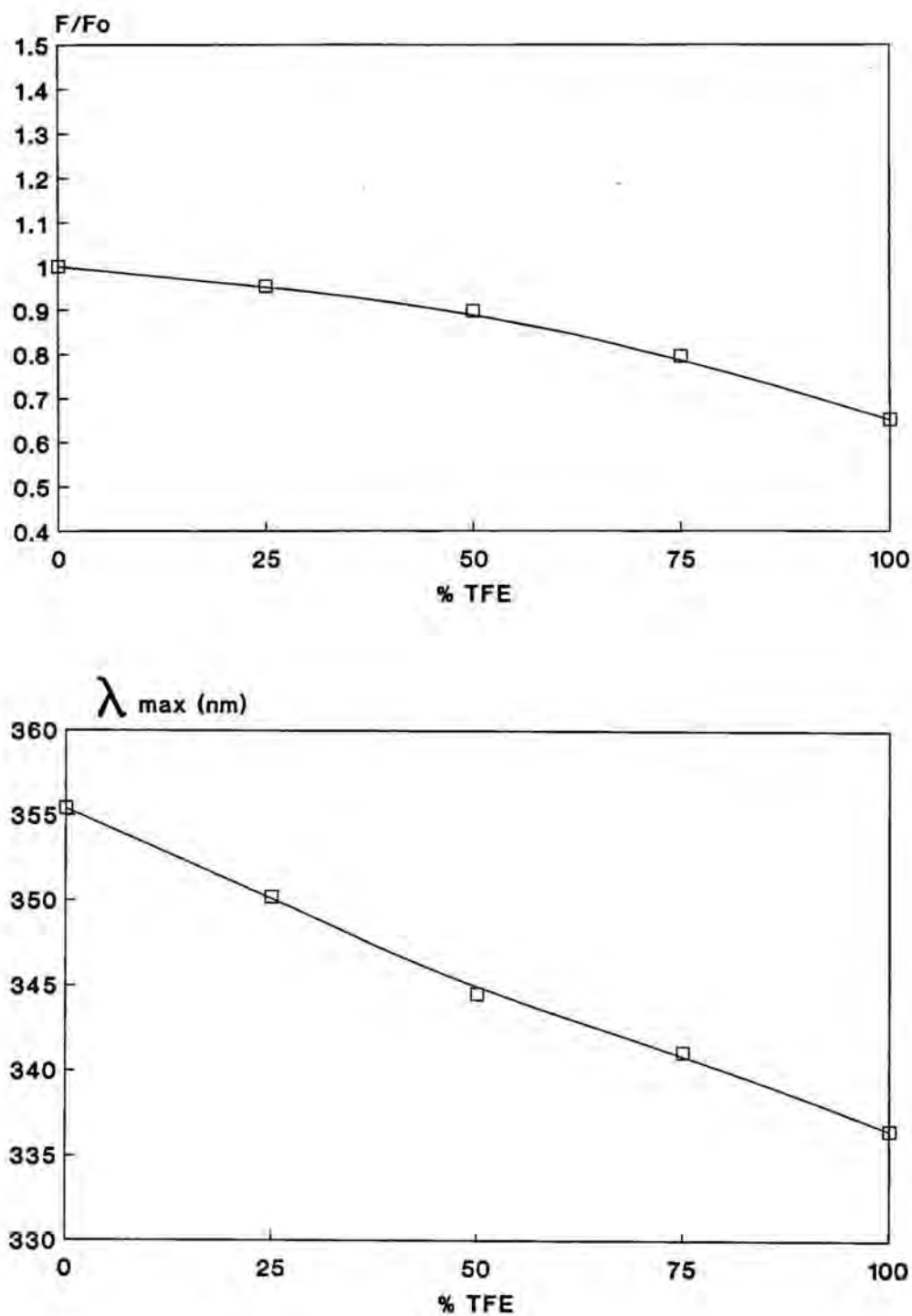


Figura 30: *Arriba:* Cambios en la intensidad de fluorescencia (F/F_o) de LHRH a 340 nm en función de la proporción de TFE. *Abajo:* Cambios en la longitud de onda del máximo de emisión (λ_{em}). Excitación a 280 nm. Concentración de péptido: $1.4 \cdot 10^{-6}$ M. Temperatura 20 ± 1 °C. Cada punto es la media de dos determinaciones.

Asimismo, también se determinó la intensidad de emisión de fluorescencia del residuo de triptófano de LHRH a 340 nm en las diferentes mezclas tampón acetato (pH 7.4)-TFE, observándose una importante disminución de la misma: desde 440 (unidades arbitrarias) en solución acuosa hasta 310.8 en TFE, es decir un descenso del 29%.

2.2.5. CAMBIOS EN LA FLUORESCENCIA DE hGH EN PRESENCIA DE LIPOSOMAS UNILAMINARES DE DPPC

Al excitar a 280 nm una disolución de hGH en tampón acetato (pH 7.4), λ_{em} a 20 °C fue de 339 nm, lo que representa un desplazamiento de 21 nm respecto a la N-acetiltryptofanamida, y de unos 16 nm respecto a LHRH y SRIF. Esto es debido a que hGH es una proteína globular de 191 aminoácidos, y esto hace que el único residuo de triptófano que contiene no esté expuesto al medio, ya que probablemente no se encuentra en la superficie de la proteína, sino que está protegido del medio acuoso por la conformación adoptada por la misma (Lakovicz, 1983a).

La emisión de fluorescencia de hGH a 340 nm permitió apoyar esta hipótesis, ya que resultó ser superior a la que se obtenía para SRIF y LHRH a la misma concentración; esto era debido a que el *quenching* de la fluorescencia del triptófano debido a los enlaces peptídicos al formar puentes de hidrógeno con el agua del medio disminuía o desaparecía en el entorno hidrófobo que representa el interior de la proteína globular. Debido a este hecho fue necesario reducir la rendija de emisión, que pasó de 10 nm a 6 nm (la de excitación se mantuvo en 10 nm); de este modo el espectro de emisión quedaba dentro de los límites de escala del aparato. Por otra parte, se pudieron añadir mayores concentraciones de liposomas, ya que al ser menor la rendija de emisión se reducía considerablemente el efecto de dispersión de la luz (*light scattering*).

No se produjo agregación de la hormona en solución, como se desprende de los valores de absorbancia UV y fluorescencia en solución (F_0), que se mantenían constantes.

Interacción con liposomas en estado de gel

En presencia de liposomas de DPPC (20 °C), se produjo un *blue shift* de 1.7 nm para la relación molar DPPC/hGH=500:1; sin embargo, la curva de λ_{em} respecto a la relación lípido/hormona no alcanzó la saturación en este rango de relaciones molares, tal como se observa en la figura 31; por ello se incrementó la proporción de lípido hasta una relación DPPC/hGH=1375:1; de este modo se alcanzó prácticamente la saturación para las fracciones con DPPC/hGH $\geq$ 1125:1, siendo λ_{em} =335.5 nm (DPPC/hGH=1375), es decir que para ésta relación molar se encontró un *blue shift* de 3.6 nm.

Por otra parte, en lo que se refiere a la intensidad de fluorescencia a 340 nm, únicamente pudo calcularse para relaciones molares lípido:proteína de hasta 500:1, ya que para concentraciones mayores de liposomas las muestras presentaban valores de A_{280} muy altos (superiores a 0.1), por lo que no era correcto aplicar el factor de corrección $\text{antilog}[(A_{280} + A_{340})/2]$.

Para relaciones molares hasta DPPC/hGH=500:1, se produjo un aumento de fluorescencia, con F/Fo de 1.17, sin embargo no se alcanzaba la saturación de la curva. Esto indica que si bien hGH interaccionaba con los liposomas de DPPC, no presentaba una elevada afinidad, ya que se necesitaban proporciones muy elevadas de liposomas para alcanzar la saturación.

Interacción con liposomas en estado de cristal líquido

Por encima de la Tc de DPPC, la hormona del crecimiento no mostró ninguna afinidad por los liposomas, como se pudo deducir de la ausencia de variación en el máximo de emisión y en la fluorescencia a 340 nm (fig. 31). λ_{em} se mantuvo en 339.2 nm, lo que implica que a esta temperatura no se había desnaturalizado la hormona, ya que esto se reflejaría en un *red shift* (desplazamiento de λ_{em} a valores más altos) debido a la exposición del triptófano al medio acuoso (Lakovicz, 1983a).

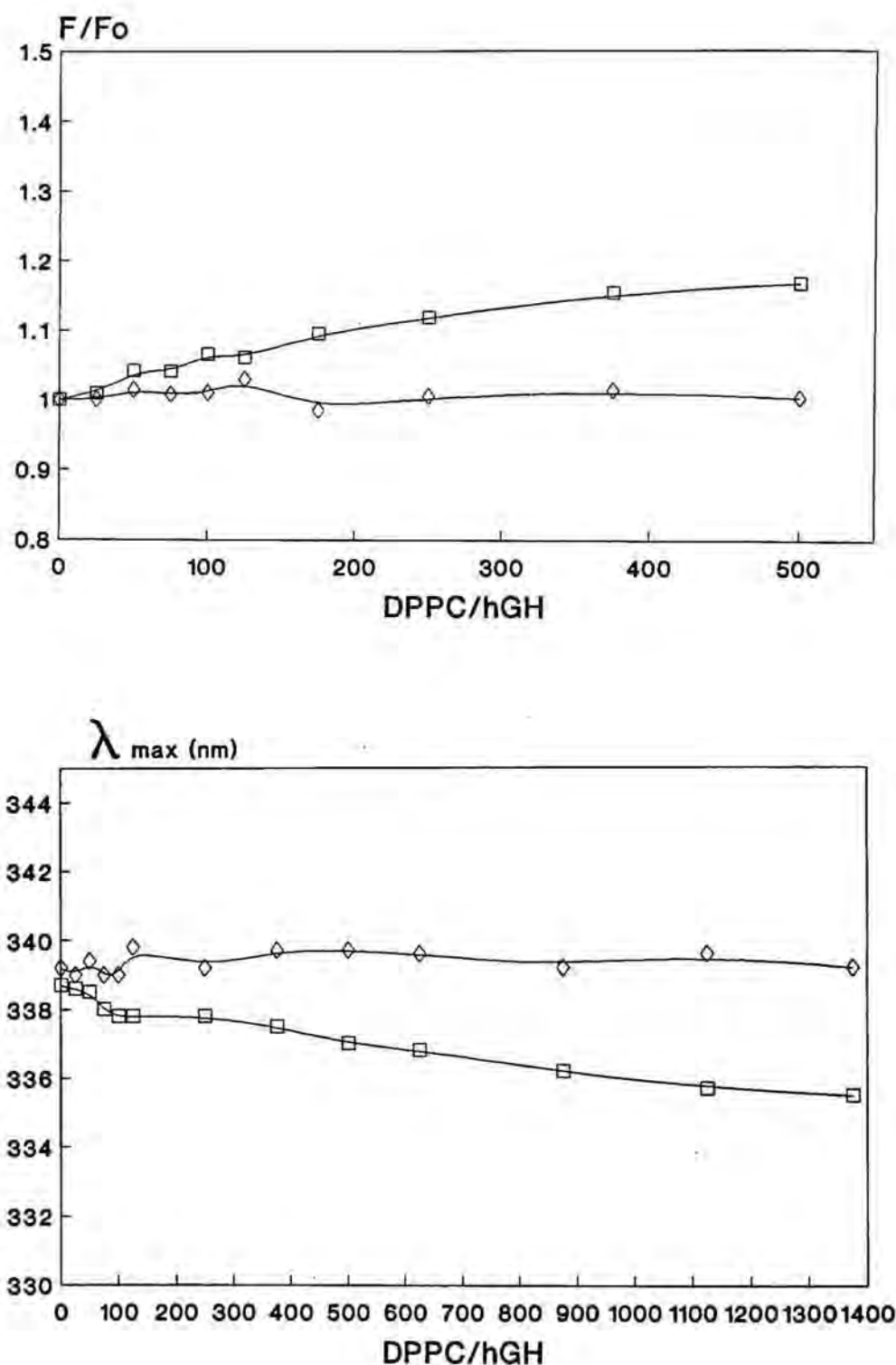


Figura 31: Arriba: Cambios en la intensidad de fluorescencia (F/F_0) de hGH a 340 nm en función de la relación molar lípido/péptido. Abajo: Cambios en la longitud de onda del máximo de emisión (λ_{em}). Excitación a 280 nm. Concentración de péptido: $1.4 \cdot 10^{-6}$ M. ($\square$) temperatura 20 °C; ($\diamond$) temperatura 50 °C. Cada punto es la media de dos determinaciones.

2.2.6. CAMBIOS EN LA FLUORESCENCIA DE GHRH(1-29) EN PRESENCIA DE LIPOSOMAS UNILAMINARES DE DPPC

Un caso diferente a los descritos hasta el momento es el de GHRH(1-29), hormona peptídica de 29 aminoácidos que no tiene triptófano en su estructura. El espectro de emisión ($\lambda_{ex} = 280$ nm) para una solución $1.4 \cdot 10^{-6}$ M de la hormona en tampón acetato (pH 7.4) se muestra en la figura 32. Para estudiar la interacción de esta hormona con DPPC-SUVs se monitorizó la fluorescencia de los residuos de tirosina, en posiciones 1 y 10 de la cadena peptídica.

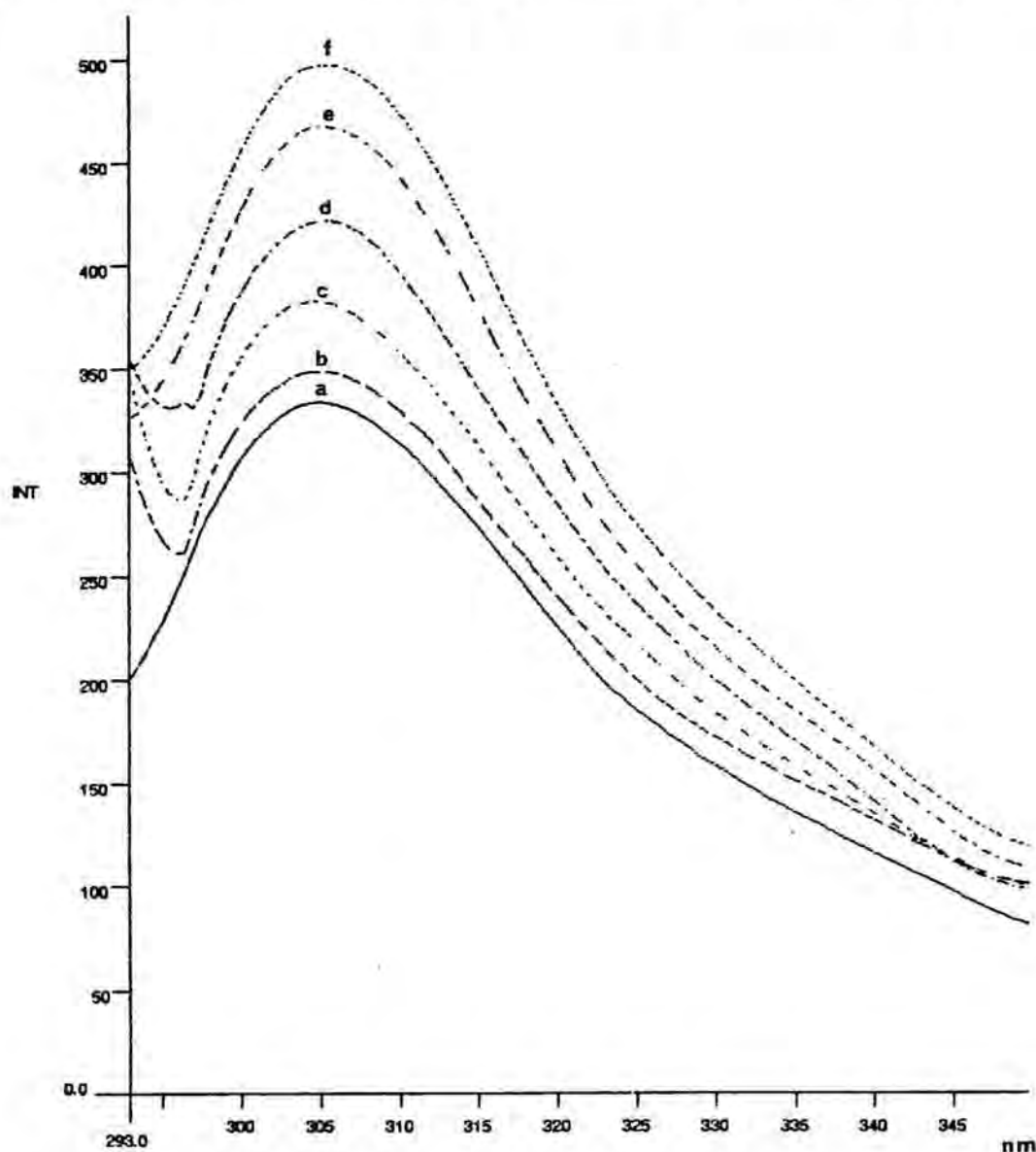


Figura 32: Espectro de fluorescencia de GHRH(1-29) ($1.4 \cdot 10^{-6}$ M) en tampón acetato pH 7.4 (a), y en presencia de liposomas DPPC-SUV (0.027M) a diferentes relaciones molares DPPC/GHRH(1-29): 16:1 (b), 32:1 (c), 54:1 (d), 77:1 (e) y 100:1 (f). Excitación: 280 nm. Temperatura 20 °C.

GHRH(1-29) interaccionó fuertemente con los liposomas en estado de gel, produciéndose un importante incremento en la fluorescencia a 305 nm (máximo de emisión de la tirosina), de forma que $F/F_0 = 2.54$ (340 nm) para la relación molar DPPC/GHRH(1-29) = 190:1 (figura 33); la saturación se alcanzó para relaciones molares DPPC/GHRH muy bajas, concretamente a partir de 158:1, lo que representa una proporción de liposomas marcadamente inferior a la necesaria para la saturación de LHRH, SRIF y sobre todo hGH.

Con liposomas en estado de cristal líquido, GHRH(1-29) interaccionaba muy poco, produciéndose un aumento de fluorescencia a 305 nm de tan sólo un 10%.

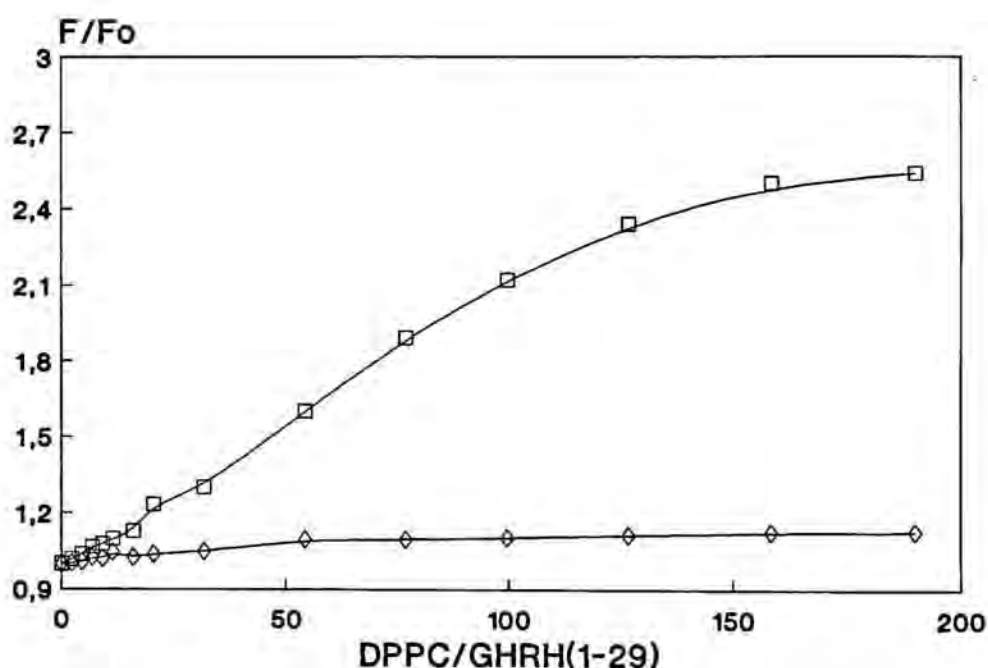


Figura 33: Cambios en la intensidad de fluorescencia (F/F_0) de GHRH(1-29) a 305 nm en función de la relación molar lípido/péptido. Concentración de péptido: $1.4 \cdot 10^{-6}$ M. (□) temperatura 20 °C; (◇) temperatura 50 °C. Cada punto es la media de dos determinaciones.

2.2.7. FLUORESCENCIA DE GHRH(1-29) EN TFE

Se monitorizó la fluorescencia de GHRH(1-29) en solución acuosa conteniendo distintas proporciones de TFE, con el fin de determinar si existía algún paralelismo con el comportamiento de este péptido en liposomas. Se prepararon soluciones de GHRH(1-29) de concentración $1.4 \cdot 10^{-6}$ M en mezclas de tampón acetato pH=7.4 y TFE a las siguientes proporciones de ambos disolventes: 100:0, 90:10, 70:30, 40:60 y 3:97. Puesto que la fluorescencia de esta hormona viene determinada por los dos residuos de tirosina, λ_{em} no variaba al adicionar TFE, ya que, como se ha indicado anteriormente, la posición del máximo de emisión de la tirosina no es sensible a la polaridad del entorno. Sin embargo sí se producía un aumento en la intensidad de fluorescencia de hasta el 175% ($F/F_0=2.75$) en solución al 97% TFE (figura 34), mientras que en presencia de liposomas SUV-DPPC el incremento de fluorescencia alcanzaba el máximo a DPPC/GHRH=190:1, con $F/F_0=2.54$, valor comparable al obtenido en 97% TFE. Esto nos indica que la conformación adoptada por GHRH(1-29) era la misma en los dos casos.

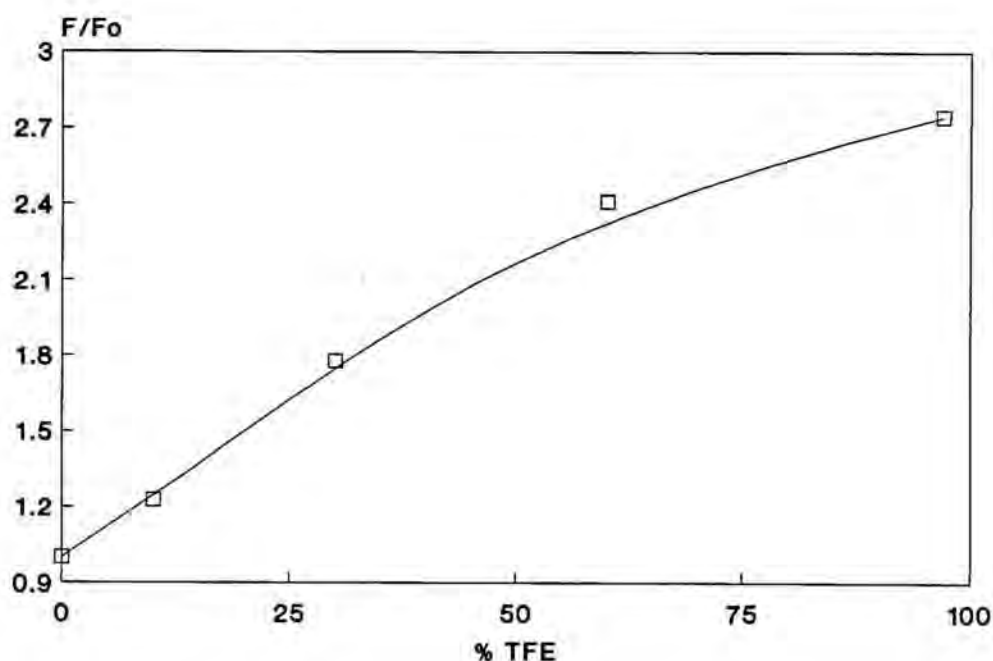


Figura 34: Cambios en la intensidad de fluorescencia (F/F_0) de GHRH(1-29) a 305 nm en función de la proporción de TFE. Excitación a 280 nm. Concentración de péptido: $1.4 \cdot 10^{-6}$ M. Temperatura $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Cada punto es la media de dos determinaciones.

2.3. CAMBIOS EN LA FLUIDEZ DE LOS LIPOSOMAS INDUCIDOS POR LAS HORMONAS PEPTIDICAS

Los estudios de fluorescencia de las hormonas peptídicas basados en la fluorescencia intrínseca debida a los residuos de triptófano y tirosina que se han expuesto en el apartado anterior, proporcionaban información sobre los cambios conformacionales que se producían en dichas hormonas al interaccionar con liposomas. Sin embargo, otra consecuencia de la interacción péptido-lípido podrían ser modificaciones en el estado de ordenación de los liposomas. Para detectar estos posibles cambios se utilizaron liposomas unilaminares pequeños de DPPC marcados con ácido 8-anilino-1-naftalensulfónico (ANS) o con 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH). Puesto que la polarización de la fluorescencia es altamente dependiente de la viscosidad de la bicapa lipídica a la que está ligado el fluoróforo, estudiando la despolarización* de estos marcadores incorporados en liposomas al ir aumentando la temperatura se pudo evaluar la fluidez de las bicapas tanto en estado de gel (a temperaturas por debajo de T_c) como de cristal líquido (a temperaturas superiores a la T_c) y en dos zonas diferenciadas de la bicapa: la hidrófoba, formada por las cadenas hidrocarbonadas de ácido palmítico, donde se concentra el DPH, y la hidrófila, constituida por las cabezas polares de la fosfatidilcolina, donde se sitúa el ANS (Joshi et al., 1989). Comparando la variación de la polarización en presencia del péptido con esta misma magnitud en liposomas puros, fue posible deducir con que zona del liposoma interaccionaba preferentemente la hormona.

Puesto que la incorporación de ANS ó DPH a las bicapas lipídicas es altamente dependiente de las características fisicoquímicas del lípido constituyente de los liposomas, se procedió en primer lugar a determinar las proporciones necesarias de fluoróforo en el caso de los liposomas DPPC-SUV, para trabajar en condiciones de saturación.

2.3.1. SATURACION DE LOS LIPOSOMAS DPPC-SUV CON ANS

Se marcaron liposomas SUV-DPPC con ANS en varias proporciones molares y se determinó

*La polarización (P) se calculó aplicando la fórmula $P = (I_{vv} - G \cdot I_{vh}) / (I_{vv} + G \cdot I_{vh})$, donde I_{vv} y I_{vh} son las intensidades de emisión de fluorescencia medidas paralela y perpendicularmente respecto al plano vertical de polarización de la luz de excitación, y $G = I_{hv} / I_{hh}$ es un factor para la corrección de posibles diferencias de transmisión de los polarizadores

la intensidad de fluorescencia según se describe en el apartado 2.9.3.2.1 de Métodos.

El incremento de fluorescencia en función de la proporción de ANS se muestra en la figura 35. Como se puede apreciar, para saturar los liposomas con ANS eran necesarias proporciones molares ANS/DPPC superiores a $30 \cdot 10^{-4}$, es decir $\text{DPPC/ANS} \leq 333$.

Finalmente, se seleccionó la relación $\text{DPPC/ANS} = 300:1$, proporción que coincide con los resultados de Bashford et al. (1976), como adecuada para el marcaje de liposomas unilaminares de DPPC.

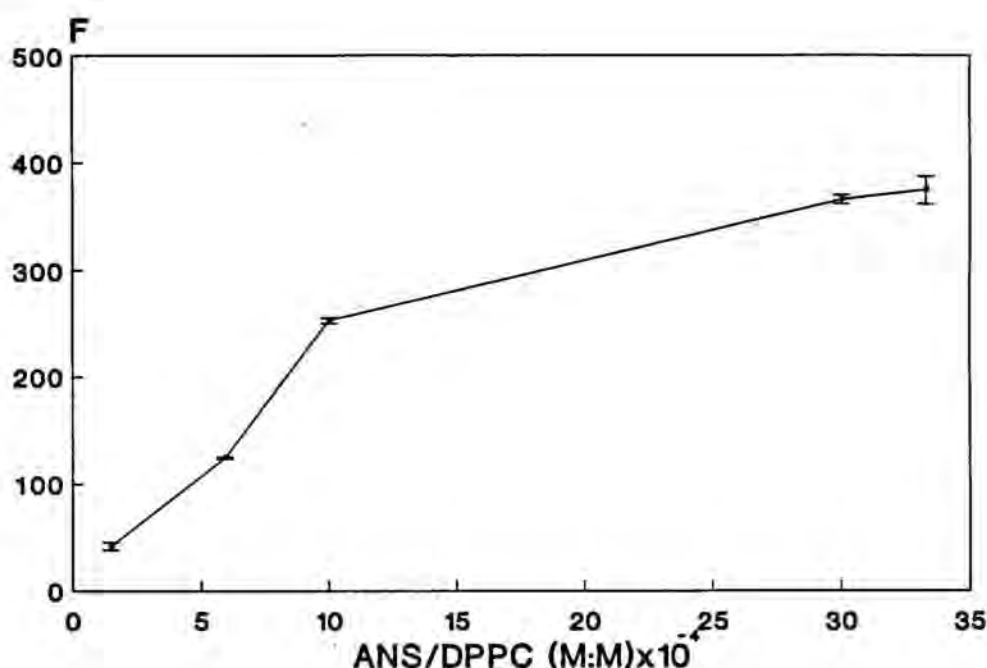


Figura 35: Saturación de liposomas SUV de DPPC (0.027 M) con ANS. Excitación: 380 nm; emisión: 480 nm. Los resultados son la media de tres experimentos con la correspondiente desviación estándar.

2.3.2. SATURACION DE LIPOSOMAS DPPC-SUV CON DPH

Los liposomas SUV de DPPC (0.027M) alcanzaron la saturación con cantidades muy bajas de DPH. Tal como se observa en la figura 36, a relaciones molares DPH/DPPC superiores o iguales a $5.95 \cdot 10^{-4}$ la intensidad de fluorescencia se mantenía constante. Para el marcaje de los liposomas se optó por una relación molar $\text{DPPC/DPH} = 540:1$. En estas condiciones los

DPPC-SUV se encontraban totalmente saturados con marcador fluorescente.

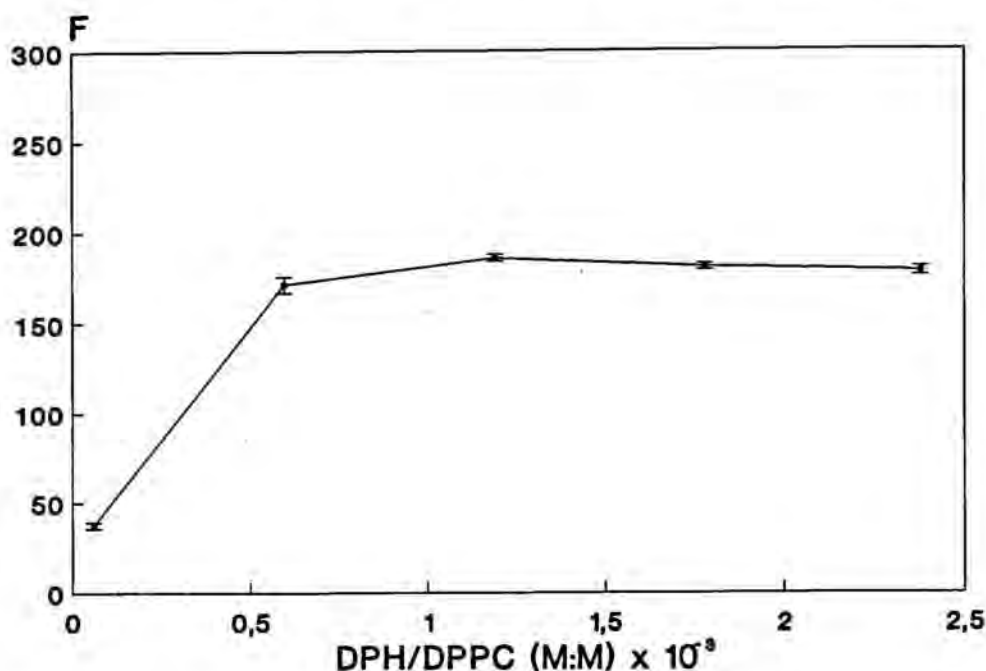


Figura 36: Saturación de liposomas SUV de DPPC (0.027M) con DPH. Excitación: 365 nm; emisión: 425 nm. Los resultados son la media de tres experimentos con la correspondiente desviación estándar.

2.3.3. CORRECCION DE LA POLARIZACION

Cuando se efectúan medidas de polarización en soluciones turbias, puede ocurrir que se produzca la dispersión del haz de luz polarizada incidente o de excitación, lo que resulta en un incremento erróneo de la polarización. En estos casos debe corregirse de la contribución de la luz dispersada a la polarización (Shinitzky et al., 1971; Thulborn y Sawyer, 1978), aplicando la fórmula:

$$P = \frac{(I_{vv} - I_{vv}^*) - G (I_{vh} - I_{vh}^*)}{(I_{vv} - I_{vv}^*) + G (I_{vh} - I_{vh}^*)}$$

Donde I_{vv}^* y I_{vh}^* son los componentes vertical y horizontal de la luz emitida para una preparación sin marcador fluorescente.

Para determinar si esto ocurría en el caso de los liposomas marcados (ya sea con DPH o con ANS), se hizo simultáneamente el mismo experimento de cálculo de variación de P respecto a la temperatura en dos preparaciones liposómicas: una marcada con la sonda fluorescente y

la otra sin marcar. Se calculó I_{vv} , I_{vh} , I_{vv}^* , I_{vh}^* y G , y a partir de estos valores de intensidad de fluorescencia se calculó la polarización sin corregir y corregida para cada temperatura. Las curvas de despolarización así obtenidas se superponían, ya que las intensidades de fluorescencia I_{vv}^* y I_{vh}^* eran muy bajas, de manera que no era necesaria la corrección.

2.3.4. AJUSTE DE LAS CURVAS DE DESPOLARIZACION DEL DPH

Las gráficas de variación de polarización (P) de liposomas marcados con DPH se ajustaron por regresión no lineal a curvas sigmoides en escala logarítmica con la ecuación siguiente

$$Y = A + \frac{B - A}{1 + \frac{(10^X)^D}{(10^C)^D}}$$

Donde:

X es el logaritmo de la temperatura

Y es la polarización (P)

A es el valor más bajo de P

B es el valor más alto de P

C es el valor de X (log T) en el punto de inflexión de la curva

D es el "coeficiente de Hill" o factor de pendiente.

A partir del valor de C se calculó la temperatura de transición (T_c), ya que $C = \text{antilog } T_c$. La bondad del ajuste se juzgó según el valor de la raíz cuadrada de SS/df , siendo SS la suma de cuadrados y df los grados de libertad. A partir de las curvas de primera derivada de las sigmoides ajustadas, se determinaron los cambios en la amplitud del proceso de transición.

2.3.5. INFLUENCIA DE SOMATOSTATINA EN LA FLUIDEZ DE LOS LIPOSOMAS

Cuando la concentración de SRIF ensayada fue $1.4 \cdot 10^{-6}$ M, lo que significa una relación molar DPPC/SRIF de 125:1, no se produjo ningún cambio en la fluidez de los liposomas de DPPC a pesar de que en los estudios de fluorescencia del triptófano se había detectado un elevado grado de interacción a esta relación molar (apartado 2.2.1). Sin embargo, en las determinaciones de polarización lo que se monitoriza es la fluorescencia del liposoma

marcado, y no la del péptido, por lo que se pensó que aumentando la proporción de péptido podría apreciarse mejor cualquier efecto. Por ello se preparó solución de SRIF 4×10^{-6} M, de manera que la relación molar DPPC/SRIF era 44:1.

Sin embargo, en estas nuevas condiciones SRIF tampoco produjo ningún cambio significativo en la fluidez del liposoma a nivel de la superficie en todo el rango de temperaturas ensayado (18 °C a 55 °C), como se observa en la figura 37. Las curvas de despolarización de los liposomas marcados con ANS en presencia de SRIF y sin este péptido en el medio se superponían totalmente, y aplicando el test *t* de Student no se observaron diferencias significativas en ningún caso ($p > 0.05$).

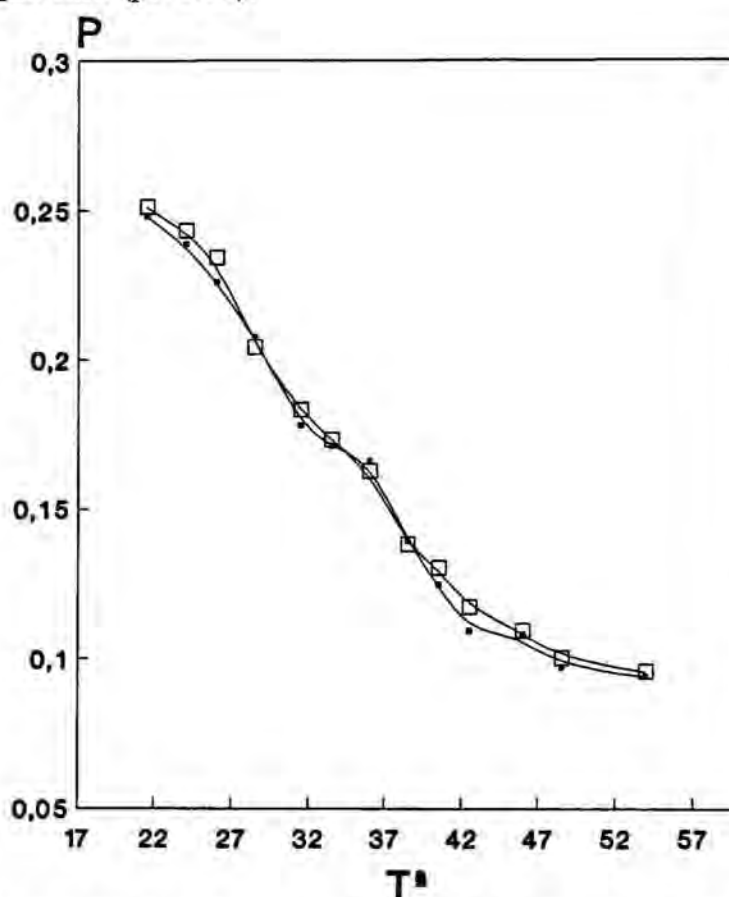


Figura 37: Variación de la polarización de fluorescencia (P) de SUV-DPPC marcados con ANS. (■) SUV-DPPC; (□) SUV-DPPC con SRIF, relación molar 44:1.

Por otra parte, esta hormona sí alteraba la polarización del DPH a partir de 38 °C (figura 38), temperatura muy próxima a la T_c . La polarización era significativamente más alta en presencia de SRIF por encima de la T_c ($p < 0.01$), de lo que se deduce que esta hormona se intercalaba en la zona apolar de los liposomas causando un aumento en la rigidez de los

fosfolípidos y por tanto reduciendo la fluidez de la bicapa.

Por otra parte, de los ajustes por regresión no lineal se obtuvo una de $T_c=41.0\pm0.2$ para el blanco de liposomas de DPPC que pasó a ser 42.0 ± 0.3 en presencia de SRIF; sin embargo, la amplitud del proceso de cambio de fase era la misma, como se deduce de los gráficos de primera derivada de las sigmoides ajustadas. Los parámetros obtenidos en el ajuste se muestran en la tabla 4.

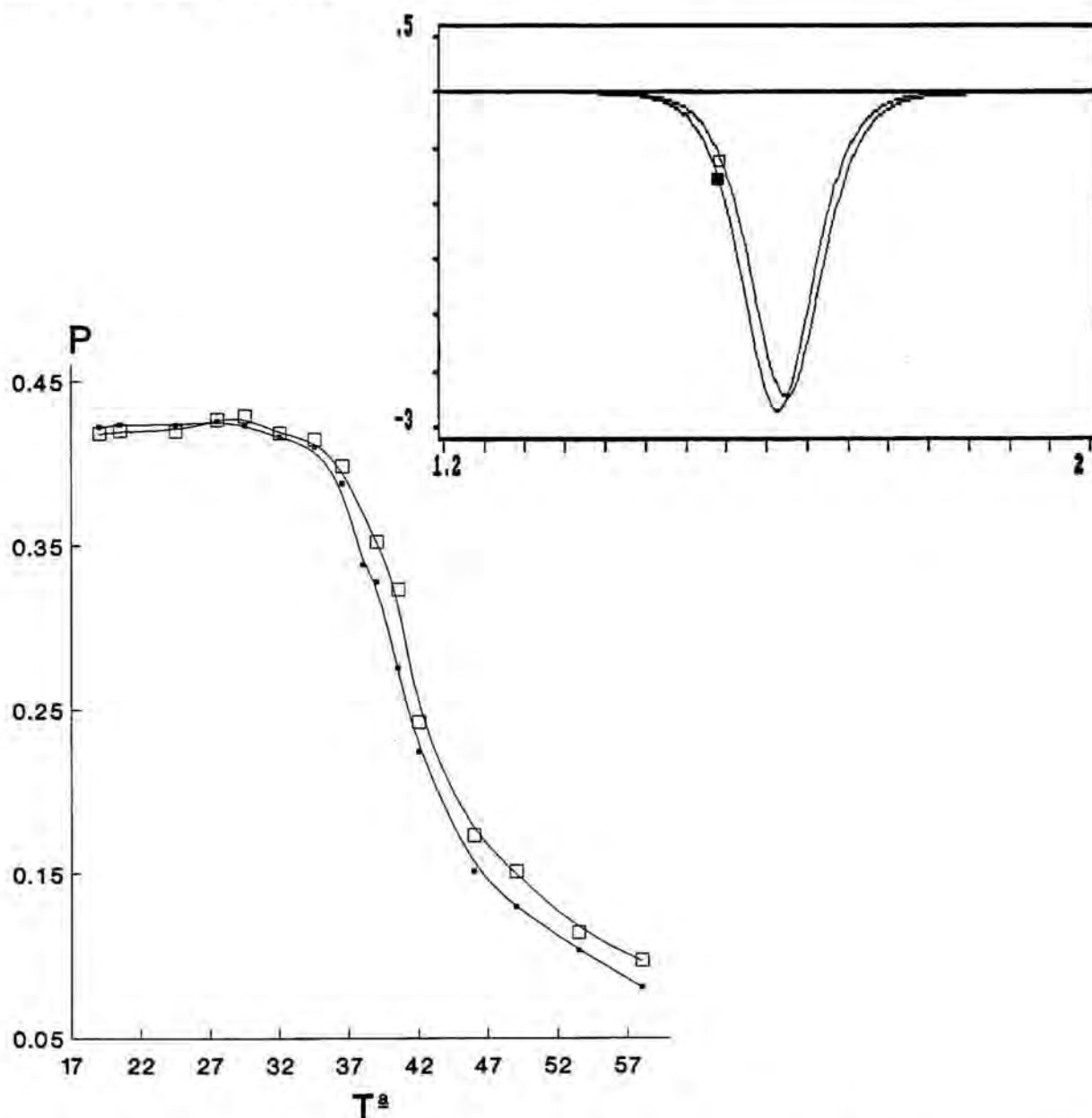


Figura 38: Variación de la polarización de fluorescencia (P) de SUV-DPPC marcados con DPH y análisis de primera derivada de las curvas ajustadas. (■) SUV-DPPC; (□) SUV-DPPC con SRIF, relación molar 44:1. Cada punto es la media de un mínimo de tres determinaciones.

Parámetros	Control de liposomas	Liposomas + SRIF
A	$0.0939378 \pm 6.213 \cdot 10^{-3}$	$0.1058698 \pm 9.284 \cdot 10^{-3}$
B	$0.4255468 \pm 3.359 \cdot 10^{-3}$	$0.4241871 \pm 4.793 \cdot 10^{-3}$
C	$1.613767 \pm 2.289 \cdot 10^{-3}$	$1.62293 \pm 3.595 \cdot 10^{-3}$
D	-14.89185 ± 1.061652	-14.90186 ± 1.527757
SS	$8.326 \cdot 10^{-4}$	$1.605 \cdot 10^{-3}$
df	12	12

Tabla 4: Parámetros que definen las curvas de despolarización de SUV-DPPC marcados con DPH en tampón acetato pH 7.4 (control de liposomas) y en solución de SRIF $4 \cdot 10^{-6}$ M. Relación molar DPPC/SRIF=44:1. El significado de estos parámetros se especifica en el apartado 2.3.4. de Resultados.

2.3.6. INFLUENCIA DE LHRH EN LA FLUIDEZ DE LOS LIPOSOMAS

En presencia de LHRH, los liposomas DPPC-SUV no experimentaron ninguna alteración en sus propiedades termotrópicas tanto si la relación molar de DPPC respecto a LHRH era de 125:1 como si era de 44:1.

LHRH no perturbó el empaquetamiento de las cadenas de ácido graso en las bicapas de DPPC, ya que la polarización de los liposomas con DPH no variaba significativamente al añadir esta hormona (fig. 39); asimismo, tampoco se modificó la T_c , que era de 40.9 ± 0.2 para el blanco de liposomas, y de 41.2 ± 0.2 en presencia de LHRH. Los parámetros que definen las curvas de despolarización se muestran en la tabla 5. La amplitud del proceso de transición de fase de gel a cristal líquido no resultó afectado, ya que los análisis de primera derivada de los gráficos de despolarización eran perfectamente superponibles.

Por otra parte, como puede observarse en la figura 40, LHRH tampoco alteró la fluidez de los liposomas a nivel de superficie polar (monitorizada mediante el ANS).

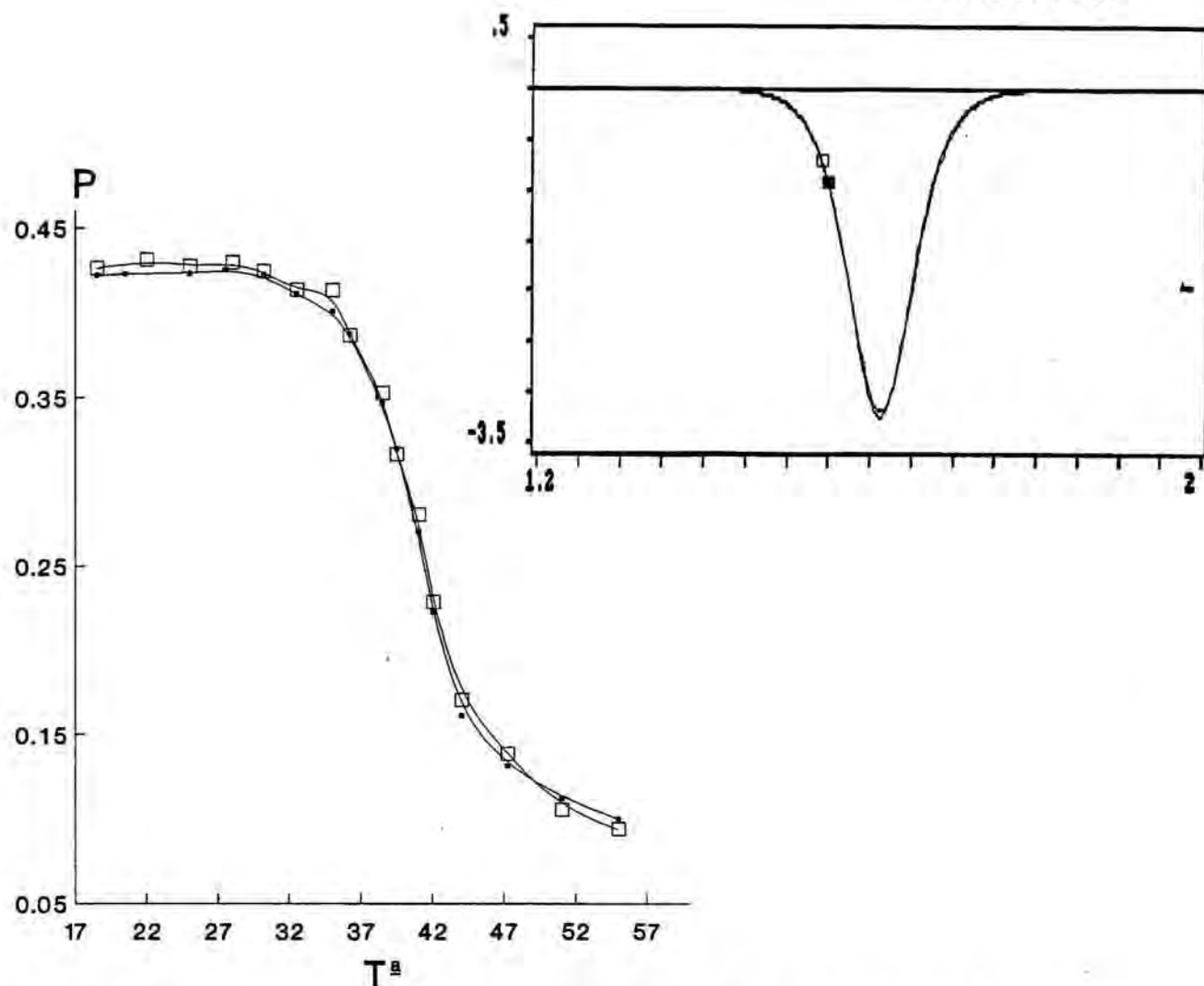


Figura 39: Variación de la polarización de fluorescencia (P) de SUV-DPPC marcados con DPH y análisis de primera derivada de las curvas ajustadas, (■) SUV-DPPC; (□) SUV-DPPC con LHRH, relación molar 44:1. Cada punto es la media de un mínimo de tres determinaciones.

Parámetros	Control de liposomas	Liposomas + LHRH
A	$0.1001901 \pm 6.517 \cdot 10^{-3}$	$0.0954100 \pm 6.329 \cdot 10^{-3}$
B	$0.4299706 \pm 3.625 \cdot 10^{-3}$	$0.4291216 \pm 3.350 \cdot 10^{-3}$
C	$1.611471 \pm 1.924 \cdot 10^{-3}$	$1.614715 \pm 1.856 \cdot 10^{-3}$
D	-17.14711 ± 1.245525	-16.58998 ± 1.116646
SS	$8.999 \cdot 10^{-4}$	$7.678 \cdot 10^{-4}$
df	12	12

Tabla 5: Parámetros que definen las curvas de despolarización de SUV-DPPC marcados con DPH en tampón acetato pH 7.4 (control de liposomas) y en solución de LHRH $4 \cdot 10^{-6}$ M. Relación molar DPPC/LHRH=44:1. El significado de estos parámetros estadísticos se especifica en el apartado 2.3.4. de este capítulo.

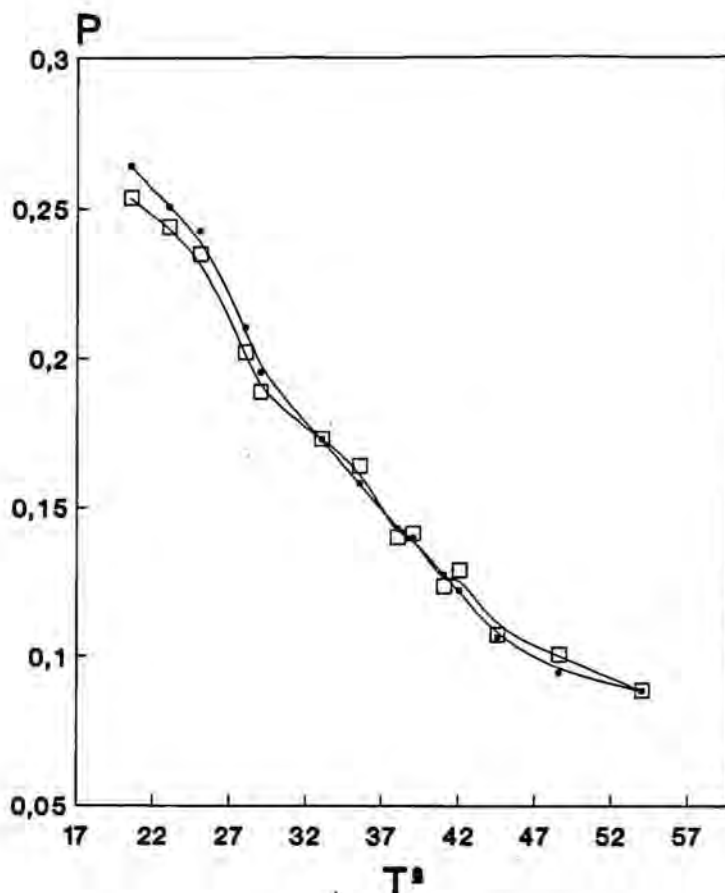


Figura 40: Variación de la polarización de fluorescencia (P) de SUV-DPPC marcados con ANS. (●) SUV-DPPC; (□) SUV-DPPC con LHRH, relación molar 44:1. Cada punto es la media de un mínimo de tres determinaciones.

2.3.7. INFLUENCIA DE hGH EN LA FLUIDEZ DE LOS LIPOSOMAS

La presencia de hGH modificó la transición de fase de los liposomas SUV-DPPC de manera más acusada a nivel de las cabezas polares de los fosfolípidos. En la figura 42 se observa que la presencia de esta hormona el medio causaba un incremento de la polarización del sistema DPPC-ANS, fenómeno que era más acusado a temperaturas superiores a 25°C. El efecto era máximo en el intervalo de temperaturas alrededor de la T_c (41°C). Esto significa que hGH ejercía un efecto rigidificante en esta zona del liposoma.

Sin embargo, la polarización del DPH no se modificó de manera significativa (fig. 41), lo cual es indicativo de ausencia de interacción en la zona hidrófoba del liposoma. Del ajuste de las curvas de despolarización se dedujo que la T_c no resultaba afectada en presencia de hGH (relación molar DPPC/hGH 44:1): T_c (blanco) = 41.1 ± 0.2 , y T_c (hGH) = 41.0 ± 0.2 (tabla 6).

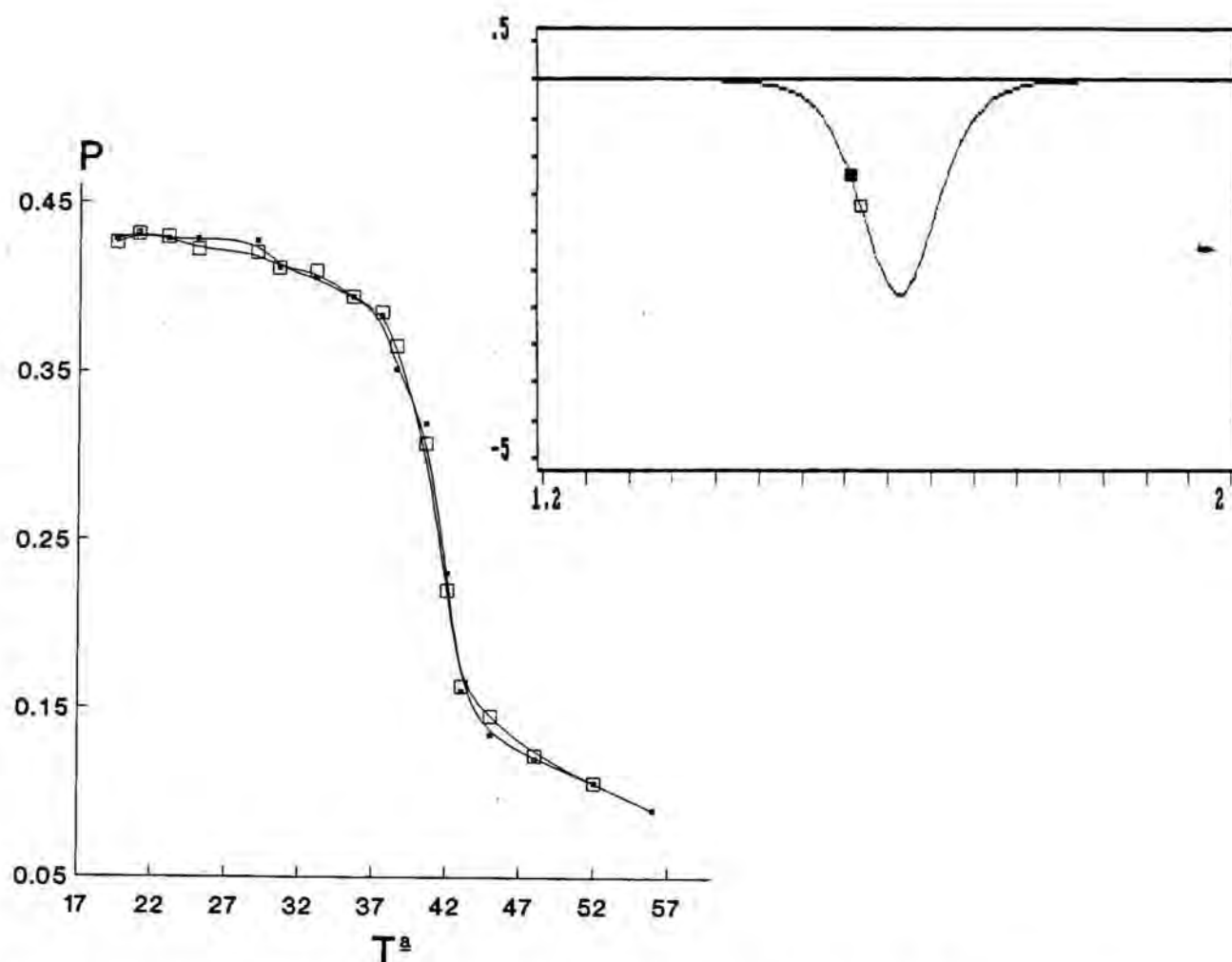


Figura 41: Variación de la polarización de fluorescencia (P) de SUV-DPPC marcados con DPH y análisis de primera derivada de las curvas ajustadas. (■) SUV-DPPC; (□) SUV-DPPC con hGH, relación molar 44:1. Cada punto es la media de un mínimo de tres determinaciones.

Parámetros	Control de liposomas	Liposomas + hGH
A	$0.0939378 \pm 6.213 \cdot 10^{-3}$	$0.1100713 \pm 8.900 \cdot 10^{-3}$
B	$0.4255468 \pm 3.539 \cdot 10^{-3}$	$0.4187035 \pm 4.337 \cdot 10^{-3}$
C	$1.613767 \pm 2.289 \cdot 10^{-3}$	$1.612781 \pm 2.488 \cdot 10^{-3}$
D	-14.89185 ± 1.061652	-15.56927 ± 2.882692
SS	$8.326 \cdot 10^{-4}$	$1.563 \cdot 10^{-3}$
df	12	11

Tabla 6: Parámetros que definen las curvas de despolarización de SUV-DPPC marcados con DPH en tampón acetato pH 7.4 (control de liposomas) y en solución de hGH $4 \cdot 10^{-6}$ M. Relación molar DPPC/hGH=44:1. El significado de estos parámetros estadísticos se especifica en el apartado 2.3.4. de este capítulo.

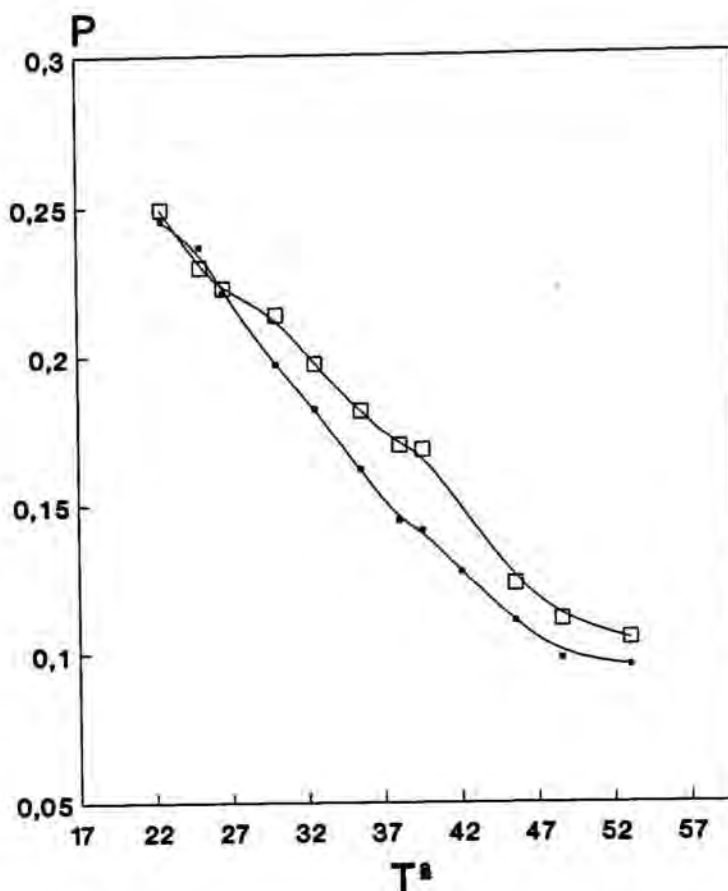


Figura 42: Variación de la polarización de fluorescencia (P) de SUV-DPPC marcados con ANS. (■) SUV-DPPC; (□) SUV-DPPC con hGH, relación molar 44:1. Cada punto es la media de un mínimo de tres determinaciones..

Estos resultados se interpretan como una penetración de hGH en la zona superficial delimitada por los grupos de fosfatidilcolina.

2.3.8. INFLUENCIA DE GHRH(1-29) EN LA FLUIDEZ DE LOS LIPOSOMAS

Esta hormona produjo cambios importantes en las características de la transición de fase de gel a cristal líquido de DPPC-SUVs. En los sistemas de liposomas marcados con ANS, GHRH(1-29) causó un incremento de polarización significativo ($p < 0.05$) (fig. 43) a temperaturas inferiores a la T_c (a 38 °C en el blanco $P = 0.145 \pm 5 \cdot 10^{-4}$, y con GHRH $P = 0.165 \pm 5 \cdot 10^{-3}$) mientras que una vez superada la temperatura de transición, los valores de P fueron los mismos que en el blanco. Esto nos indica que el péptido ejercía un efecto de

disminución de la fluidez en el dominio hidrófilo determinado por las cabezas polares de fosfatidilcolina únicamente cuando los liposomas están en estado de gel.

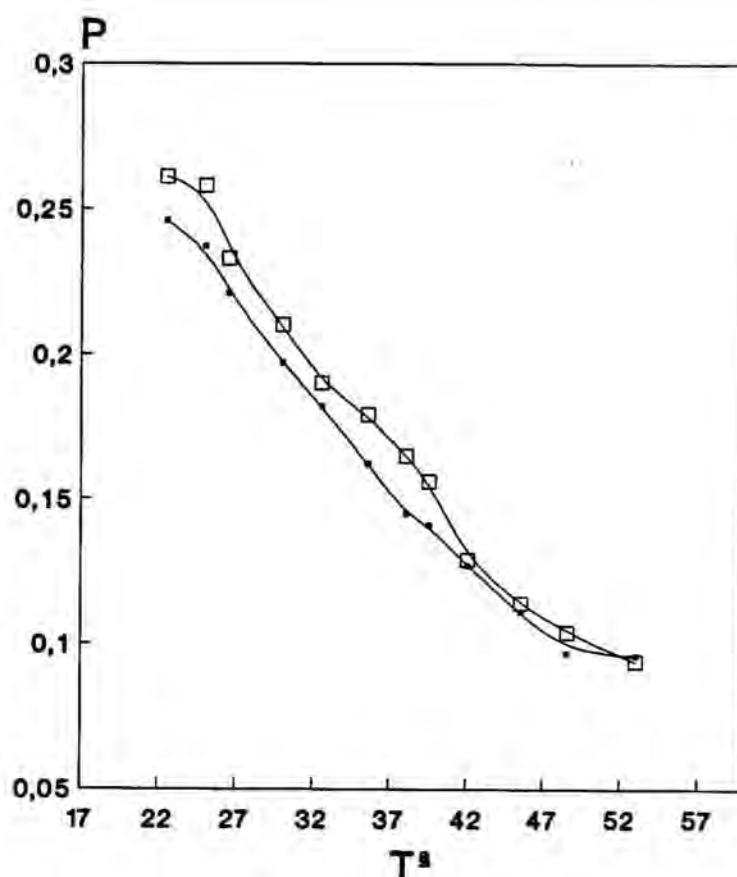


Figura 43: Variación de la polarización de fluorescencia (P) de SUV-DPPC marcados con ANS. (●) SUV-DPPC; (□) SUV-DPPC con GHRH(1-29), relación molar 44:1. Cada punto es la media de un mínimo de tres determinaciones.

El efecto sobre el comportamiento termotrópico de los liposomas a nivel del entorno hidrófobo fue todavía más pronunciado (fig. 44). En presencia de GHRH(1-29) se observó un importante aumento de polarización en todo el rango de temperaturas estudiado (de 18 °C a 57 °C), siendo el incremento más significativo por debajo de la T_c ($P < 0.01$), por ejemplo a 36 °C, $P = 0.387 \pm 0.007$ para el control, y $P = 0.429 \pm 0.006$ para el complejo DPPC-GHRH(1-29). En la tabla 7 se muestran los parámetros de ajuste por regresión no lineal. A partir del análisis de estos parámetros se encontró que la temperatura de transición para el control de liposomas era de 40.9 ± 0.2 °C, mientras que la presencia de GHRH(1-29) la incrementaba significativamente a 42.3 ± 0.2 °C.

Por otra parte, al obtener la primera derivada se comprobó que la hormona reducía considerablemente la amplitud del proceso de transición de fase. La transición en presencia del péptido tenía lugar en un intervalo más estrecho de temperaturas, mientras que la pendiente de la curva, definida por el parámetro de ajuste D (factor de pendiente o coeficiente de Hill) pasaba de -17.15 ± 1.25 en el control de liposomas a -41.96 ± 6.36 en presencia de GHRH(1-29), lo que indica que el proceso era altamente cooperativo.

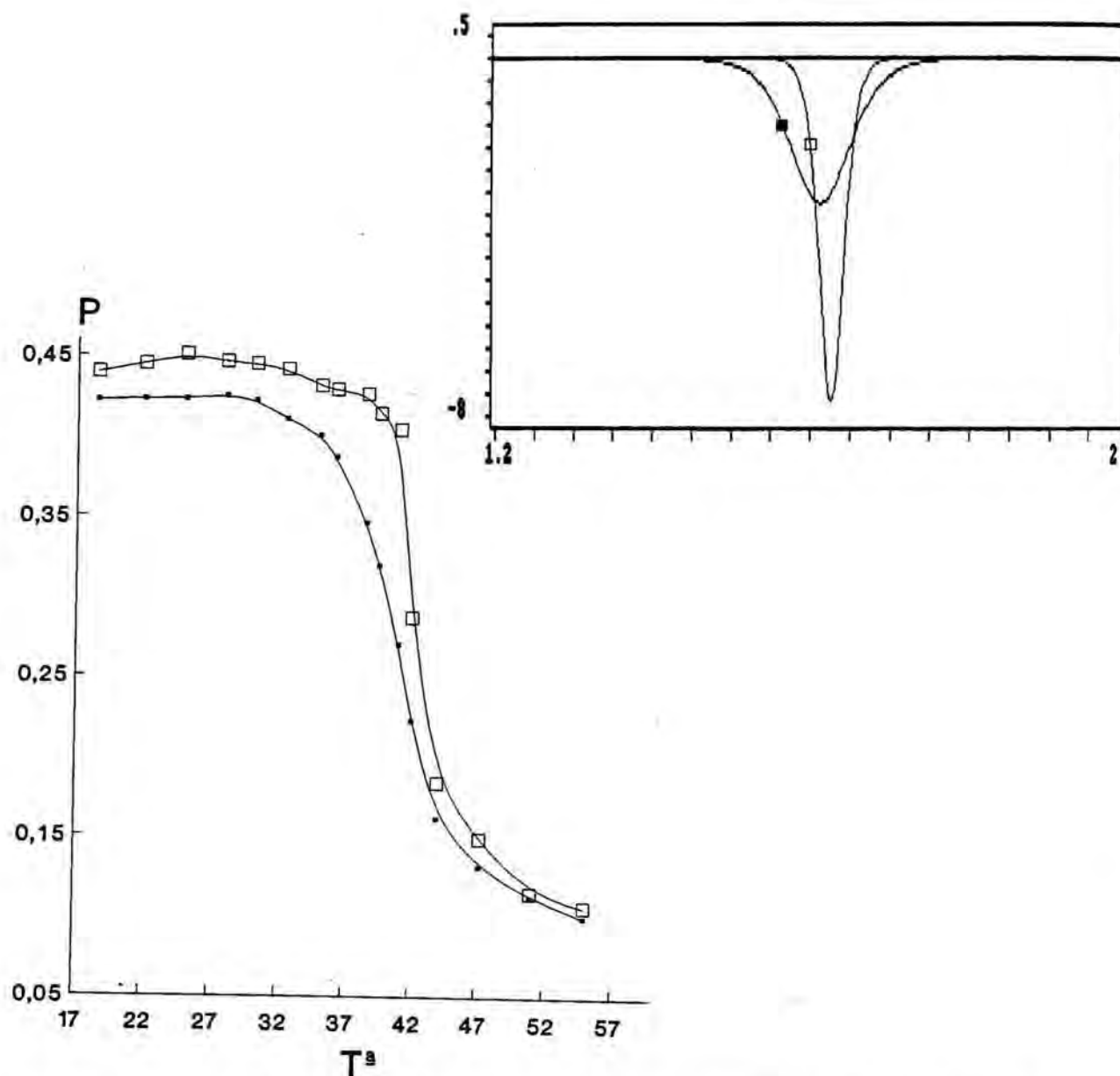


Figura 44: Variación de la polarización de fluorescencia (P) de SUV-DPPC marcados con DPH y análisis de primera derivada de las curvas ajustadas. (●) SUV-DPPC; (□) SUV-DPPC con GHRH(1-29), relación molar 44:1. Cada punto es la media de un mínimo de tres determinaciones.

Parámetros	Control de liposomas	Liposomas + GHRH(1-29)
A	$0.1001901 \pm 6.517 \cdot 10^{-3}$	$0.1224086 \pm 9.065 \cdot 10^{-3}$
B	$0.4299706 \pm 3.625 \cdot 10^{-3}$	$0.4402311 \pm 5.098 \cdot 10^{-3}$
C	$1.611471 \pm 1.924 \cdot 10^{-3}$	$1.626509 \pm 1.830 \cdot 10^{-3}$
D	-17.14711 ± 1.245525	-41.95635 ± 6.363028
SS	$8.999 \cdot 10^{-4}$	$2.781 \cdot 10^{-3}$
df	12	12

Tabla 7: Parámetros que definen las curvas de despolarización de SUV-DPPC marcados con DPH en tampón acetato pH 7.4 (control de liposomas) y en solución de GHRH(1-29) $4 \cdot 10^{-6}$ M. Relación molar DPPC/GHRH=44:1. El significado de estos parámetros estadísticos se especifica en el apartado 2.3.4. de este capítulo.

2.4. CAMBIOS CONFORMACIONALES EN LAS HORMONAS PEPTIDICAS EN PRESENCIA DE LIPOSOMAS Y EN TFE: ESPECTROSCOPIA DE DICROISMO CIRCULAR (CD)

La estructura secundaria de las hormonas peptídicas en solución acuosa con y sin liposomas SUV-DPPC 0.027 M (relación molar DPPC/hormona = 30:1), y en 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) se determinó a partir de los espectros de dicroísmo circular (CD).

Los espectros de CD experimentales se interpretaron como combinaciones lineales de cuatro espectros teóricos básicos, característicos de las cuatro conformaciones básicas posibles de los péptidos: hélice α , hoja β , giro β y aperiódica (figura 45). La contribución de cada una de estas cuatro conformaciones básicas en la conformación real del péptido se estimó a partir del espectro teórico que más se aproximase al experimental. Para ello se utilizó un programa de ordenador denominado CDPROT (Menéndez-Arias et al., 1988) que se basa en la minimización de las diferencias entre elipticidades experimentales y teóricas calculando el error cuadrático medio (r.m.s.) descrito por Brahms (1980).

$$\text{r.m.s.} = 100 \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m (C_m - D_m)^2}{\sum_{i=1}^m (D_m)^2}}$$

Siendo C_m y D_m los valores de elipticidad $[\Theta]$ teóricos y experimentales respectivamente para cada longitud de onda (nm).

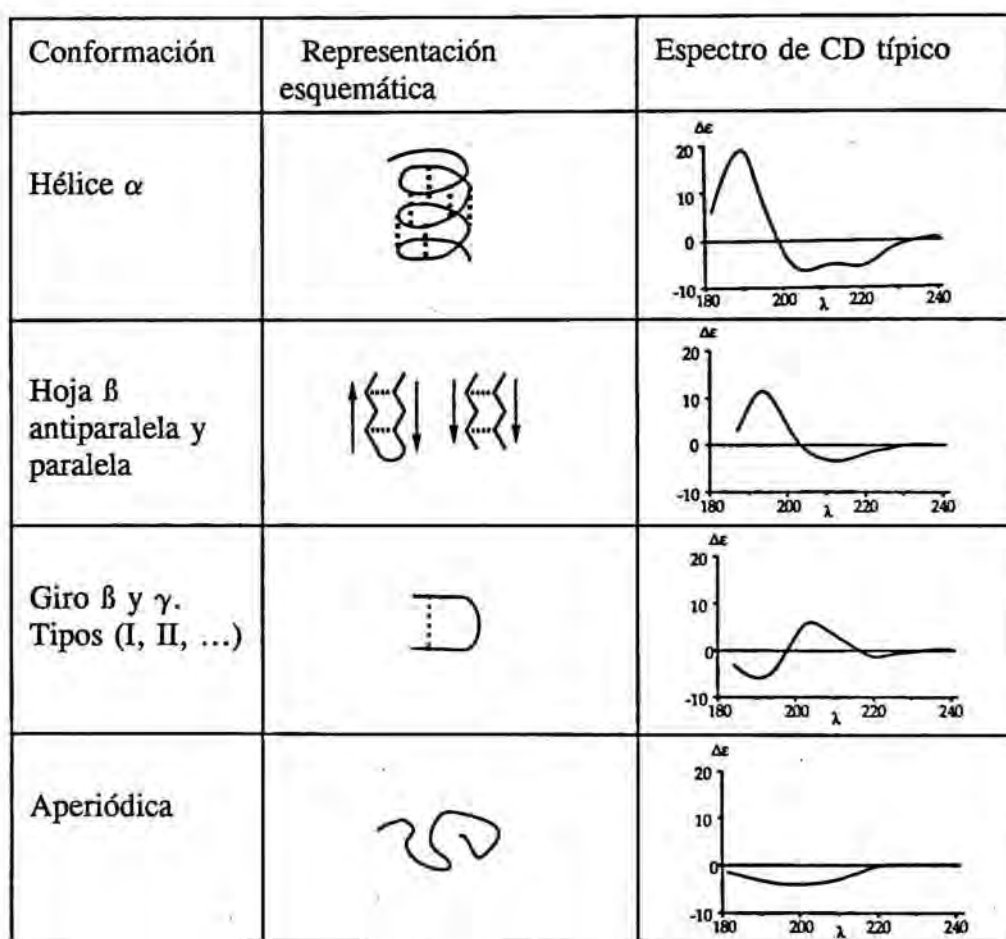


Figura 45: Espectros de CD característicos de las cuatro estructuras secundarias básicas. Las líneas discontinúas representan puentes de hidrógeno.

Para el cálculo de los espectros teóricos que mejor se ajustaban a los datos experimentales se utilizaron varios métodos:

- 1) Método de Yang & Kubota (1985), que utiliza modelos polipeptídicos
- 2) Método de Cheng, Yang & Martinez (1972), basado en proteínas de estructura terciaria conocida.
- 3) Método de Bolotina et al. (1980), también basado en proteínas de estructura terciaria conocida; permite estimar el porcentaje de estructura tipo giro β .
- 4) Método de Cheng, Yang & Chau (1974)
- 5) Método de Chang, Wu & Yang (1978)

Estos dos últimos métodos consideran el número medio de aminoácidos por paso de hélice (N), valor que debe ser prefijado teniendo en cuenta que hélices de más de 25 residuos o de menos de 6 no son frecuentes (Chou & Fasman, 1974).

A continuación se describirán los resultados correspondientes a cada una de las hormonas estudiadas en solución acuosa, incubadas con liposomas y en TFE. A modo de resumen, la contribución de cada estructura a la conformación global se muestra en la tabla 8.

	Conformación (%)				
	$[\Theta]_{222}$	hélice α	hoja β	giro β	aperiódica
SRIF					
agua	-775	6.14	6.35	40.15	47.36
DPPC*	-221	4.95	13.96	38.24	42.85
TFE	-1158	2.38	45.51	15.45	36.65
LHRH					
agua	-1268	8.65	30.30	17.75	43.3
DPPC*	-577	10.03	31.77	15.86	42.34
TFE	-3511	19.40	22.46	29.53	28.62
hGH					
agua	-5764	10.77	17.50	21.52	50.2
DPPC*	-11848	36.58	9.33	23.33	30.77
TFE	-19571	53.16	10.51	8.45	27.97
GHRH					
agua	-4877	5.63	18.64	20.5	55.22
DPPC*	-6171	19.45	12.63	15.22	52.78
TFE	-22356	33.97	25.89	14.67	25.45

Tabla 8: Estructura secundaria de las hormonas peptídicas por CD: contribución de las cuatro estructuras secundarias básicas y elipticidad a 222 nm (deg.cm².dmol⁻¹). Valores calculados aplicando los parámetros de Chang et al. (1978). (*) relación molar DPPC/hormona 30:1.

2.4.1. ANÁLISIS CONFORMACIONAL DE SOMATOSTATINA POR CD

Los espectros de CD de SRIF se muestran en la figura 46. El mejor ajuste de estos espectros experimentales a espectros teóricos se consiguió aplicando los parámetros de Chang et al. (1978), ya que este método proporcionaba los errores (r.m.s.) más bajos de los cinco que se aplicaron. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 9.

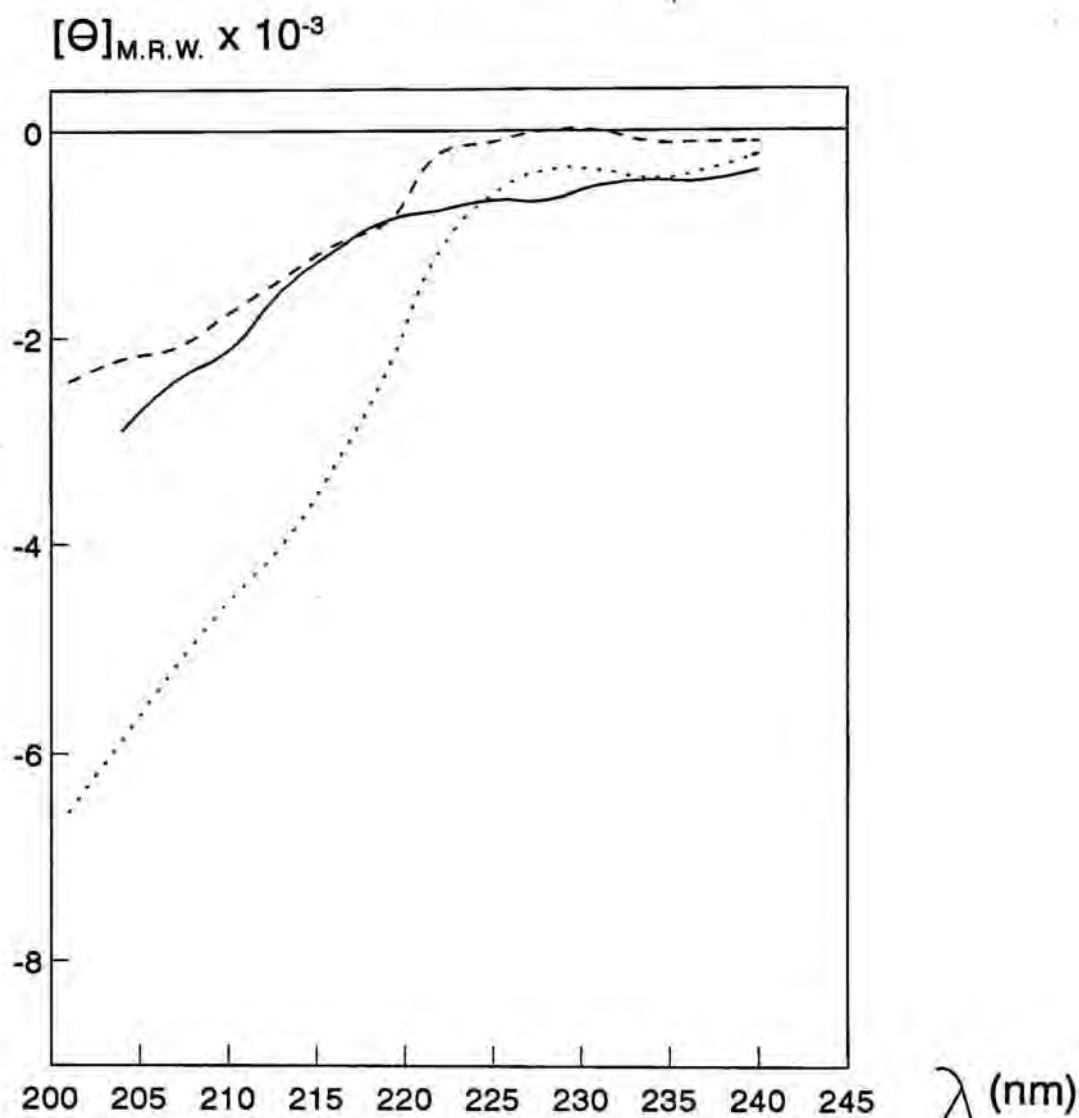


Figura 46: Espectro de Dicroísmo Circular de la somatostatina. Concentración de péptido: $1.22 \cdot 10^{-4}$ M. Se representa la variación de la elipticidad $[\Theta]_{MRW}$ ($\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$) frente a la longitud de onda (nm). (—) somatostatina en solución acuosa; (---) DPPC/somatostatina (30:1); (....) somatostatina en TFE.

El análisis cuantitativo del espectro de CD de la somatostatina en solución acuosa mostraba una elevada proporción de giro β en su estructura secundaria (40%), mientras que las

contribuciones de estructura helicoidal y de hoja β eran poco importantes (alrededor del 6% en ambos casos). El porcentaje de la conformación aperiódica resultó muy elevado (47%). El espectro de SRIF unida a liposomas de DPPC (relación molar DPPC/SRIF = 30:1) sugería la formación de estructura tipo hoja β (14% del total).

En TFE, disolvente en el que se ponen de manifiesto las tendencias conformacionales de los péptidos (Marché et al., 1976), el aumento en la estructura tipo hoja β fue mayor, ya que del 6% en agua pasó al 45.5% en TFE; sin embargo, el contenido en conformación tipo giro β era menor ($\approx 15\%$); en TFE se indujo una mayor ordenación del péptido, disminuyendo la proporción de estructura aperiódica.

2.4.2. ANÁLISIS CONFORMACIONAL DE LHRH POR CD

Los espectros de CD en el UV lejano para la LHRH en solución acuosa, en presencia de liposomas DPPC-SUV o en TFE se muestran en la figura 47. A partir de los datos experimentales de $[\Theta]_{MRW}$, se buscó el espectro teórico que mejor se ajustaba, proporcionando un menor r.m.s. Esto se logró con los parámetros propuestos por Chang et al. (1978) así como con los parámetros de Yang & Kubota (1985), como se resume en la tabla 9.

Estructura secundaria	Método de Chang			Método de Yang		
	Agua	DPPC	TFE	Agua	DPPC	TFE
Hélice α	8.65	10.03	19.4	8.84	10.49	11.73
Hoja β	30.3	31.77	22.46	38.08	36.76	49.54
Giro β	17.75	15.86	29.53	-	-	-
Aperiodica	43.3	42.34	28.62	53.07	52.75	38.73
N	6	10	5	-	-	-
r.m.s	12.44	10.64	13.16	10.13	23.03	27.78

Tabla 9: Conformación de LHRH determinada por CD: contribución de cada una de las principales estructuras secundarias.

Finalmente se seleccionó el método de Chang, ya que a fines comparativos debían aplicarse los mismos parámetros a todos los péptidos estudiados, y los menores errores se obtenían en los demás casos aplicando los parámetros descritos por Chang.

LHRH en solución acuosa presentaba un espectro con una magnitud de elipticidad baja, lo que indica predominio de conformación en hoja β y giro β (Abergel et al., 1989) concretamente al analizar cuantitativamente el espectro se obtuvo un 30% y un 18% respectivamente. En las mezclas de LHRH y liposomas (relación molar DPPC/LHRH = 30:1), no se observó ningún cambio conformacional significativo.

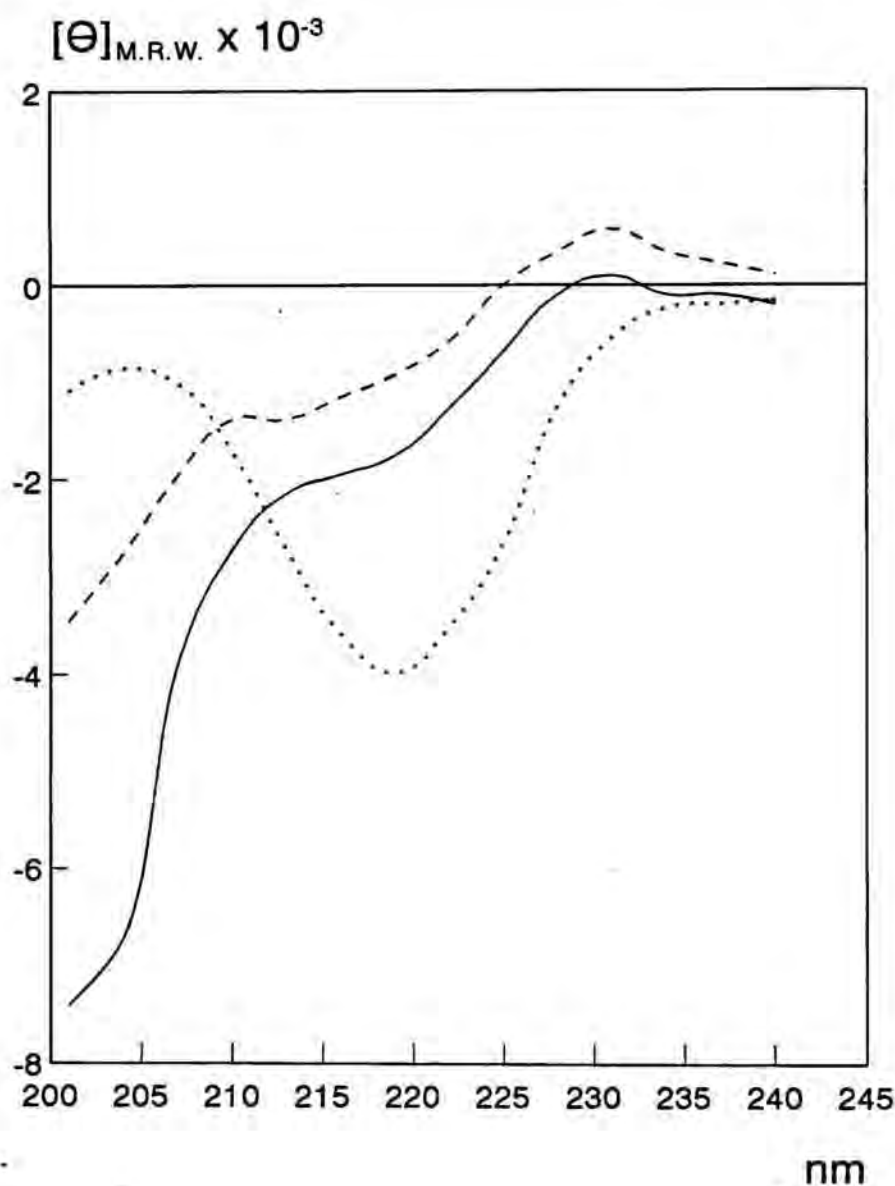


Figura 47: Espectro de Dicroísmo Circular de LHRH. Concentración de péptido: $1.69 \cdot 10^{-4}$ M. Se representa la variación de la elipticidad $[\Theta]_{MRW}$ ($\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$) frente a la longitud de onda (nm). (—) LHRH en solución acuosa; (---) DPPC/LHRH (30:1); (....) LHRH en TFE.

2.4.3. ANÁLISIS CONFORMACIONAL DE GHRH(1-29) POR CD

La amplitud del espectro de CD para la GHRH(1-29) en solución acuosa con y sin liposomas SUV-DPPC (figura 48) era mayor que la que se obtenía para los péptidos LHRH y SRIF, indicando un mayor contenido en estructura helicoidal. Un valor importante es $[\Theta]_{222}$, que de $-4877 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ para el péptido en solución acuosa descendió a $-6171 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ al añadir liposomas (relación molar DPPC/GHRH = 30:1), lo que se correspondía con un aumento de la estructura en hélice α . Los espectros obtenidos se analizaron según los distintos métodos disponibles, siendo una vez más el de Chang (1978) el que proporcionó un mejor ajuste.

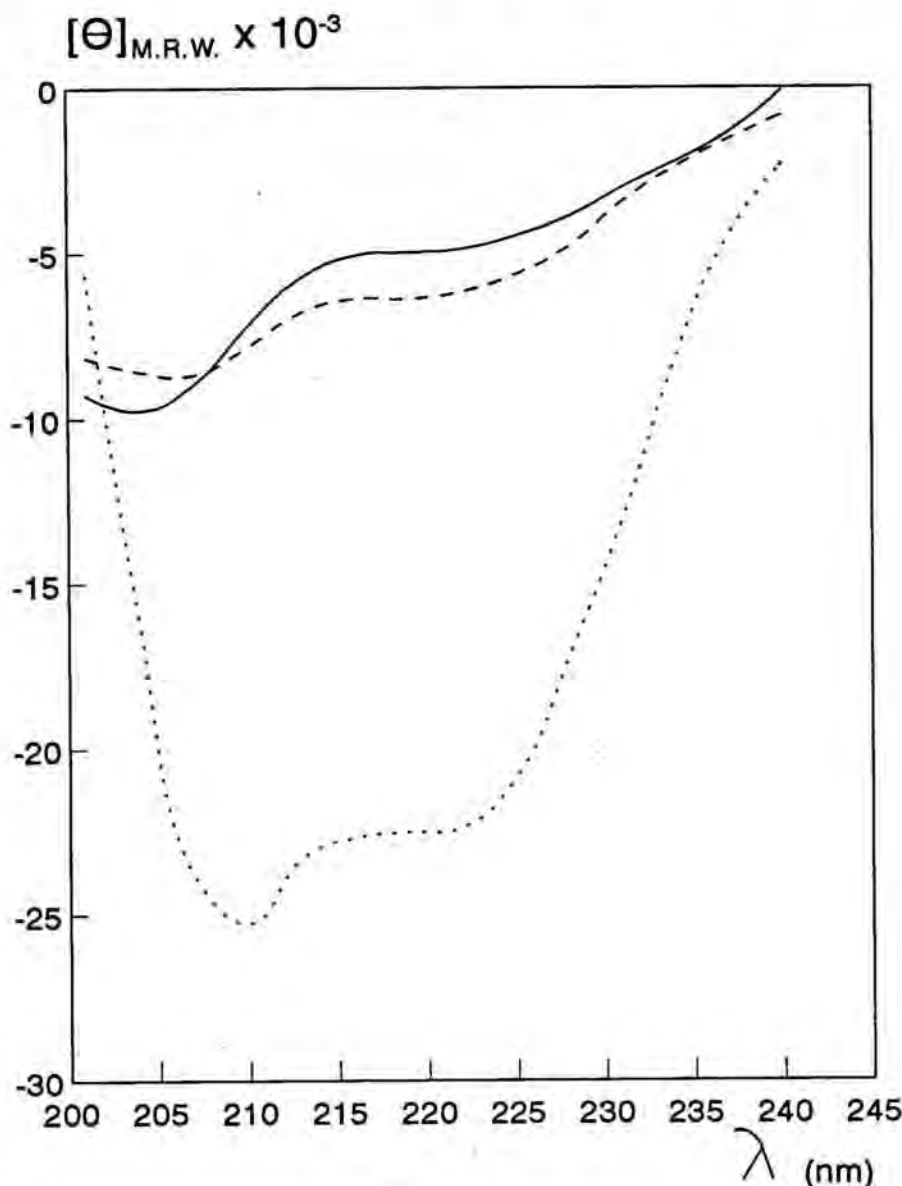


Figura 48: Espectro de Dicroísmo Circular de GHRH(1-29). Concentración de péptido: $0.6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$. Se representa la variación de la elipticidad $[\Theta]_{\text{MRW}}$ ($\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$) frente a la longitud de onda (nm). (—) GHRH(1-29) en solución acuosa; (-----) DPPC/GHRH(1-29) 30:1; (.....) GHRH(1-29) en TFE.

La conformación de GHRH(1-29) en solución acuosa estaba determinada por una combinación de estructura aperiódica (más del 55%), hoja β (18.64%) y giro β (20.5%); sin embargo había poca proporción de estructura helicoidal (menos del 6%) (tabla 8).

Los liposomas de DPPC indujeron un importante cambio conformacional, con cerca de un 20% de conformación tipo hélice α : en el espectro de CD aparecían las dos bandas negativas con mínimos a 222 y 210 nm, característicos de hélice α .

En TFE, el espectro de CD era el característico de una conformación predominantemente helicoidal, puesto que los dos mínimos se hacían más negativos ($[\Theta]_{222} = -22356 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ y $[\Theta]_{210} = -25265 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$). Aplicando los parámetros de Chang (1978) para el análisis de estructura secundaria se llegaba a esta misma conclusión, obteniéndose un 34% de hélice α . También se observó un descenso importante en las conformaciones aperiódicas o desordenadas, que pasaron de un 55% en solución acuosa a un 25% en TFE.

2.4.4. ANÁLISIS CONFORMACIONAL DE hGH POR CD

Los espectros de CD de hGH se muestran en la figura 49. En disolución acuosa, la elipticidad se mantuvo en valores absolutos bastante bajos a lo largo de todo el espectro, con dos mínimos a 207 nm ($[\Theta]_{207} = -8585 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$) y a 219 nm ($[\Theta]_{219} = -6067 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$); al analizar este espectro según los parámetros de Chang (1978) (tabla 8) se obtuvo una elevada proporción de estructura aperiódica o desordenada (50%), un 11% de hélice α , un 17.5% de hoja β y un 21.5 % de giro β .

En presencia de liposomas DPPC-SUV, se produjeron cambios conformacionales importantes en la hormona, como se deduce de la observación del espectro: la magnitud de elipticidad aumentó considerablemente en todo el espectro, y los mínimos se desplazaron, el de 207 nm a 210 nm ($[\Theta]_{210} = -12805 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$), y el de 219 nm a 222 nm ($[\Theta]_{222} = -11848 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$); estos cambios se corresponden a un aumento del contenido en hélice α en la hGH unida a los liposomas. Concretamente, el análisis cuantitativo de elipticidad dio un 36.6% de hélice α , un 9.3% de hoja β , un 23.3% de giro β y un claro descenso en la

proporción de conformaciones desordenadas, que pasaron a ser de alrededor del 30%.

Los cambios estructurales de hGH disuelta en TFE fueron del mismo tipo que los inducidos por los liposomas, pero de mayor magnitud; los mínimos se mantuvieron en los valores característicos de hélice α , pero la amplitud fue mayor, con $[\Theta]_{210} = -20029 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ y $[\Theta]_{222} = -19571 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$; estos valores se correspondían con un 53% de hélice α mientras que la proporción de estructura tipo hoja β o giro β eran poco importantes (10.5% y 8.4% respectivamente); por otra parte, la proporción de estructura desordenada era del 28%, muy similar a la obtenida en presencia de liposomas.

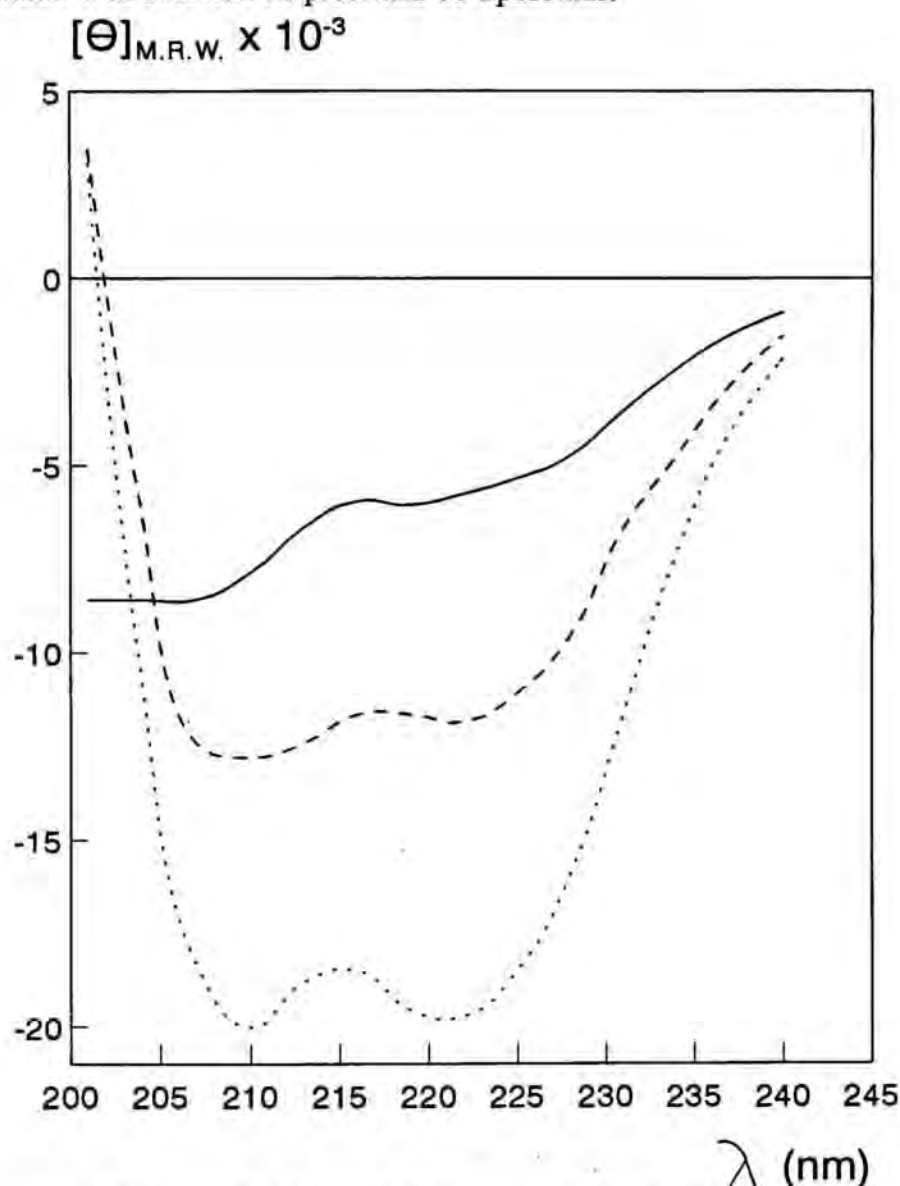


Figura 49: Espectro de Dicroísmo Circular de hGH. Concentración de péptido: $0.8 \cdot 10^{-4} \text{ M}$. Se representa la variación de la elipticidad $[\Theta]_{\text{MRW}}$ ($\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$) frente a la longitud de onda (nm). (—) hGH en solución acuosa; (---) DPPC/hGH (30:1); (.....) hGH en TFE.

2.5. PERTURBACION DE LA ESTRUCTURA DE LOS LIPOSOMAS INDUCIDA POR LAS HORMONAS PEPTIDICAS: LIBERACION DE CARBOXIFLUORESCEINA

La interacción de las hormonas peptídicas con liposomas se examinó también determinando la liberación de CF inducida por la incubación de las hormonas con liposomas encapsulando dicha molécula. Estas medidas se llevaron a cabo con liposomas de composición lipídica variable, a fin de determinar si se producían interacciones selectivas entre las hormonas peptídicas y alguno de los lípidos. De este modo se pueden estimar las perturbaciones en la estructura de las bicapas lipídicas inducidas por la unión de las hormonas a las mismas.

Para este tipo de estudios se utilizaron liposomas DRV, ya que los SUV que se habían utilizado anteriormente en los estudios de polarización y fluorescencia de los péptidos presentan un pequeño volumen acuoso interno y una sola bicapa lipídica, lo que hace que su capacidad de encapsulación de CF sea muy baja. En cambio, los liposomas DRV son oligolaminares y de mayor tamaño que los SUV, lo que se traduce en una mayor capacidad de encapsulación de CF, que dado su carácter hidrófilo, se acumula en el espacio acuoso interno y en los espacios acuosos que separan las bicapas fosfolipídicas. Cabe señalar que la mayor turbidez de este tipo de liposomas, que sería un inconveniente a las longitudes de onda utilizadas en los anteriores experimentos, no lo es en las condiciones de detección de CF ($\lambda_{ex} = 490 \text{ nm}$ y $\lambda_{em} = 520 \text{ nm}$).

2.5.1. LATENCIA DE CF

Para los estudios de liberación de CF de liposomas inducida por las hormonas peptídicas era necesario partir de preparaciones liposómicas en que se hubiera eliminado completamente la CF no encapsulada y que presentasen además unos valores de latencia* elevados. Esto es debido a que en esta técnica se determina el incremento en la fluorescencia que se produce cuando la CF encapsulada es liberada al medio y queda diluida en el mismo.

La latencia en todos los lotes de liposomas en el momento de ser utilizados era superior al

* % latencia = $[(F_t - F)/F_t] \cdot 100$, siendo F la fluorescencia debida a la CF no encapsulada y F_t la debida al total de CF una vez rotos los liposomas por adición de tritón.

80%; en caso de reutilizar un lote de liposomas se determinó previamente la latencia, procediendo al lavado de los liposomas en caso de encontrarse un valor inferior al 80%.

2.5.2. ENCAPSULACIÓN DE CF

La cantidad de CF que se había encapsulado en los liposomas se calculó según se indica en el apartado 2.4.3.1 del capítulo de Métodos, expresándose el resultado de dos maneras diferentes: a) como porcentaje de encapsulación o tanto por ciento de moles de CF iniciales que se habían encapsulado en liposomas, y b) como eficacia de encapsulación, o moles de CF encapsulados por mol de lípido. Los resultados se muestran en la tabla 10.

Composición lipídica	% Encapsulación	Moles CF/mol lípido
PC/COL (1:1)	10.14	0.387
HPC/COL (1:1)	10.16	0.388
PC/PS/COL (1:1:2)	7.0	0.267
HPC/PS/COL (1:1:2)	0.82	0.032
PC/PI/COL (1:1:2)	8.53	0.325
HPC/PI/COL (1:1:2)	3.3	0.126
PC/SM/COL (1:1:2)	6.16	0.235
HPC/SM/COL (1:1:2)	10.29	0.393
PC/G/COL (1:1:2)	0.74	0.029
HPC/G/COL (1:1:2)	0.40	0.016
DPPC	15.2	0.430



Tabla 10: Encapsulación de CF en liposomas DRV de diferentes composiciones lipídicas.

2.5.3 LIBERACIÓN DE CF A TIEMPO CONSTANTE

Se determinó la liberación de CF de los DRV tras incubar estos liposomas con las hormonas peptídicas de manera que la relación molar lípido/péptido fuera 1:1. De esta forma se puede poner de manifiesto cualquier perturbación de la estructura de la bicapa inducida por el péptido, mientras que para relaciones molares más altas el efecto podría pasar desapercibido.

Se representó el porcentaje de CF libre* a los 30 min de incubación de las mezclas DRV-hormona peptídica a temperatura ambiente ($20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$) (fig. 50).

La capacidad de inducir la salida del marcador fluorescente de los liposomas siguió el orden $\text{GHRH}(1-29) > \text{SRIF} \geq \text{hGH} > \text{LHRH}$ (tabla 11). La hormona $\text{GHRH}(1-29)$ provocaba la liberación de CF con mayor intensidad si la fosfatidilcolina empleada en la preparación de liposomas era hidrogenada (HPC) que si era PC, alcanzándose un 100% de liberación en los liposomas cargados negativamente HPC/PS/COL. Estas diferencias se pueden explicar teniendo en cuenta las diferentes temperaturas de transición de ambos fosfolípidos. La PC de huevo presenta una T_c muy baja, de forma que a temperatura ambiente los liposomas de PC se encuentran en estado de cristal líquido; en esta fase, la presencia de colesterol tiene un efecto rigidificante de las bicapas. Por el contrario la HPC presenta una elevada T_c (alrededor de $53\text{ }^{\circ}\text{C}$), con lo que a temperatura ambiente se encuentra en estado de gel, y en este estado la adición de colesterol tiene el efecto contrario, causando la distorsión de las moléculas de fosfolípido que se encontraban estrechamente empaquetadas, con lo que se facilitaría la liberación de CF.

Sin embargo, esto sólo explica las pequeñas diferencias entre liposomas conteniendo PC o HPC, pero la principal causa de la liberación de CF de los liposomas radica en lo que se conoce como *defect sites*, o lugares de la membrana con una elevada proporción de lípidos en conformación "gauche". Estas zonas se forman principalmente cuando los liposomas se encuentran en estado de gel, y podrían actuar como lugares preferentes de unión de los péptidos (Surewicz, 1984). De esta manera se formarían en las bicapas lipídicas dos dominios diferenciados: uno constituido por complejos lípido-péptido, donde las moléculas de lípido se empaquetarían más rígidamente, y otros dominios de lípido puro. En consecuencia, tendría lugar una separación de fases en la membrana lipídica. La liberación de CF podría tener lugar a través de las zonas limítrofes entre los dos dominios. Muchos autores defienden esta teoría en sus trabajos; concretamente Jain (1982) fue quien primero observó que estos defectos de membrana, a los que denominó "cracks", se formaban en membranas en las que se daba una

* $\% \text{ CF} = (\text{F}-\text{Fo})/(\text{Ft}-\text{Fo}) \times 100$, siendo Fo y Ft las intensidades de fluorescencia del control de liposomas con CF antes y después de añadir tritón 10%, y F la intensidad de fluorescencia de la mezcla de incubación DRV-péptido. $\lambda_{\text{ex}} = 490\text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 520\text{ nm}$.

separación de fases. En el capítulo de Discusión se profundizará algo más en este modelo de interacción.

Composición lipídica	% liberación CF			
	LHRH	SRIF	hGH	GHRH(1-29)
PC/COL (1:1)	5.5	2.2	0.5	16.2
HPC/COL (1:1)	6.3	10.8	11.1	84.8
PC/PS/COL (1:1:2)	3.2	16.3	12.0	83.3
HPC/PS/COL (1:1:2)	2.0	38.1	25.7	100.0
PC/PI/COL (1:1:2)	0.5	4.0	0.5	29.7
HPC/PI/COL (1:1:2)	0.5	0.5	0.5	32.0
PC/SM/COL (1:1:2)	0.5	0.5	0.5	56.5
HPC/SM/COL (1:1:2)	10.76	20.8	18.6	61.8
PC/G/COL (1:1:2)	0.5	7.5	0.5	60.0
HPC/G/COL (1:1:2)	0.5	4.6	4.5	86.3

Tabla 10: Efecto de las hormonas peptídicas en la liberación de carboxifluoresceína encapsulada en liposomas DRV de distintas composiciones lipídicas. Tiempo de incubación 30 minutos. Temperatura 20°C.

La presencia del fosfolípido de carga negativa PI demostró tener un efecto estabilizante de los liposomas frente a la inducción de liberación de CF por parte de las cuatro hormonas estudiadas, independientemente de si la fosfatidilcolina utilizada era PC o HPC. Por ejemplo, la liberación de CF de estos liposomas en presencia de GHRH(1-29) era de alrededor del 30%, frente al 61.8 % para los de HPC/SM/COL o al 84.8 % de los de HPC/COL. Con LHRH, SRIF y hGH prácticamente no se produjo salida de CF si PI formaba parte de la composición lipídica de los liposomas.

La LHRH prácticamente no tuvo ningún efecto en la liberación de CF independientemente de la composición de los liposomas, con la única excepción de los DRV de HPC/SM/COL, en los que indujo la liberación del 10.76% y los de PC/COL y HPC/COL con un 5.5% y un 6.3% respectivamente. En las demás composiciones ensayadas se puede decir que esta hormona no perturbó la estructura de la membrana y no causó separación de fases en los liposomas.

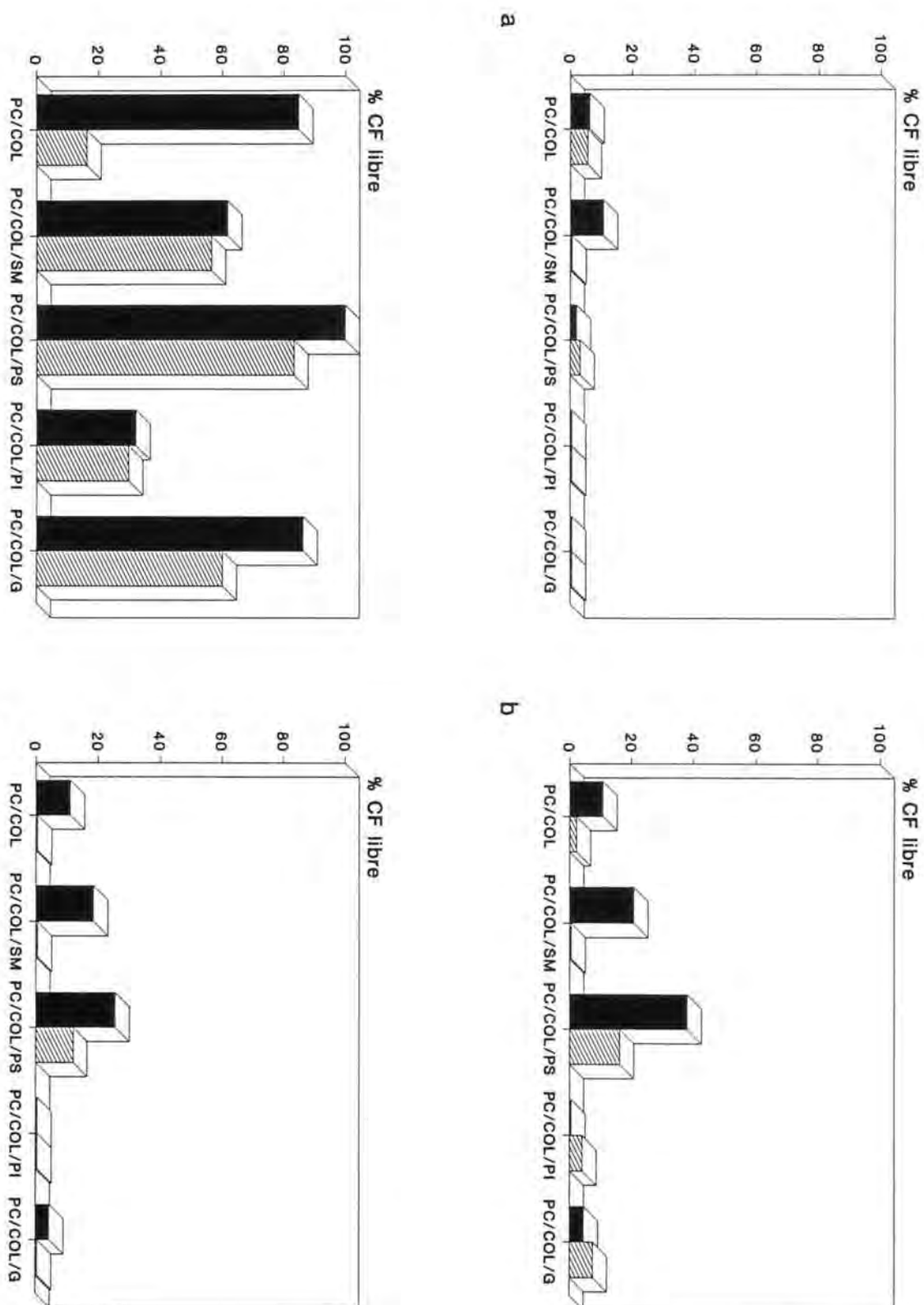


Figura 50: Liberación de CF encapsulada en liposomas DRV ($6.8 \cdot 10^{-3}$ M) en presencia de hormonas peptídicas ($3.0 \cdot 10^{-4}$ M). Relación molar lípido/péptido = 1:1. a) LHRH, b) SRIF, c) GHRH(1-29), d) hGH. ■ HPC; ▨ PC.

Por otra parte, SRIF y hGH se comportaron de manera similar, lo que en principio podría resultar extraño dadas las grandes diferencias existentes entre ambas hormonas (SRIF es un péptido de 14 aminoácidos, mientras que hGH es una proteína de 191 aminoácidos). La razón más probable es que hGH es una proteína globular, con una estructura terciaria definida, de manera que su inserción en las bicapas se encuentra dificultada estéricamente. Para todos los liposomas ensayados, SRIF indujo mayor liberación de CF que hGH, si bien en la mayoría de los casos las diferencias fueron mínimas. En ambas hormonas, la mayor inducción de liberación de CF se produjo para los liposomas con PS, en el orden HPC/PS/COL > PC/PS/COL. Como ocurría para LHRH, también en estas dos hormonas se observó una interacción bastante importante con los liposomas de composición HPC/SM/COL, pero no con los de PC/SM/COL.

A la vista de estos resultados, no puede extraerse una conclusión clara de como afecta la composición lipídica a la estabilidad de los liposomas frente a las hormonas estudiadas, sin embargo las diferencias podrían ser causadas por los diferentes tamaños de las cabezas polares de los fosfolípidos, que facilitarían o dificultarían el empaquetamiento de las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos, así como por la carga eléctrica neta de los péptidos y el potencial de superficie de los liposomas.

2.5.4. LIBERACION DE CARBOXIFLUORESCEINA EN FUNCION DEL TIEMPO

Como complemento de los estudios de fluorescencia realizados, se determinó la capacidad relativa de las hormonas peptídicas de interaccionar con liposomas DRV de DPPC (el mismo fosfolípido que se utilizó en la preparación de SUV para los estudios de fluorescencia de triptófano y tirosina y para las medidas de polarización) y de DPPC/COL (1:1). Para ello, se monitorizó la liberación de CF encapsulada al incubar los liposomas con los péptidos a distintos períodos de tiempo. Se ensayaron dos relaciones molares DPPC/péptido (1:1 y 44:1), y la temperatura se mantuvo a $20 \pm 1^\circ\text{C}$, es decir por debajo de la T_c de la DPPC, con lo que los liposomas estaban en estado de gel. Por encima de la T_c no se pudo realizar este estudio ya que los liposomas perdían la CF encapsulada en su totalidad durante el proceso de cambio de fase.

Como se observa en la figura 51, LHRH no tenía efecto alguno en la liberación de CF a ninguna de las relaciones molares ensayadas independientemente de si los liposomas contenían colesterol o no.

Por otra parte, SRIF no interaccionó con DPPC-DRV cuando la relación molar era de 44:1, pero sin embargo cuando era 1:1 indujo una rápida liberación de CF, que a los 30 minutos era del 20%; a partir de entonces, la salida de CF continuó de forma lenta, alcanzándose un estado de equilibrio. Esto indica que SRIF interaccionaba con los liposomas, confirmando los resultados de fluorescencia anteriormente obtenidos. El rápido y agudo aumento inicial en la liberación de CF podría explicarse en base a la formación de defectos en la membrana lipídica durante las etapas iniciales de unión de la hormona a las membranas (Nam et al., 1989).

En presencia de colesterol, la capacidad de SRIF de inducir liberación de CF fue menor, tan solo de un 3% (para la relación molar DPPC/SRIF=44:1).

La hGH, hormona que se unía preferentemente a la superficie de los liposomas DPPC-SUV (según los estudios de polarización del ANS), únicamente indujo liberación de CF de liposomas de DPPC sin colesterol y cuando la relación molar lípido/péptido era de 1:1; a lo largo del tiempo se produjo una liberación gradual de CF hasta un 9% a las 4 horas de incubación a 20 °C, lo que podría explicarse por la formación de defectos de membrana ocasionados al alterar la hormona la orientación de las cabezas polares del fosfolípido.

Al igual que ocurría con todos los liposomas ensayados anteriormente (apartado 2.5.3), también en los liposomas de DPPC el efecto de GHRH(1-29) en la liberación de CF resultó ser muy acusado. Cuando la relación péptido/lípido era equimolar, la interacción se caracterizó por un brusco aumento de la salida de CF, que a los 20 min. era del 26%; a partir de aquí se seguía liberando CF pero de forma mucho más suave, llegando al 30% a las 4 horas de incubación. Cuando la relación molar fue de 44:1, se obtuvieron similares resultados, con la salvedad de que la salida de CF fue algo menos brusca. Asimismo, en este caso la presencia de colesterol tuvo una influencia mucho menor que en los anteriores en lo que a estabilización de las bicapas se refiere.

Como resumen, puede decirse que las capacidades relativas de las hormonas peptídicas de

inducir la liberación de CF de DPPC-DRV coincide con el orden de mayor a menor afinidad que se deriva de los estudios de interacción por cambios en las propiedades de fluorescencia intrínseca de las mismas: GHRH(1-29) > SRIF > hGH > LHRH.

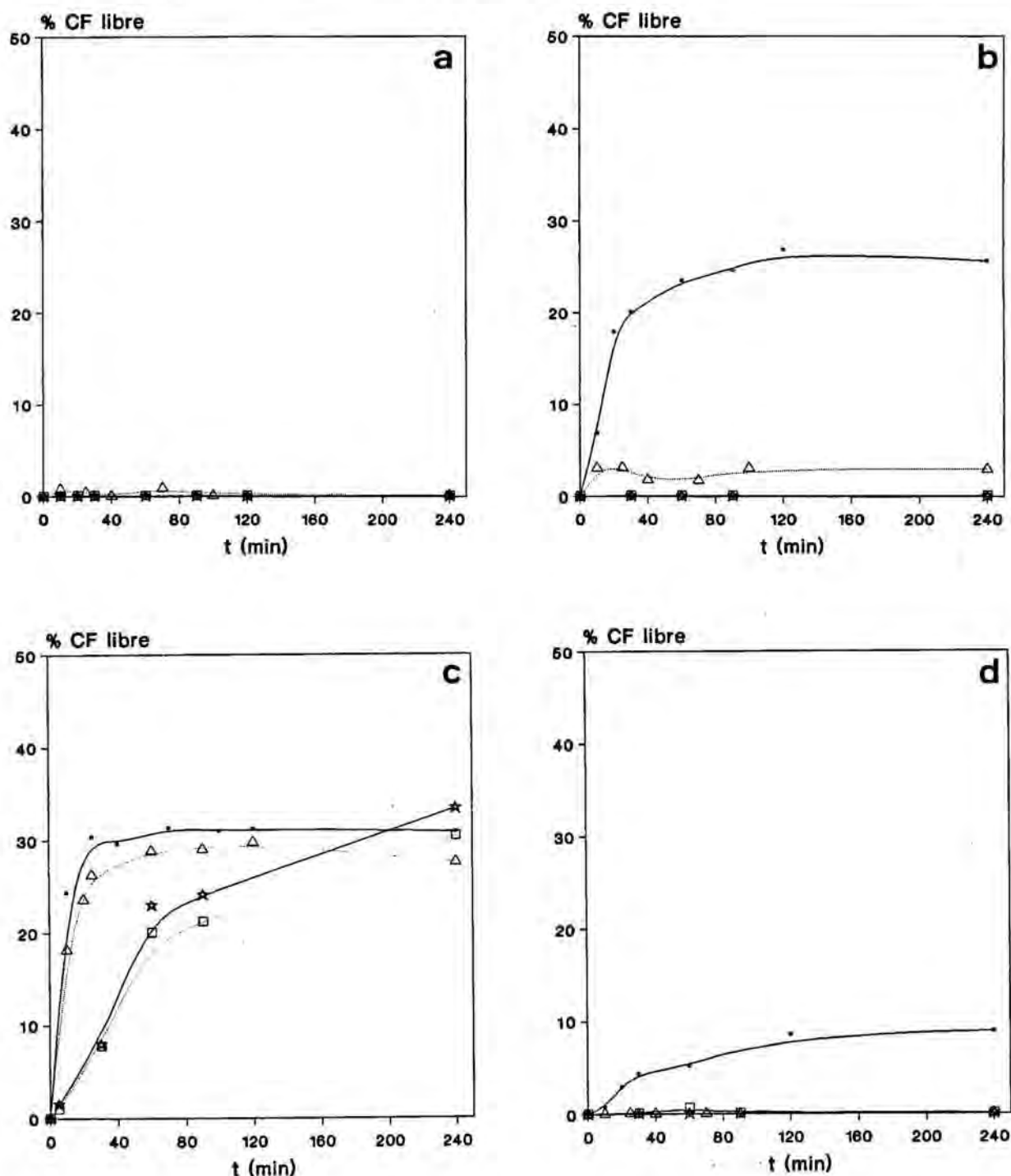


Figura 51: Liberación de CF encapsulada en liposomas DRV de DPPC ó DPPC/COL (1:1) (concentración de fosfolípido 6.8 mM) en presencia de hormonas peptídicas. a) LHRH, b) SRIF, c) GHRH(1-29), d) hGH. Temperatura 20 ± 1 °C. Relación molar DPPC/péptido 1:1: ■ DPPC, Δ DPPC/COL. Relación molar DPPC/péptido 44:1: ★ DPPC, □ DPPC/COL.

2.6. INTERACCION DE LAS HORMONAS PEPTIDICAS CON CAPAS LIPIDICAS MONOMOLECULARES

2.6.1. CINETICAS DE PENETRACIÓN A AREA CONSTANTE

Los experimentos de penetración en monocapas constituyen una valiosa herramienta para estudiar las interacciones entre monocapas lipídicas y péptidos o proteínas, y permiten, con limitaciones, obtener una orientación sobre las interacciones lípido-péptido a nivel de bicapas lipídicas (Williams et al., 1989).

Las cinéticas de penetración se estudiaron a dos valores de presión superficial inicial (π_i): 5 y 20 mN.m⁻¹ (este segundo valor es equivalente al existente en las bicapas lipídicas de los liposomas MLV ó DRV).

Se ensayaron diversas composiciones lipídicas, mezclas de fosfatidilcolina con otros fosfolípidos (SM, PS, PI), con gangliósidos y con colesterol, reproduciendo la composición de los liposomas preparados para los estudios de liberación de CF. Por otra parte, se compararon los resultados de penetración en monocapas con fosfatidilcolina natural (PC) (en estado de cristal líquido a temperatura ambiente) con los de monocapas con lecitina hidrogenada (HPC) (en estado de gel a la temperatura del estudio).

2.6.1.1. *Cinéticas de penetración de Somatostatina en monocapas*

La actividad superficial de SRIF fue de 1.92 mN.m⁻¹ cuando se inyectaron 7.75 10⁻⁹ moles. A partir de este valor se calculó el exceso superficial de esta molécula (Γ), que fue de 0.421 10⁻¹¹ mol.cm⁻²

Cuando π_i de la monocapa era de 5 mN.m⁻¹, la adición de 7.75 10⁻⁹ moles de SRIF (concentración final en la subfase 15.5 10⁻⁸ M) causaba un incremento significativo en la presión superficial. Este aumento era prácticamente independiente de si la lecitina utilizada era PC o HPC excepto en las monocapas que contenían SM, en las que SRIF penetraba más si la fosfatidilcolina utilizada era insaturada (PC). La incorporación de colesterol a las

monocapas de PC ó HPC no proporcionaba diferencias en la penetración de la hormona, ya que los incrementos de π se mantenían iguales. La interacción resultaba ligeramente favorecida al incluir en las monocapas otro fosfolípido (SM, PS, PI) o un gangliósido (figura 52a).

Al fijar π_i en 20 mN.m⁻¹, la penetración de SRIF a esta misma concentración se redujo considerablemente (figura 53a). En las monocapas con PC el aumento en la presión superficial era de 0.57 mN.m⁻¹, frente a 2.16 mN.m⁻¹ detectado en las de PC/COL.

2.6.1.2. *Cinéticas de penetración de LHRH*

La LHRH es una hormona con muy baja actividad superficial, ya que al inyectar en la subfase 7.75 10⁻⁹ moles de esta hormona (concentración final en la subfase 15.5 10⁻⁸ M), se produjo un incremento en la presión superficial de sólo 0.62 mN.m⁻¹. Esto se corresponde con un exceso superficial (Γ) de 0.136 10⁻¹¹ mol.cm⁻².

Esta baja actividad superficial va unida a una reducida capacidad de penetración de la hormona en monocapas. En monocapas a presión superficial inicial de 5mN.m⁻¹, la LHRH (15.5 10⁻⁸ M) causaba incrementos de la presión superficial muy pequeños (p.e. 3 mN.m⁻¹ en monocapas de HPC/COL/PS) (figura 52b).

Al incrementar la presión inicial de las monocapas a 20 mN.m⁻¹, la penetración de LHRH resultó todavía más baja. Al igual que en el caso de SRIF, la presencia de colesterol favorecía la penetración de la hormona (figura 53b). En cambio, la incorporación de PS, SM, PI o G no tenía una influencia apreciable en la penetración.

2.6.1.3. *Cinéticas de penetración de GHRH(1-29) en monocapas*

La GHRH(1-29) presentaba una elevada actividad superficial. Al inyectar volúmenes crecientes (5, 15, 25, 30 y 50 μ l) de solución 1.10 10⁻⁴ M de la hormona en la subfase, se detectaron incrementos significativos en la presión superficial. Para concentraciones finales superiores a 3.3 10⁻⁸ M (obtenida al inyectar 15 μ l), el incremento de π se mantenía

2.6. INTERACCION DE LAS HORMONAS PEPTIDICAS CON CAPAS LIPIDICAS MONOMOLECULARES

2.6.1. CINETICAS DE PENETRACIÓN A AREA CONSTANTE

Los experimentos de penetración en monocapas constituyen una valiosa herramienta para estudiar las interacciones entre monocapas lipídicas y péptidos o proteínas, y permiten, con limitaciones, obtener una orientación sobre las interacciones lípido-péptido a nivel de bicapas lipídicas (Williams et al., 1989).

Las cinéticas de penetración se estudiaron a dos valores de presión superficial inicial (π_i): 5 y 20 mN.m⁻¹ (este segundo valor es equivalente al existente en las bicapas lipídicas de los liposomas MLV ó DRV).

Se ensayaron diversas composiciones lipídicas, mezclas de fosfatidilcolina con otros fosfolípidos (SM, PS, PI), con gangliósidos y con colesterol, reproduciendo la composición de los liposomas preparados para los estudios de liberación de CF. Por otra parte, se compararon los resultados de penetración en monocapas con fosfatidilcolina natural (PC) (en estado de cristal líquido a temperatura ambiente) con los de monocapas con lecitina hidrogenada (HPC) (en estado de gel a la temperatura del estudio).

2.6.1.1. *Cinéticas de penetración de Somatostatina en monocapas*

La actividad superficial de SRIF fue de 1.92 mN.m⁻¹ cuando se inyectaron 7.75 10⁻⁹ moles. A partir de este valor se calculó el exceso superficial de esta molécula (Γ), que fue de 0.421 10⁻¹¹ mol.cm⁻²

Cuando π_i de la monocapa era de 5 mN.m⁻¹, la adición de 7.75 10⁻⁹ moles de SRIF (concentración final en la subfase 15.5 10⁻⁸ M) causaba un incremento significativo en la presión superficial. Este aumento era prácticamente independiente de si la lecitina utilizada era PC o HPC excepto en las monocapas que contenían SM, en las que SRIF penetraba más si la fosfatidilcolina utilizada era insaturada (PC). La incorporación de colesterol a las

monocapas de PC ó HPC no proporcionaba diferencias en la penetración de la hormona, ya que los incrementos de π se mantenían iguales. La interacción resultaba ligeramente favorecida al incluir en las monocapas otro fosfolípido (SM, PS, PI) o un gangliósido (figura 52a).

Al fijar π_i en 20 mN.m⁻¹, la penetración de SRIF a esta misma concentración se redujo considerablemente (figura 53a). En las monocapas con PC el aumento en la presión superficial era de 0.57 mN.m⁻¹, frente a 2.16 mN.m⁻¹ detectado en las de PC/COL.

2.6.1.2. *Cinéticas de penetración de LHRH*

La LHRH es una hormona con muy baja actividad superficial, ya que al inyectar en la subfase 7.75 10⁻⁹ moles de esta hormona (concentración final en la subfase 15.5 10⁻⁸ M), se produjo un incremento en la presión superficial de sólo 0.62 mN.m⁻¹. Esto se corresponde con un exceso superficial (Γ) de 0.136 10⁻¹¹ mol.cm⁻².

Esta baja actividad superficial va unida a una reducida capacidad de penetración de la hormona en monocapas. En monocapas a presión superficial inicial de 5mN.m⁻¹, la LHRH (15.5 10⁻⁸ M) causaba incrementos de la presión superficial muy pequeños (p.e. 3 mN.m⁻¹ en monocapas de HPC/COL/PS) (figura 52b).

Al incrementar la presión inicial de las monocapas a 20 mN.m⁻¹, la penetración de LHRH resultó todavía más baja. Al igual que en el caso de SRIF, la presencia de colesterol favorecía la penetración de la hormona (figura 53b). En cambio, la incorporación de PS, SM, PI o G no tenía una influencia apreciable en la penetración.

2.6.1.3. *Cinéticas de penetración de GHRH(1-29) en monocapas*

La GHRH(1-29) presentaba una elevada actividad superficial. Al inyectar volúmenes crecientes (5, 15, 25, 30 y 50 μ l) de solución 1.10 10⁻⁴ M de la hormona en la subfase, se detectaron incrementos significativos en la presión superficial. Para concentraciones finales superiores a 3.3 10⁻⁸ M (obtenida al inyectar 15 μ l), el incremento de π se mantenía

constante. Las diferentes presiones superficiales y los excesos superficiales en función de la concentración de péptido en la subfase se muestran en la tabla 12. En la figura 54 se representa el exceso superficial para cada concentración de péptido.

Cuando se inyectaron $2.75 \cdot 10^{-9}$ moles de GHRH(1-29) en monocapas a una presión superficial baja (5 mN.m^{-1}) (concentración final de péptido $5.51 \cdot 10^{-8} \text{ M}$), la hormona causaba importantes incrementos en la presión superficial (figura 52c). La penetración era superior en monocapas con PC que en las de HPC, excepto en las monocapas de PC/COL y de PC/COL/PI, en las que el incremento de presión era similar en los dos casos. En monocapas preparadas con lecitina hidrogenada, la incorporación de SM, PS o G reducía la permeabilidad a esta hormona.

Por otra parte, cuando la presión superficial inicial de las monocapas (π_i) fue de 20 mN.m^{-1} , GHRH(1-29) ($5.51 \cdot 10^{-8} \text{ M}$) causaba incrementos de presión superficial superiores a los obtenidos con SRIF e independientes de la composición lipídica (figura 53c). La penetración del péptido aumentaba cuando se incluía colesterol en las monocapas, sin embargo a 20 mN.m^{-1} este efecto era apenas perceptible.

Concentración	$\Delta\pi \text{ (mN.m}^{-1}\text{)}$	$\Gamma \text{ (mol.cm}^{-2}\text{)}$
$1.10 \cdot 10^{-8} \text{ M}$	4.56	$1.02 \cdot 10^{-11}$
$3.30 \cdot 10^{-8} \text{ M}$	6.72	$1.60 \cdot 10^{-11}$
$5.51 \cdot 10^{-8} \text{ M}$	7.20	$1.77 \cdot 10^{-11}$
$6.61 \cdot 10^{-8} \text{ M}$	7.68	$1.90 \cdot 10^{-11}$
$11.02 \cdot 10^{-8} \text{ M}$	8.64	$2.21 \cdot 10^{-11}$

Tabla 12: Incrementos en la presión superficial (π) y exceso superficial (Γ) en función de la concentración de GHRH(1-29) en la subfase.

2.6.1.4. *Cinéticas de penetración de hGH en monocapas*

La actividad superficial de hGH resultó muy elevada, ya que al inyectar volúmenes variables ($5, 15, 25, 30$ y $50 \mu\text{l}$) de una solución $1.0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ en la subfase consistente en 50 ml de solución tamponada $\text{pH}=7.4$, se producían incrementos de presión superficial de casi 18

mN.m⁻¹. Los incrementos de presión alcanzaban el equilibrio a concentraciones finales superiores a 5.26 10⁻⁸ M, tal como se recoge en la tabla 13. Las excesos superficiales correspondientes se representan en la figura 54.

Concentración	$\Delta\pi$ (mN.m ⁻¹)	Γ (mol.cm ⁻²)
1.05 10 ⁻⁸ M	9.20	2.05 10 ⁻¹¹
3.15 10 ⁻⁸ M	14.88	3.53 10 ⁻¹¹
5.26 10 ⁻⁸ M	16.32	3.99 10 ⁻¹¹
6.31 10 ⁻⁸ M	16.80	4.15 10 ⁻¹¹
10.52 10 ⁻⁸ M	17.76	4.53 10 ⁻¹¹

Tabla 13: Incrementos en la presión superficial (π) y exceso superficial (Γ) en función de la concentración de hGH en la subfase.

En monocapas a $\pi_i = 5$ mN. m⁻¹, la hGH presentaba una elevada capacidad de penetración (figura 52d). No se observaron diferencias significativas en función del tipo de lecitina (PC o HPC), así como en función de la presencia de colesterol o de otros fosfolípidos o gangliósidos. A $\pi_i = 20$ mN. m⁻¹, presión equiparable a la existente en los liposomas, la capacidad de penetración era máxima en presencia de gangliósidos (figura 53d).

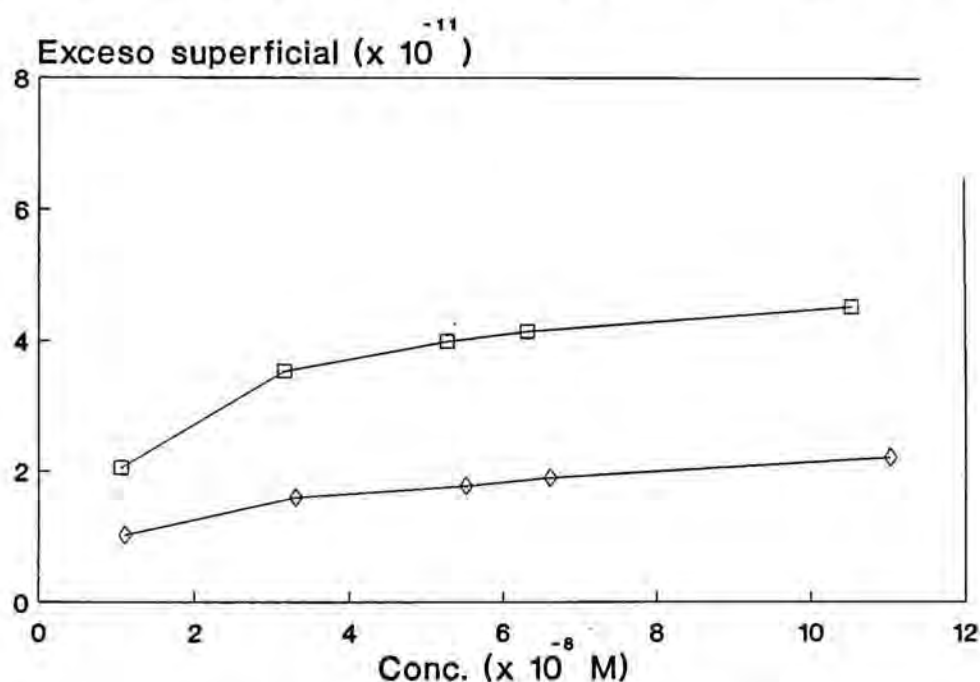


Figura 54: Excesos superficiales (Γ mol.cm⁻²) en función de la concentración de hormona en la subfase. ($\diamond$) GHRH(1-29); ($\square$) hGH.

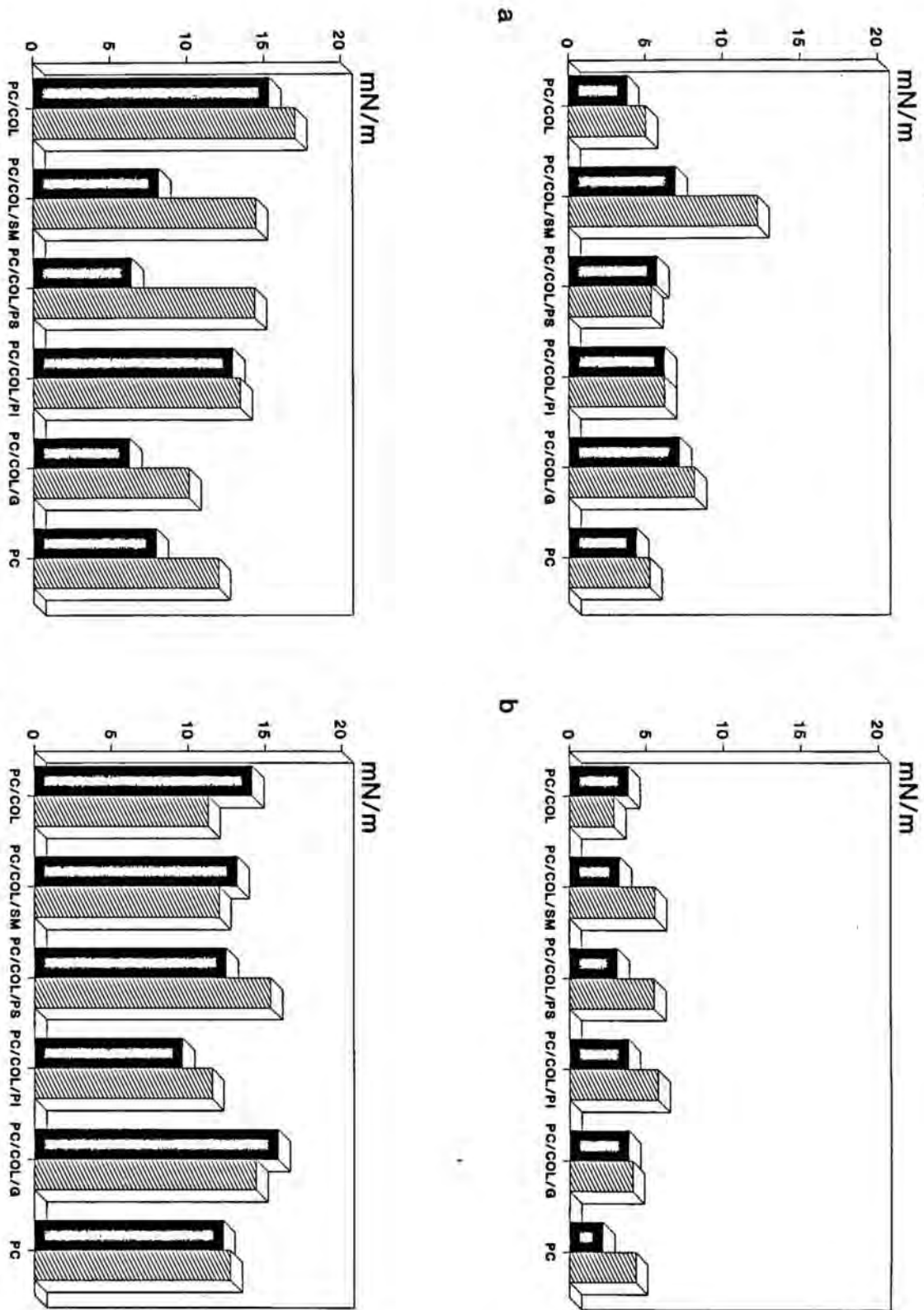
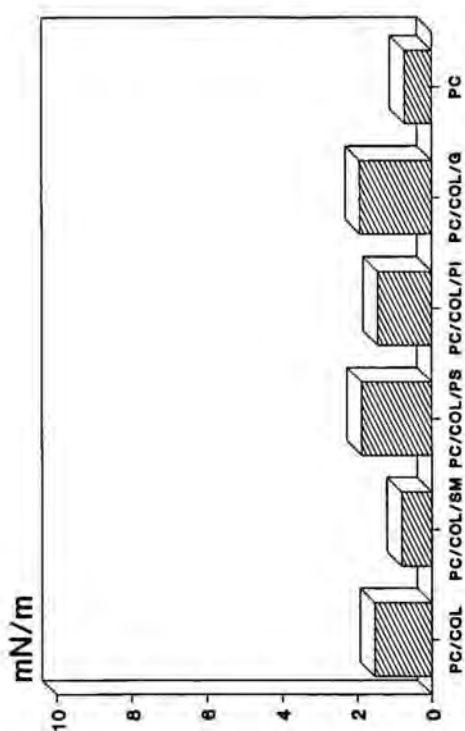
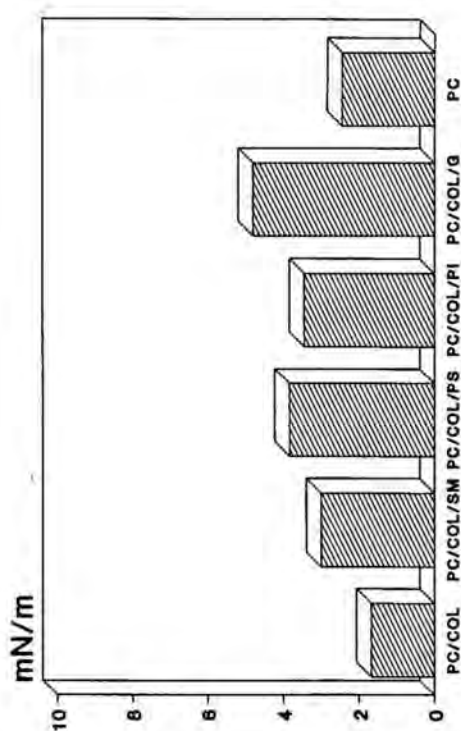


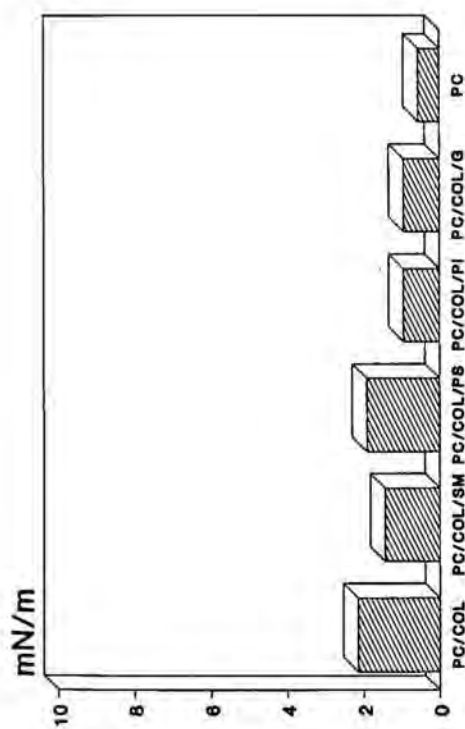
Figura 52: Incrementos de presión superficial causados por la penetración de hormonas peptídicas en monocapas de diferentes composiciones lipídicas. a) SRIF, b) LHRH, c) GHRH(1-29), d) hGH. Presión inicial: 5 mN.m⁻¹. Concentración de hormona: 15 10⁻⁸ M (LHRH, SRIF); 5.5 10⁻⁸ M (hGH, GHRH(1-29)). ■ HPC; ▨ PC.



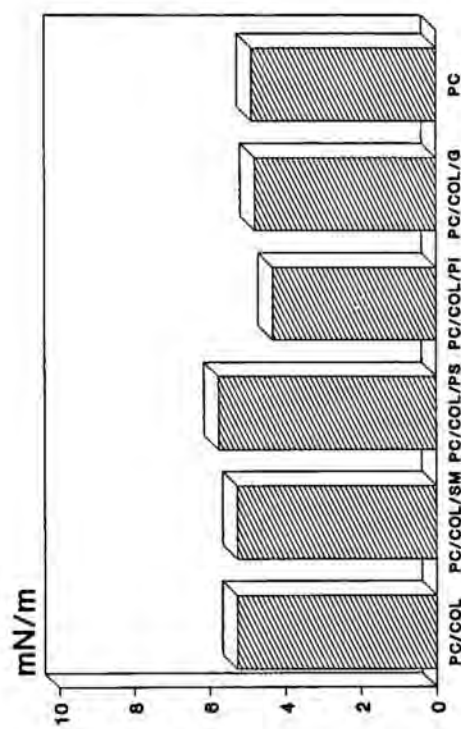
a



b



c



d

Figura 53: Incrementos de presión superficial causados por la penetración de hormonas peptídicas en monocapas de diferentes composiciones lipídicas. a) SRIF, b) LHRH, c) GHRH(1-29), d) hGH. Presión inicial: 20 mN.m⁻¹. Concentración de hormona: 15 10⁻⁹ M (LHRH, SRIF); 5.5 10⁻⁸ M (hGH, GHRH(1-29)).

2.6.2. ISOTERMAS DE COMPRESION DE MONOCAPAS MIXTAS DE HORMONAS PEPTIDICAS CON DPPC

Como otra aproximación a la interacción hormona-membrana, se estudiaron las isotermas de compresión de DPPC pura y mezclada con cada una de las cuatro hormonas en estudio.

2.6.2.1. *Isotermas de compresión de monocapas mixtas Somatostatina/DPPC*

Las isotermas obtenidas para los dos componentes (DPPC y SRIF) puros, así como para las distintas fracciones molares de ambos se muestran en la figura 55.

No existía una gradación en los valores de área/molécula de las diferentes monocapas mixtas. La monocapa de composición DPPC/SRIF 0.75:0.25 estaba claramente más comprimida que el resto. Esto es indicativo de la existencia de fuerzas de atracción entre las moléculas de DPPC y SRIF a esta composición molar. El resto de las isotermas presentaban un tramo de líquido expandido hasta una presión de alrededor de 10 mN.m^{-1} , pasando a continuación a líquido condensado. No se observó colapso en ningún caso. Además, se podía apreciar que a bajas presiones las monocapas mixtas a excepción de la que contenía 0.75 de DPPC, estaban ligeramente más expandidas que las puras, pero por el contrario, a presiones elevadas estaban algo más condensadas. Las energías asociadas a estos procesos se comentarán más adelante.

En la tabla 14 se muestran los valores de las áreas ocupadas por molécula para las diferentes mezclas medidas a diferentes presiones superficiales.

π mN.m^{-1}	Relación molar DPPC/SRIF				
	1:0	0.75:0.25	0.5:0.5	0.25:0.75	0:1
5	1.04	0.87	1.10	1.25	0.98
10	0.97	0.75	0.94	1.08	0.91
15	0.93	0.68	0.82	0.97	---
20	0.87	0.63	0.78	0.91	---

Tabla 14: Áreas ocupadas por molécula expresadas en $\text{nm}^2.\text{molec}^{-1}$ para monocapas mixtas de DPPC y somatostatina medidas a diferentes presiones superficiales (π).

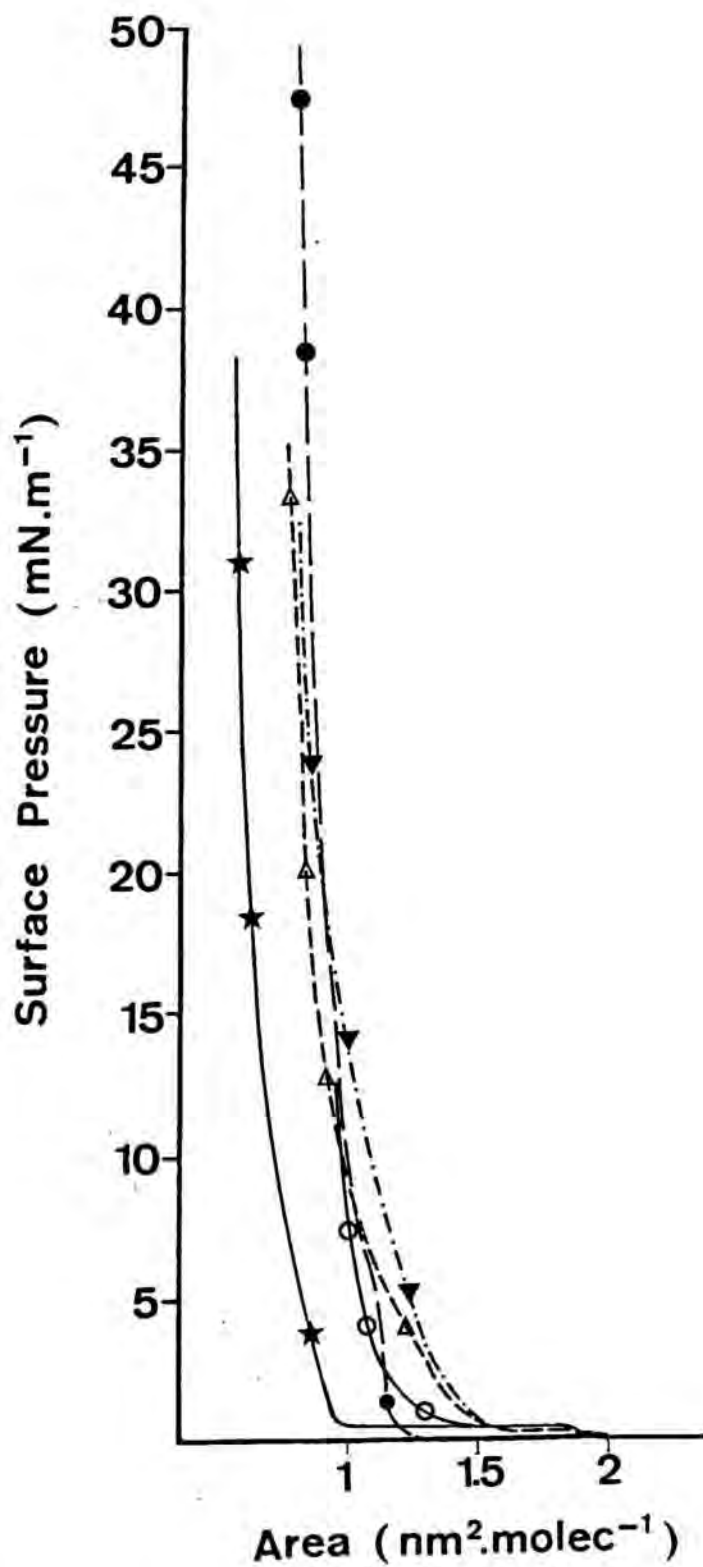


Figura 55: Isotermas de compresión de monocapas mixtas de DPPC/SRIF extendidas sobre tampón acetato pH=7.4. Fracción molar de DPPC: ● 1; ★ 0.75; △ 0.5; ▼ 0.25; ○ 0.

Para interpretar las interacciones lípido-péptido en una monocapa de composición variable se compara el área ocupada por molécula para las diferentes fracciones molares. Si la mezcla es ideal ó no existe interacción, el área ocupada por molécula viene dada por la contribución de cada componente en estado puro multiplicado por su fracción molar. En este caso se dice que se cumple la regla de la aditividad. En caso contrario pueden producirse desviaciones positivas o negativas que son indicativas de la mayor o menor estabilidad de la mezcla.

En la figura 56, se representan los valores de las áreas moleculares obtenidas a cada presión superficial considerada, para las diferentes fracciones molares DPPC/SRIF. Como puede observarse, existía una desviación positiva respecto a la regla de la aditividad, que alcanzaba un valor máximo cuando la proporción molar de péptido es de 0.75 para presiones de 5 y 10 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Dado que las monocapas de péptido puro no podían comprimirse a presiones superiores a $12.5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, no se pudieron extraer conclusiones referentes al caracter ideal de la mezcla a presiones elevadas. Asimismo, puede observarse una desviación de caracter negativo para la relación molar DPPC/SRIF 0.75:0.25.

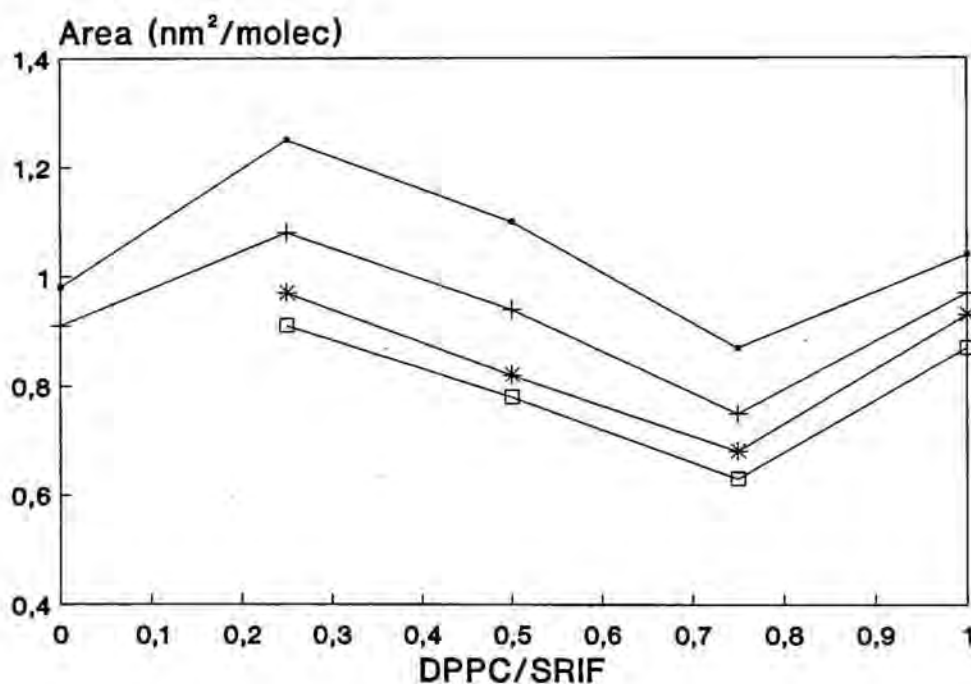


Figura 56: Miscibilidad de DPPC/SRIF en monocapas mixtas extendidas sobre tampón acetato ($\text{pH}=7.4$). Áreas ocupadas por molécula ($\text{nm}^2\cdot\text{molec}^{-1}$) a diferentes presiones superficiales ($\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$): ■ 5; + 10; * 15, □ 20.

Cálculos termodinámicos

Siguiendo los conceptos teóricos descritos en el apartado 2.2.7.1 de Introducción, se han calculado los parámetros termodinámicos referentes a la interacción entre DPPC y SRIF.

Se calcularon las energías libres en exceso de mezcla (ΔG_M^E) y los valores del parámetro de interacción (α) a la presión superficial (π) de 10 mN.m⁻¹ (tabla 15)

Dado que la isoterma de SRIF únicamente se puede comprimir hasta presiones superficiales de 10 mN.m⁻¹, los cálculos termodinámicos sólo se han podido obtener a dicha presión superficial. Asimismo, no fue posible calcular la energía de interacción (Δh), dado que las isotermas de compresión de los componentes puros no presentaban colapso.

Fracción molar DPPC/SRIF	$\pi = 10 \text{ mN.m}^{-1}$	
	ΔG_M^E	α
0.75:0.25	-322	-3
0.50:0.50	80	1
0.25:0.75	278	3

Tabla 15: Energías de mezcla en exceso (ΔG_M^E) en cal.mol⁻¹ y parámetros de interacción (α) para monocapas mixtas de DPPC y SRIF extendidas sobre subfase tamponada (pH=7.4) a una presión superficial de 10 mN.m⁻¹.

2.6.2.2. Isotermas de compresión de monocapas mixtas LHRH/DPPC

Las isotermas de compresión correspondientes a la hormona peptídica LHRH, la DPPC y mezclas de ambos componentes a distintas proporciones molares se muestran en la figura 57.

Puede observarse que el estado de ordenación de las moléculas pasaba de líquido expandido a bajas presiones a líquido condensado al incrementar la presión. La monocapa correspondiente a LHRH pura era la más condensada, y únicamente podía comprimirse hasta 16 mN.m⁻¹. Al ir incrementando la proporción de DPPC iba aumentando el área ocupada por molécula, es decir que la monocapa estaba más expandida. Una excepción se detectó para la fracción molar DPPC/LHRH 0.50:0.50, ya que la monocapa se encontraba más expandida que la de DPPC/LHRH 0.75:0.25, sin embargo la diferencia entre ambas era muy poco importante, tal como se refleja en la tabla 16.

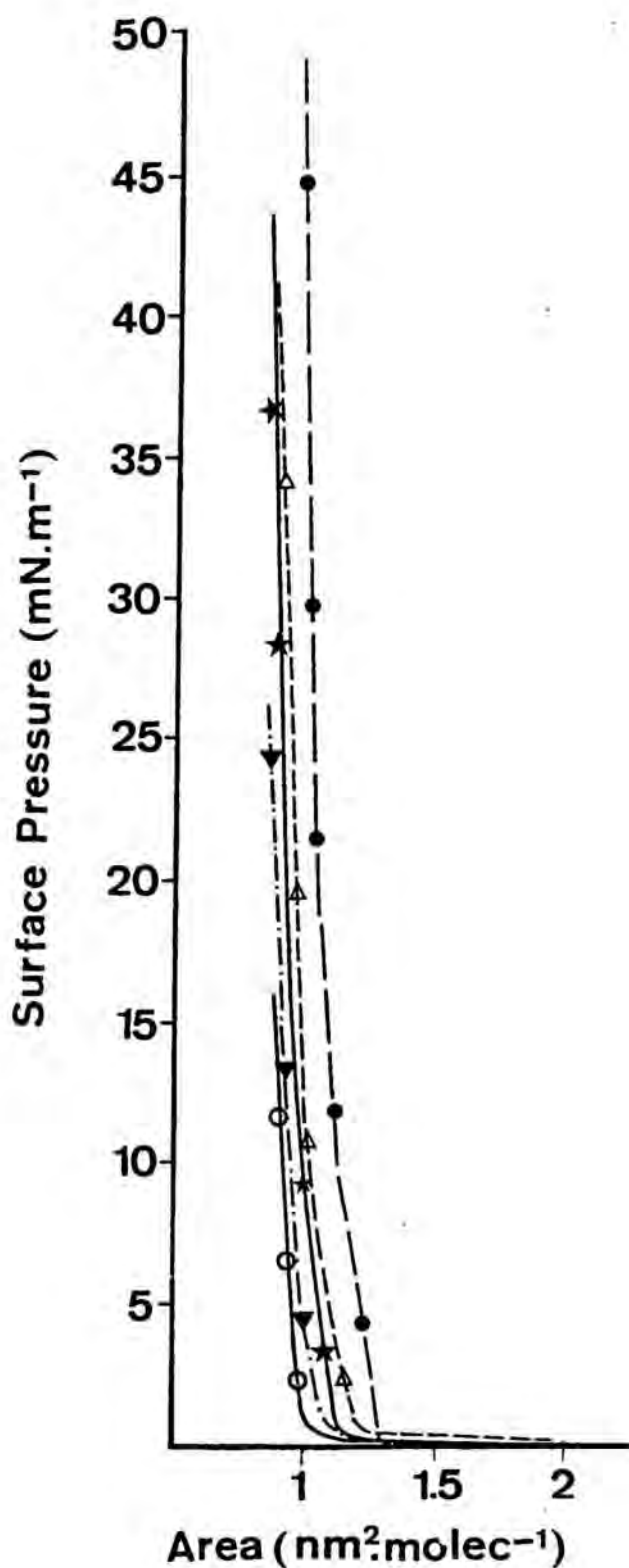


Figura 57: Isotermas de compresión de monocapas mixtas de DPPC/LHRH extendidas sobre tampón acetato pH=7.4. Fracción molar de DPPC: ● 1; ★ 0.75; △ 0.5; ▼ 0.25; ○ 0.

π mN.m ⁻¹	Relación molar DPPC/LHRH				
	1:0	0.75:0.25	0.50:0.50	0.25:0.75	0:1
5	1.15	1.06	1.09	1.04	0.97
10	1.02	0.98	1.00	0.97	0.92
15	0.98	0.93	0.97	0.93	0.88
20	0.96	0.91	0.94	0.88	---

Tabla 16: Áreas ocupadas por molécula expresadas en nm².molec⁻¹ para monocapas mixtas de DPPC y LHRH medidas a diferentes presiones superficiales.

Al representar las áreas moleculares (nm².molec⁻¹) correspondientes a las diferentes fracciones molares DPPC/LHRH y a varias presiones superficiales (mN.m⁻¹) (figura 58), puede considerarse que existía una desviación positiva de la idealidad, desviación que era más acentuada para la fracción molar DPPC/LHRH 0.50:0.50 y a 5 mN.m⁻¹. Al aumentar la presión superficial, esta desviación era menos importante.

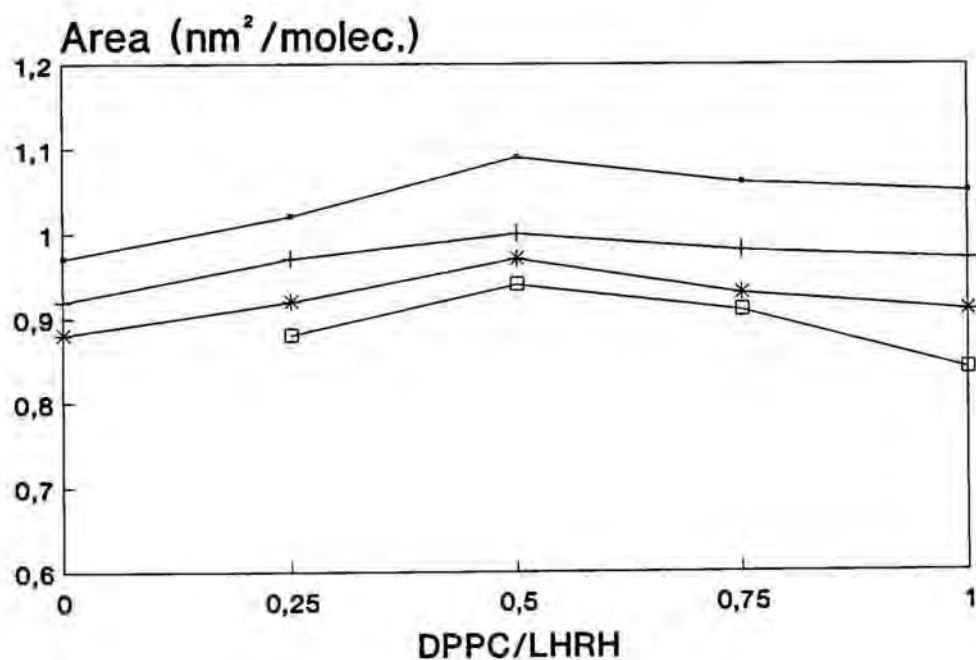


Figura 58: Miscibilidad de DPPC/LHRH en monocapas mixtas extendidas sobre tampón acetato (pH=7.4). Áreas ocupadas por molécula (nm².molec⁻¹) a diferentes presiones superficiales (mN.m⁻¹): ■ 5; + 10; * 15, □ 20.

Cálculos termodinámicos

Al igual que en el caso de SRIF, la isoterma de LHRH pura no se podía comprimir a presiones superficiales elevadas, por lo que los cálculos termodinámicos se han realizado a 10 mN.m^{-1} . Tampoco en este caso los componentes presentaban colapso. Los valores obtenidos para ΔG_M^E y α se muestran en la tabla 17 para la presión superficial de 10 mN.m^{-1} .

Fracción molar DPPC/LHRH	$\pi = 10 \text{ mN.m}^{-1}$	
	ΔG_M^E	α
0.75:0.25	226	2
0.50:0.50	143	1
0.25:0.75	-56	-1

Tabla 17: Energías de mezcla en exceso (ΔG_M^E) en cal.mol^{-1} y parámetros de interacción (α) para monocapas mixtas de DPPC y LHRH extendidas sobre subfase tamponada ($\text{pH}=7.4$) a una presión superficial de 10 mN.m^{-1} .

2.6.2.3. Isotermas de compresión de monocapas mixtas GHRH(1-29)/DPPC

Tal como se desprende de los resultados de las cinéticas de penetración en monocapas así como de los estudios de fluorescencia y CD, GHRH(1-29) es un péptido que interacciona fuertemente con los lípidos. Esto se confirmó con los estudios de isotermas mixtas con DPPC. En primer lugar se preparó una solución de GHRH(1-29) de 2.84 mg/ml , pero resultó excesiva, ya que las isotermas correspondientes al péptido puro no mostraban la primera parte, es decir la fase en que las moléculas de péptido están más expandidas, aún extendiendo volúmenes muy pequeños. Por ello se optó por preparar una solución más diluída, de 1 mg/ml (70% metanol y 30% agua), siendo necesario extender $20 \mu\text{l}$, ya que con $50 \mu\text{l}$ continuaba enmascarándose la primera parte de la isoterma. La solución de DPPC necesaria para obtener una relación equimolar con el péptido fue de sólo 0.218 mg/ml , por lo que al extender tan poco volumen de esta solución ($20 \mu\text{l}$), no aparecía la isoterma.

Las isotermas obtenidas se muestran en la figura 59. La correspondiente a GHRH(1-29) pura presentaba un estado de ordenación de tipo líquido expandido. A medida que la proporción de DPPC aumentaba, se observaron dos fenómenos: por una parte disminuía el área ocupada

por molécula, y al mismo tiempo las monocapas pasaban al estado de líquido condensado a presiones cada vez más bajas (por ejemplo cuando la fracción molar era 0.8 DPPC/0.2 GHRH las moléculas se encontraban es este estado a presiones inferiores a 2 mN.m⁻¹). En la tabla 18 se muestran los valores de las áreas ocupadas por molécula para las diferentes mezclas, medidas a distintas presiones superficiales.

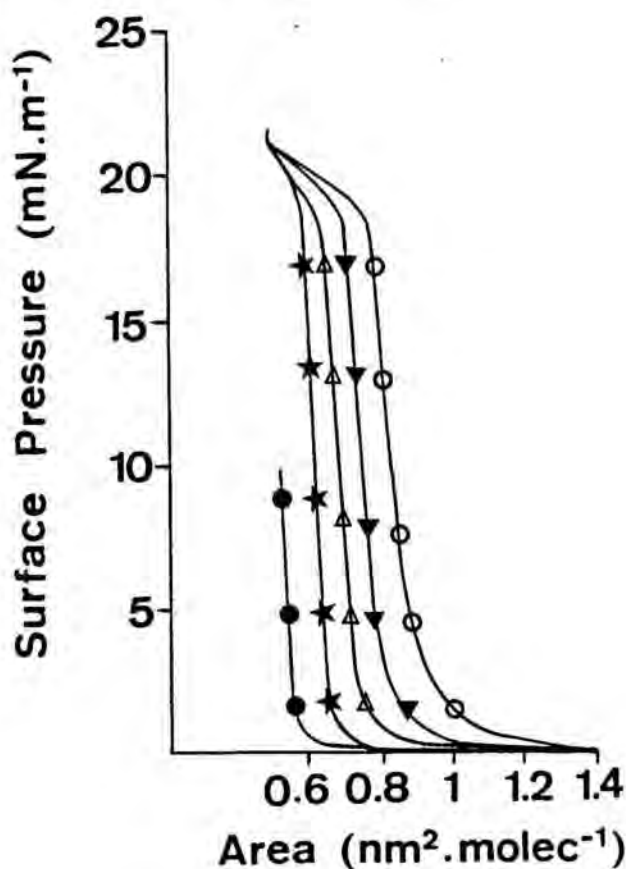


Figura 59: Isotermas de compresión de monocapas mixtas de DPPC/GHRH(1-29) extendidas sobre subfase de tampón acetato pH=7.4. Fracción molar de DPPC: ● 0.8; ★ 0.6; Δ 0.4; ▼ 0.2; ○ 0.

π mN.m ⁻¹	Relación molar DPPC/GHRH(1-29)					
	1:0	0.8:0.2	0.6:0.2	0.4:0.6	0.2:0.8	0:1
5	----	0.53	0.66	0.71	0.80	0.88
10	----	0.50	0.61	0.68	0.75	0.84
15	----	----	0.59	0.65	0.73	0.79
20	----	----	0.55	0.57	0.61	0.62

Tabla 18: Áreas ocupadas por molécula (nm².molec⁻¹) para monocapas de composición variable medidas a diferentes presiones superficiales.

En la figura 60 se representan los valores de las áreas moleculares ($\text{nm}^2 \cdot \text{molec}^{-1}$) obtenidas a distintas presiones superficiales para las diferentes fracciones DPPC/GHRH(1-29) ensayadas. El perfil de miscibilidad era prácticamente ideal a las diferentes presiones ensayadas, lo que puede indicar o bien que los dos componentes son completamente miscibles o que existe una total separación de fases. Dado que en este caso no disponíamos de la isoterma de DPPC pura, no se pudieron hacer los cálculos termodinámicos necesarios para determinar en cual de los dos casos nos encontramos.

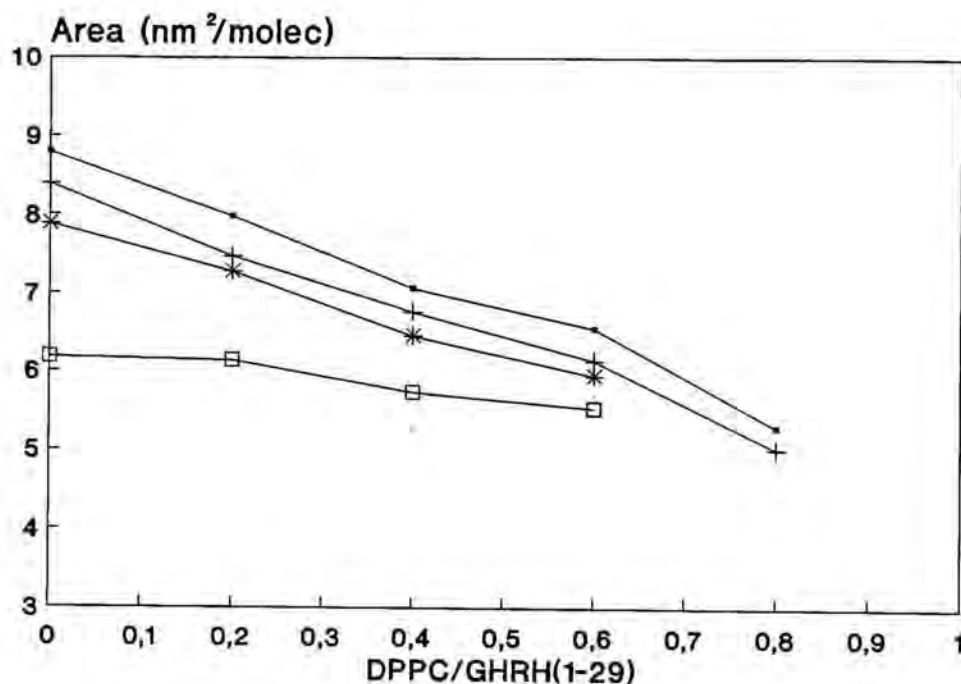


Figura 60: Miscibilidad de DPPC/GHRH(1-29) en monocapas mixtas extendidas sobre tampón acetato ($\text{pH}=7.4$). Áreas ocupadas por molécula ($\text{nm}^2 \cdot \text{molec}^{-1}$) a diferentes presiones superficiales ($\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$): ■ 5; + 10; * 15, □ 20.

2.6.2.4. *Isotermas de compresión de monocapas mixtas hGH/DPPC.*

Al extender, como se ha descrito en los apartados anteriores para las demás hormonas peptídicas, las mismas cantidades de una solución acuosa de 1 mg/ml de hGH sobre una subfase de tampón acetato ($\text{pH}=7.4$) y comprimir, no se apreció variación alguna en la presión superficial, es decir que no se formaron isotermas de compresión. Dado que muchas moléculas, a pesar de no formar monocapas estables, son capaces de interaccionar con monocapas de fosfolípidos, se ha llevado a cabo el estudio de interacción de esta hormona con una monocapa de DPPC extendida en la superficie, determinando la influencia de hGH

en el estado de ordenación de las moléculas de DPPC en la isoterma de compresión.

Así pues, se extendió una monocapa de DPPC a una presión superficial $\pi_i = 1 \text{ mN.m}^{-1}$ sobre una solución de hGH $1.3 \cdot 10^{-6} \text{ M}$. En estas condiciones se registró la isoterma de compresión. En la figura 61 se muestran de modo comparativo las isotermas de DPPC extendida sobre tampón y sobre solución de hGH en éste mismo tampón, respectivamente. Puede observarse que la presencia de la hormona en la subfase provocaba una expansión en el estado de ordenación de las moléculas de DPPC, expansión que disminuía gradualmente a medida que aumentaba la presión superficial. Es de destacar el hecho de que la transición de fase correspondiente a la DPPC tenía lugar a una presión superficial superior en presencia de hGH en la subfase, y además, alrededor de 26.5 mN.m^{-1} aparecía una nueva transición de fase.

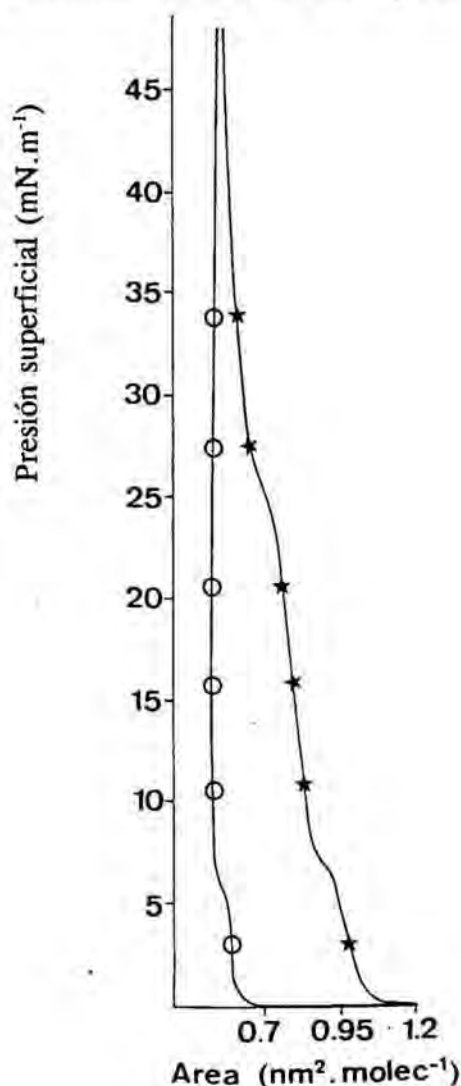


Figura 61: Isotermas de compresión de una monocapa de DPPC extendida sobre subfase conteniendo ○ tampón acetato pH=7.4, y ★ hGH $1.3 \cdot 10^{-6} \text{ M}$.

3. INTERACCION DE INMUNOGENOS PEPTIDICOS DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B CON MODELOS DE MEMBRANA

3.1. ANALISIS DE PUREZA DE PEPTIDO Y LIPOPEPTIDOS

En este capítulo se ha estudiado la interacción con liposomas y monocapas del péptido preS(120-145) y tres derivados lipopeptídicos conteniendo residuos de ácido esteárico, ácido colánico y Pam₃CSS.

El péptido preS(120-145) es un fragmento de la proteína preS del virus de la hepatitis B que ha sido seleccionado como inmunógeno por tres razones:

1. La secuencia incluye el máximo absoluto de hidrofília en el perfil obtenido según el método de Hoop & Woods (resíduos $\approx$ 128-135), y está descrita la existencia de una correspondencia entre los máximos de hidrofília y los epítomos
2. Diversos estudios han demostrado que entre los residuos 132-145 se encuentra localizado el epítomo dominante reconocido por anticuerpos (en el sistema murino). Además, el péptido preS(120-145) es altamente inmunógeno, presenta reactividad cruzada con la región preS₂ nativa y reacciona con anticuerpos naturales de pacientes convalecientes de hepatitis B (Milich, 1988).
3. Se ha localizado un determinante antigénico T entre los residuos 120-132 (Milich, 1988). Por otra parte, según el algoritmo de Berzofsky, el segmento 126-130 presenta un índice de hélice α anfipática relevante. La presencia de este epítomo T ha permitido explicar la inmunogenicidad de este péptido sin conjugar (título de anticuerpos primarios 1/512000).

Este péptido ha sido sintetizado y caracterizado en nuestro laboratorio siguiendo el protocolo Fmoc-poliacrilamida en un sintetizador de flujo continuo (Rabanal et al., 1990). La secuencia primaria se muestra a continuación:

¹²⁰Met-Gln-Trp-Asn-Ser-Thr-Ala-Leu-His-Gln-Ala-Leu-Gln-Asp-Pro-Arg-Val-Arg-Gly-Leu-Tyr-Leu-Pro-Ala-Gly-Gly¹⁴⁵

En general, los péptidos administrados en forma libre son inmunógenos débiles, y por lo tanto

deben asociarse a un inmunoadyuvante que potencie la respuesta inmune. Se han descrito numerosas sustancias con propiedades inmunoadyuvantes; algunas de ellas son inmunogénicas por sí mismas y actúan como portadores, de manera que unidas a un péptido aumentan la producción de anticuerpos contra el mismo. Dentro de este grupo se incluyen proteínas como BSA y KLH. Otras, como algunos aceites vegetales, sales de aluminio y liposomas, actúan como vehículos, formando depósitos que liberan el antígeno lentamente. Diversos autores han demostrado que los liposomas potencian la respuesta contra el antígeno encapsulado o unido covalentemente a ellos, sin embargo, dado que la secuencia de aminoácidos del péptido preS(120-145) constituye un máximo de hidrofilia, su encapsulación en liposomas resultaría poco eficaz. Por ello se han sintetizado y caracterizado una serie de lipopéptidos obtenidos por acilación en el extremo N-terminal, siguiendo la misma estrategia de síntesis en fase sólida que para el péptido base (Rabanal et al., 1991). Así pues, los derivados estudiados han sido (figura 62):

1. Incorporación de ácido esteárico: **Estearoil-preS(120-145)**
2. Incorporación de ácido colánico: **Colanoil-preS(120-145)**
3. Incorporación de tripalmitoil-glicerilcisteinil-seril-serina: **Pam₃CSS-preS(120-145)**.

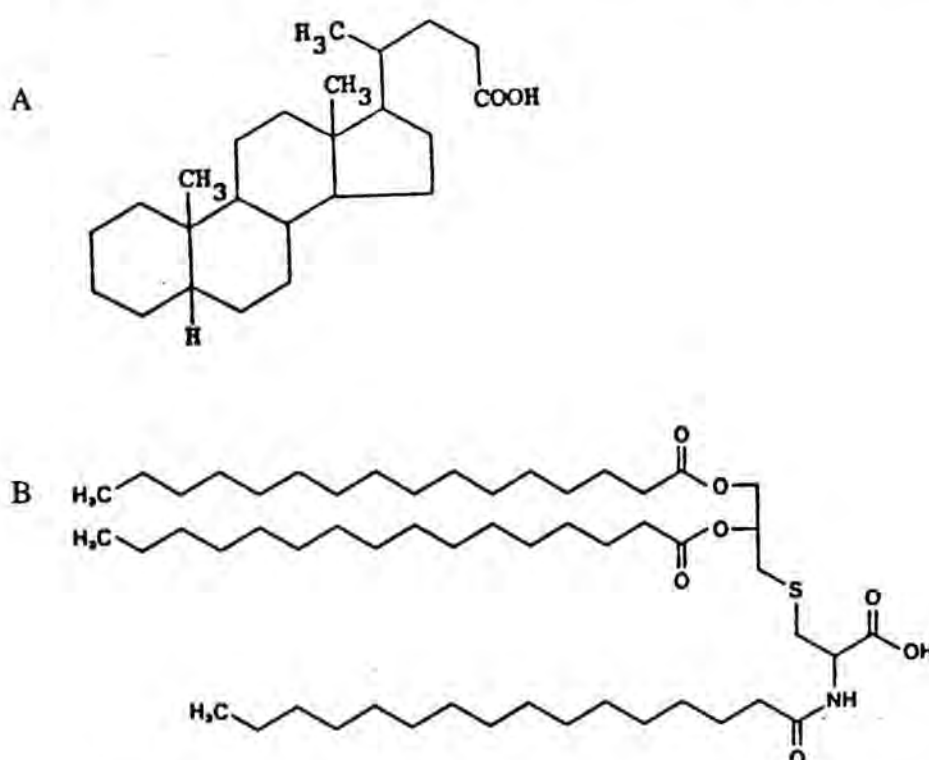


Figura 62: Estructura de A) ácido colánico: 17-β-(1-metil-3-carboxipropil)etilcolano, B) Pam₃Cys: S-[2,3-Bis(palmitoiloxi)-(2-R,S)-propil]-N-palmitoil-(R)-cisteína.

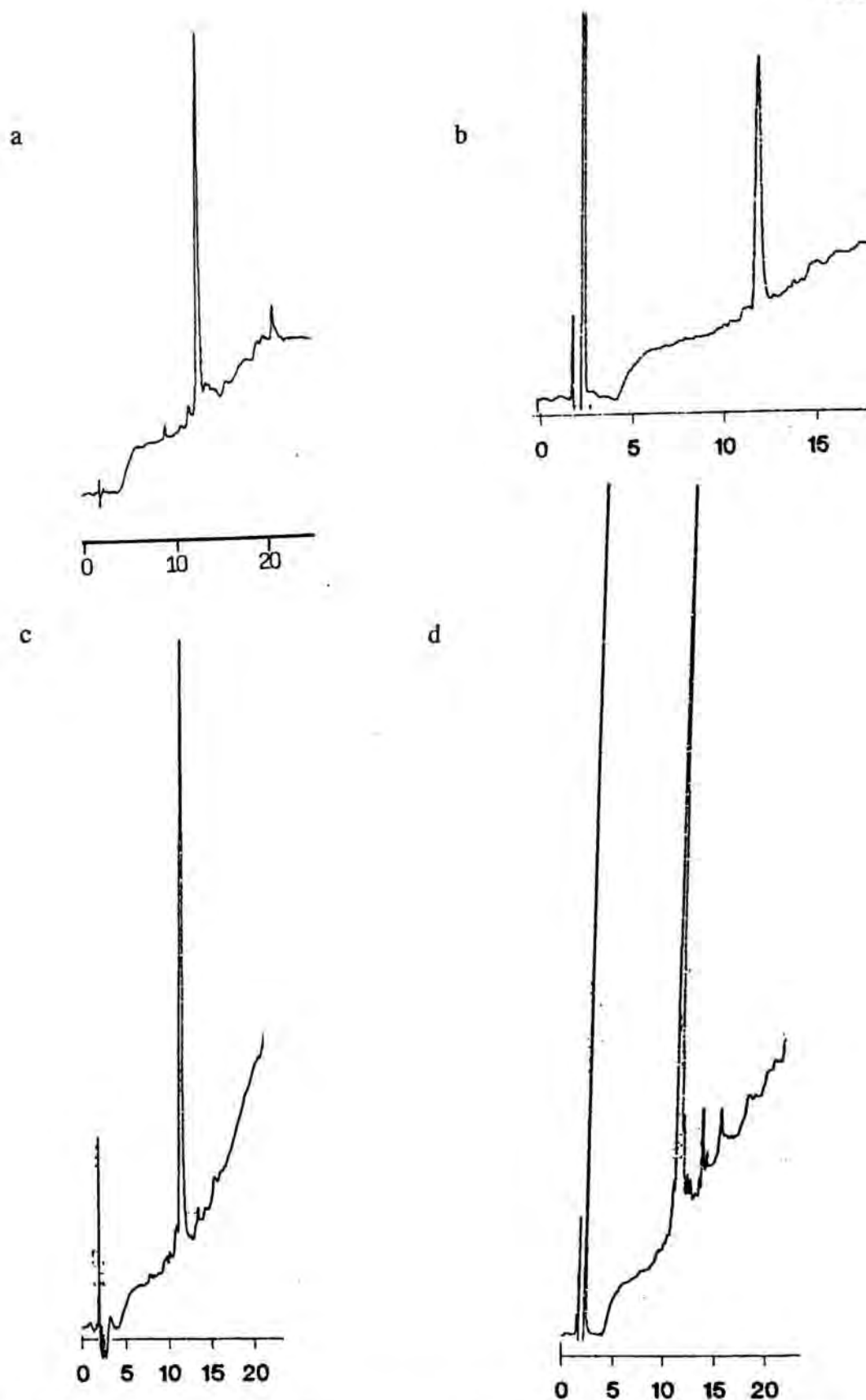


Figura 63: Perfiles cromatográficos correspondientes a: a) preS(120-145), b) Colanoil-preS(120-145), c) Estearoil-preS(120-145) y d) Pam₃CSS-preS(120-145). Condiciones descritas en el texto.

La pureza de estos péptidos y lipopéptidos se comprobó por HPLC en columna de fase reversa de octadecilsilano, tamaño de partícula 10 μ m y dimensiones 250x4.6 mm.

En el caso de preS(120-145), la fase móvil era A: acetonitrilo-0.1% TFA y B: agua-0.1% TFA, efectuando un gradiente de 20% a 80% de A en 20 minutos y 80% a 100% de A en 10 minutos, a un flujo de 1.2 ml/min y detección UV a 226 nm. Para los lipopéptidos se emplearon las mismas condiciones analíticas, con la única diferencia de que la detección se efectuó a 215 nm (figura 63).

3.2. INTERACCION DEL INMUNOPEPTIDO PreS(120-145) CON LIPOSOMAS DE DPPC: CAMBIOS EN LA FLUORESCENCIA DEL PEPTIDO.

Tal como se explica en el apartado 2.2 de este capítulo, la fluorescencia de los péptidos y proteínas viene determinada por los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano. Las propiedades de fluorescencia características de estos residuos pueden cambiar cuando el péptido o proteína se une a un ligando, como por ejemplo los fosfolípidos que constituyen un liposoma. De este modo, empleando un sistema bien definido como modelo artificial de membrana, como es el caso de los liposomas, y estudiando cómo varía la fluorescencia del péptido en contacto con los mismos en condiciones controladas de temperatura, pueden determinarse cambios en la polaridad del entorno del péptido. De estos resultados se puede deducir si el péptido ha penetrado o no en las bicapas lipídicas que constituyen el liposoma.

El péptido preS(120-145) contiene 1 residuo de tirosina y 1 residuo de triptófano, y su espectro de fluorescencia viene dominado por el triptófano. Esto se debe probablemente a que en la conformación que adopta en solución, la tirosina se encuentra suficientemente próxima al triptófano para que se produzca una transferencia de energía Tyr→Trp, además de que el coeficiente de extinción es superior para el triptófano.

3.2.1. INTERACCION CON LIPOSOMAS EN ESTADO DE GEL

Al excitar el péptido preS(120-145) en solución tampón acetato (pH 7.5) a 280 nm, se obtenía un espectro de emisión con un máximo a 355.3 nm, igual al obtenido para SRIF (figura 64).

Este espectro es indicativo de que el triptófano se encontraba en un entorno preferentemente polar, aunque no totalmente expuesto al solvente, ya que en este caso presentaría un máximo de emisión igual al de la N-acetiltryptofanamida ($\lambda_{em}=360$ nm) tomada como referencia. Esto parece indicar que el péptido presenta una cierta conformación en solución acuosa.

Los resultados de intensidad de fluorescencia expresados en función de la temperatura y de la relación lípido/péptido indicaban que PreS(120-145) ($1.4 \cdot 10^{-6}$ M en tampón acetato pH 7.4) interaccionaba fuertemente con los liposomas de DPPC (0.027 M) en estado de gel (figuras 64 y 65). Esta interacción se caracterizó por un marcado aumento de la fluorescencia intrínseca del péptido, siendo $F/F_0 = 3.10$ ($\lambda_{em}=340$ nm) para la relación molar DPPC/preS = 500:1. Con esta proporción de lípido presente en el medio, la curva de variación de fluorescencia respecto a relación molar lípido/péptido aún no había alcanzado la saturación, sin embargo no se pudieron ensayar proporciones mayores de lípido debido a que la turbidez, y en consecuencia el efecto de *light scattering* eran demasiado importantes.

El incremento en la intensidad de fluorescencia iba acompañado de un *blue shift* en el máximo de emisión del péptido, que pasó de 355.3 nm en ausencia de liposomas a 340.8 nm para DPPC/preS = 500, es decir un desplazamiento de 14.5 nm.

Cabe destacar que la emisión de fluorescencia de preS(120-145) en tampón acetato pH 7.4 mantenido a 20°C y leída a 340 nm (F_0) permaneció estable durante todo el experimento, así como la absorbancia a 280 nm y a 340 nm (longitudes de onda de excitación y emisión de fluorescencia respectivamente), lo que es indicativo de que en estas condiciones el péptido no formaba agregados. Por otra parte no se observó agregación de los liposomas causada por el péptido, ya que las absorbancias a 280 nm y a 340 nm de las muestras con liposomas eran iguales tanto si había péptido en el medio como si no.

Estos cambios tan acusados de las características de fluorescencia demuestran una afinidad del péptido preS(120-145) por las bicapas de DPPC. Esta asociación va acompañada por una penetración del anillo indólico del residuo de triptófano en un entorno menos polar que el que tenía en solución acuosa, probablemente entre las cadenas alifáticas de ácido palmítico.

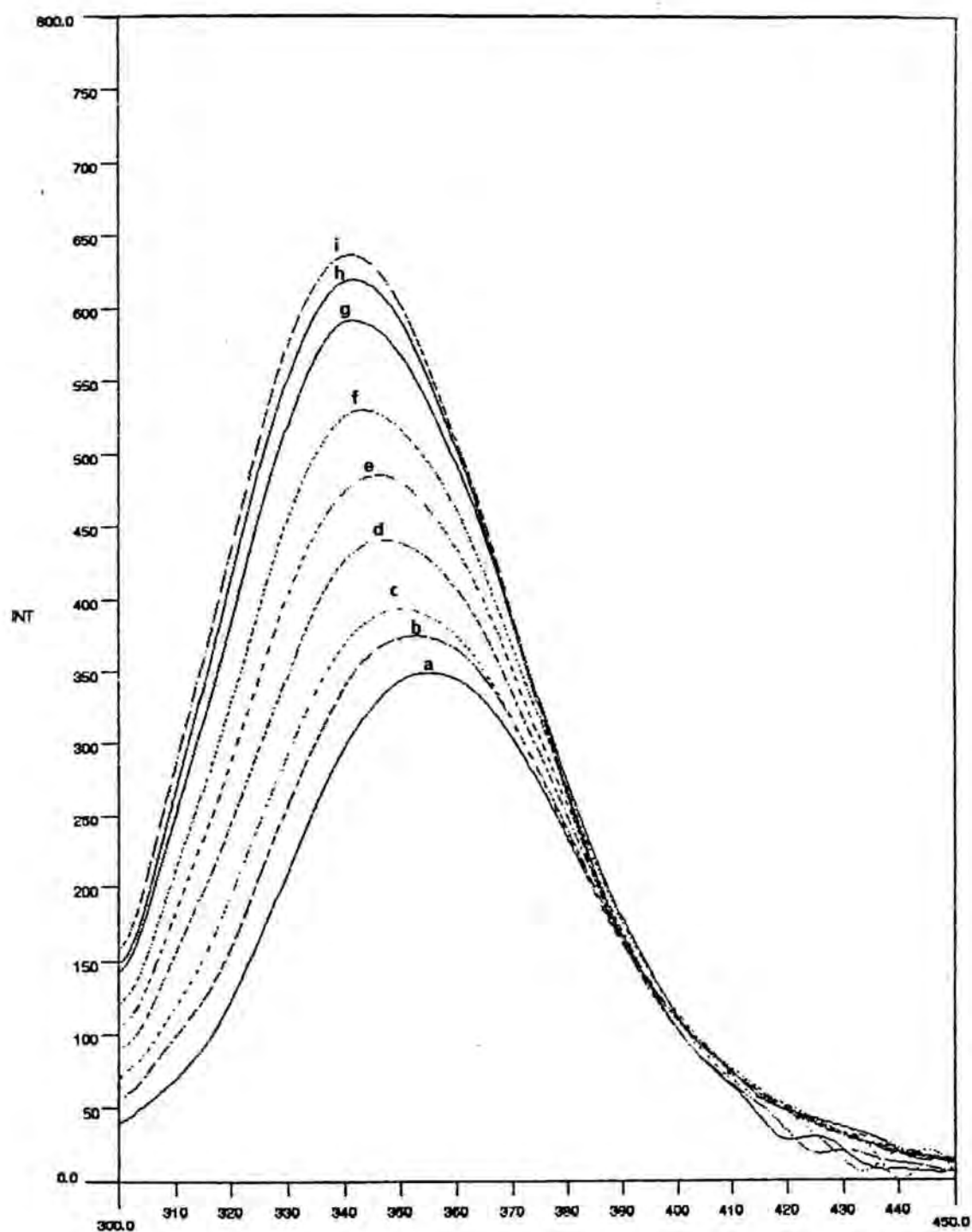


Figura 64: Espectros de fluorescencia de preS(120-145) ($1.4 \cdot 10^{-6}$ M) en ausencia (a) y en presencia de DPPC, relación molar DPPC/preS(120-145): b) 25:1, c) 50:1, d) 75:1, e) 100:1, f) 125:1, g) 250:1, h) 375:1, i) 500:1. λ_{ex} = 280 nm. Temperatura 20°C.

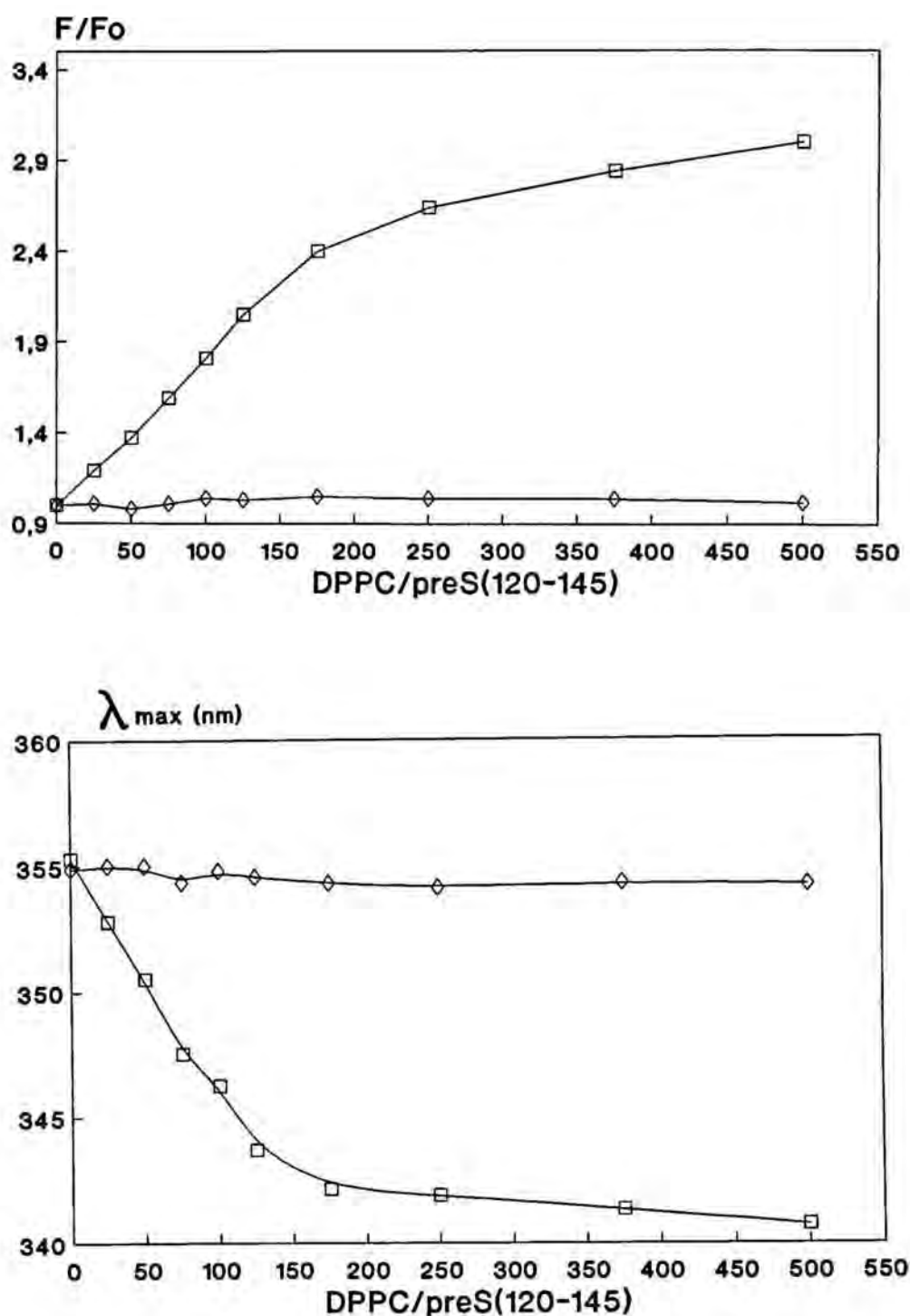


Figura 65: *Arriba:* Cambios en la intensidad de fluorescencia (F/F_0) de preS(120-145) a 340 nm en función de la relación molar lípido/péptido. *Abajo:* Cambios en la longitud de onda del máximo de emisión (λ_{em}). Excitación a 280 nm. Concentración de péptido: $1.4 \cdot 10^{-6}$ M. (□) temperatura 20 °C; (◇) temperatura 50 °C. Cada punto es la media de dos determinaciones.

3.2.2. INTERACCION CON LOS LIPOSOMAS EN ESTADO DE CRISTAL LÍQUIDO.

El mismo experimento se llevó a cabo a 50 °C. A esta temperatura, los liposomas de DPPC se encontraban en el estado de cristal líquido, ya que la temperatura de transición es de alrededor de 41 °C.

PreS(120-145) no mostró afinidad por los liposomas de DPPC en estado de cristal líquido. El máximo de emisión de fluorescencia se mantuvo en 355 nm independientemente de la proporción de liposomas. Por otra parte, la fluorescencia relativa (F/F_0) leída a 340 nm tampoco experimentó cambios a lo largo de la valoración (figura 65). Según estos resultados, no tenía lugar interacción entre preS y DPPC SUVs por encima de la temperatura de transición, o bien esta interacción se producía sin alterar la conformación que el péptido presentaba en tampón acetato. Los estudios de CD y polarización de fluorescencia permitirán aclarar un poco más la naturaleza de la interacción que tiene lugar.

3.2.3. FLUORESCENCIA DE preS(120-145) EN TRIFLUOROETANOL

Se determinó la variación de las propiedades de fluorescencia de preS(120-145) en soluciones con distinta proporción de 2,2,2-trifluoroetanol (TFE). De este modo se podría determinar si existe algún paralelismo entre la conformación adoptada por este péptido al interaccionar con liposomas y en solución de TFE, ya que este solvente, que se considera no interaccionante (Zhou, 1990), se ha empleado como modelo de entorno lipídico, ya que induce o estabiliza estructuras ordenadas en cadenas peptídicas.

Se prepararon disoluciones del péptido de concentración $1.4 \cdot 10^{-6}$ M en mezclas TFE/tampón acetato con 0%, 20%, 37%, 56% y 78% TFE. Al incrementarse la proporción de TFE, el espectro de emisión característico de preS(120-145) (con $\lambda_{em}=355$ nm) experimentaba un desplazamiento del máximo de emisión hacia valores inferiores, con $\lambda_{em}=348$ nm para un 78% TFE (figuras 66 y 67). Este desplazamiento es similar al producido al interaccionar con liposomas cuando la relación molar DPPC/preS(120-145) era de 100:1.

Por otra parte, al ir aumentando el contenido en TFE, la intensidad de fluorescencia del

péptido aumentaba. Este incremento era significativamente inferior al que se producía al interaccionar con liposomas, sin embargo esto es debido al que el TFE tiene propiedades de *electron scavenger*, lo que causaría una disminución en la fluorescencia del péptido (esto era lo que ocurría en el caso de LHRH o de SRIF). Por el contrario, en este caso el aumento de la intensidad de fluorescencia causado por la estructuración del péptido en TFE contrarresta en cierta medida este efecto de *quenching* característico del TFE.

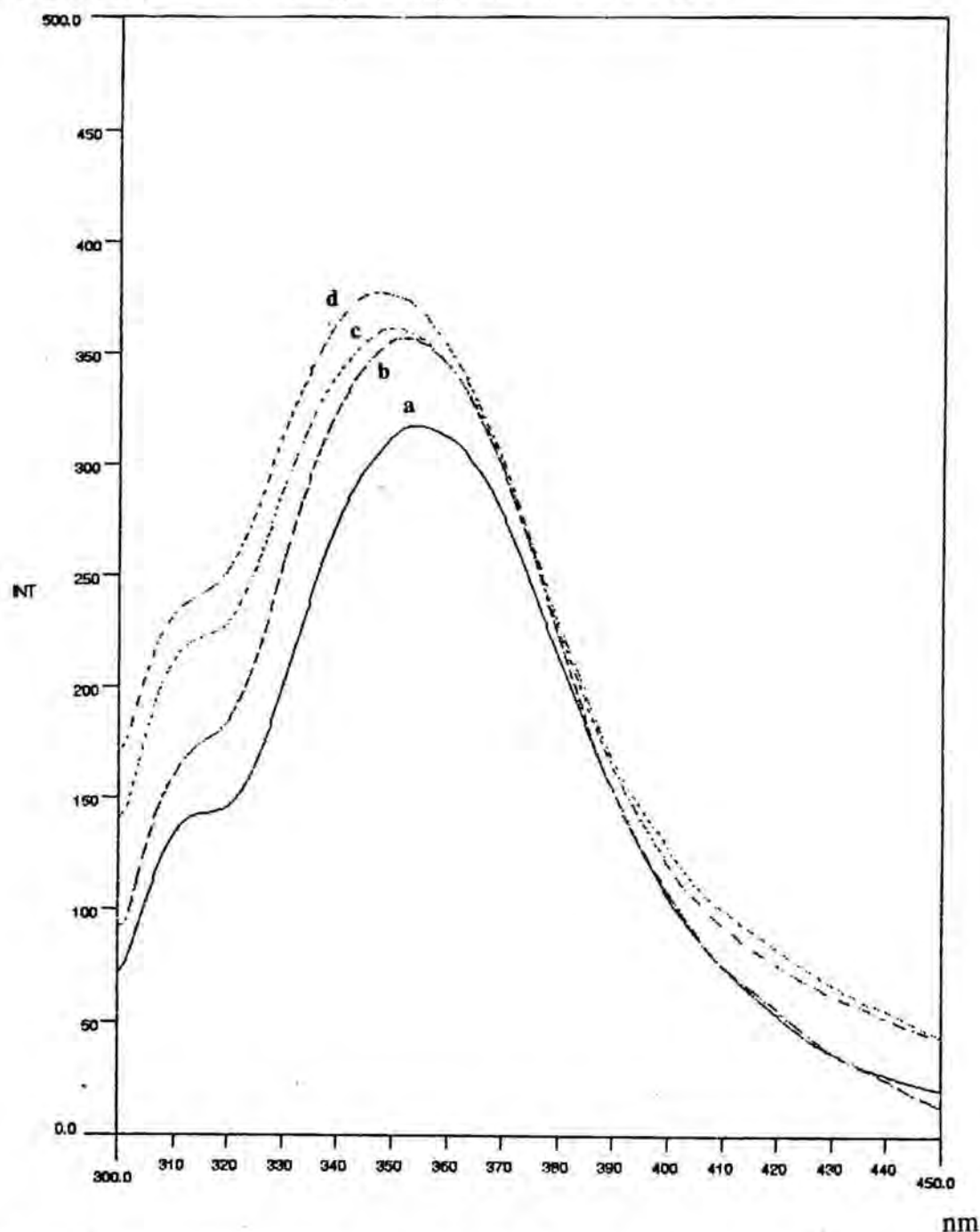


Figura 66: Espectros de fluorescencia de preS(120-145) $1.4 \cdot 10^{-6}$ M en tampón acetato (a) y en mezclas de éste con TFE: 20% (b), 37% (c) y 78% (d). Temperatura 20°C.

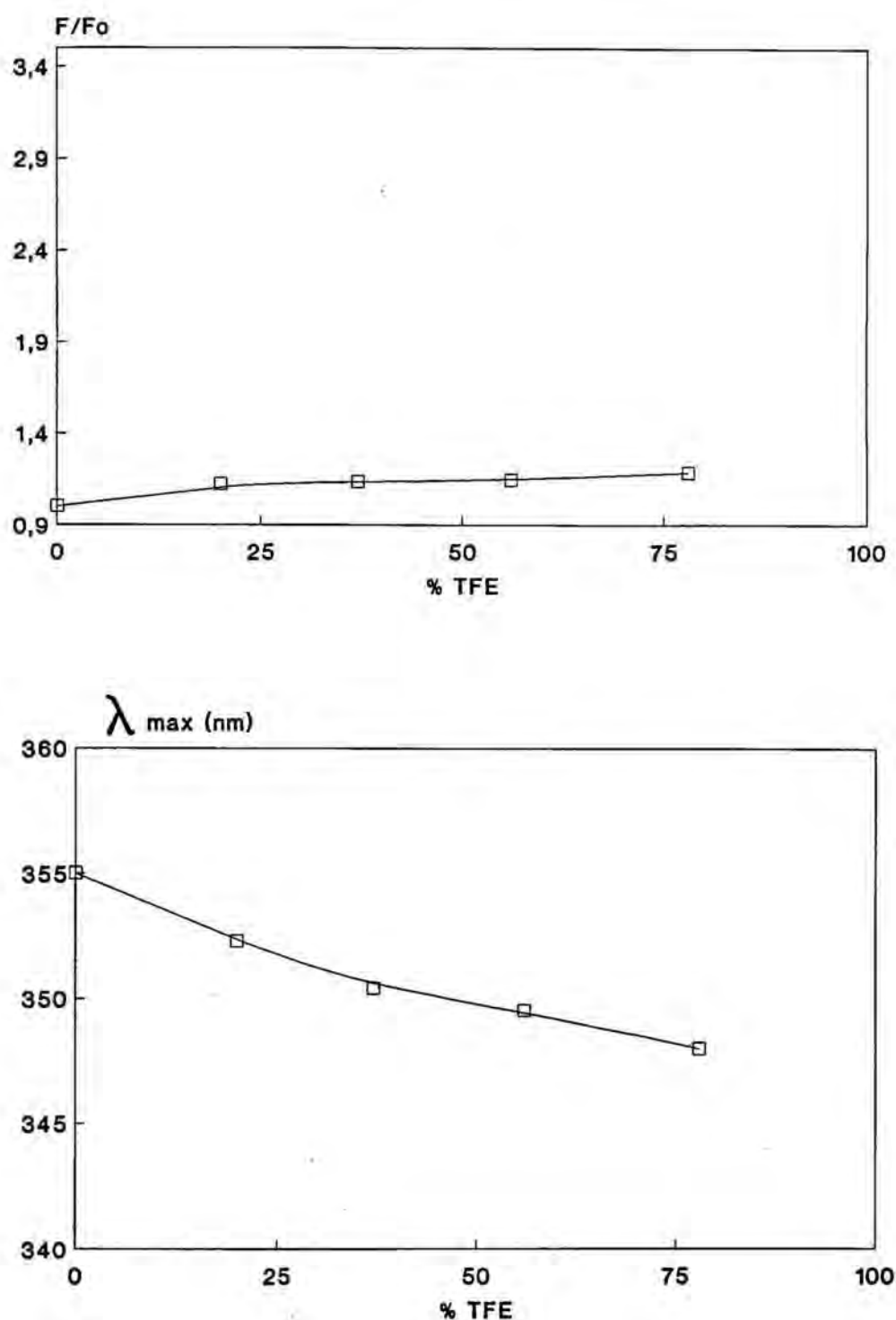


Figura 67: *Arriba:* Cambios en la intensidad de fluorescencia (F/F_o) de preS(120-145) a 340 nm en función de la proporción de TFE. *Abajo:* Cambios en la longitud de onda del máximo de emisión (λ_{em}). Excitación a 280 nm. Concentración de péptido: $1.4 \cdot 10^{-6}$ M. Temperatura 20°C. Cada punto es la media de dos determinaciones.

3.3. EFECTO DEL PEPTIDO preS(120-145) Y SUS DERIVADOS LIPOPEPTIDICOS EN EL COMPORTAMIENTO TERMOTROPICO DE LOS LIPOSOMAS

Se determinaron los cambios que se producían en la fluidez de los liposomas de DPPC en presencia de estos péptidos y lipopéptidos. Para ello se monitorizó la despolarización de los liposomas previamente marcados con DPH o con ANS a medida que se incrementaba la temperatura. Como se especifica con más detalle en el apartado 2.3 del capítulo de Resultados, el DPH es un marcador fluorescente que se acumula en la zona hidrófoba de los liposomas, mientras que el ANS se sitúa preferentemente en la hidrófila, es decir la zona determinada por las cabezas polares de los ácidos grasos.

3.3.1. INFLUENCIA DE PreS(120-145) EN LA FLUIDEZ DE LOS LIPOSOMAS

Se ensayó una relación molar DPPC/preS de 44:1, siendo la concentración del péptido $4.02 \cdot 10^{-6}$ M, y la de los liposomas 0.027 M. La presencia de este péptido modificó el comportamiento termotrópico de los liposomas de DPPC a nivel de la zona hidrófoba de las bicapas determinada por las cadenas de ácidos grasos, tal como se deduce de la observación de las curvas de despolarización de liposomas marcados con DPH que se representan en la figura 68. Ajustando estas curvas por regresión no lineal (parámetros en tabla 19), se pudo calcular la temperatura de transición del proceso de cambio de fase ($C = \text{antilog } T_c$), que pasó de 41.0 ± 0.2 °C a 41.9 ± 0.3 °C en presencia del péptido. Además de aumentar la T_c alrededor de 1 °C, la transición de fase del estado de gel al fluido tenía lugar en un intervalo más estrecho de temperaturas en presencia de péptido en el medio, como se deduce de la observación de las gráficas de primera derivada.

Por otra parte, a temperaturas inferiores a 34.5 °C, preS(120-145) no alteraba la fluidez de los liposomas de DPPC en estado de gel; sin embargo a partir de esta temperatura la incorporación del péptido entre las bicapas lipídicas se tradujo en un efecto rigidificante de las mismas, ya que se produjo un aumento significativo de la polarización del DPH ($p < 0.05$).

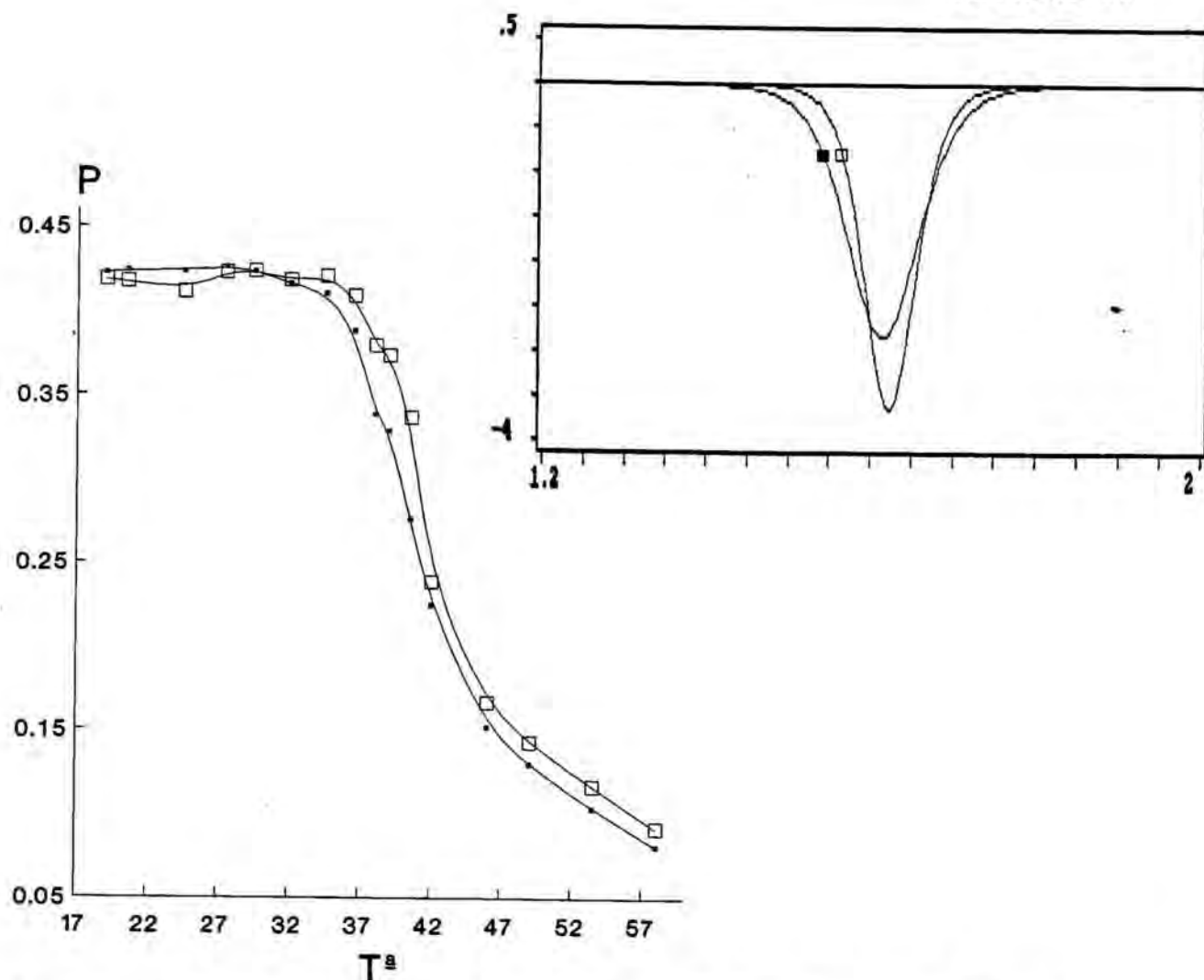


Figura 68: Variación de la polarización de fluorescencia (P) de SUV-DPPC marcados con DPH y análisis de primera derivada de las curvas ajustadas. (■) SUV-DPPC; (□) SUV-DPPC con preS(120-145), relación molar 44:1. Cada punto es la media de un mínimo de tres determinaciones.

Parámetro	Control de liposomas	Liposomas + preS
A	$0.093938 \pm 6.213 \cdot 10^{-3}$	$0.113850 \pm 8.903 \cdot 10^{-3}$
B	$0.425547 \pm 3.539 \cdot 10^{-3}$	$0.420455 \pm 5.187 \cdot 10^{-3}$
C	$1.613767 \pm 2.289 \cdot 10^{-3}$	$1.622295 \pm 3.271 \cdot 10^{-3}$
D	-14.89185 ± 1.061652	-20.60111 ± 2.704328
SS	$8.326 \cdot 10^{-4}$	$2.202 \cdot 10^{-3}$
df	12	12

Tabla 19: Parámetros de ajuste por regresión no lineal de las sigmoides de despolarización de SUV-DPPC marcados con DPH en tampón acetato pH 7.4 (liposomas control) y en solución de preS(120-145) $4 \cdot 10^{-6}$ M. Relación molar DPPC/preS(120-145)=44:1. El tipo de ajuste y significado de estos parámetros se especifica en el apartado 2.3.4.

Estos cambios indican que las moléculas de fosfolípido situadas alrededor del péptido que ha penetrado en el interior de la bicapa presentan una movilidad restringida en relación a las situadas en bicapas de DPPC puras.

En la figura 69 se muestra como varía la polarización respecto a la temperatura para liposomas de DPPC marcados con ANS, con y sin péptido preS(120-145) en el medio de incubación. Las dos curvas de despolarización eran prácticamente superponibles, y no se encontraron diferencias significativas entre ellas, lo que significa que preS(120-145) no alteraba la movilidad de las cabezas polares de los liposomas en el rango de temperaturas ensayado.

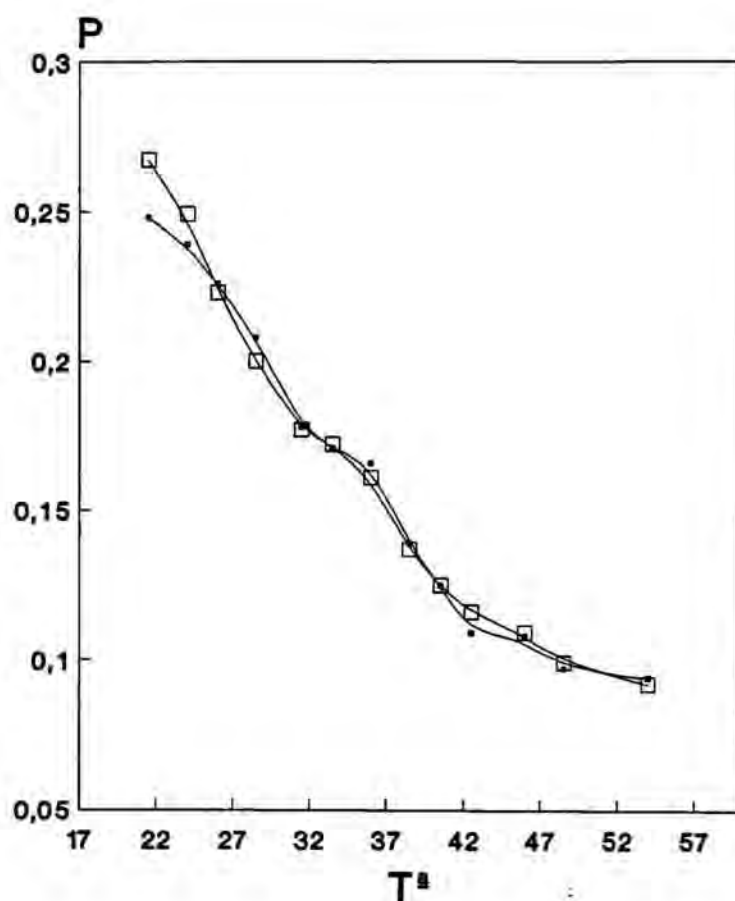


Figura 69: Variación de la polarización de fluorescencia (P) de SUV-DPPC marcados con ANS. (■) SUV-DPPC; (□) SUV-DPPC con preS(120-145), relación molar 44:1. Cada punto es la media de un mínimo de tres determinaciones.

3.3.2. INFLUENCIA DE ESTEAROIL-preS(120-145) EN LA FLUIDEZ DE LOS LIPOSOMAS

Cuando se estudió el efecto del lipopéptido estearoil-preS(120-145) sobre la transición de fase de los liposomas de DPPC previamente marcados con DPH, se pudo observar que inducía un aumento de 3 °C en la T_c , que pasaba de 41.0 ± 0.3 °C a 42.9 ± 0.1 °C, como se pudo deducir a partir de los parámetros de ajuste por regresión no lineal de las curvas de despolarización (tabla 20). Las curvas de despolarización del DPH se muestran en la figura 70. Obteniendo las derivadas de las sigmoides pudo observarse que, efectivamente, la derivada correspondiente a los liposomas de DPPC en presencia de estearoil-preS(120-145) tenía el mínimo desplazado hacia temperaturas más altas; además, la amplitud del proceso de transición era menor que la correspondiente a los liposomas puros. Esto significa que el lipopéptido interaccionaba con los liposomas de manera que el cambio de fase tenía lugar de forma más cooperativa, ya que se producía en un intervalo más estrecho de temperatura. Por otra parte, la incorporación de estearoil-preS(120-145) causó una rigidificación de las bicapas tanto en estado de gel como de cristal líquido, como se deduce del incremento de polarización de DPH ($p < 0.05$).

Parámetro	Control de liposomas	Liposomas+EstearoilpreS
A	$0.1105125 \pm 1.092 \cdot 10^{-2}$	$0.1765109 \pm 5.569 \cdot 10^{-3}$
B	$0.4175918 \pm 4.358 \cdot 10^{-3}$	$0.4264467 \pm 2.069 \cdot 10^{-3}$
C	$1.612256 \pm 3.113 \cdot 10^{-3}$	$1.632748 \pm 1.544 \cdot 10^{-3}$
D	-19.49099 ± 2.170702	-39.14614 ± 3.272615
SS	$5.308 \cdot 10^{-4}$	$1.717 \cdot 10^{-4}$
df	6	6

Tabla 20: Parámetros de ajuste de las sigmoides de despolarización de liposomas SUV-DPPC en tampón acetato pH=7.4 (control de liposomas) marcados con DPH y de estos liposomas en solución de estearoil-preS(120-145) $4 \cdot 10^{-6}$ M. Relación molar DPPC/péptido=44:1.

La incorporación del péptido a los liposomas también afectaba a la movilidad de las cabezas polares de fosfolípido. En la figura 71 se muestra el mayor valor de polarización del ANS en presencia del lipopéptido; el aumento de P resultó significativo ($p < 0.05$) para temperaturas superiores a 30 °C, mientras que en el caso del DPH lo era a partir de 27°C.

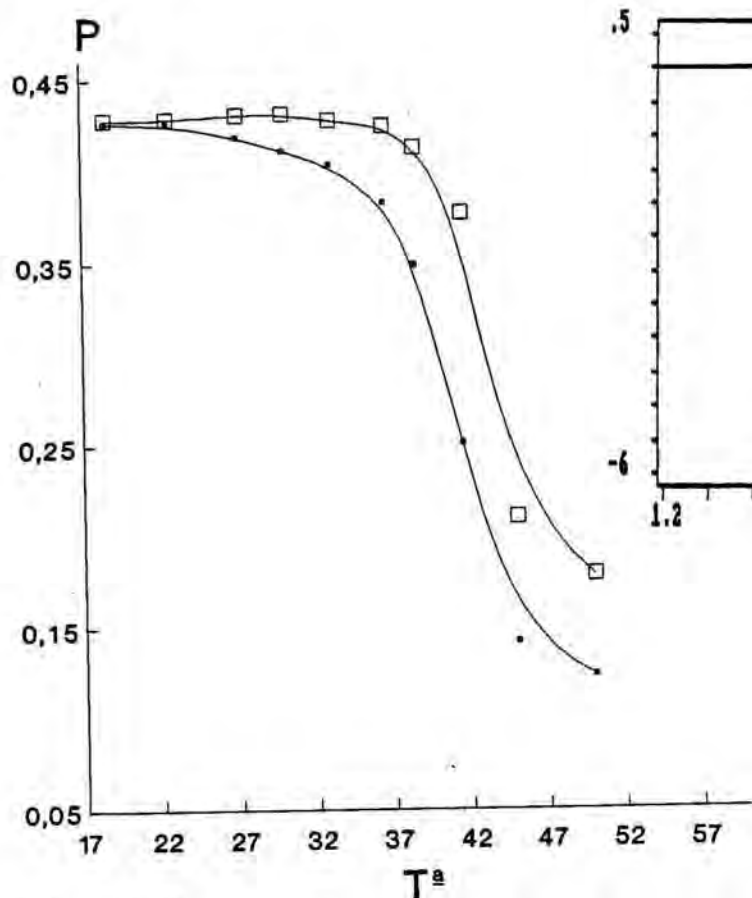


Figura 70: Variación de la polarización de fluorescencia (P) de SUV-DPPC marcados con DPH y análisis de primera derivada de las curvas ajustadas. (▲) SUV-DPPC; (□) SUV-DPPC con estearoil-preS(120-145), relación molar 44:1. Cada punto es la media de un mínimo de tres determinaciones.

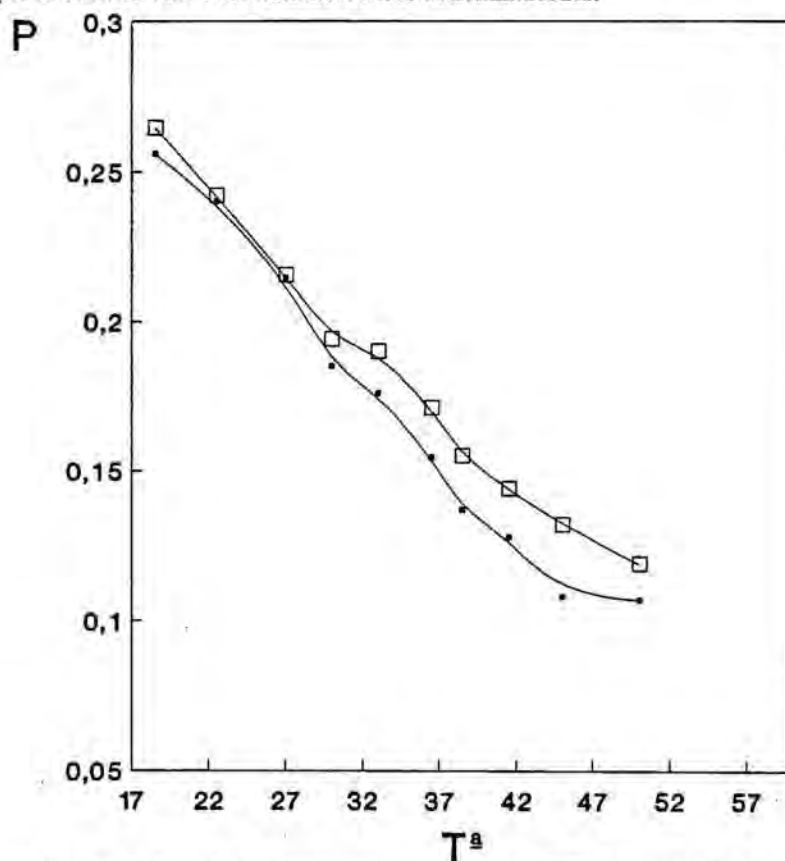


Figura 71: Variación de la polarización de fluorescencia (P) de SUV-DPPC marcados con ANS. (▲) SUV-DPPC; (□) SUV-DPPC con estearoil-preS(120-145), relación molar 44:1. Cada punto es la media de un mínimo de tres determinaciones.

3.3.3. INFLUENCIA DE COLANOIL-preS(120-145) EN LA FLUIDEZ DE LOS LIPOSOMAS

El efecto del lipopéptido colanoil-preS(120-145) en el comportamiento de transición de fase de los liposomas de DPPC marcados con DPH se muestra en la figura 72. Colanoil-preS modificó de manera importante el comportamiento de cambio de fase de los liposomas, como se deduce del aumento significativo de la polarización (con $p < 0.01$) en el intervalo de temperaturas $30\text{ }^{\circ}\text{C} \geq T < 46.5\text{ }^{\circ}\text{C}$; este aumento se corresponde con una disminución en la fluidez de las bicapas. Al incorporarse a los liposomas, colanoil-preS inducía un incremento de $1.4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en la T_c (pasaba de $41.3 \pm 0.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $42.7 \pm 0.2\text{ }^{\circ}\text{C}$). Los parámetros obtenidos ajustando las curvas de la figura 72 por regresión no lineal se suman en la tabla 21. Las gráficas de primera derivada de estas curvas muestran una transición de fase en un intervalo más estrecho de temperaturas, además del mencionado cambio de T_c .

Parámetro	Liposomas control	Liposomas+ColanoilpreS
A	$0.09614 \pm 6.033 \cdot 10^{-3}$	$0.1128023 \pm 7.489 \cdot 10^{-3}$
B	$0.420326 \pm 2.951 \cdot 10^{-3}$	$0.426942 \pm 4.679 \cdot 10^{-3}$
C	$1.616098 \pm 1.923 \cdot 10^{-3}$	$1.630552 \pm 1.620 \cdot 10^{-3}$
D	-16.62542 ± 1.068097	-44.01099 ± 8.440775
SS	$3.122 \cdot 10^{-4}$	$1.154 \cdot 10^{-3}$
df	8	8

Tabla 21: Parámetros de ajuste por regresión no lineal de las sigmoides de despolarización de liposomas marcados con DPH en tampón acetato, pH 7.4, (control de liposomas), y en solución de colanoil-preS(120-145), $4 \cdot 10^{-6}$ M. Relación molar DPPC/péptido = 44:1.

En la figura 73 se representa la despolarización con la temperatura para liposomas SUV-DPPC marcados con ANS, con y sin colanoil-preS(120-145). Este lipopéptido influía también de manera importante en el proceso de transición de fase de los liposomas, disminuyendo la fluidez a nivel de las cabezas polares de fosfolípido. A pesar de que los valores de polarización fueron superiores en presencia del lipopéptido en todo el intervalo estudiado (de $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $53\text{ }^{\circ}\text{C}$), las diferencias sólo resultaron significativas ($p < 0.05$) en el intervalo comprendido entre 33 y $43\text{ }^{\circ}\text{C}$, alrededor de la T_c .

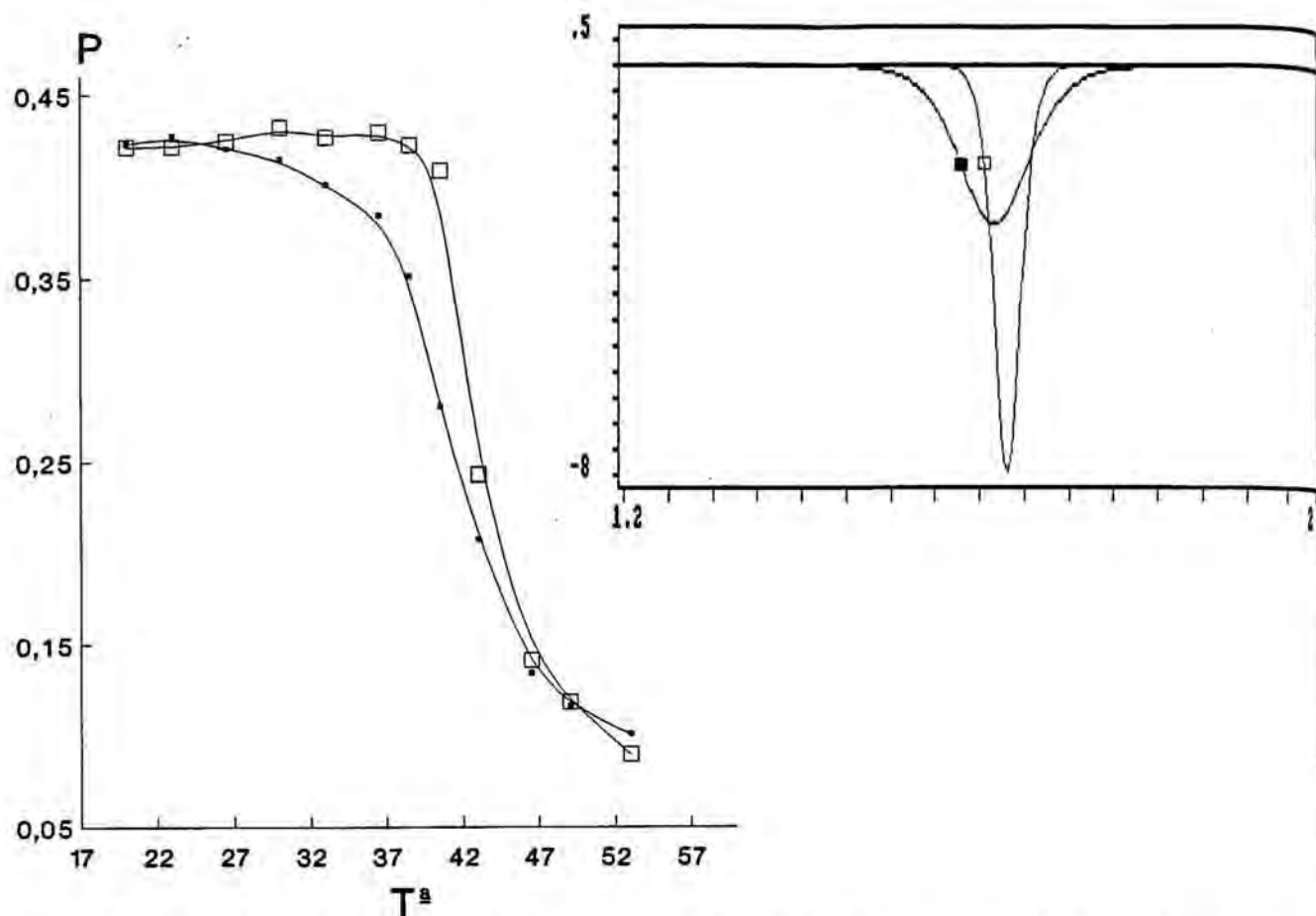


Figura 72: Variación de la polarización de fluorescencia (P) de SUV-DPPC marcados con DPH y análisis de primera derivada de las curvas ajustadas. (■) SUV-DPPC; (□) SUV-DPPC con colanil-preS(120-145), relación molar 44:1. Cada punto es la media de un mínimo de tres determinaciones.

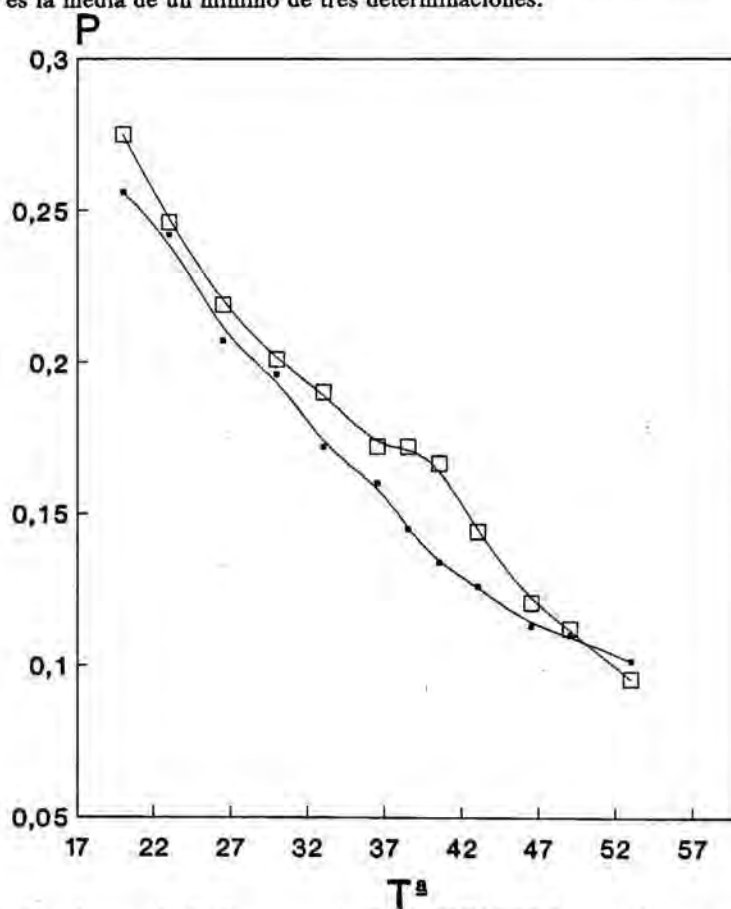


Figura 73: Variación de la polarización de fluorescencia (P) de SUV-DPPC marcados con ANS. (■) SUV-DPPC; (□) SUV-DPPC con colanil-preS(120-145), relación molar 44:1. Cada punto es la media de tres determinaciones.

3.3.4. INFLUENCIA DE Pam₃CSS-PreS(120-145) EN LA FLUIDEZ DE LOS LIPOSOMAS

La incorporación de Pam₃CSS-preS(120-145) a liposomas SUV-DPPC marcados con DPH se tradujo en una disminución de la fluidez a nivel de la zona apolar delimitada por las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos (figura 74). El aumento de la polarización del DPH era significativo ($p < 0.05$) en la mayor parte del rango de temperaturas abarcado en el estudio: para $20\text{ }^{\circ}\text{C} > T < 53.5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los parámetros que definen las curvas de la figura 74 se recogen en la tabla 22. Al obtener las curvas de primera derivada de las gráficas ajustadas por regresión no lineal, pudo observarse que la amplitud del proceso de cambio de fase aumentaba ligeramente, y la T_c pasaba de $41.2 \pm 0.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $42.9 \pm 0.2\text{ }^{\circ}\text{C}$. La fuerte interacción de Pam₃CSS-preS(120-145) con los liposomas SUV-DPPC a nivel de la zona hidrófoba no iba acompañada de una modificación de la fluidez a nivel de la superficie polar, ya que la polarización de los liposomas marcados con ANS no se modificaba de manera significativa en todo el rango de temperaturas estudiado (figura 75).

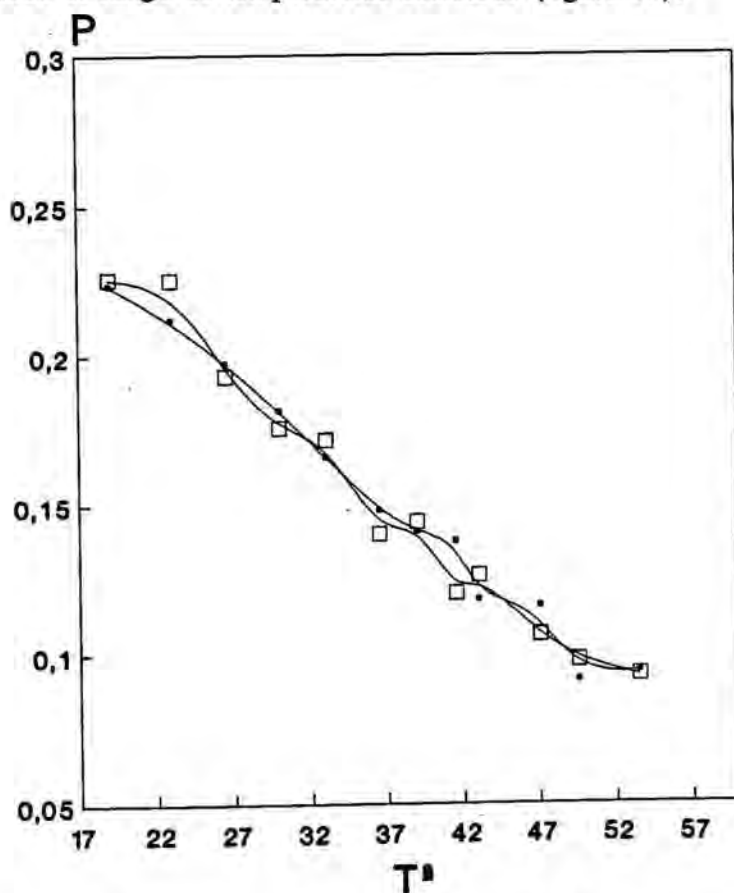


Figura 75: Variación de la polarización de fluorescencia (P) de SUV-DPPC marcados con ANS. (○) SUV-DPPC; (□) SUV-DPPC con Pam₃CSS-preS(120-145), relación molar 44:1. Media de un mínimo de tres determinaciones

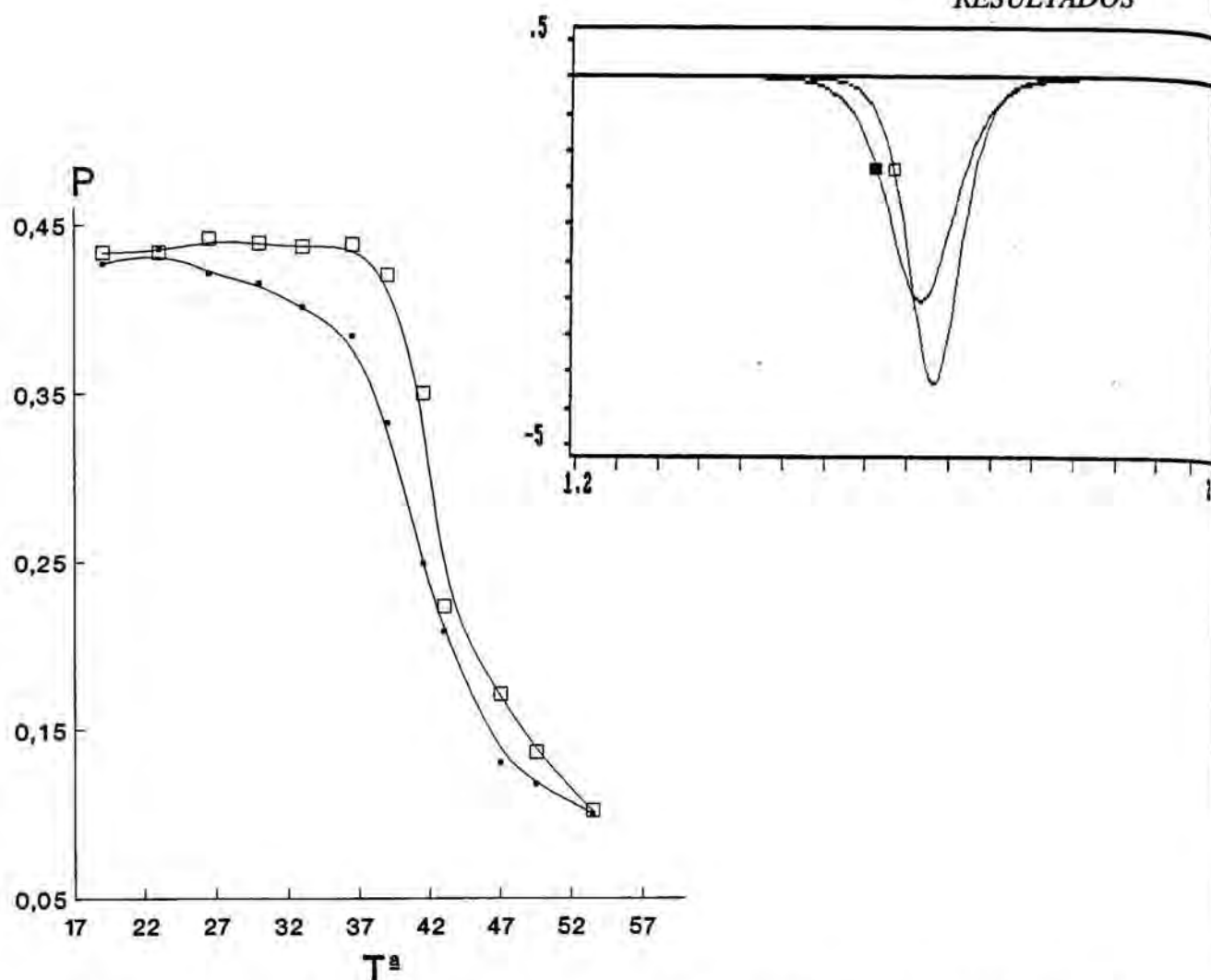


Figura 74: Variación de la polarización de fluorescencia (P) de SUV-DPPC marcados con DPH y análisis de primera derivada de las curvas ajustadas. (■) SUV-DPPC; (□) SUV-DPPC con Pam₃CSS-preS(120-145), relación molar 44:1. Cada punto es la media de un mínimo de tres determinaciones.

Parámetro	Liposomas control	Liposomas + Pam ₃ CSS-preS
A	0.09795 ± 0.005257	0.1 (*)
B	0.4192903 ± 0.003101	0.441764 ± 0.009221
C	1.615671 ± 0.001672	1.632186 ± 0.001862
D	-16.43258 ± 1.027175	-21.06701 ± 3.78626
SS	2.299 10 ⁻⁴	4.234 10 ⁻³
df	7	9

Tabla 22: Parámetros que definen las sigmoides de despolarización de liposomas marcados con DPH en presencia de Pam₃CSS-preS(120-145). (*) Se hizo un primer ajuste en el que se obtuvo éste valor para el parámetro A, y en un segundo ajuste se fijó este valor como constante.

3.4. CAMBIOS CONFORMACIONALES EN PreS(120-145) EN PRESENCIA DE LIPOSOMAS Y EN TFE: ESPECTROSCOPIA DE DICROISMO CIRCULAR (CD)

Para comprender mejor la naturaleza de la interacción entre el péptido inmunógeno preS(120-145) y los liposomas de DPPC se llevó a cabo un estudio conformacional por CD de este péptido. Se determinó el espectro de CD en el UV lejano de preS(120-145) en solución acuosa ($6.94 \cdot 10^{-5}$ M). Con el fin de determinar cambios en la estructura secundaria inducidos por liposomas, se analizó el espectro de CD de este péptido en presencia de DPPC-SUVs (0.027 M) a una relación molar DPPC/preS(120-145) de 37:1. Por último, se registró el espectro del péptido disuelto en TFE ($6.94 \cdot 10^{-5}$ M); este disolvente orgánico favorece la expresión de las tendencias conformacionales de los péptidos.

Los tres espectros se muestran en la figura 76. Los valores de elipticidad ($[\Theta]_{MRW}$) obtenidos en cada caso se analizaron por varios métodos (ver apartado 2.4 de Resultados), y se seleccionó el método de Chang (1978) por ser el que proporcionaba un mejor ajuste.

El espectro de CD de preS(120-145) en agua era característico de una estructura predominantemente aperiódica. Concretamente, y según el método de Chang (1978), prácticamente un 50% se correspondía con una estructura de este tipo (tabla 23); el resto venía determinado por estructura tipo β , mientras que la proporción de estructura helicoidal era mínima.

La adición de liposomas de DPPC únicamente causó ligeras variaciones en la magnitud de elipticidad a 222 nm y 207 nm. De esto se deduce que los liposomas a esta concentración no producían un incremento importante de hélice α . Una vez analizados los valores de $[\Theta]_{MRW}$ según el método de Chang (1978), el contenido en hélice α pasaba de un 2.2% para el péptido en solución a un 4.7% en presencia de liposomas; tampoco se observaron cambios de importancia en la proporción de estructura tipo β , y el porcentaje de estructura aperiódica se mantenía prácticamente igual (48.4% y 46.7% respectivamente).

En solución de TFE sí se producían cambios conformacionales importantes. En el espectro de CD se observa la aparición de dos bandas negativas con mínimos a 222 y 207 nm, característicos de una estructura de hélice α ; $[\Theta]_{MRW}$ pasaba de $-2009 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ en agua

a $-6503 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ en TFE, y $[\Theta]_{207}$ de -5662 a $-8037 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$.

Condición	$[\Theta]_{207}$	$[\Theta]_{222}$	hélice α	estr. β	giro β	aperiód
Agua	-5662	-2009	2.23	21.54	27.82	48.41
+DPPC	-5520	-2208	4.69	18.11	30.49	46.71
TFE	-8037	-6503	22.03	8.77	30.91	38.29

Tabla 23: Valores de elipticidad ($\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$) a 207 y 222 nm y estructura secundaria de preS(120-145) en medio acuoso, en presencia de liposomas (DPPC/preS(120-145)=37:1) y en TFE. La contribución de cada componente se calculó aplicando el método de Chang (1978). Concentración de péptido: $6.94 \cdot 10^{-5} \text{ M}$.

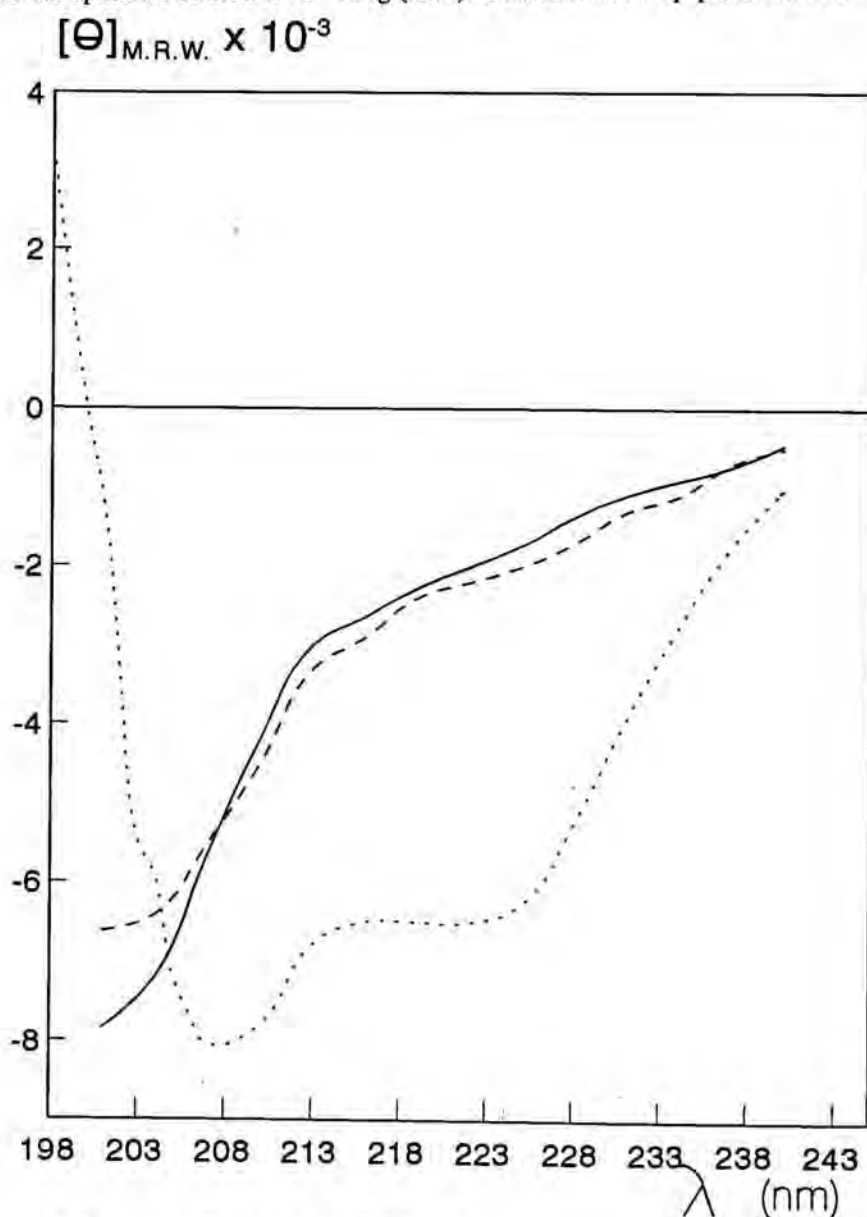


Figura 76: Espectro de Dicroísmo Circular de preS(120-145). Concentración de péptido: $6.94 \cdot 10^{-5} \text{ M}$. Se representa la variación de la elipticidad $[\Theta]_{\text{MRW}}$ ($\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$) frente a la longitud de onda (nm). (—) preS(120-145) en solución acuosa; (---) DPPC/preS(120-145) 37:1; (.....) preS(120-145) en TFE.

3.5. PERTURBACION DE LA ESTRUCTURA DE LOS LIPOSOMAS INDUCIDA POR LOS PEPTIDOS Y LIPOPEPTIDOS. LIBERACION DE CARBOXIFLUORESCEINA.

Se determinó la capacidad de los péptidos y lipopéptidos en estudio para inducir la liberación de CF encapsulada en liposomas DRV 6.8 mM de DPPC ó DPPC/COL (1:1). El estudio se llevó a cabo a 20 °C, es decir con los liposomas en estado de gel, y la relación molar lípido/péptido fue de 44:1 y/o 1:1.

En estas condiciones, y cuando la relación molar DPPC/péptido era 44:1, el péptido preS(120-145) no inducía la salida de CF encapsulada en liposomas DRV, tanto si contenían colesterol como si no. Al incrementar la relación molar hasta 1:1, en el caso de los liposomas de DPPC se producía una liberación brusca de un 6% a los 20 minutos, valor que se mantuvo estable en las siguientes lecturas. En liposomas con colesterol, únicamente se detectaba la salida de un 1-2% de CF encapsulada a los 100 minutos de incubación (figura 77a).

En el caso de estearoil-preS(120-145), al incubarlo en presencia de DPPC-DRV (relación molar 44:1), se producía una liberación poco importante de CF, alcanzándose un 10% a la 4 horas. La liberación era más rápida durante los primeros 60 minutos, con un 7% de CF en el medio de incubación. La presencia de colesterol estabilizaba los liposomas frente a la interacción del péptido, detectándose tan sólo un 4% de CF liberada a las 4 horas (fig. 77b).

Al incubar el lipopéptido colanoil-preS(120-145) con liposomas DPPC-DRV en estado de gel (relación molar 44:1), se producía un incremento gradual de liberación de CF, llegándose a poco más del 13% a los 90 minutos; a partir de este punto, el péptido continuaba induciendo la salida de CF encapsulada, pero de una forma todavía más lenta, alcanzándose el 25% a las 7 horas de incubación. Los liposomas DPPC/COL (1:1), eran algo más estables, con un máximo de 7% de CF libre a las 4 horas (figura 77c).

El derivado Pam₃CSS-preS(120-145) no tenía ningún efecto inductor de la liberación de CF en ninguna de las dos composiciones lipídicas ensayadas (relación molar lípido/péptido 44:1) (figura 77d).

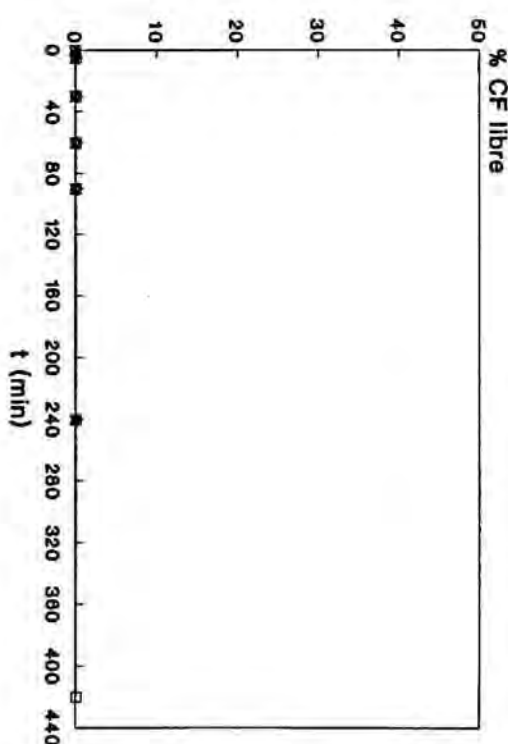
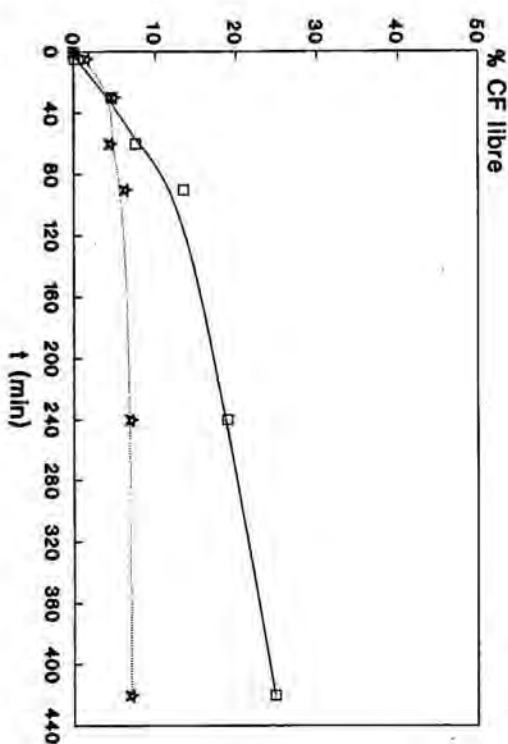
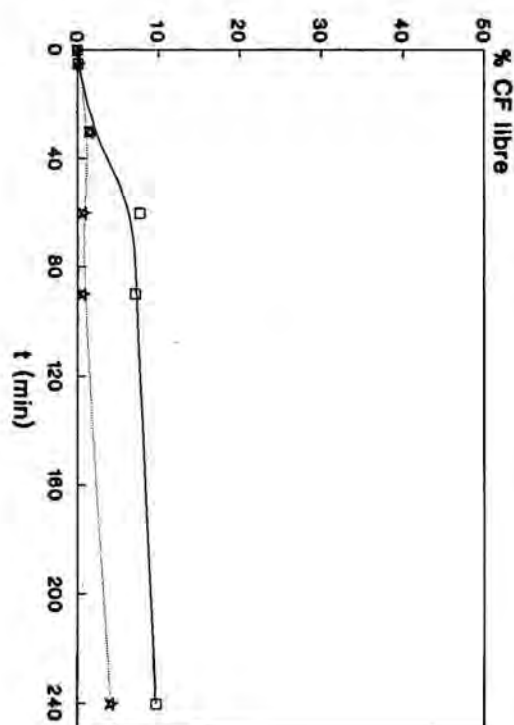
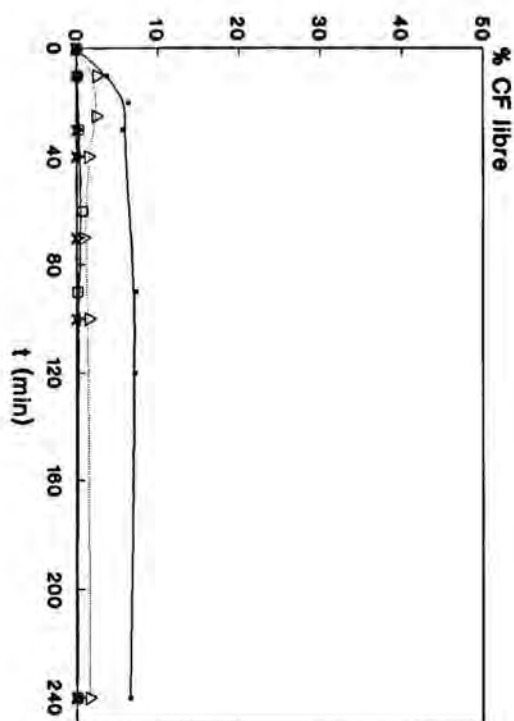


Figura 77: Liberación de CF encapsulada en liposomas DRV de DPPC 6 DPPC/COL (1:1) (concentración de fosfolípido 6,8 mM) en presencia de a) preS(120-145); b) estearoil-preS(120-145); c) colanoli-preS(120-145) y d) Pam₃CSS-preS(120-145). Temperatura 20 ± 1 °C. Relación molar DPPC/peptide 1:1: ■ DPPC, Δ DPPC/COL. Relación molar DPPC/peptide 44:1: □ DPPC, ★ DPPC/COL.

3.6. INTERACCION DE preS(120-145), ESTEAROIL-preS(120-145), COLANOIL-preS(120-145) Y Pam₃CSS-preS(120-145) CON MONOCAPAS LIPIDICAS

Empleando capas monomoleculares como modelo de membrana, se han llevado a cabo varios tipos de determinaciones. En primer lugar se han realizado las isothermas de compresión de las monocapas de los péptidos puros. En segundo lugar se ha determinado la influencia de los péptidos en el estado de ordenación de una monocapa lipídica, cuando se inyectaba el péptido en la subfase. En tercer lugar, se estudio la miscibilidad péptido-lípido mediante isothermas de compresión de las monocapas mixtas. Con todo ello se pretendía obtener más información que permitiese explicar la capacidad de estos péptidos y lipopéptidos de insertarse en liposomas, y por consiguiente conocer mejor el mecanismo de interacción de los mismos con membranas biológicas.

3.6.1. ISOTHERMAS DE COMPRESION DE LOS PEPTIDOS PUROS

En primer lugar se llevaron a cabo varios ensayos para determinar la cantidad idónea de péptido o lipopéptido a extender en la subfase, a fin de obtener isothermas adecuadas a las características de nuestro sistema de medida. La cantidad final seleccionada equivalía a $1 \cdot 10^{16}$ moléculas, y se mantuvo invariable para los cuatro péptidos.

Trabajando en estas condiciones se obtuvieron los registros que se muestran en la figura 78. Se puede apreciar que existe una gradación en el área ocupada por molécula, en la presión a la que tiene lugar el cambio de fase y en la presión máxima alcanzada. Todos estos parámetros se resumen en la tabla 24.

Los análogos peptídicos daban isothermas en estado expandido, mientras que el péptido preS(120-145) formaba isothermas en estado gaseoso.

Una característica a destacar es la estabilidad de las monocapas formadas, propiedad que se encuentra directamente relacionada con la máxima presión de compresión alcanzada. Como se puede comprobar en la figura 78, existía una gradación en la estabilidad de las monocapas, siendo las más estables las correspondientes a los derivados de ácido esteárico y colánico.

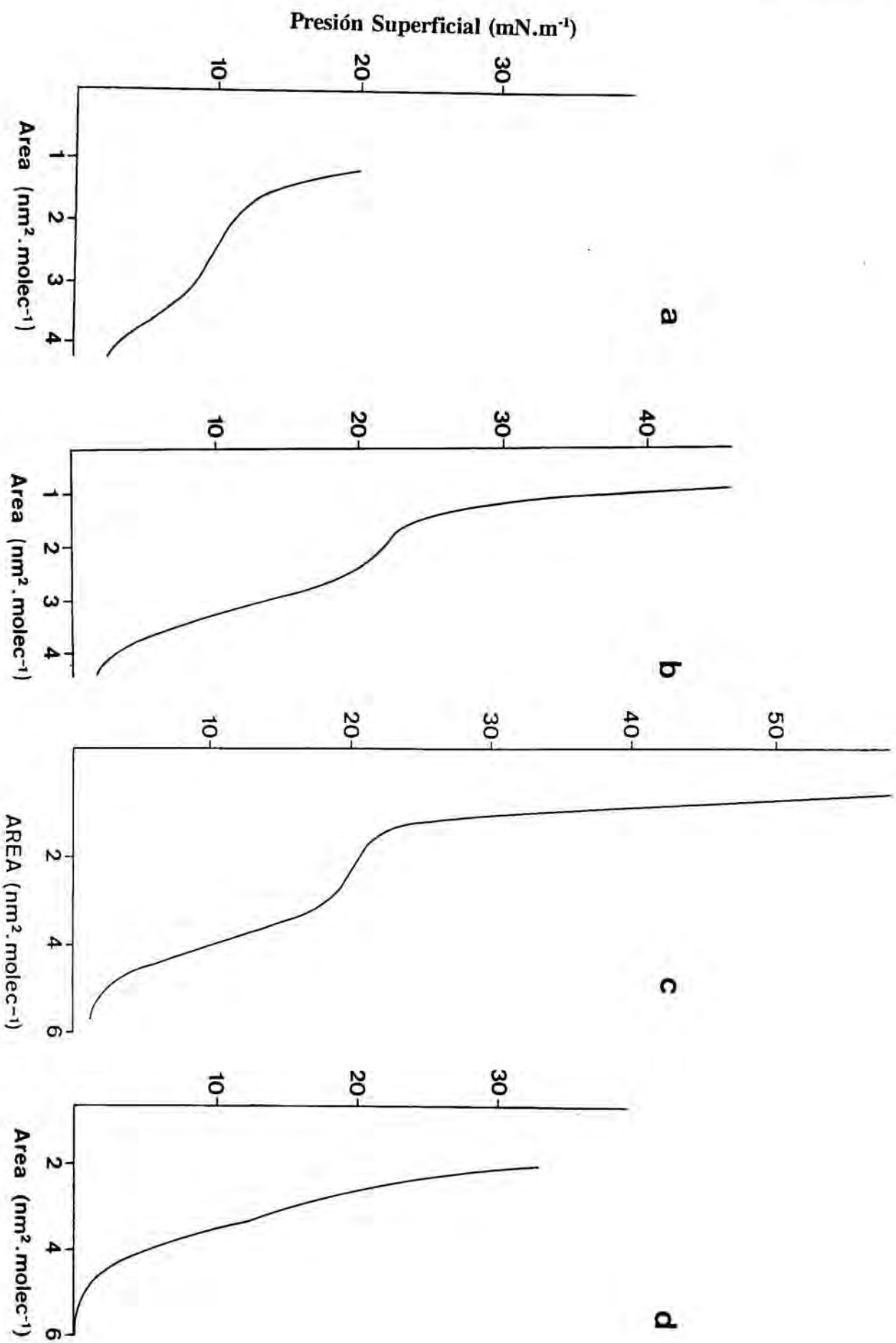


Figura 78: Isotermas de compresión de a) presS(120-145), b) Estearoil-presS(120-145), c) Colanoil-presS(120-145) y d) Pam₃CSS-presS(120-145) extendidos sobre subfase de PBS (pH=7.4)

Sorprendentemente, el derivado Pam₃CSS-preS(120-145) presentaba una menor estabilidad que los anteriores, contrariamente a lo que cabría esperar dada la elevada proporción de restos hidrófobos que contiene. Este comportamiento anómalo es coincidente con el que presenta en el análisis por HPLC y podría ser debido a la formación de micelas. En este caso existiría un equilibrio entre las moléculas situadas en la monocapa, es decir en la interfase líquido-aire, y los agregados micelares, de manera que la concentración real del lipopéptido en la interfase sería inferior a la teórica. No obstante, los valores de presión máxima alcanzados para el péptido original y el derivado Pam₃CSS-preS son del mismo orden que los descritos para otros péptidos de tamaño similar (Fidelio et al., 1986). Las monocapas formadas por el péptido PreS(120-145) fueron las menos estables.

Los valores de área ocupada por molécula en el punto de máxima compresión (tabla 23), sugieren la existencia de una estructura secundaria plegada, tal como se comentará en el apartado de discusión.

Peptido	Cambio de fase		Compresión máxima	
	Presión*	Area**	Presión*	Area**
preS(120-145)	9.3	2.37	16.8	1.25
Colanoil-preS	20.1	2.18	52.8	0.91
Estearoil-preS	22.0	2.14	48.0	0.85
Pam ₃ CSS-preS	12.5	3.36	31.2	1.82

Tabla 24: Parámetros característicos de las isotermas de compresión del péptido preS(120-145) y los lipopéptidos estearoil-preS, colanoil-preS y Pam₃CSS-preS. * mN.m⁻¹; ** nm².molec⁻¹

3.6.2. ISOTERMAS DE COMPRESION DE MONOCAPAS DE DPPC EXTENDIDAS SOBRE SOLUCIONES DE PEPTIDOS

La capacidad de preS(120-145) y los lipopéptidos derivados de insertarse en una monocapa de fosfolípido se comprobó inyectando soluciones acuosas de cada uno de ellos en una subfase de PBS (pH 7.4). La presión inicial de la monocapa de DPPC fue de 1 mN.m⁻¹, y la concentración de péptido en la subfase se seleccionó de tal modo que no presentara actividad superficial por si mismo. En la figura 79 se muestran las isotermas de compresión de la DPPC extendida sobre PBS y sobre soluciones de cada uno de los péptidos en este tampón.

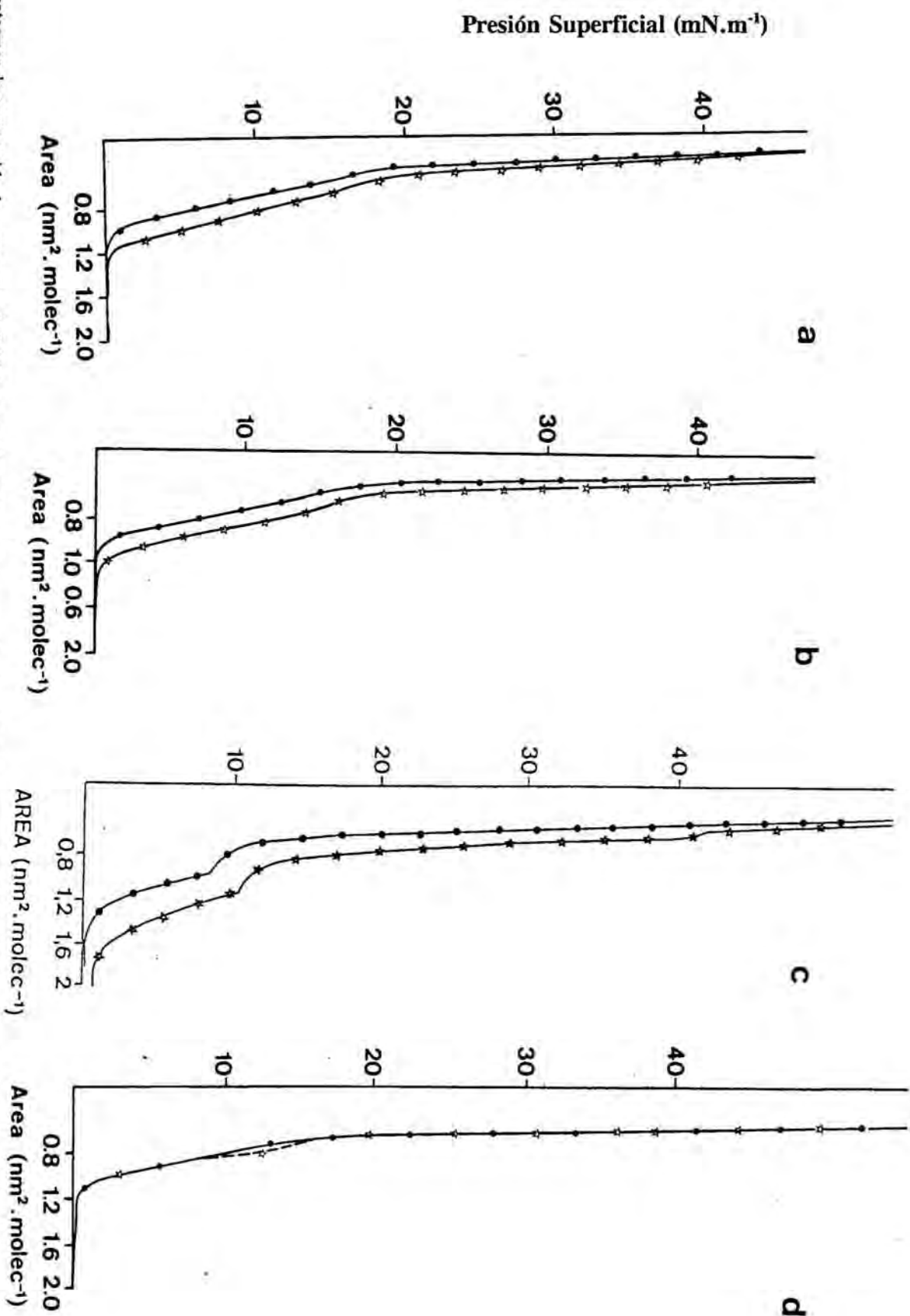


Figura 79: Isotermas de compresión de monocapas de DPPC extendidas sobre subfases conteniendo: (●) PBS, y (×) péptido 6 lipopéptido: a) pres(120-145), b) estearoil-pres(120-145), c) colanoil-pres(120-145), d) Pam₃CSS-pres(120-145).

A la vista de estos resultados se pudo comprobar como, en líneas generales, la presencia del péptido o lipopéptido producía una expansión de la monocapa. Este efecto era claramente apreciable a presiones superficiales bajas. También en este caso, la actividad de Pam₃CSS-preS(120-145) resultó inferior a la del resto de moléculas estudiadas. El efecto expansivo disminuía al aumentar la presión superficial de la monocapa. Por otra parte, el cambio de fase característico de DPPC aparecía a presiones superiores en presencia de los péptidos en la subfase.

3.6.3. ISOTERMAS DE COMPRESION DE MONOCAPAS MIXTAS DE preS(120-145) Y LIPOPEPTIDOS DERIVADOS CON DPPC

3.6.3.1. *Isotermas de compresión de monocapas mixtas preS(120-145)/DPPC*

Como puede observarse en la figura 80, las monocapas mixtas DPPC/preS(120-145) eran del tipo líquido expandido y presentaban un comportamiento intermedio con respecto a los componentes puros. El área ocupada por molécula disminuía a medida que aumentaba la proporción de DPPC; esta disminución era más evidente a bajas presiones. La transición de fase observada para el péptido puro se mantenía en las mezclas, sin embargo tenía lugar a presiones tanto mayores cuanto mayor era la proporción de DPPC en la monocapa. En la tabla 25 se muestran los valores de las áreas ocupadas por las moléculas para las diferentes relaciones molares ensayadas.

π mN.m ⁻¹	Relación molar DPPC/preS(120-145)					
	0:1	0.2:0.8	0.4:0.6	0.6:0.4	0.8:0.2	1:0
5	3.57	3.39	3.39	3.32	2.96	2.25
10	2.89	2.79	2.96	2.93	2.64	2.07
20	1.57	1.54	1.68	1.89	1.86	1.82
30	---	---	---	---	---	1.75
40	---	---	---	---	---	1.61

Tabla 25: Area ocupada por molécula (nm².molec⁻¹) para monocapas mixtas DPPC-preS(120-145) de distintas proporciones molares de ambos componentes, medida a diferentes presiones superficiales (π).

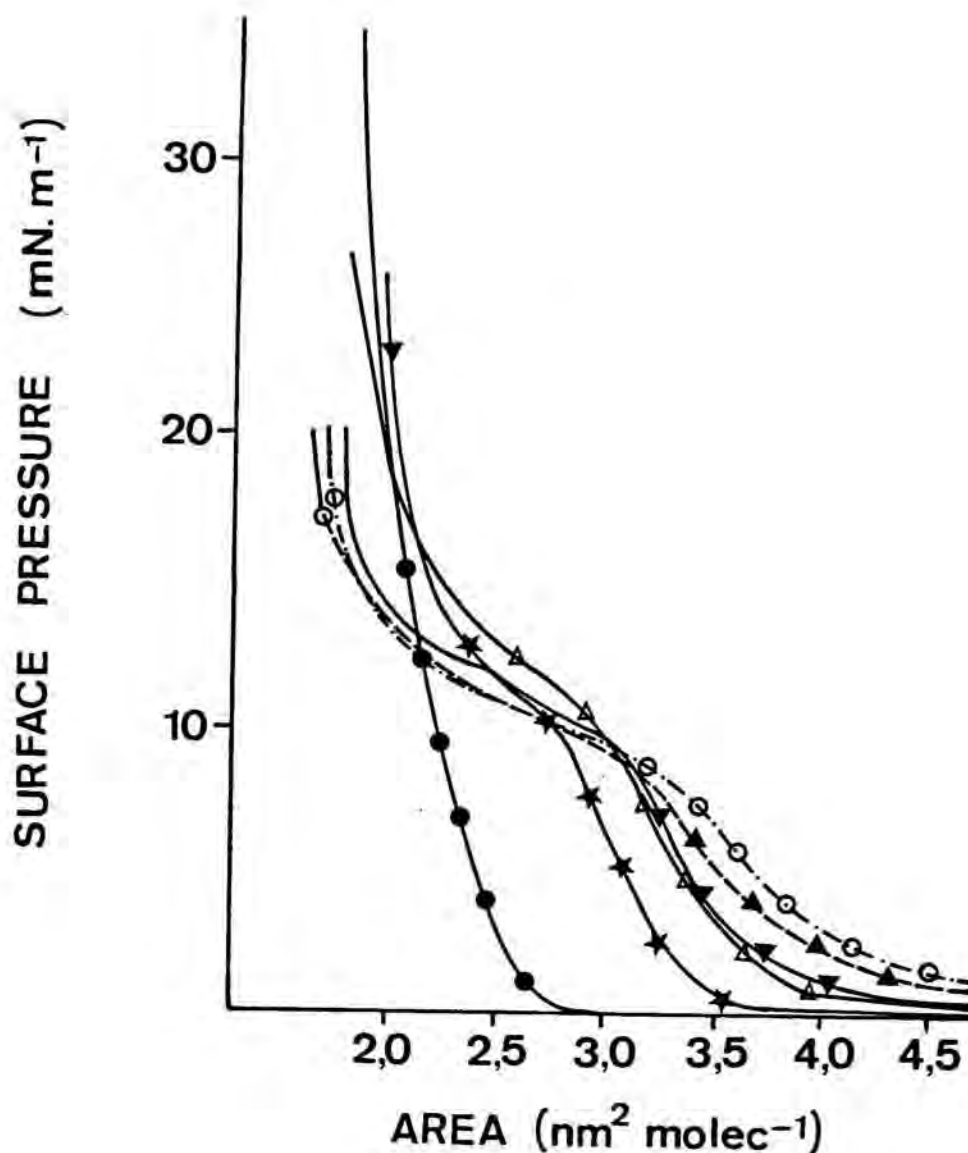


Figura 80: Isotermas de compresión de monocapas mixtas de DPPC/preS(120-145) extendidas sobre PBS. Fracción molar DPPC: ● 1; ★ 0.8; △ 0.6; ▼ 0.4; ▲ 0.2; ○ 0.

Tal como se deduce de la observación de la figura 81, la miscibilidad del péptido y la DPPC era prácticamente ideal a altas presiones superficiales (20 mN.m^{-1}), mientras que a presiones menores se ponían de manifiesto pequeñas desviaciones de la idealidad.

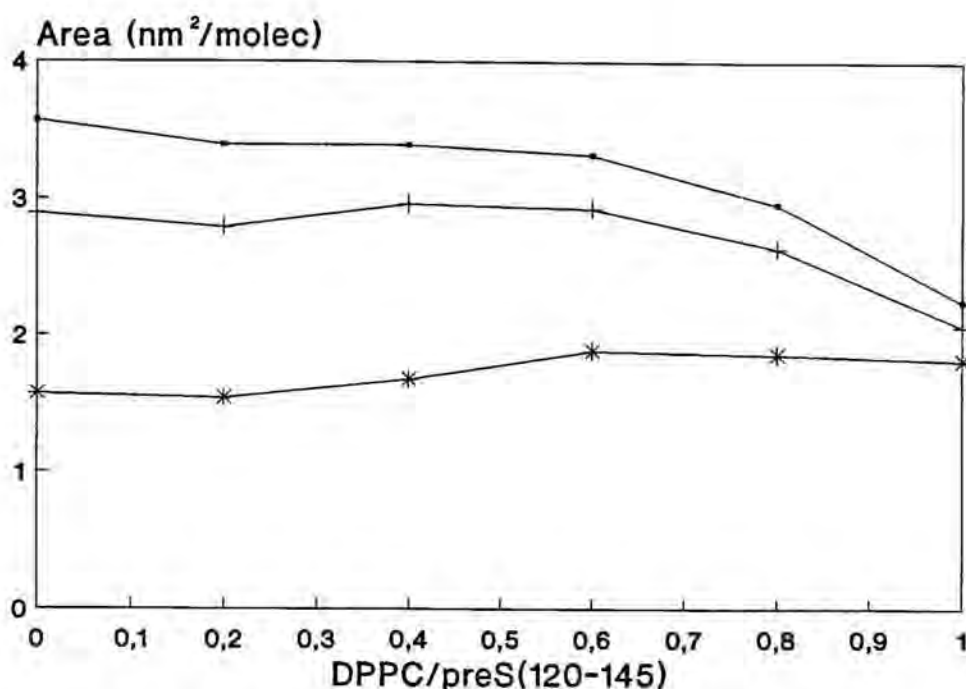


Figura 81: Miscibilidad de DPPC/preS(120-145) en monocapas mixtas extendidas sobre PBS. Áreas ocupadas por molécula (nm².molec.⁻¹) a diferentes presiones superficiales (mN.m⁻¹): ■ 5; + 10; * 20.

Procediendo de la misma manera que para las hormonas peptídicas, y siguiendo los conceptos teóricos descritos en el apartado 2.2.7.1. de la Introducción, se han calculado los parámetros termodinámicos (ΔG_M^E y α) referentes a la interacción entre DPPC y preS(120-145) para las presiones superficiales de 10 y 20 mN.m⁻¹ (tabla 26).

Fracción molar DPPC/preS	$\pi = 10 \text{ mN.m}^{-1}$		$\pi = 20 \text{ mN.m}^{-1}$	
	ΔG_M^E	α	ΔG_M^E	α
0.8:0.2	568.62	6.01	903.08	9.65
0.6:0.4	697.36	4.97	1178.81	8.4
0.4:0.6	423.78	3.02	718.71	5.12
0.2:0.8	181.01	1.93	166.61	1.78

Tabla 26: Energías de mezcla en exceso (ΔG_M^E) en cal.mol⁻¹ y parámetros de interacción (α) para monocapas mixtas de DPPC y preS(120-145) extendidas sobre subfase de PBS (pH 7.4) a presiones superficiales de 10 y 20 mN.m⁻¹.

3.6.3.2. Isotermas de compresión de monocapas mixtas estearoil-preS(120-145)/DPPC.

Las mezclas DPPC/Estearoil-preS(120-145) presentaron un comportamiento intermedio entre los componentes puros (fig. 82). Todas las monocapas estaban expandidas respecto a la DPPC pura, y el área ocupada por molécula aumentaba con la proporción de lipopéptido (tabla 27). Tal como se observa en la figura 83, la miscibilidad fue prácticamente ideal a todas las presiones superficiales. La transición de fase tenía lugar a una presión similar a la del lipopéptido puro. Las presiones de colapso eran cercanas a las de la DPPC, por lo que no pudo aplicarse el criterio de miscibilidad basado en las presiones de colapso (Gaines et al., 1966).

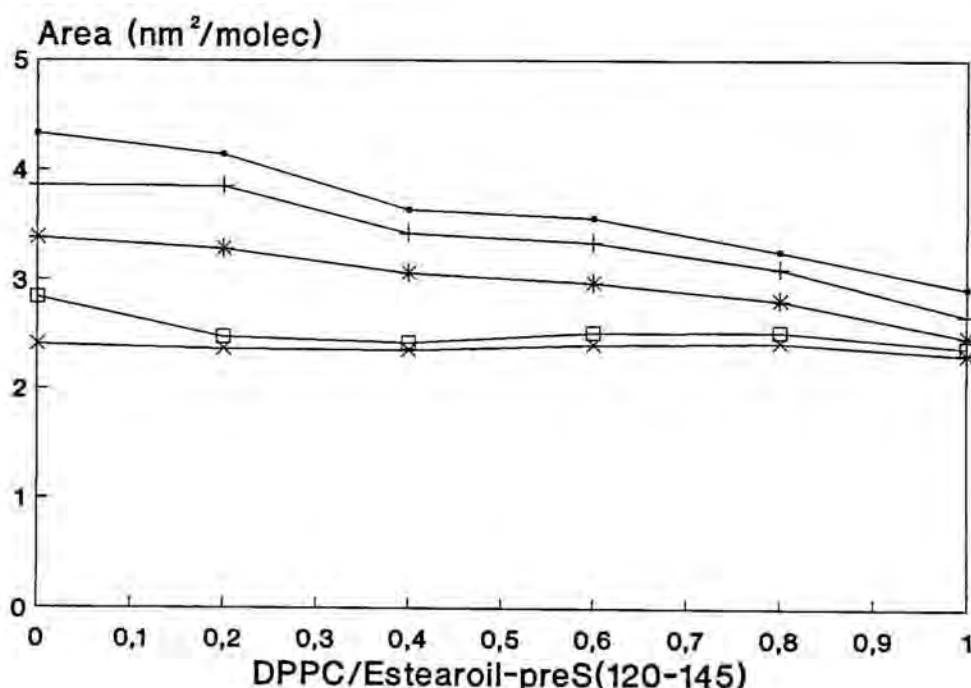


Figura 83: Miscibilidad de DPPC/estearoil-preS(120-145) en monocapas mixtas extendidas sobre PBS. Áreas ocupadas por molécula ($\text{nm}^2 \cdot \text{molécula}^{-1}$) a diferentes presiones superficiales ($\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$): ■ 5; + 10; * 20, □ 30; X 40.

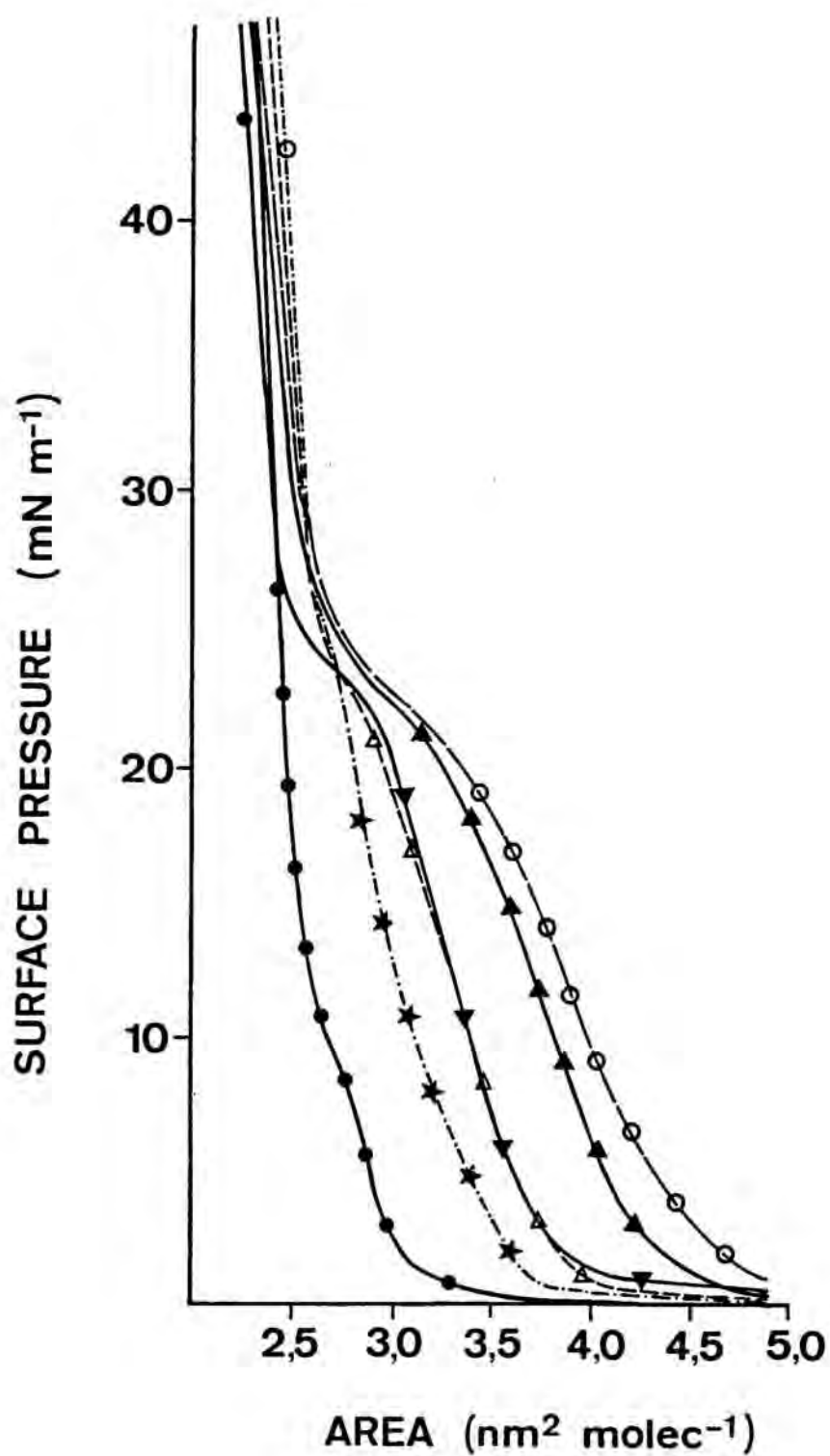


Figura 82: Isotermas de compresión de monocapas mixtas de DPPC/estearoil-preS(120-145) extendidas sobre PBS. Fracción molar DPPC: ● 1; ★ 0.8; △ 0.6; ▼ 0.4; ▲ 0.2; ○ 0

π mN.m ⁻¹	Relación molar DPPC/Estearoil-preS(120-145)					
	0:1	0.2:0.8	0.4:0.6	0.6:0.4	0.8:0.2	1:0
5	4.33	4.14	3.64	3.56	3.26	2.92
10	3.86	3.85	3.42	3.34	3.10	2.67
20	3.38	3.28	3.06	2.97	2.81	2.47
30	2.84	2.47	2.42	2.51	2.52	2.38
40	2.40	2.36	2.35	2.40	2.42	2.31

Tabla 27: Área ocupada por molécula (nm².molec⁻¹) para monocapas mixtas DPPC/Estearoil-preS(120-145) en función de la relación molar de ambos componentes y a diferentes presiones superficiales.

Los cálculos termodinámicos correspondientes a las presiones de 10 y 20 mN.m⁻¹ se muestran en la tabla 28.

Fracción molar DPPC/estearoil preS(120-145)	$\pi=10$ mN.m ⁻¹		$\pi=20$ mN.m ⁻¹	
	ΔG_M^E	α	ΔG_M^E	α
0.8:0.2	272.11	2.91	580.39	6.2
0.6:0.4	172.37	1.23	409.76	2.92
0.4:0.6	297.61	2.12	-31.00	-0.22
0.2:0.8	205.98	2.20	408.48	4.30

Tabla 28: Energías de mezcla en exceso (ΔG_M^E) en cal.mol⁻¹ y parámetros de interacción (α) para monocapas mixtas de DPPC y estearoil-preS(120-145) extendidas sobre subfase de PBS (pH=7.4) a presiones superficiales de 10 y 20 mN.m⁻¹.

3.6.3.3. Isotermas de compresión de monocapas mixtas Colanoil-preS(120-145)/DPPC.

De modo similar a los apartados anteriores, en la figura 84 y en la tabla 29 se muestran los registros obtenidos y los valores del área ocupada por molécula calculados a partir de las isotermas. Se puede comprobar que la miscibilidad (figura 85) presentaba un comportamiento prácticamente ideal, lo que indica o bien una total separación de fases o una mezcla ideal de ambos componentes. El cambio de fase característico de las isotermas de colanoil-preS(120-145) aparecía también en las monocapas mixtas, pero a valores de presión superficial superiores.

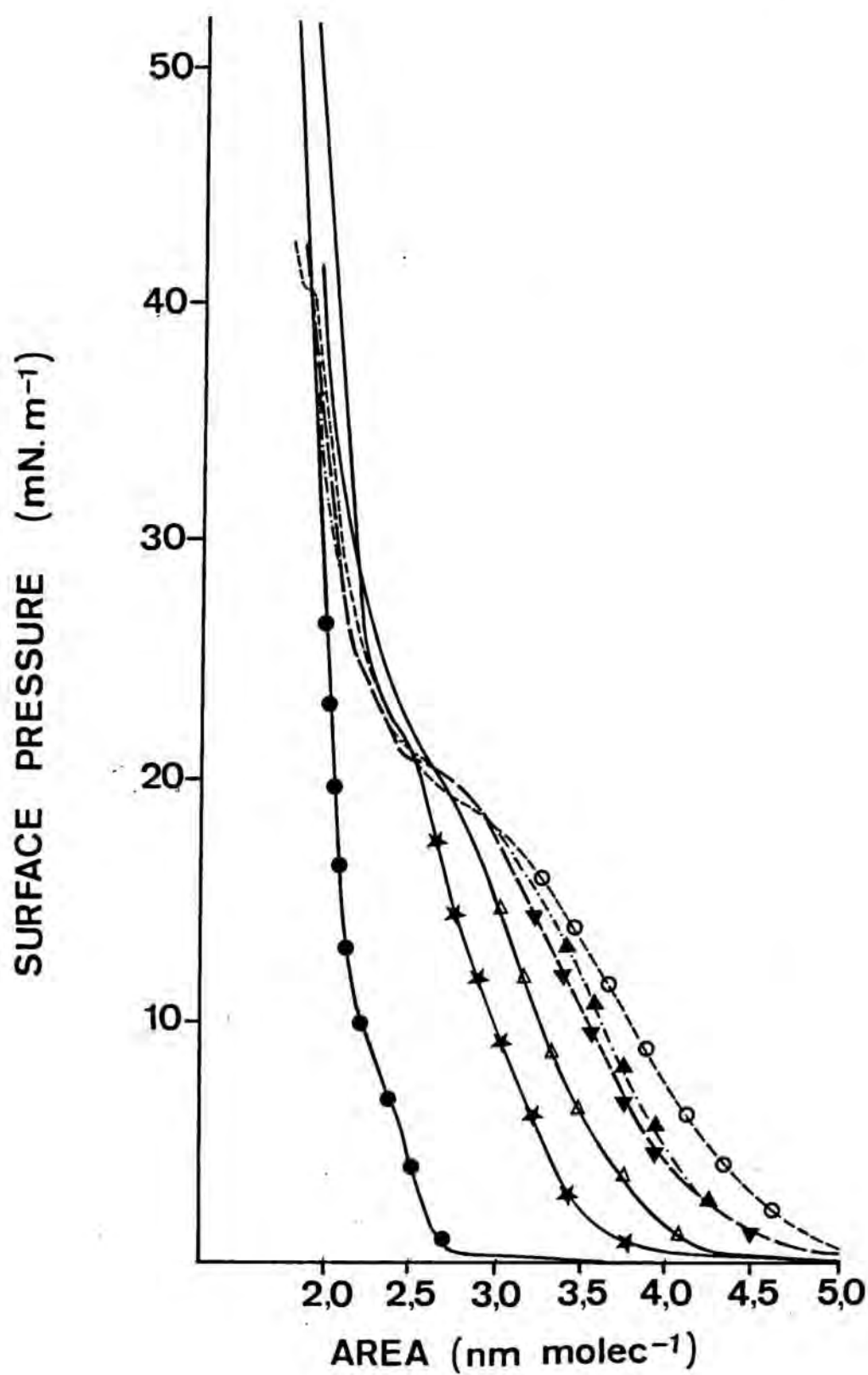


Figura 84: Isotermas de compresión de monocapas mixtas de DPPC/colanoil-preS(120-145) extendidas sobre PBS. Fracción molar DPPC: ● 1; ★ 0.8; △ 0.6; ▼ 0.4; ▲ 0.2; ○ 0.

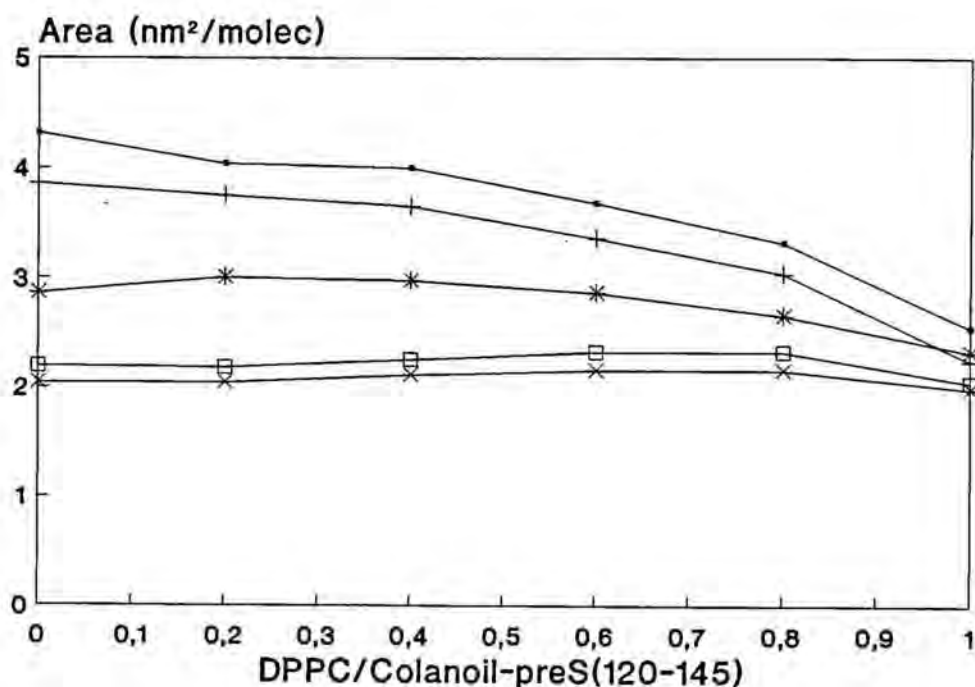


Figura 85: Miscibilidad de DPPC/Colanoil-preS(120-145) en monocapas mixtas extendidas sobre PBS. Áreas ocupadas por molécula ($\text{nm}^2 \cdot \text{molec}^{-1}$) a diferentes presiones superficiales ($\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$): ■ 5; + 10; * 20, □ 30; X 40.

π $\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$	Relación molar DPPC/Colanoil-preS(120-145)					
	0:1	0.2:0.8	0.4:0.6	0.6:0.4	0.8:0.2	1:0
5	4.32	4.04	4.00	3.68	3.32	2.54
10	3.86	3.75	3.65	3.36	3.04	2.24
20	2.86	3.00	2.97	2.86	2.65	2.13
30	2.19	2.18	2.25	2.32	2.32	2.04
40	2.04	2.04	2.11	2.15	2.15	1.98

Tabla 29: Área ocupada por molécula ($\text{nm}^2 \cdot \text{molec}^{-1}$) para monocapas mixtas DPPC/colanoil-preS(120-145) en función de la relación molar de ambos componentes y a diferentes presiones superficiales.

Los cálculos termodinámicos realizados a las presiones superficiales de 10 y 20 mN.m⁻¹ se muestran en la tabla 30.

Fracción molar DPPC/colanoil preS(120-145)	$\pi_i=10 \text{ mN.m}^{-1}$		$\pi_i=20 \text{ mN.m}^{-1}$	
	ΔG_M^E	α	ΔG_M^E	α
0.8:0.2	599.63	6.41	1287.71	13.76
0.6:0.4	613.00	4.37	1294.91	9.22
0.4:0.6	580.11	4.13	2020.08	14.39
0.2:0.8	195.44	2.09	469.62	5.02

Tabla 30: Energías de mezcla en exceso (ΔG_M^E) en cal.mol⁻¹ y parámetros de interacción (α) para monocapas mixtas de DPPC y colanoil-preS(120-145) extendidas sobre subfase tamponada (pH=7.4) a presiones superficiales de 10 y 20 mN.m⁻¹.

3.6.3.4. Isotermas de compresión de monocapas mixtas Pam₃CSS-preS(120-145)/DPPC.

Las isotermas de compresión obtenidas para las diferentes proporciones molares de DPPC y Pam₃CSS-preS(120-145) se muestran en la figura 86. El área ocupada por molécula disminuía al aumentar la proporción de fosfolípido, tal como se resume en la tabla 31. Al representar los valores de área ocupada por molécula a diferentes presiones superficiales (figura 87), se comprobó que existía una desviación positiva de la idealidad, correspondiente a la proporción molar 0.8 de DPPC. Esta desviación se acentuaba a presiones superficiales bajas (5 y 10 mN.m⁻¹), mientras que a 20 mN.m⁻¹ el comportamiento era prácticamente ideal.

π mN.m ⁻¹	Relación molar DPPC/Pam ₃ CSS-preS(120-145)					
	0:1	0.2:0.8	0.4:0.6	0.6:0.4	0.8:0.2	1:0
5	4.60	4.46	3.82	3.43	3.51	2.50
10	3.84	3.78	3.23	3.01	3.10	2.34
20	2.87	2.89	2.58	2.51	2.60	2.23
30	2.32	2.34	---	---	---	---
40	---	---	---	---	---	---

Tabla 31: Área ocupada por molécula (nm².molec⁻¹) para monocapas mixtas DPPC/Pam₃CSS-preS(120-145) en función de la relación molar de ambos componentes y a diferentes presiones superficiales.

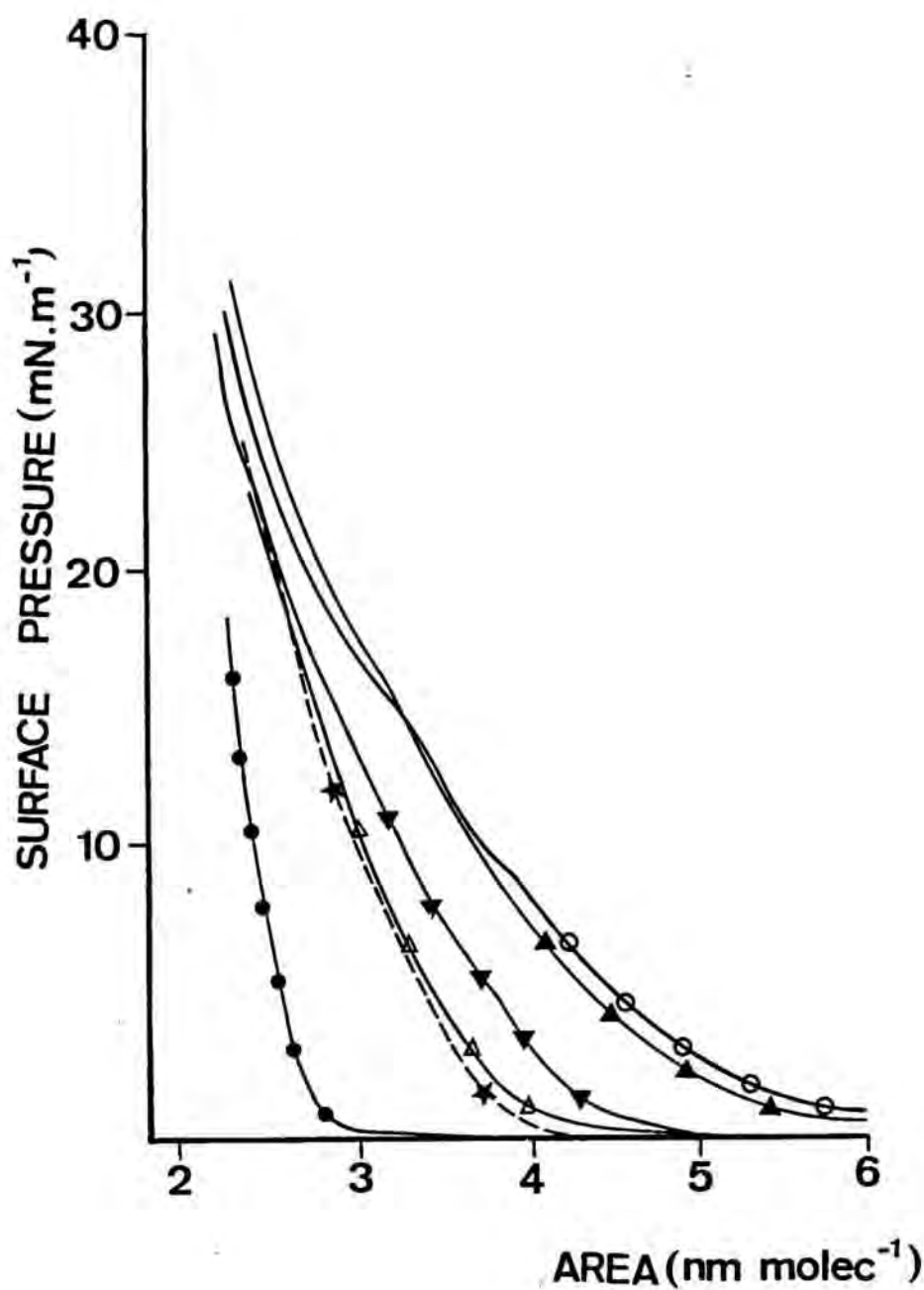


Figura 86: Isotermas de compresión de monocapas mixtas de DPPC/Pam₃CSS-preS(120-145) extendidas sobre PBS. Fracción molar DPPC: ● 1; ★ 0.8; △ 0.6; ▼ 0.4; ▲ 0.2; ○ 0.

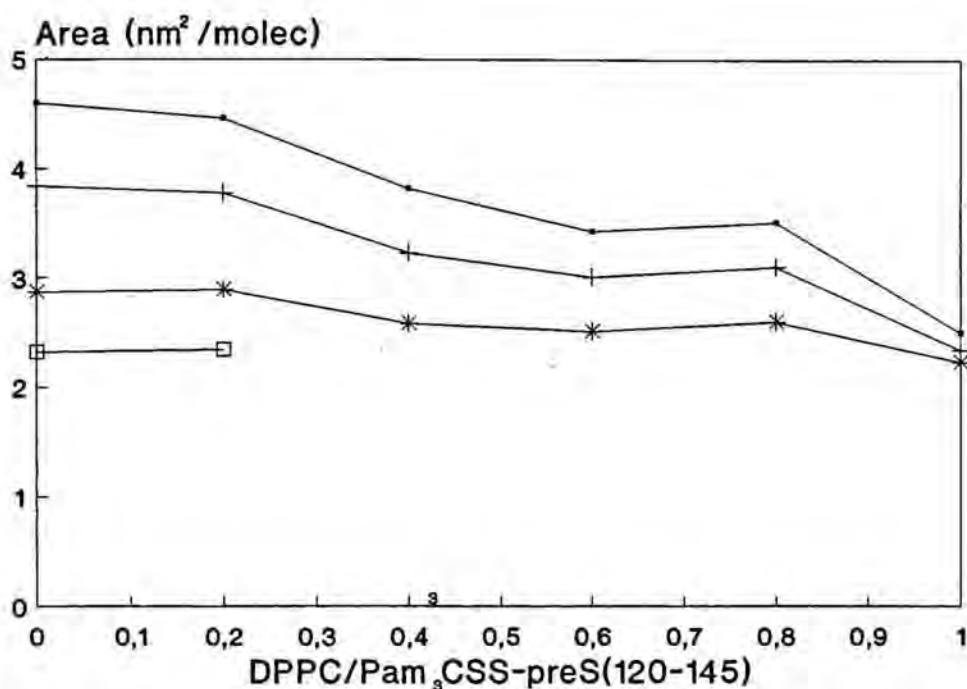


Figura 87: Miscibilidad de DPPC/Pam₃CSS-preS(120-145) en monocapas mixtas extendidas sobre PBS. Áreas ocupadas por molécula (nm².molec.⁻¹) a diferentes presiones superficiales (mN.m⁻¹): ■ 5; + 10; * 20, □ 30.

Los cálculos termodinámicos a las presiones de 10 y 20 mN.m⁻¹ se muestran en la tabla 32.

Fracción molar DPPC/Pam ₃ CSS preS(120-145)	$\pi=10 \text{ mN.m}^{-1}$		$\pi=20 \text{ mN.m}^{-1}$	
	ΔG_M^E	α	ΔG_M^E	α
0.8:0.2	721.88	7.7	1203.84	12.86
0.6:0.4	76.32	0.54	126.92	0.9
0.4:0.6	51.66	0.37	52.49	0.37
0.2:0.8	361.34	3.86	667.4	7.13

Tabla 32: Energías de mezcla en exceso (ΔG_M^E) en cal.mol⁻¹ y parámetros de interacción (α) para monocapas mixtas de DPPC y Pam₃CSS-preS(120-145) extendidas sobre subfase de PBS (pH=7.4) a presiones superficiales de 10 y 20 mN.m⁻¹.

DISCUSSION

Dado el gran interés de encontrar una correlación entre afinidad por la membrana y actividad biológica en los péptidos, el objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido profundizar en el conocimiento de la interacción lípido-péptido para dos series de péptidos de diferente actividad biológica: hormonas peptídicas e inmunopéptidos del virus de la hepatitis B. Para ello se han utilizado diversos métodos complementarios, unos basados en las propiedades del péptido, como el estudio de la variación de la *fluorescencia intrínseca*, o la determinación de cambios estructurales por *dicroísmo circular*. También se han empleado técnicas basadas en monitorizar cambios en el modelo lipídico de membrana, como la *polarización de fluorescencia de ANS o DPH* (marcadores fluorescentes ligados a la membrana de los liposomas), la *liberación de CF* (marcador encapsulado en el interior de los liposomas), o bien estudios utilizando *monocapas lipídicas* como modelo de membrana.

Si bien en el capítulo de Resultados se han separado entre sí las diferentes técnicas de estudio de interacción empleadas, a continuación se intentará correlacionar la información aportada por cada una de ellas para cada péptido, con el objetivo de definir el modelo de interacción más probable en cada caso.

Las hormonas peptídicas pueden clasificarse en tres categorías estructurales (Kaiser, 1984). El primer grupo incluye péptidos cortos, como los opiáceos de 5 aminoácidos [Met⁵]-encefalina y [Leu⁵]-encefalina. En estos casos, la totalidad de la estructura de la hormona constituye el "lugar de reconocimiento" que determina la interacción con el receptor. La segunda categoría incluye estructuras más complejas, con un número de aminoácidos que les permite adoptar estructuras terciarias que les confieran estabilidad en solución acuosa, ya sea por formación de puentes disulfuro o de un núcleo o "core" de naturaleza hidrófoba. Este es el caso de insulina y hGH. En un tercer grupo se emplazan aquellas hormonas peptídicas formadas por una única cadena de aminoácidos, entre 10 y 50, y que no suelen contener más de un puente disulfuro. Algunos ejemplos son: LHRH, SRIF y GHRH.

El entorno funcional de los péptidos biológicamente activos en su lugar de acción es de naturaleza anfifílica, y viene determinado por la interfase entre la superficie celular (donde se encuentra el receptor específico), y el medio externo acuoso. Cuando el péptido se aproxima a la membrana celular, ésta induce conformaciones preferentes en el mismo (Sargent et al., 1986 y 1988; Jacobs y White, 1989); estas estructuras, lógicamente, favorecen la separación espacial entre los residuos hidrofóbicos y los hidrofílicos, creando de esta manera una anfipaticidad complementaria (Kaiser y Kézdy, 1987; Jacobs y White, 1989). Como regla general, estas conformaciones no son necesariamente predominantes cuando el péptido o proteína se encuentran disueltos en agua, pero pueden ser inducidos por la proximidad de la superficie anfifílica de la membrana (Ojcius y Young, 1991).

La formación de **estructuras secundarias de caracter anfipático** (ya sea hélice α , hélice π o hoja β) persigue tres posibles objetivos: 1) conferir al "sitio activo" la orientación adecuada para favorecer su unión al receptor y desencadenar así la respuesta biológica. Ya ha sido demostrado para péptidos opiáceos y taquiquininas que los parámetros estructurales de interacción entre péptidos individuales y membranas lipídicas artificiales pueden usarse para la predicción cuantitativa de la potencia y selectividad por el receptor (Kimura, 1992); 2) incrementar la velocidad de acceso del péptido al receptor: una vez el péptido ha adoptado la estructura secundaria adecuada en la superficie celular próxima al receptor, puede localizarlo por adsorción en la superficie celular seguida de difusión en sólo dos dimensiones en dicha superficie; en ausencia de esta estructura secundaria definida, sería necesaria una búsqueda tridimensional, lo que requeriría una mayor cantidad de energía; 3) la estructura secundaria anfipática podría proteger al péptido de la proteólisis, ya sea por interacciones intramoleculares con otras regiones de la molécula, dificultando así su destrucción por los enzimas proteolíticos, o bien por asociación con la superficie de la membrana celular.

Este modelo de interacción propuesto en primer lugar para las hormonas peptídicas, es extensible a cualquier péptido biológicamente activo (Sargent, 1986; Segrest, 1990), y por tanto podría ayudar a explicar el mecanismo por el cual un péptido potencialmente inmunógeno es capaz de generar la formación de anticuerpos, ya que para ello debe interaccionar con receptores específicos situados en la membrana celular de los linfocitos B.

Para la predicción de la estructura secundaria, perfiles de hidrofília y anfipaticidad de los péptidos en estudio, se han utilizado dos programas informáticos: ELEM/PREDICT (CSPS CoshiSoft/Peptisearch, Checoslovaquia) y EPIPLOT (Luis Menendez-Arias, Universidad Complutense, Madrid). Se han aplicado los métodos empíricos de predicción de estructura secundaria de Chou y Fasman (1978), de predicción de hidrofobicidad basado en la escala de hidrofília de Kyte y Doolittle (1982), y de predicción de caracter anfipático mediante el algoritmo de De Lisi y Berzofsky, basado en la escala de Fauchère y Pliska (1985).

A continuación se discuten por separado los resultados obtenidos para cada péptido.

1. INTERACCION DE LA SOMATOSTATINA CON MODELOS DE MEMBRANA

La predicción de estructura secundaria de la somatostatina según el algoritmo de Chou-Fasman (1978), se muestra a continuación:

```

      ┌──────────┐
AGCKNFFWKFTFTSC
rrttttssssssss

```

- (r) estructura aperiódica
- (t) giro β
- (s) hoja β

El valor de los parámetros conformacionales calculados por este método* es de $\langle Ph \rangle = 0.96$, y $\langle Ps \rangle = 1.16$. Según este método de predicción, SRIF adoptará preferentemente una estructura en hoja β , y presentará también un giro β . Por otra parte, si se tiene en cuenta el índice de hidrofília de los residuos de aminoácidos según la escala de Kyte y Doolittle (1982), se obtiene un valor medio de $+0.382$, indicativo de un carácter ligeramente hidrófilo. En lo que se refiere a la anfipaticidad de la molécula, se aplicó el método de predicción de De Lisi y Berzofsky (1985), según el cual la secuencia comprendida entre los aminoácidos 3 y 9 es la que presenta mayor probabilidad, con un índice de anfipaticidad A.S. = 6.73; sin embargo, valores de A.S. inferiores a 10 no pueden considerarse significativos.

Holladay y Puett llevaron a cabo un estudio en 1976 en el que se demostraba la validez de esta predicción estructural. Según estos autores, SRIF en solución acuosa presentaba una conformación definida, estabilizada por interacciones intramoleculares. Mediante estudios de sedimentación demostraron que la hormona se encontraba predominantemente en forma monomérica, sin formar agregados. En resumen, SRIF presentaría una estructura elongada, en la que se distinguirían dos dominios: un extremo hidrófilo, en el que se situarían los aminoácidos Ala-Gly y el puente disulfuro, y un dominio hidrófobo, donde se encontrarían los aminoácidos aromáticos (Phe, Trp), y que tendría estructura de hoja β antiparalela y con un giro β . Los estudios de desnaturalización con hidrocioruro de guanidinio demostraron que esta estructura era muy estable gracias a la existencia de tres puentes de hidrógeno

* Los parámetros conformacionales son: $\langle Ph \rangle$ o probabilidad de estructura secundaria de tipo hélice α , y $\langle Ps \rangle$ o probabilidad de estructura secundaria tipo hoja β .

esta estructura era muy estable gracias a la existencia de tres puentes de hidrógeno intramoleculares.

Una primera aproximación a como transcurre la interacción de la somatostatina con la membrana celular se obtiene a partir del estudio de los cambios en las propiedades de fluorescencia del Trp⁸ al incubar la hormona con liposomas DPPC-SUV. Para este estudio se tomó la N-acetil-triptofanamida como referencia. Este compuesto presenta una λ_{em} de 360 nm cuando se encuentra disuelto en tampón acetato pH=7.4, y este valor no resulta influido por la polaridad del entorno (figura 21). La longitud de onda de máxima emisión (λ_{em}) de SRIF medida en estas mismas condiciones, es de 355.4 nm. Esto representa un *blue shift* de unos 5 nm respecto a λ_{em} de N-acetil-triptofanamida, debido a que en la conformación adoptada por la hormona en solución acuosa, el triptófano se encuentra formando parte de la estructura de hoja β , dominio de naturaleza predominantemente hidrófoba, por lo que no está totalmente expuesto al medio acuoso. La intensidad de fluorescencia y la absorbancia (A_{280} y A_{340}) del péptido en ausencia de liposomas se mantienen constantes a lo largo de toda la experimentación, lo que coincide con los experimentos de Holladay y Puett (1976) demostrando la inexistencia de agregación de esta hormona en solución.

Cuando SRIF se incuba con liposomas DPPC-SUV en estado de gel, se produce un incremento en la intensidad de fluorescencia a 340 nm y un desplazamiento de λ_{em} (disminuye prácticamente 12 nm cuando DPPC/SRIF=500:1) (fig. 24). Estos cambios se producen cuando el triptófano pasa a un entorno más apolar, como por ejemplo al interaccionar con las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos que forman la bicapa de los liposomas. Por tanto, se puede afirmar que SRIF se incorpora en parte a las bicapas lipídicas. Sin embargo, las propiedades de fluorescencia del Trp⁸ no se alteran en presencia de liposomas en estado de cristal líquido ($T > T_c$), indicando la ausencia de penetración de la hormona en la bicapa lipídica. Este mismo efecto de la temperatura fue observado por Surewicz y Epand (1984) para la interacción de una serie de pentapéptidos derivados de la pentagastrina con liposomas de DMPC; estos péptidos presentan mayor afinidad por la DMPC a 8°C ($< T_c$) que a 40°C ($> T_c$). Igualmente, el fragmento (1-34) de la hormona paratiroidea interacciona preferentemente con liposomas de DMPC en estado de gel (Epand et al., 1985). Beschiaschvili y Seelig (1991) obtuvieron resultados similares en su estudio de interacción de

SRIF con POPG-SUV, con una disminución de λ_{em} de hasta 12 nm, indicando una penetración profunda del péptido en la zona hidrófoba de los liposomas.

En principio, cabría esperar que la mayor interacción tuviera lugar a temperaturas superiores a la T_c , ya que en el estado de cristal líquido, dada la mayor fluidez de las bicapas, podría incorporarse más fácilmente el péptido. Una posible explicación a este comportamiento es que que los péptidos interaccionen preferiblemente con *defectos de membrana* que se forman en el estado de gel. A cualquier temperatura superior al cero absoluto, un sólido presenta *defectos*, constituidos por zonas de separación entre cristales o gránulos con distinta orientación; si la diferencia de orientación es considerable (superior a 15 o 20°), la zona de separación presenta espacios vacíos o "agujeros". Puede ocurrir que estos espacios vacíos se agregen formando espacios mayores en cuyos alrededores las moléculas tienden a colapsarse, formando volúmenes de desorden dentro de la estructura ordenada del sólido. En las proximidades de estos defectos, cuyo número se incrementa con la temperatura, la transición al estado líquido tendrá lugar más fácilmente, y por tanto a menor temperatura que en el material ordenado. Este mismo modelo es aplicable a la transición de gel a cristal líquido en los liposomas (Lee, 1977), justificándose así el hecho de que el proceso de transición de fase tenga lugar en un intervalo definido de temperaturas.

En el estado de gel, los *agujeros* y desorganizaciones que tienen lugar en una estructura regular y ordenada constituyen lo que algunos autores denominan *defect sites*, que no son otra cosa que zonas favorables para la difusión de pequeñas moléculas. En estas zonas, las moléculas lipídicas se encuentran en conformación *gauche*, y son isoenergéticas, siendo su energía inferior a la correspondiente a otras las moléculas lipídicas que las rodean. Los péptidos, al interaccionar con la bicapa, podrían crear nuevos defectos, o bien cambiar el número o la energía de las moléculas isoenergéticas que los constituyen (Jain et al, 1985), siendo esta interacción muy favorable energéticamente. Jain et al (1982) se apoyaron en esta hipótesis para explicar la interacción de la fosfolipasa A_2 con liposomas. Más recientemente, Yagi et al (1990) también justifican la interacción de análogos de la Gramicidina S (GS) con liposomas basándose en la separación de fases en la membrana lipídica: las zonas intermedias entre los dominios de lípido puro y los dominios ricos en el análogo GS presentaban *defectos* que favorecerían la interacción y la permeabilidad de los liposomas.

Por otra parte, al igual que ocurre con los liposomas en estado de gel, el TFE, solvente que mimetiza el entorno lipídico (Sargent et al., 1988), también hace que λ_{em} de la somatostatina se desplace a valores inferiores respecto al valor que presenta en tampón acetato (fig. 26). Sin embargo, en presencia de liposomas la intensidad de fluorescencia aumenta ($F/F_0 = 1.16$ para DPPC/SRIF=175:1). La disminución de fluorescencia que se observa en TFE puede ser debida a dos factores:

- el efecto *electron scavenger* propio del TFE, que causaría un descenso en la fluorescencia mayor en magnitud que el aumento de la misma causado por la estructuración del péptido, o bien

- SRIF adopta una conformación diferente en TFE que en presencia de liposomas, si bien en ambos casos se produce una penetración del triptófano en un medio más apolar.

En lo que se refiere a la influencia de SRIF en las propiedades de fluidez de los liposomas, las curvas de polarización de fluorescencia de liposomas DPPC-SUV marcados con DPH muestran que la interacción de SRIF modifica la transición de fase de la DPPC, que se incrementa 1°C. Al penetrar en la zona apolar del liposoma, la hormona tiene un efecto rigidificante para los liposomas a temperaturas superiores a los 38 °C, es decir alrededor de la transición de fase y en estado de cristal líquido ($T > T_c$), mientras que no modifica la fluidez de la bicapa en estado de gel (fig. 38). Sin embargo, no se produce ninguna alteración en el empaquetamiento de las moléculas de fosfolípido a nivel de la superficie polar del liposoma, ya que las curvas de polarización de los mismos marcados con ANS se superponen a las obtenidas en presencia de péptido (fig. 37). Estos resultados se interpretan como la inducción por la hormona de una separación de fases en los liposomas de DPPC en estado de cristal líquido, de manera que las moléculas de fosfolípido situadas alrededor de la hormona insertada en la bicapa presentarían una movilidad restringida, mientras que en el estado de gel, en el que las moléculas de fosfolípido ya se encuentran estrechamente empaquetadas, la SRIF no altera el estado de ordenación.

Puede parecer contradictorio el hecho de que SRIF sea capaz de rigidificar la bicapa de DPPC por encima de la T_c y sin embargo no se modifique la fluorescencia de la hormona; sin embargo, los estudios publicados por Lee (1977) sobre los defectos de membrana permiten encontrar una explicación lógica. Este autor llegó a la conclusión de que si bien en

el estado de gel los defectos de membrana son lugares favorables para la interacción con moléculas pequeñas, como es el caso de la somatostatina, en la fase de cristal-líquido el concepto de estructura ordenada carece de sentido, y por tanto no se puede hablar de "agujeros" ni defectos. Los lípidos por encima de la T_c están menos rígidamente empaquetados que en la de fase de gel (por debajo de la T_c), pero las regiones desordenadas que proveían en esta última una ruta favorable a la difusión han desaparecido.

Según estas afirmaciones, posiblemente SRIF no sea capaz de penetrar en la bicapa lipídica cuando ésta se encuentra desde un principio en estado de cristal líquido ($T > T_c$), como es el caso de los estudios de fluorescencia efectuados a 50 °C, ya que la barrera energética para la unión de cualquier molécula a la membrana es superior para la fase de cristal líquido (New et al, 1990c). Por el contrario, en los estudios de polarización, se parte de liposomas en estado de gel ($T < T_c$), donde la hormona sí se incorpora en el liposoma, estableciéndose unas interacciones con las cadenas de fosfolípido que hacen energéticamente desfavorable la salida de la hormona al exterior incluso al incrementar la temperatura por encima de la T_c .

La espectroscopía de dicroísmo circular proporciona información complementaria sobre la conformación adoptada por la hormona. Como se observa en la figura 46, el espectro de dicroísmo circular de SRIF en solución acuosa se corresponde a una estructura predominantemente de giro β (40.15%), lo que coincide la predicción de estructura secundaria según el método de Chou-Fasman descrito anteriormente, y estructura desordenada (47.36%). Al interaccionar con liposomas de DPPC ($T < T_c$) a la relación molar DPPC/SRIF=30:1, la estructura no sufre alteraciones importantes, únicamente hay que destacar un ligero incremento en la estructura de hoja β .

En TFE se produce una importante reestructuración de la somatostatina, incrementándose la proporción de hoja β hasta un 45.5% del total. Krstenansky et al (1989) observaron este mismo tipo de estructura en el péptido Suc-MAP_{3,11}-amida (SucKLLEKLLK); este péptido también tenía un elevado contenido en estructura β , estructura que resultaba potenciada por la presencia de lípido y de TFE. Según estos autores, este comportamiento es indicativo de una conformación de carácter anfipático.

Teniendo en cuenta estos resultados, un posible modelo de interacción consistiría en la

penetración de SRIF en la bicapa lipídica de los liposomas de DPPC en estado de gel ($T < T_c$) mediante interacciones de naturaleza hidrofóbica. El dominio de carácter más apolar de la hormona, es decir el formado por los residuos que constituyen la estructura en hoja β (incluyendo Trp), se insertaría entre las cadenas hidrocarbonadas de ácidos grasos sin modificar su empaquetamiento, es decir sin alterar la fluidez de la bicapa. Esto podría explicarse teniendo en cuenta que, en el estado de gel, la cabeza polar de una molécula de fosfolípido ocupa un área de $42 \text{ \AA}^2$, e incluso mayor en función del fosfolípido, mientras que las dos cadenas de ácido graso ocupan un área menor (unos $39 \text{ \AA}^2$) (Nam et al, 1989; New et al., 1990). SRIF es un péptido pequeño y cíclico, y presenta una estructura secundaria en hoja β antiparalela que le permitiría insertarse entre las cadenas de ácidos grasos de dos moléculas adyacentes de fosfolípido sin alterar de modo detectable su estado de ordenación. Sin embargo, al incrementar la temperatura e ir adquiriendo los lípidos la conformación *gauche*, las moléculas de SRIF insertadas impedirían o dificultarían el incremento de área de las cadenas de ácidos grasos, reduciendo su movilidad respecto a la de los liposomas puros, y por tanto incrementando la rigidez. El pequeño dominio hidrófilo presente en la hormona podría situarse entre las cabezas polares de fosfolípido sin alterar su estado de ordenación.

Por otra parte, como se deduce de la observación de los espectros de CD, al interaccionar con liposomas, se producen cambios poco importantes en la estructura de la somatostatina; no obstante, en muchos casos la transferencia de segmentos proteicos del agua a un medio más apolar da lugar a una drástica reorganización de los puentes de hidrógeno, ya que se reemplazan los existentes entre el agua del medio y las cadenas laterales de los aminoácidos por puentes de hidrógeno intramoleculares, dando lugar a estructuras altamente ordenadas. Un ejemplo típico es la melitina, que al interaccionar con liposomas pasa de una estructura desordenada a una estructura en hélice α (Weaver et al., 1992). Para SRIF y otros péptidos cíclicos pequeños, como su análogo SMS 201-995 (Beschiaschvili y Seelig, 1992), los escasos cambios conformacionales que tienen lugar sugieren mecanismos alternativos para satisfacer los requerimientos energéticos. Probablemente, los puentes de hidrógeno con el agua son reemplazados por otros con el agua de hidratación de las cabezas polares de los fosfolípidos.

Este modelo de interacción explica también que la somatostatina no provoque la liberación de CF encapsulada en liposomas de DPPC. Únicamente incrementando la proporción molar

DPPC/SRIF hasta 1:1 se produce una liberación del 25 % (fig. 51). Proporciones tan elevadas de péptido podrían crear una separación de fases entre un dominio lipídico conteniendo una elevada proporción de péptido, y un dominio de lípido puro. La zona de transición entre los dos dominios actuaría como un canal para la CF encapsulada. Similares resultados fueron observados para un grupo de promotores tumorales (TPA, teleocidina) al interaccionar con liposomas de DPPC en estado de gel (Nam et al, 1989). En liposomas que contienen un 50% de colesterol (figura 50), la liberación de CF es mayor cuando la fosfatidilcolina empleada está saturada (en estado sólido a temperatura ambiente) que cuando es insaturada (en estado fluido a temperatura ambiente), lo que es debido al efecto del colesterol (rigidificante por encima de la T_c , fluidificante por debajo de esta temperatura). No pudieron extraerse conclusiones sobre la influencia de la carga eléctrica de los liposomas, lo que refuerza la teoría de una interacción de carácter predominantemente hidrófobo.

Por último, los estudios de interacción de SRIF con monocapas lipídicas permiten perfilar este modelo de interacción. En primer lugar, se observa que las monocapas mixtas de somatostatina y DPPC a diferentes proporciones molares presentan un comportamiento ideal, lo cual puede indicar o bien una mezcla ideal de los dos componentes o bien una total separación de fases. Los valores de energía libre de la mezcla en exceso (ΔG_M^E) a 10 mN.m^{-1} resultan negativos para la proporción molar DPPC/SRIF 0.75:0.25 (tabla 15), apuntando a una mezcla más estable que los componentes puros, y positivos en las demás proporciones molares ensayadas. Sin embargo, en todos los casos los valores absolutos de estas energías son menores que RT (cuyo valor es de $591.3 \text{ cal.mol}^{-1}$ a 25°C), por lo que las desviaciones de la idealidad no pueden considerarse significativas.

En segundo lugar, SRIF en concentración submicromolar ($0.155 \mu\text{M}$) en subfase de tampón acetato ($\text{pH}=7.4$) presenta muy poca actividad superficial, disminuyendo la tensión de la interfase agua/aire tan sólo 1.92 mN.m^{-1} (exceso superficial $0.421 \cdot 10^{-11} \text{ mol.cm}^{-2}$). Como referencia, la presión correspondiente a los péptidos HIV_{A1a} y HIV_{A1b} (fragmentos peptídicos de la glicoproteína de membrana gp41 del virus de la inmunodeficiencia humana), es de 23 y 25 mN.m^{-1} respectivamente (Rafalski et al., 1990). Las cinéticas de penetración de SRIF en monocapas de diferentes composiciones lipídicas extendidas en subfase de tampón acetato ($\text{pH}=7.4$), corroboran la naturaleza hidrófoba de la interacción entre la somatostatina y los

fosfolípidos, ya que los incrementos de presión superficial ($\Delta\pi$) son similares para monocapas con fosfolípidos cargados positivamente (SM) o negativamente (PS, PI) (figura 52). A pesar de que los valores de $\Delta\pi$ a los 30 minutos no muestran diferencias significativas entre las diferentes monocapas, las curvas de penetración sí resultan diferentes desde el punto de vista cualitativo. Con el fin de obtener mayor información sobre la interacción entre SRIF y las diferentes monocapas, hemos asumido que $\Delta\pi$ es función de la cantidad de hormona que se encuentra ligada durante el proceso de penetración, y que los incrementos de presión pueden ajustarse a un análisis de Lineweaver-Burk (Alsina et al., 1992). Partiendo de esta base, se aplicaron dos expresiones matemáticas que describen el proceso de penetración en función de los incrementos de presión:

$$\frac{1}{\pi} = \frac{K}{\pi_m} \cdot \frac{1}{t} + \frac{1}{\pi_m} \quad /1/$$

$$\ln \pi = \ln a + b.t \quad /2/$$

donde π es la presión superficial en mN.m^{-1} , t el tiempo en minutos y π_m la presión máxima alcanzada en la saturación. Otro parámetro importante es el tiempo transcurrido hasta que se alcanza la mitad de la presión de saturación ($t_{1/2}$).

Los valores experimentales se ajustaron satisfactoriamente a ambas ecuaciones, sin embargo los coeficientes de regresión fueron en conjunto mejores para la /1/. En la figura 88 se muestran las gráficas correspondientes a la transformación lineal del proceso de penetración; los valores de π_m y $t_{1/2}$ se muestran en la tabla 33. En general, la penetración es más lenta en monocapas de fosfolípidos ceutros saturados (HPC), con tiempos medios de saturación más elevados que con PC insaturada. Sin embargo, en el caso de las monocapas con SM ocurre lo contrario, siendo además el único caso en que se observan diferencias importantes en la presión máxima.

Composición	π_m (mN.m ⁻¹)	$t_{1/2}$ (min)
HPC	7.65	25.45
PC	5.52	3.44
HPC/COL	4.92	7.66
PC/COL	5.14	2.52
HPC/COL/SM	10.33	13.63
PC/COL/SM	21.58	21.53
HPC/COL/PS	9.79	21.00
PC/COL/PS	8.14	12.41
HPC/COL/PI	6.48	1.46
PC/COL/PI	7.52	4.40
HPC/COL/G	10.11	12.68
PC/COL/G	7.91	1.56

Tabla 33: Presiones máximas alcanzadas y tiempos medios de saturación aplicando la ecuación /1/ a la penetración de SRIF en monocapas lipídicas de diferentes composiciones.

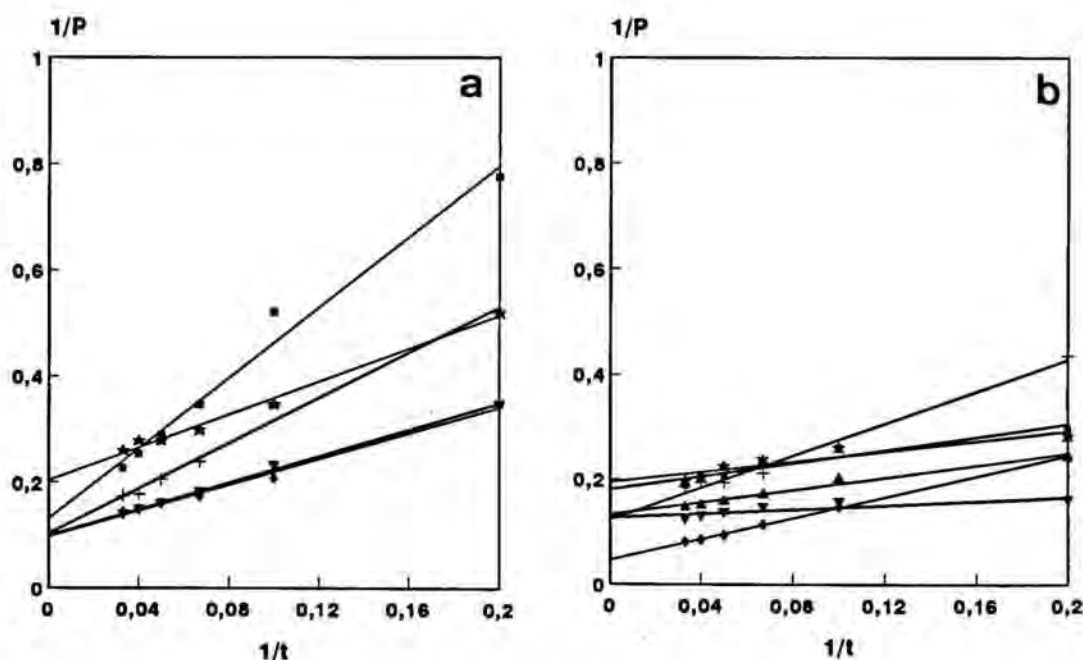


Figura 88: Linealización de los incrementos de presión superficial en función del tiempo calculados mediante la expresión /1/ para la penetración de SRIF en monocapas lipídicas de diferentes composiciones. ■ PC, ★ PC/COL ◆ PC/COL/SM, + PC/COL/PS, ▼ PC/COL/G, ▲ PC/COL/PI. a) lecitina hidrogenada (saturada); b) lecitina de huevo (insaturada). $1/P$ m.mN⁻¹; $1/t$ min⁻¹

2. INTERACCION DE LHRH CON MODELOS DE MEMBRANA

La LHRH es un péptido pequeño y altamente flexible que presenta una considerable libertad conformacional (Geiger et al., 1990). La secuencia de aminoácidos es <EHWSYGLRPG-NH₂. Hasta el momento, se han llevado a cabo diversos estudios conformacionales (Marché et al., 1976; Paul et al., 1989) que demuestran la existencia de un giro β en torno al residuo Gly⁶ (figura 89); esta conformación se asume como la biológicamente activa de la hormona, es decir la que es capaz de unirse al receptor y desencadenar la respuesta biológica. Por otra parte, la alternancia de residuos hidrófobos e hidrófilos en la secuencia primaria posibilita la formación de una estructura secundaria en hoja β anfipática. Péptidos de este tipo tienen tendencia a formar estructuras estables de tipo hoja β en solución acuosa, mediante la interacción de las caras hidrófobas (Kaiser, 1987).

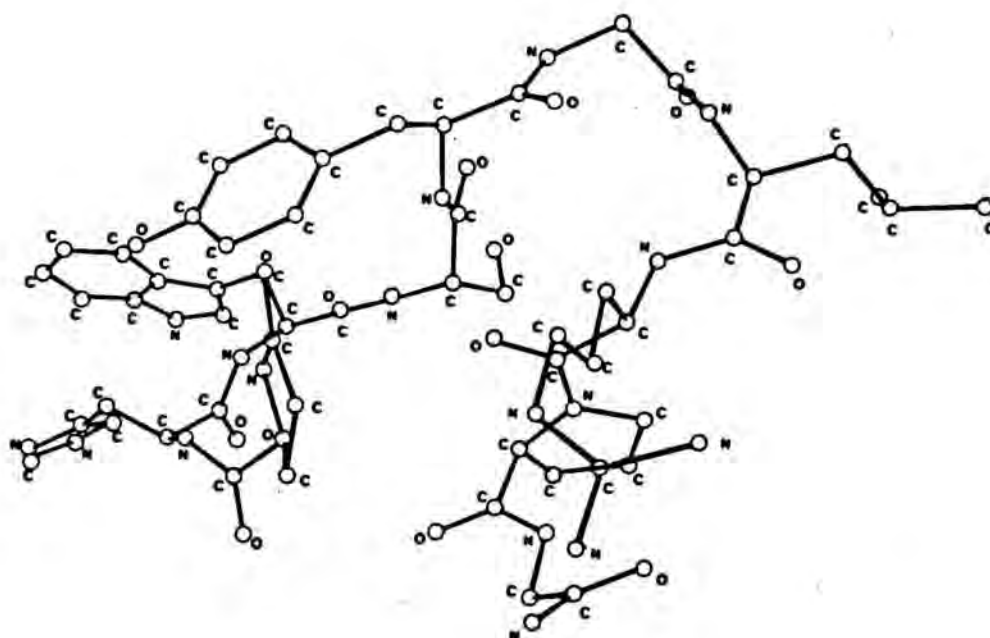


Figura 89: Conformación de mínima energía de LHRH, considerada como la biológicamente activa (Geiger y König, 1990)

Los valores de $\langle Ph \rangle$ y $\langle Ps \rangle$ calculados según el algoritmo de Chou-Fasman (1978), son de 0.83 y 1.00 respectivamente, lo que significa mayor probabilidad de estructura en hoja β .

Una primera aproximación al conocimiento del tipo de interacción que tiene lugar entre esta

hormona y liposomas, se obtiene de la interpretación de los resultados obtenidos en el estudio de la variación de la fluorescencia intrínseca de la primera. En primer lugar, es importante destacar que la hormona en solución acuosa no se encuentra en forma de monómero. Según Mutter y Hesperger (1990), un péptido con estructura secundaria de tipo hoja β anfipática, en solución acuosa tiene tendencia a formar bloques o estructuras en bicapa en las cuales dos moléculas con estructura β se unen generando una estructura de menor energía, con un interior hidrófobo y una superficie externa hidrófila. La LHRH presenta las características conformacionales necesarias para experimentar este fenómeno. Como consecuencia de esta agregación, los residuos de triptófano de las dos moléculas que forman el dímero se encuentran muy próximas, y como resultado de esta interacción Trp-Trp se produce un apantallamiento o *quenching* de la fluorescencia. Por este motivo, la fluorescencia del péptido en solución (F_0) disminuye con el tiempo hasta un 30%. Killian et al (1990), en un estudio de interacción de liposomas con el péptido de 21 aa PhoE, perteneciente a *Escherichia coli*, también encontraron un descenso en la intensidad de fluorescencia del péptido en solución hasta un 40% del valor inicial a los 10 minutos; según estos autores, la causa era también el *quenching* debido a las interacciones intermoleculares Trp-Trp.

Por otra parte, LHRH interacciona con los liposomas de DPPC en estado de gel (20°C), ya que el máximo de emisión de fluorescencia se desplaza hacia valores inferiores de longitud de onda, disminuyendo un máximo de 3 nm para la relación molar DPPC/LHRH=500:1 (fig. 27). Este desplazamiento indica que el entorno del triptófano es ligeramente más apolar.

Puesto que los valores de absorbancia A_{280} y A_{340} de las soluciones de LHRH con liposomas en estado de gel son significativamente superiores a los del blanco de liposomas de igual concentración, y también que los de la solución de péptido puro, puede afirmarse que LHRH causa la agregación de los liposomas. Probablemente, en presencia de liposomas, las estructuras de tipo bicapa formadas por dos moléculas de LHRH agregadas forman extensas láminas que cubren parcialmente los liposomas, favoreciendo la agregación.

Los espectros de CD son consistentes con este modelo de interacción. LHRH en solución acuosa presenta un espectro de dicroísmo circular consistente con una estructura secundaria mayoritariamente de tipo β (30% hoja β y 18% giro β) y aperiódica. Esta estructura no varia

en presencia de liposomas DPPC-SUV para la relación molar ensayada (DPPC/LHRH=30:1), como puede apreciarse en la figura 47.

Información adicional de la interacción entre LHRH y lípidos puede obtenerse a partir de los cambios conformacionales que se producen en la hormona en solución de TFE. Añadiendo TFE a soluciones de LHRH en tampón acetato (pH=7.4), se produce un descenso del 29% en la intensidad de fluorescencia, así como un desplazamiento de λ_{em} a valores más cortos, hasta 19 nm en 100% TFE (fig. 30). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Marché et al (1976), que comprobaron que para mezclas de N-acetil-tirosinamida + N-acetil-triptofanamida la disminución de la fluorescencia en TFE era mucho mayor que para LHRH (80% frente a 40%), mientras que no variaba λ_{em} . Según estos autores, para la mezcla de aminoácidos, la disminución de fluorescencia era debida al efecto de apantallamiento causado por las propiedades de *electron scavenger* del TFE, mientras que en el caso de la LHRH se superponían dos fenómenos: el ya comentado de apantallamiento y un efecto opuesto de incremento de la fluorescencia producido al transferirse el triptófano a un entorno más apolar (Cowgill, 1967). El comportamiento de LHRH en TFE no es comparable al observado en liposomas de DPPC, ya que en TFE se produce un desplazamiento de λ_{em} mucho más importante (19 nm frente a 2.7 nm). Esto puede explicarse admitiendo que la estructuración de LHRH se produce al ir pasando de agua a TFE (Marché, 1976), sin embargo en este caso el modelo del TFE como entorno hidrófobo no puede equipararse al de los liposomas, ya que LHRH causa la agregación de los mismos.

En apoyo de lo expuesto hasta ahora, está el espectro de dicroísmo circular de LHRH en TFE, indicativo de una mayor estructuración de la hormona, y se corresponde a una conformación predominantemente β , con elevada proporción de giro β (fig. 47). Al comparar estos resultados con los de fluorescencia, se corrobora que la estructuración de la hormona tiene lugar al pasar de agua a TFE, y que el residuo de Trp interviene en esta reorganización, pasando a un entorno más apolar. No se observa, en cambio, agregación de LHRH en solución de trifluoroetanol.

La interacción de LHRH con liposomas DPPC-SUV en estado de cristal líquido (50°C) resulta totalmente diferente. En primer lugar, se observa que a esta temperatura la hormona en solución acuosa (tampón acetato pH 7.4) no se agrega, ya que la fluorescencia (F_0) se mantiene constante a lo largo del experimento. En consecuencia, puede afirmarse que LHRH no forma las estructuras de tipo bicapa por asociación de dos moléculas con estructura de hoja β anfipática. Posiblemente, a esta temperatura, la molécula de LHRH, que es altamente flexible, se encuentra en forma de monómero, estabilizada mediante la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares gracias a la existencia del giro β alrededor del residuo Gly⁶. El hecho de que λ_{em} se mantenga en 355.6 nm confirma la existencia de una estructura definida en la hormona, ya que el máximo correspondiente a la N-acetiltriptofanamida en estas condiciones es 360 nm.

En segundo lugar, al incubar la LHRH con liposomas DPPC-SUV en estado de cristal líquido, la longitud de onda del máximo de emisión se desplaza a valores más altos (*red shift*), pasando de 355 nm a 360 nm, que es la longitud de onda correspondiente al máximo de emisión de N-acetil-triptofanamida, mientras que la fluorescencia relativa del péptido (F/F_0) disminuye (figura 27). Estos resultados son indicativos de la transferencia del triptófano de un entorno relativamente hidrófobo, como es la estructura en hoja β antiparalela creada por el giro β , a un entorno más polar, como el constituido por las cabezas polares de la DPPC. Esta transferencia conlleva una reorganización de los puentes de hidrógeno. Probablemente, los puentes de hidrógeno constituyentes de la hoja β son reemplazados por otros con el agua de hidratación de las cabezas polares de los fosfolípidos. Esta hipótesis se apoya en los estudios ya clásicos de fluorescencia de Cowgill (1964), según los cuales los enlaces peptídicos producen un apantallamiento de la fluorescencia intrínseca de un péptido siempre y cuando se encuentren en contacto con un disolvente formador de puentes de hidrógeno, como el agua. La disminución de la fluorescencia en la LHRH en presencia de DPPC-SUV podría pues ser debida a una reorganización de los puentes de hidrógeno, de manera que los intracatenarios que estabilizaban la estructura de hoja β anfipática sean sustituidos por otros con el agua de hidratación de las cabezas polares de fosfolípido, lo que explicaría la disminución de la intensidad de fluorescencia y el desplazamiento de λ_{em} , ya que el Trp no formaría parte en este caso del interior hidrófobo determinado por el giro β , sino que estaría en contacto con el agua de hidratación.

En tercer y último lugar, a 50 °C LHRH no induce la agregación de los liposomas, como se deduce de los valores de absorbancia a 280 y 340 nm, que se mantuvieron en el mismo orden que en el blanco de liposomas a lo largo de todo el estudio.

Por otra parte, la interacción de LHRH con liposomas DPPC-SUV que se acaba de describir, transcurre sin penetrar en la bicapa lipídica, como se deduce de los experimentos de polarización de DPH en los que no se altera el grado de ordenación a nivel de las cadenas apolares de ácido graso, ni tampoco se modifica la T_c ni la amplitud del proceso de transición (fig. 39). Tampoco varía la ordenación de las cabezas polares de fosfolípido, a juzgar por los resultados de los estudios llevados a cabo con liposomas previamente marcados en la superficie polar con ANS (fig. 40).

Podría establecerse un paralelismo entre este tipo de interacción y la de la espectrina con liposomas de PE y PE/PC, en los que la fluorescencia intrínseca de la proteína disminuye hasta un 48% a pH 7.7 (Sikorski et al., 1987). Este efecto era atribuido a cambios conformacionales en ciertos segmentos de la espectrina inducidos por la unión a las bicapas lipídicas. Del mismo modo, el poli(γ -bencil-L-glutamato)_n de $n < 20$ no modifica la polarización del DPH ni del ANS en liposomas de DMPC a ninguna temperatura (Tamura et al., 1988).

En concordancia con estos resultados, LHRH no perturba la estructura de la membrana liposómica, ya que no induce la liberación de CF encapsulada en liposomas de DPPC o DPPC/COL (1:1), como se observa en la figura 51. Este comportamiento permite corroborar el modelo de interacción propuesto, demostrando que no existe penetración de hormona en la bicapa incluso a elevadas proporciones molares (DPPC/LHRH 1:1). Es decir que LHRH no causa una separación de fases en los liposomas.

La incorporación en la composición lipídica de los liposomas de otros fosfolípidos: SM, PS, PI, G, tampoco tiene una influencia significativa en la permeabilidad, lo que indica que la interacción no es de carácter electrostático, puesto que la presencia de fosfolípidos con carga eléctrica positiva o negativa no ejerce efecto alguno en la interacción. Tampoco se observa

diferencia alguna entre liposomas conteniendo PC (lecitina de huevo) o HPC (hidrogenada) (figura 50).

Los resultados de interacción de LHRH con monocapas lipídicas como modelo de membrana, se encuentran en la misma línea que los de interacción con liposomas que se acaban de exponer. Así por ejemplo, las monocapas mixtas de LHRH y DPPC presentan un comportamiento ideal (fig. 58), como se deduce del valor de ΔG_M^E (tabla 17).

Por otra parte, la actividad superficial de LHRH ($0.155 \mu M$) extendida sobre subfase de tampón acetato (pH 7.4) es muy baja, inferior incluso a la de SRIF: $0.62 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (exceso superficial $0.136 \cdot 10^{-11} \text{ mol}\cdot\text{cm}^{-2}$), y la capacidad de penetración en monocapas resulta también muy reducida. En general, la penetración a $\pi_i = 5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ es algo mayor en monocapas con PC de huevo (insaturada) (fig. 52). No se observa ninguna influencia de la carga eléctrica de los fosfolípidos ni las diferentes cabezas polares de los mismos, lo que corrobora la hipótesis de una interacción de carácter no electrostático.

Las cinéticas de penetración se linealizaron aplicando el modelo de Lineweaver-Burck (Alsina et al, 1992), según la ecuación:

$$\frac{1}{\pi} = \frac{K}{\pi_m} \cdot \frac{1}{t} + \frac{1}{\pi_m} \quad /1/$$

Las rectas resultantes se muestran en la figura 90. Los valores de presión máxima (π_m) y tiempo medio de saturación ($t_{1/2}$) se resumen en la tabla 34.

Al igual que ocurre con SRIF, la penetración de LHRH en monocapas es más lenta cuando el fosfolípido es HPC que cuando es PC, con tiempos medios de saturación más elevados en el primer caso. Sin embargo, las presiones de saturación no difieren sustancialmente.

Composición	π_m (mN.m ⁻¹)	$t_{1/2}$ (min)
HPC	4.74	46.70
PC	4.65	4.97
HPC/COL	5.27	13.73
PC/COL	3.10	5.32
HPC/COL/SM	5.46	24.03
PC/COL/SM	6.11	7.11
HPC/COL/PS	3.71	6.82
PC/COL/PS	5.32	2.32
HPC/COL/PI	4.57	34.61
PC/COL/PI	7.97	17.35
HPC/COL/G	9.91	45.87
PC/COL/G	4.97	13.03

Tabla 34: Presiones máximas alcanzadas y tiempos medios de saturación aplicando la ecuación /1/ a la penetración de LHRH en monocapas lipídicas de diferentes composiciones. ($\pi_i=5$ mN.m⁻¹)

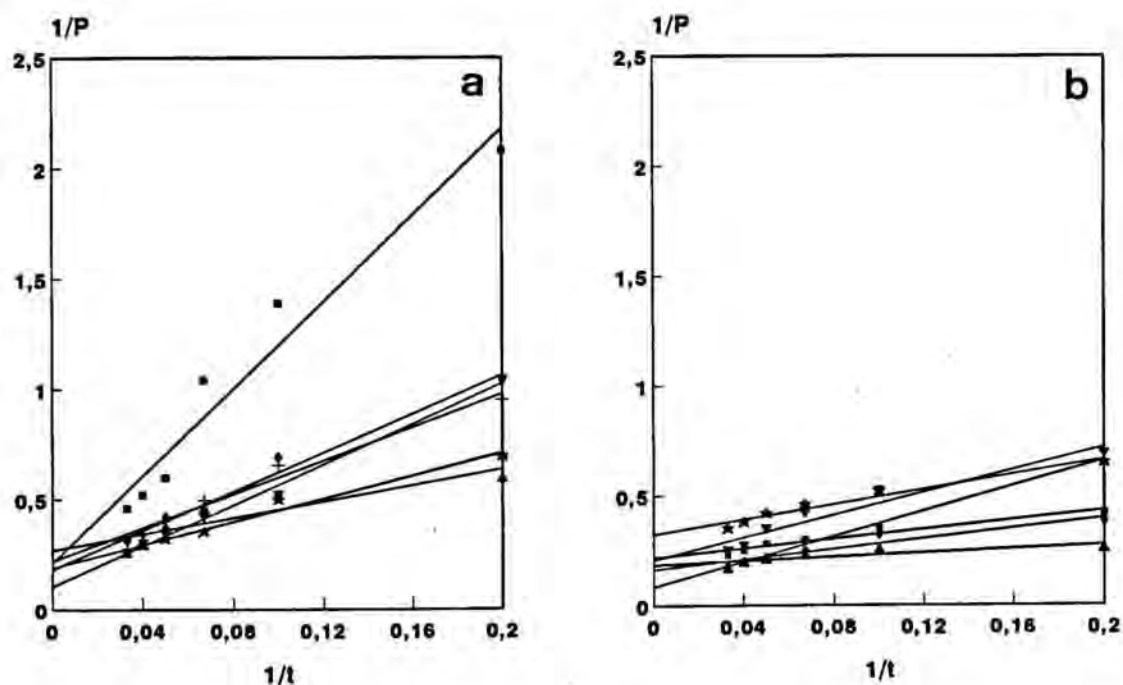


Figura 90: Linealización de los incrementos de presión superficial en función del tiempo calculados mediante la expresión /1/ para la penetración de LHRH en monocapas lipídicas de diferentes composiciones. ■ PC, ★ PC/COL, ◆ PC/COL/SM, + PC/COL/PS, ▼ PC/COL/G, ▲ PC/COL/PI. a) lecitina hidrogenada (saturada); b) lecitina de huevo (insaturada). $1/P$ m.mN⁻¹; $1/t$ min⁻¹

3. INTERACCION DE GHRH(1-29) CON MODELOS DE MEMBRANA

La predicción de estructura secundaria de GHRH(1-29) según el algoritmo de Chou-Fasman (1978) muestra una elevada proporción de hélice α :

YADAIFTNSYRKVLGQLSARKLLQDIMSR-NH₂
 hhhhhhhttttssssshhhhhhhhhrrr

Siendo (h) hélice α ; (s) estructura β ; (t) giro β y (r) estructura aperiódica.

Por otra parte, según el método de predicción de anfipaticidad de De Lisi-Berzofsky (1985), la hormona presenta una elevada tendencia a formar estructuras de carácter anfipático, con un valor de escala de anfipaticidad A.S. = 20.69 entre los residuos 8 a 16 y A. S. = 13.01 para el fragmento comprendido entre los aminoácidos 22-26; hay que tener en cuenta que valores de A.S. superiores a 10 se consideran significativos.

GHRH(1-29) es un fragmento biológicamente activo de la hormona GHRH(1-44) que no presenta estructura definida, sino que su conformación depende del entorno (Kaiser y Kézdy, 1984; Petersen, 1989). En un entorno anfipático, como la membrana celular, los liposomas o las monocapas lipídicas, GHRH(1-29) tiende a adoptar una estructura de hélice anfipática, ya sea hélice π (la cara hidrófoba se dispone en línea recta a lo largo del eje de la hélice), o bien hélice α (la cara hidrófoba gira entorno al eje) (Kaiser y Kézdy, 1984; Veliçelebi et al., 1986).

De los estudios de fluorescencia de la hormona en presencia de liposomas DPPC-SUV pueden extraerse conclusiones sobre el tipo de interacción que tiene lugar, ya que la intensidad de fluorescencia de la tirosina es sensible a la polaridad del entorno; sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con Trp, la posición del máximo de emisión no resulta afectada (Dufourq et al., 1981). Por este motivo, al interaccionar con liposomas en estado de gel (20°C), no se aprecia variación en el valor de λ_{em} del espectro de GHRH(1-29), pero en cambio si se observa un incremento de la intensidad de fluorescencia de hasta 2.5 veces el valor de la misma en ausencia de liposomas (figura 33). La curva de intensidad relativa respecto a la proporción de lípido (DPPC) se satura para relaciones molares DPPC/GHRH(1-29) por

encima de 158:1, indicando una elevada afinidad de la hormona por los liposomas de DPPC en estado de gel.

Al igual que ocurría con SRIF, la interacción con liposomas DPPC-SUV en estado de cristal-líquido es prácticamente inexistente desde el punto de vista de cambios en la fluorescencia del péptido (fig. 33).

Un estudio muy similar es el realizado por Gavilanes et al (1985), que determinaron la interacción de la histona H1 con liposomas DPPC-SUV a una temperatura inferior a la de transición, monitorizando la fluorescencia de la tirosina. Estos autores obtuvieron resultados en el mismo sentido que los que acabamos de comentar para GHRH(1-29) (incremento de 2.5 veces en la intensidad de fluorescencia sin variación de λ_{em}). Estos resultados están de acuerdo con la transferencia de la tirosina a un entorno más hidrófobo en estas condiciones; según esto, GHRH(1-29) se intercalaría de alguna manera en la zona apolar o interna de la bicapa lipídica.

En soluciones conteniendo diferentes proporciones de TFE, el comportamiento de GHRH(1-29) es similar al que presenta al interaccionar con liposomas, produciéndose un incremento en la intensidad de fluorescencia de manera que en soluciones al 97% de TFE alcanza una magnitud similar a la correspondiente en presencia de liposomas una vez alcanzada la saturación (fig. 34). Estos datos indican que la conformación adoptada por la hormona es la misma en los dos casos. Para conocer cual es esta estructura, se dispone de los resultados de dicroísmo circular.

Los estudios de dicroísmo circular muestran un incremento de la elipticidad del espectro a 222 nm ($[\Theta]_{222}$) al añadir liposomas DPPC-SUV, lo que representa una mayor contribución de hélice α . En TFE, disolvente que mimetiza el entorno hidrófobo de la membrana lipídica, el espectro de CD era el característico de una estructura helicoidal, con $[\Theta]_{222}$ mayor que con liposomas (fig. 48). Estos datos indican que la hormona unida al liposoma presenta estructura helicoidal, al igual que ocurre con la melitina (Pendergast, 1982).

Por otra parte, a partir de los estudios de despolarización de liposomas marcados con DPH,

se observa que GHRH(1-29) modifica el comportamiento de transición de fase de la DPPC. La T_c , que en los liposomas es de 41°C , aumenta algo más de 2°C para el complejo DPPC/GHRH(1-29). Además, como se representa en la figura 44, la hormona induce una reducción en la amplitud del proceso de transición, comportamiento que también se daba en la interacción de la histona H1 con DPPC (Gavilanes et al, 1985), así como de la α -sarcina con DMPG (Gasset et al, 1989). También Houbre et al (1990), empleando la técnica de polarización del DPH, observaron que al interaccionar el proteolípidos de la mielina PLP con liposomas de PS/DPPC se producía un incremento de la T_c y un estrechamiento en la transición, hechos que estos autores atribuyeron a una separación de fases en la bicapa, de manera que el lípido de menor T_c , (la PS), quedaba inmovilizado en la zona de separación, y por tanto la T_c quedaba dominada por el lípido de T_c más elevada, la DPPC, cuya orientación no resultaría modificada por la presencia de PLP.

Teniendo en cuenta estos estudios anteriores, se puede concluir que GHRH(1-29) penetra en la bicapa lipídica en estado de gel, de manera que las moléculas de fosfolípido que se disponen alrededor del péptido presentan movilidad restringida (la polarización de los liposomas marcados con DPH aumenta en presencia de la hormona).

Como resultado de esta interacción, GHRH(1-29) también ejerce un efecto de disminución de la fluidez del liposoma a nivel de la superficie polar, tal como se deduce de los experimentos de despolarización de liposomas marcados con ANS (fig. 43); sin embargo, este efecto únicamente es significativo para temperaturas inferiores a la de transición, mientras que en el caso de los liposomas en estado de cristal líquido, la presencia de la hormona no modifica las propiedades de fluidez del liposoma en esta zona.

Las perturbaciones en la estructura de la membrana inducidas por la unión de GHRH(1-29) se examinaron determinando la liberación de CF encapsulada en liposomas de diferentes composiciones lipídicas. Si aceptamos que como consecuencia de la interacción péptido-lípido se forman en la membrana dominios de lípido puro y dominios ricos en péptido en los cuales las moléculas lipídicas están más estrechamente empaquetadas, las zonas de separación entre ambos dominios constituirán lugares de mayor permeabilidad de la membrana. Jain et al (1982) llamaron a estos defectos de membrana *cracks*. Esta teoría, que ya ha sido detallada

en el apartado correspondiente a la somatostatina, ha sido defendida por otros autores para explicar la interacción de diversos péptidos con liposomas (Yagui et al., 1990; Nam et al., 1989). Sin embargo, en el caso de péptidos con una elevada tendencia a formar hélices anfipáticas, como es el caso de GHRH(1-29), como resultado de la interacción también puede romperse la estructura del liposoma y formarse otro tipo de estructuras lipídicas, denominadas micelas mixtas, como se explicará más adelante. En liposomas de DPPC y DPPC/COL (1:1), la liberación de CF se produce de manera muy rápida (fig. 51), lo cual indica una rápida solubilización o lisis de las vesículas.

En el caso de liposomas con un 10% de fosfolípidos distintos de la PC (PS, PI, SM ó G), la liberación de CF es importante en todos ellos (fig. 50), sin embargo no pueden extraerse consecuencias en cuanto a la influencia de la estructura o la carga del liposoma. Si bien la liberación es máxima para liposomas con PS, este comportamiento no puede asociarse a la carga negativa del fosfolípido, ya que en los liposomas con PI, fosfolípido de carga negativa, la liberación es baja. Probablemente no sólo la carga, sino principalmente otras características del grupo polar del fosfolípido (como el tamaño y la orientación), influyen en la integridad de las bicapas. Pendergast et al. (1982) también justificaron la capacidad de la melitina (MLT) para interaccionar con liposomas o micelas independientemente de la carga de los lípidos por el carácter hidrofóbico de la interacción.

La mayor liberación de CF encapsulada en liposomas DRV con HPC respecto a los liposomas de igual composición pero conteniendo PC, puede explicarse por la diferente temperatura de transición de ambos fosfolípidos. La temperatura del experimento (25 °C), es superior a la T_c de PC, por lo que se encontrará en estado de cristal líquido, y en este estado, el colesterol tiene un efecto rigidificante, dificultando en cierta medida la penetración de la hormona y la ruptura de la estructura de las bicapas. Por el contrario, la transición de fase de HPC tiene lugar alrededor de 53 °C, por lo que a 25 °C se encuentra en estado de gel, y la presencia del colesterol causa un incremento de la fluidez.

De los estudios de penetración en monocapas puede extraerse información adicional sobre el tipo de interacción que tiene lugar. En primer lugar, destaca la elevada actividad superficial de GHRH(1-29), ya que la concentración de péptido en la subfase requerida para alcanzar la

presión máxima es de $0.11 \mu\text{M}$, inferior a la de la melitina ($0.18 \mu\text{M}$). Esto sugiere que la hormona penetra con facilidad en las membranas *in vivo*.

Además, presenta una importante capacidad de penetración en monocapas de diferentes composiciones lipídicas empaquetadas a una presión inicial de 5 ó 20 mN.m^{-1} , tal como se representa en las figuras 52 y 53. A $\pi_i = 20 \text{ mN.m}^{-1}$, presión equiparable a la existente en los liposomas, no se observan diferencias en la penetración en función de la composición lipídica, lo que indica que la fuerza fundamental de la interacción no es de naturaleza electrostática, sino hidrofóbica. Lo mismo ocurre con la melitina, péptido de 26 aminoácidos que también presenta estructura de hélice anfipática (Prendergast, 1982). Para monocapas empaquetadas a $\pi_i = 5 \text{ mN.m}^{-1}$, la penetración es mayor, si bien en este caso las diferencias en función de la composición lipídica de las monocapas son más importantes. Concretamente, la penetración es mayor para monocapas con PC (fosfatidilcolina de huevo, con ácidos grasos insaturados), que para las monocapas con HPC (fosfolípidos neutros hidrogenados), si bien no pueden extraerse conclusiones acerca de la influencia de la carga lipídica.

Las cinéticas de penetración se linealizaron aplicando el modelo de Lineweaver-Burck, según la ecuación:

$$\frac{1}{\pi} = \frac{K}{\pi_m} \cdot \frac{1}{t} + \frac{1}{\pi_m} \quad /1/$$

Las ecuaciones de las rectas resultantes se muestran en la figura 91. Los valores de presión máxima (π_m) y tiempo medio de saturación ($t_{1/2}$) se resumen en la tabla 35.

La importante interacción entre GHRH(1-29) y DPPC-SUV también se pone de manifiesto en las isotermas de compresión de monocapas mixtas DPPC-GHRH(1-29) (fig. 59). Las isotermas de las diferentes mezclas ensayadas presentan un comportamiento intermedio entre los componentes puros, y el área ocupada por molécula aumenta con la proporción de hormona presente en la monocapa, es decir que la interacción conduce a una expansión de la monocapa.

Composición	π_m (mN.m ⁻¹)	$t_{1/2}$ (min)
HPC	24.22	68.48
PC	12.63	5.18
HPC/COL	15.36	$3.9 \cdot 10^{-3}$
PC/COL	17.19	1.00
HPC/COL/SM	8.85	4.01
PC/COL/SM	23.13	22.26
HPC/COL/PS	10.11	15.89
PC/COL/PS	21.08	16.13
HPC/COL/PI	24.17	29.20
PC/COL/PI	18.11	13.90
HPC/COL/G	14.58	46.60
PC/COL/G	21.04	34.90

Tabla 35: Presiones máximas alcanzadas y tiempos medios de saturación aplicando la ecuación /1/ a la penetración de GHRH(1-29) en monocapas lipídicas de diferentes composiciones. PC: lecitina de huevo (insaturada); HPC: lecitina hidrogenada; COL: colesterol; SM: esfingomielina; PS: fosfatidilserina; PI: fosfatidilinositol; G: gangliósidos.

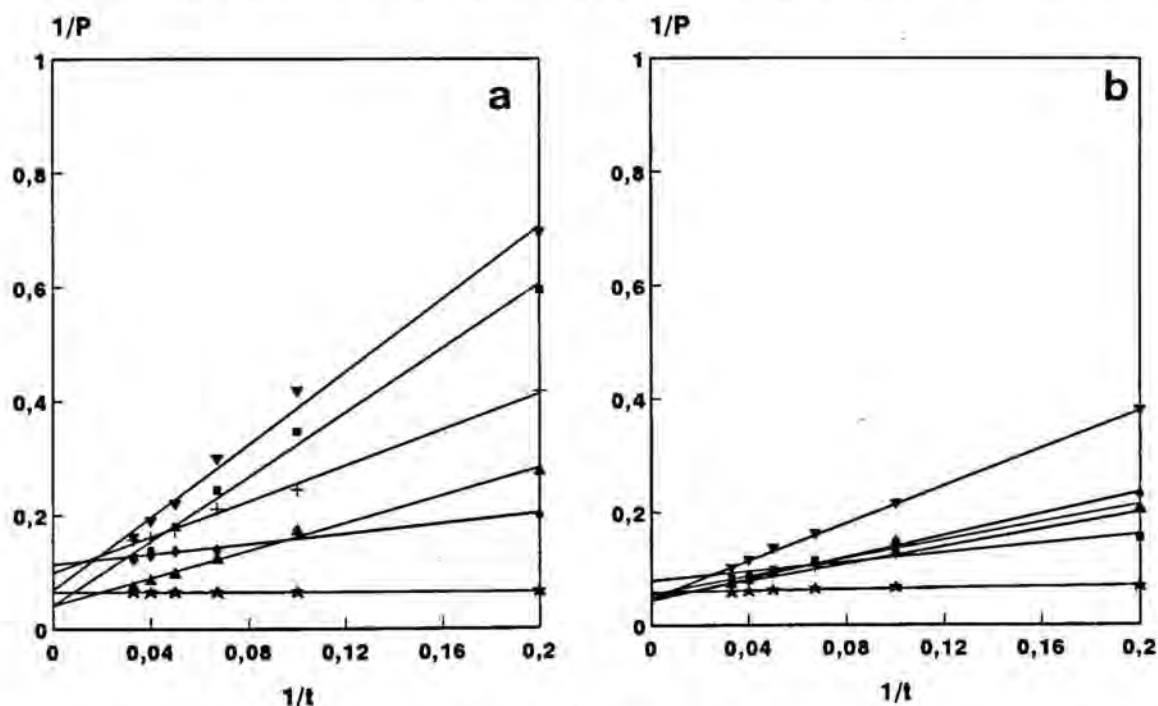


Figura 91: Linealización de los incrementos de presión superficial en función del tiempo calculados mediante la expresión /1/ para la penetración de GHRH(1-29) en monocapas lipídicas de diferentes composiciones. ■ PC, ★ PC/COL ♦ PC/COL/SM, + PC/COL/PS, ▼ PC/COL/G, ▲ PC/COL/PI. a) lecitina hidrogenada (saturada); b) lecitina de huevo (insaturada). $1/P$ m.mN⁻¹; $1/t$ min⁻¹

Como ya se ha ido poniendo de manifiesto en distintos puntos de esta discusión, existen muchos paralelismos entre GHRH(1-29) y la melitina (MLT), péptido cuya interacción con liposomas ha sido exhaustivamente estudiada:

- (1) Similar número de aminoácidos: 26 la melitina y 29 la hormona.
- (2) La misma estructura secundaria: hélice α .
- (3) Elevada capacidad de interacción con lípidos, independientemente de la carga eléctrica de los mismos.
- (4) Capacidad para causar la lisis irreversible de los liposomas
- (5) Ambos alteran de la misma manera la fluidez de liposomas neutros: incremento de la T_c , disminución de la amplitud del proceso de transición y por lo tanto incremento de la cooperatividad del proceso, e incremento de la rigidez de las bicapas, principalmente por debajo de la T_c . Prendergast et al (1982) completaron los experimentos de polarización del DPH con el cálculo de los tiempos de vida media de fluorescencia del DPH, concluyendo que si bien la movilidad del DPH era menor en los complejos MLT-DMPC que en los liposomas puros (para $T < T_c$), el lípido continuaba presentando una transición de fase de gel a cristal-líquido altamente cooperativa.

Por ello, podría pensarse en un modelo de interacción similar para ambos péptidos. Por otra parte, en el trabajo de Prendergast se realizan estudios de QLS (*Quasi-Elastic light scattering*) y observación por microscopía electrónica de los complejos MLT-DMPC formados, comprobando que se trataba de poblaciones de menor tamaño que los liposomas (200-250 Å frente a 700 Å), y más homogéneas. Estos complejos fueron identificados como micelas mixtas, de estructura no vesicular y forma discoidal.

De todo ello podemos deducir que GHRH(1-29) probablemente interacciona con los liposomas DPPC-SUV en estado de gel, penetrando en la bicapa lipídica de los mismos y promoviendo la rotura de la estructura vesicular, formándose otras estructuras lipídicas denominadas **micelas mixtas**. Estas estructuras conservarían la estructura básica en bicapa, ya que la cooperatividad del proceso de transición de fase no sólo se mantiene, sino que incluso aumenta. Además, la menor amplitud del proceso de transición también puede indicar que GHRH(1-29), al igual que ocurría con MLT, se distribuye uniformemente o de manera

estadísticamente aleatoria en las micelas, es decir que no existe una población de micelas con una concentración local particularmente elevada de la hormona.

También la apolipoproteína A₁ forma estructuras discoidales al interaccionar con DMPC, y estas micelas mixtas muestran también una T_c más elevada (3-4 °C) y un estrechamiento de la transición (Jonas y Mason, 1981). Sin embargo, este comportamiento no es muy frecuente en las interacciones péptido-lípido.

El descubrimiento de que los lípidos pueden inducir conformación en hélice α anfipática en diferentes hormonas peptídicas, como β -endorfina y ACTH(1-24) (Verhallen et al., 1984; Jacobs y White, 1989), indujo a pensar que esta estructura era fisiológicamente importante. En apoyo de este papel del dominio de la hélice anfipática en la interacción hormona-receptor, está el hecho de que GHRH(1-29) sea biológicamente activa, ya que esta secuencia de aminoácidos se corresponde con la zona de mayor probabilidad de estructura helicoidal de la hormona natural. Las hélices anfipáticas encontradas en diferentes hormonas peptídicas estudiadas hasta el momento, presentan propiedades estructurales semejantes a la de los polipéptidos líticos (Segrest, 1990). Los péptidos líticos incluyen péptidos pequeños catiónicos con estructura de hélice α que se pueden encontrar en el veneno de varias especie del género *hymenopterae*, como abejas y avispas, así como una familia de péptidos estructuralmente relacionados: las magianinas, descubiertos en la piel de los sapos. Estos péptidos interaccionan con las membranas lipídicas produciendo cambios estructurales importantes y, al igual que GHRH(1-29), en presencia de lípidos y en TFE adoptan estructuras de tipo helicoidal.

Tanto las hormonas peptídicas formadoras de hélice anfipática como los péptidos líticos presentan momentos hidrofóbicos medios superiores a 0.3 y están cargados positivamente (GHRH(1-29) tiene tres cargas positivas a pH=7); además, ambos tienen densidades de carga intermedias y presentan caras polares con un ángulo inferior o igual a 100° perpendicular al eje longitudinal de la hélice (tabla 36). Estas similitudes apoyan la hipótesis de que GHRH(1-29) interacciona con los liposomas provocando la ruptura de la estructura vesicular, formando estructuras de otro tipo.

Propiedad		Hormonas peptídicas	Péptidos	
Momento hidrofóbico medio por residuo		0.54	0.37	
Hidrofobicidad media/residuo cara apolar		0.57	0.74	
Densidad de carga por 11mer de hélice	Positiva	2.4	1.8	
	Negativa	0.5	0.4	
	Total	2.9	2.0	
Relación media de carga +/-		4.8	4.0	
Localización de residuos cargados por cuadrantes	Cara apolar	Positiva		
	Cara polar			
	Cara apolar	Negativa		
	Cara polar			
Angulo medio de la cara polar		<100	<100	

Tabla 36: Características de hélices anfipáticas correspondientes a hormonas polipeptídicas y polipéptidos "líticos". Según Segrest et al (1990).

Más recientemente, McLean et al (1991a) estudiaron la interacción de una serie de péptidos de 6 a 18 aminoácidos especialmente diseñados para adoptar estructura de hélice α anfipática (MAPs), con liposomas de DPPC y DMPC, utilizando para ello diversas técnicas complementarias (DSC, CD y fluorescencia). Estos autores observaron también que los péptidos, al interaccionar con el lípido, adoptaban estructura de hélice α y rompían la estructura vesicular del liposoma, formando pequeñas estructuras micelares con una entalpía de transición de fase menor que los liposomas. Por otra parte, en el péptido unido al lípido el triptófano se encontraba en un entorno más apolar (como se evidencia por el *blue shift* de λ_{em} del péptido). En el caso de GHRH(1-29) también se pone de manifiesto este efecto, pero a partir de la fluorescencia de la tirosina (el incremento de la intensidad de fluorescencia del péptido refleja también el paso a un entorno más apolar). Estos cambios iban acompañados de un incremento en el contenido en hélice α de los péptidos al interaccionar con el lípido, incremento que era más importante cuando los péptidos se disolvían en TFE (Mc Lean et al, 1991b).

Otra hormona peptídica que al interaccionar con liposomas forma partículas de naturaleza lipoprotéica es el fragmento de la hormona paratiroidea PTH(1-34). El tipo de interacción era muy similar al de GHRH(1-29), y también era más importante a $T < T_c$ (Epand et al., 1985). Sin embargo, si bien en el caso de PTH(1-34) las moléculas del péptido se disociaban del

lípidos a temperaturas superiores a la T_c , no ocurría lo mismo en el caso de GHRH(1-29), como se deduce de la disminución de la fluidez de la bicapa de DPPC incluso por encima de la transición.

Con todos estos datos experimentales, y teniendo en cuenta los trabajos de otros autores para péptidos de características semejantes, podemos proponer un modelo de interacción de GHRH(1-29) con DPPC-SUV en el cual el péptido se encontraría en forma de hélice α ó π anfipática. Esta hélice se extendería perpendicularmente al plano de la bicapa con el extremo N-terminal, de los aminoácidos 1 a 19, incluyendo los residuos Tyr¹ y Tyr¹⁰, insertándose en la zona apolar del liposoma, determinada por las cadenas hidrocarbonadas de ácido palmítico, debido al mayor carácter hidrofóbico de esta región calculado teniendo en cuenta la escala de hidrofobicidad de Kyte y Doolittle (1982). De esta manera la movilidad de las cadenas de los ácidos grasos se encontraría restringida debido a un mayor empaquetamiento alcanzado por interacciones de naturaleza hidrofóbica. En el estudio de interacción de fragmentos peptídicos de 23 aminoácidos de la proteína de superficie gp41 del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) con liposomas, Rafalski et al (1990) llegaron a la conclusión de que aquellos péptidos que se unían a las vesículas lipídicas adoptando estructura de hélice α , y cuyo extremo N-terminal era lo suficientemente apolar para unirse a la fracción hidrocarbonada de los ácidos grasos, al penetrar en la bicapa causaban la disrupción de la estructura de la misma. La hormona GHRH(1-29) reúne las características descritas que propician este tipo de interacción, como se indica en la figura 92.

El extremo C-terminal se encuentra amidado, y presenta dos áreas bien definidas (teniendo en cuenta el índice de hidrofilia de los residuos de aminoácidos), siendo la hidrofílica la más importante. Por lo tanto, puede interaccionar con la cabeza polar del liposoma, estabilizándose la unión mediante la interacción entre las cargas positivas de los dos residuos de Arg situados en la zona limítrofe de la mitad hidrófila de la hélice y la carga negativa presente en el fosfolípido, y la carga negativa del Asp y la positiva de la colina. Estas interacciones alterarían la orientación de la cabeza polar, disminuyendo la fluidez a nivel de la superficie de la bicapa.

Como resultado de esta penetración de la hormona en la bicapa, se produciría la ruptura de la estructura vesicular y la reorganización del lípido formándose complejos lipopeptídicos de carácter micelar que conservarían la estructura de bicapa. De acuerdo con este modelo, la interacción puede explicarse en términos de la teoría de la hélice anfipática, de modo similar a la interacción entre la histona H1 y liposomas de DPPC (Gavilanes, 1985).

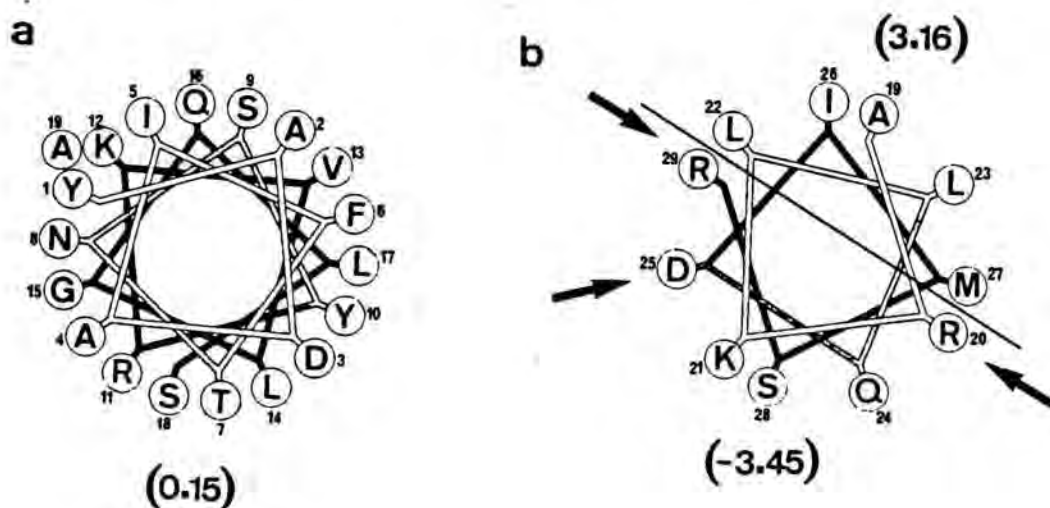


Figura 92: Diagramas de Schiffer-Edmundson de GHRH(1-29): a) extremo N-terminal (aminoácidos 1 a 19) y b) extremo C-terminal (aminoácidos 19-29). Entre paréntesis se indica el valor medio de hidrofobicidad por residuo usando los valores de referencia de Kyte y Doolittle (1982). Valores inferiores a -0.4 (correspondiente a Gly y tomado como referencia), corresponden a la cara polar de la hélice. Se indican con una flecha los residuos específicos cuyo interés se describe en el texto.

Más recientemente (Kimura et al., 1992), se ha descrito este mismo tipo de interacción para la dinorfina(1-13). En este estudio se distingue entre hélices anfipáticas primarias y secundarias. Al primer grupo pertenece la dinorfina(1-13), y la interacción con liposomas unilaminares se caracteriza por la orientación de la hélice α perpendicular a la membrana, con la inserción de la parte hidrofóbica en el interior apolar de la misma; esta interacción se traduce en una rápida liberación de CF encapsulada, una inmovilización de las moléculas de fosfolípido situadas alrededor del péptido insertado y la formación de micelas mixtas. En el caso de las hélices anfipáticas secundarias, como la del glucagón, la interacción con liposomas requiere el contacto directo de una cara de la hélice (la más apolar) con regiones hidrofóbicas de la membrana, mientras que la otra cara permanece en contacto con la fase acuosa. Como

resultado, la hélice queda orientada paralelamente a la superficie de la vesícula o de la micela plana. En consecuencia, el número de moléculas de fosfolípido cuya movilidad resulta restringida es superior que en las primarias, pero el efecto final en la movilidad de las cadenas hidrocarbonadas (variación de entropía) y en las interacciones lípido-lípido y lípido-péptido (variación de entalpía) es inferior, ya que en las hélices primarias la penetración en la membrana es más profunda. El caso de GHRH(1-29) es comparable al de dinorfina(1-13), siendo la interacción en ambos casos favorecida a temperaturas inferiores a la de transición.

4. INTERACCION DE hGH CON MODELOS DE MEMBRANA

La hormona del crecimiento humana (hGH) constituye un caso diferente al resto de hormonas estudiadas hasta el momento, ya que se trata de una proteína globular de 191 aminoácidos (Charrier y Martal, 1988).

La estructura secundaria de la hormona se analizó en primer lugar de acuerdo con el método de predicción de Chou-Fasman (1978), a partir de la estructura primaria de la cadena polipeptídica (fig. 93). Según este método, la contribución de estructura aperiódica es relativamente escasa (23%). Las zonas con mayor probabilidad de estructura helicoidal se localizan en cuatro segmentos de la cadena, en las posiciones 8, 30, 63 y 113, y es de alrededor del 26%. Se observan también varias regiones de hoja β (un 34% del total), así como una proporción significativa de giro β (17%), situados en las posiciones 26, 60, 105, 132, 147, 157, 169 y 187. Las estructuras de giro β se localizan en la superficie de las proteínas, en zonas accesibles al solvente, ya que están asociadas a la presencia de residuos de caracter polar, por lo que son zonas de alta movilidad segmental (van Regenmortel et al, 1988), y juegan un papel pasivo en el plegamiento de las proteínas (Martinez del Pozo et al., 1988).

```

FPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIP
rrrrrrrrhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhssssssrrrrssssrrrr
TPSNREETQOKSNLQLLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASNSDVYDLLKDLE
ttthhhhhhhhhsssssssssssssssssssssssssssssssssssssttttrrrhhhhh
EGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFL
hhhhrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr
RIVQCRSVEGSCGF
ssssssrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr

```

Figura 93: Predicción de estructura secundaria de hGH según el algoritmo de Chou y Fasman (1978). (h) hélice α , (s) estructura β , (t) giro β , (r) aperiódica.

Para comprobar la validez del método de Chou-Fasman, se examinó la estructura de hGH en solución mediante la técnica de espectroscopía de dicroísmo circular. El espectro obtenido

muestra dos mínimos, a 207 y 219 nm (figura 49). El análisis cuantitativo indica un 11% de estructura en hélice α , un 17.5% de hoja β y un 21.5% de giro β ; el resto, alrededor del 50%, es estructura aperiódica. Sin embargo, y como hemos visto anteriormente, la aproximación de Chou-Fasman (1978) predice valores más bajos de estructura aperiódica (23%). Este mismo hecho ha sido observado para otras proteínas globulares, como por ejemplo las globulinas de almacenamiento 7S de las leguminosas (Deshpande y Damodaran, 1990). Una explicación plausible es que la predicción de estructura de Chou-Fasman es un método semiempírico basado en la estructura de una serie de proteínas globulares cristalizadas; además, no tiene en cuenta las interacciones entre residuos situados en puntos distanciados de la secuencia.

La elevada proporción de giro β es importante, ya que, tal como se ha indicado anteriormente, estas estructuras ocupan zonas protuberantes de la proteína, y sus puentes de hidrógeno se encuentran expuestos al solvente. Esto hace disminuir la contribución de estos grupos a la energía libre de plegamiento de la proteína. Por lo tanto, la estabilidad de hGH es debida, mayoritariamente, al elevado contenido de giros β . Este mismo hecho se observó en otra proteína: la α -sarcina (Martinez del Pozo et al., 1988).

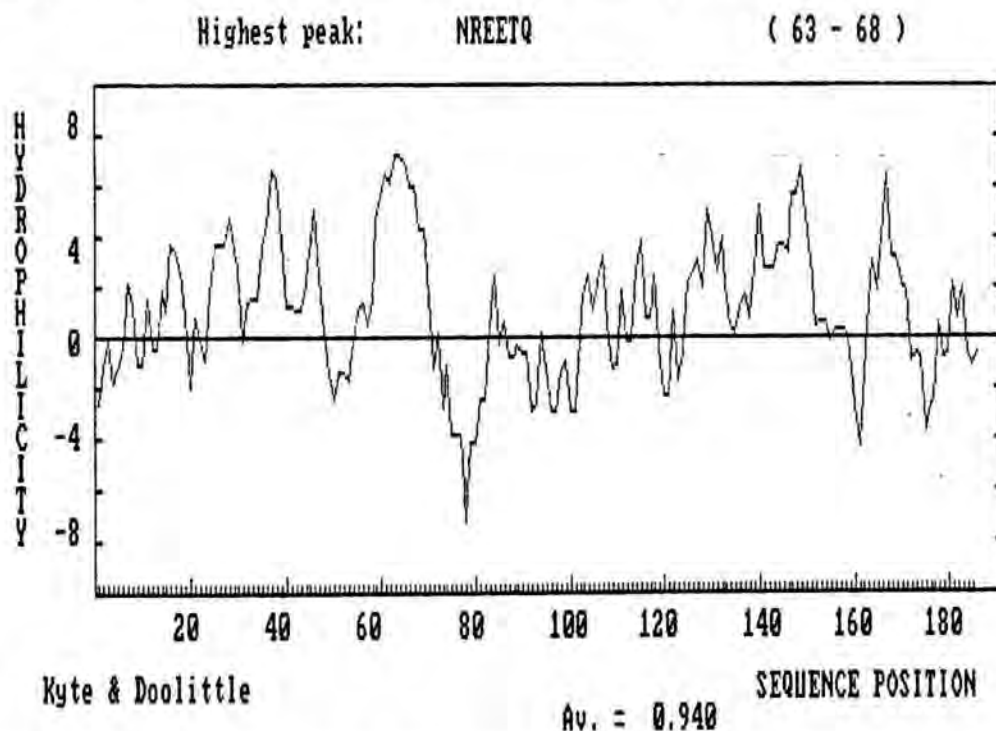


Figura 94: Perfil de hidropatía de hGH según el método de Kyte y Doolittle (1982) obtenido mediante el programa Epiplot (Gavilanes et al, 19--). La parte superior a la línea corresponde a regiones externas de la proteína, y la inferior a regiones internas de la molécula.

A fin de obtener más información sobre la estructura terciaria de hGH, se analizó el perfil de hidropatía de acuerdo con la escala de Kyte y Doolittle (1982) (figura 94). Puede observarse que predominan las regiones expuestas, que coinciden con las zonas de estructura en giro β predichas por el método de Chou y Fasman, si bien también existen zonas internas o apolares.

hGH posee un único residuo de Trp, en posición 86. La contribución de este residuo a la fluorescencia de la proteína resulta en una banda centrada en 339 nm, es decir desplazada 21 nm respecto a la de N-acetil-triptofanamida ($\lambda_{em}=360$ nm). Esto indica que el Trp⁸⁶ no se encuentra en la superficie de la proteína, sino en el interior apolar de la misma, o bien formando parte de las zonas de interacción entre subunidades en la estructura terciaria de la proteína, lo cual es un hecho común en las proteínas globulares (Deshpande y Damodaran, 1990; Lakowicz, 1983a).

A la temperatura de 50 °C, el espectro de fluorescencia de hGH mantiene el máximo de emisión en 339 nm, lo que da idea de la estabilidad de la estructura de hGH, que retiene su conformación a esta temperatura. Esta estabilidad probablemente esté posibilitada por la importante proporción de estructuras de giro β . Estudios de desnaturalización llevados a cabo en hormonas de crecimiento ovina, bobina y de rata, han demostrado que existe un estado intermedio entre la estructura desordenada y la completamente ordenada, en el que las moléculas de hormona pueden asociarse entre sí. Este estado intermedio, denominado *molten globule state* (Holzman et al., 1990; Brems et al., 1990), se caracteriza por tener una estructura secundaria definida y una estructura terciaria fluctuante, y tiende a formar dímeros. Sin embargo en el caso de hGH, si bien no se han realizado muchos estudios por el momento, parece que no se forma este estado intermedio, y por lo tanto solo puede hablarse de formas nativa y desnaturalizada (Brems et al., 1990). Por este motivo, la hormona se encuentra preferentemente como monómero, lo que explica que el espectro de fluorescencia se mantenga invariable, tanto en intensidad de fluorescencia como en la posición del máximo de emisión (figura 31). Según Brems, la hormona del crecimiento humana sufre un plegamiento secuencial, que se inicia con la formación de una estructura secundaria y a continuación la hormona adoptaría una estructura terciaria. Se cree que, a pesar de la heterogeneidad entre las diferentes especies en cuanto a la secuencia de aminoácidos, las estructuras terciarias de

GH son muy similares. En el cerdo, la estructura terciaria de la GH se ha determinado por difracción de RX, y consiste en un único dominio formado por cuatro hélices α antiparalelas dispuestas en lo que se conoce como *left-twisted helical bundle*. Esta misma estructura se ha observado en GH de otras especies animales. En el caso de hGH, actualmente no se conoce la estructura terciaria, sin embargo se cree que es muy similar, lo que se encuentra respaldado por la predicción de Chou-Fasman vista anteriormente.

Al determinar el caracter anfipático de hGH según el método de De Lisi y Berzofsky, basado en la escala de Fauchère y Pliska (1988), se obtiene un marcado caracter anfipático, siendo las secuencias con mayor anfipaticidad y su correspondiente índice (A.S.: *amphipathic score*, significativo para valores superiores a 10): 8-11 (A.S.=10.91, 16-21 (A.S.=12.07), 27-33 (A.S.=15.70), 84-96 (A.S.=30.24), 110-129 (A.S.=46.04), 137-145 (A.S.=17.17), 168-179 (A.S.=27.03).

Una primera evidencia de la interacción de hGH con liposomas de DPPC se obtiene a partir de los resultados de variación de fluorescencia del triptófano. En presencia de liposomas DPPC-SUV en estado de gel, la hormona apenas penetra en la bicapa lipídica, ya que λ_{em} disminuye muy poco (1.7 nm para la relación molar DPPC/hGH 500:1, y 3.6 nm para la relación 1375:1), y el incremento de la intensidad de fluorescencia para la relación molar 500:1 es tan solo de $F/F_0=1.17$ (figura 31). Esto indica que hGH presenta una baja afinidad por la bicapa lipídica, lo cual es previsible, ya que la mayor parte de las proteínas globulares no interaccionan con liposomas, dado su bajo momento hidrofóbico (0.13 por residuo) y la reducida hidrofobicidad de la cara apolar de las hélices α (Segrest et al., 1990). Tal como se ha indicado anteriormente, hGH es también una proteína globular mayoritariamente hidrófila. Además, la conformación plegada y globular de la proteína hace que su unión al liposoma y la posterior penetración en el interior de las bicapas sea cinéticamente desfavorable.

Si bien la penetración en la bicapa liposómica en estado de gel es muy reducida, en liposomas en estado de cristal líquido no se observa ningún indicio de penetración de hGH en la membrana, ya que las propiedades de fluorescencia de la hormona se mantienen constantes.

El efecto de hGH en la transición de fase de gel a cristal líquido de los fosfolípidos se estudió determinando la despolarización de liposomas DPPC-SUV marcados en el interior de las bicapas (DPH) o en la superficie polar (ANS). La presencia de hGH no modifica la T_c ni la amplitud del proceso de cambio de fase; tampoco altera el empaquetamiento de las cadenas de ácidos grasos, ya que la fluidez del liposoma no se altera ni por a temperaturas inferiores a la de transición ni una vez superada esta temperatura (figura 41). Estos resultados confirman la no penetración de la hormona en el interior de la bicapa.

Sin embargo, como se deduce del incremento de la polarización de los liposomas marcados con ANS (figura 42), la hormona ejerce un efecto de rigidificación a nivel de la superficie del liposoma, indicando que hGH interacciona con los liposomas de DPPC a este nivel.

Como era de esperar a la vista de los resultados expuestos hasta el momento, la capacidad desestabilizadora de las membranas lipídicas por hGH es prácticamente inexistente, tal como se desprende de los estudios de liberación de carboxifluoresceína. En liposomas de DPPC y DPPC/COL (1:1), para una relación molar lípido/péptido de 44:1 no se observa liberación de CF encapsulada, mientras que para relaciones equimolares se observa una liberación gradual de menos del 10% en liposomas de DPPC (figura 51). Probablemente esta liberación sea debida a perturbaciones de carácter transitorio producidas al unirse la hormona a la superficie del liposoma. De esta misma manera interaccionaba el promotor tumoral debromoaplastoxina con liposomas de DPPC, uniéndose a nivel superficial y disminuyendo la fluidez a este nivel, a la vez que provocaba una liberación gradual y poco importante de CF encapsulada (Nam et al., 1989). En el caso de hGH, al interaccionar con liposomas que contenían fosfolípidos cargados positiva o negativamente, se observa en general este mismo comportamiento, independientemente de la carga eléctrica (fig. 50). Este tipo de interacción indica que hGH no provoca lisis ni solubilización apreciable de las membranas.

Para comprender mejor el tipo de interacción que tiene lugar, se determinó el espectro de CD de hGH en presencia de liposomas DPPC-SUV. El espectro resultante muestra una importante reestructuración de la hormona al interaccionar con los lípidos. El espectro tiene una elipticidad mayor que el de la hormona en solución, y los mínimos situados a 207 y 219 nm se desplazan a 210 y 222 nm respectivamente, obteniéndose el espectro característico de una

estructura helicoidal (fig. 49). El análisis cuantitativo asigna un 40% de estructura de hélice α . Al interaccionar con liposomas, se produce una mayor ordenación de la hormona, con una reducción de la estructura aperiódica del 50 al 30%. En TFE, el espectro es cualitativamente igual que en presencia de liposomas pero de mayor elipticidad, y la proporción de hélice α es también superior (53%). Sin embargo, en TFE se observa una importante disminución de las estructuras de tipo giro β , que como se ha indicado anteriormente son de gran importancia para estabilizar la estructura terciaria de la proteína ya que se asocian a fragmentos externos de gran movilidad segmental. Esto puede ser debido a que el TFE actúa desnaturalizando las estructuras terciarias y cuaternarias estabilizadas por interacciones hidrofóbicas, a la vez que induce una conformación helicoidal en cadenas de aminoácidos con tendencia a formar hélice α (Zhou et al., 1990).

Los estudios de interacción de hGH con monocapas permiten perfilar el modelo de interacción descrito para el caso de los liposomas. hGH presenta una elevada actividad superficial al extenderla sobre subfase de tampón acetato (pH=7.4). Los valores de exceso superficial obtenidos alcanzan los $4.53 \cdot 10^{-11} \text{ mol.cm}^{-1}$ para una concentración de hormona en la subfase de $10.52 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ (tabla 13).

Las cinéticas de penetración de hGH en monocapas de diferentes composiciones lipídicas ($\pi_i=5 \text{ mN.m}^{-1}$), algunas de ellas incorporando fosfolípidos cargados positiva o negativamente, muestran una importante capacidad de hGH para interaccionar con todas ellas, causando importantes incrementos en la presión superficial de la monocapa (fig. 52). En la figura 95 se representa la linealización de las curvas de penetración aplicando el modelo de Lineweaver-Burck, como se ha hecho con las demás hormonas peptídicas estudiadas, según la ecuación:

$$\frac{1}{\pi} = \frac{K}{\pi_m} \cdot \frac{1}{t} + \frac{1}{\pi_m} \quad /1/$$

Los valores de presión máxima (π_m) y tiempo medio de saturación ($t_{1/2}$) se resumen en la tabla 37.

Una primera conclusión que puede extraerse es la ausencia de una interacción de carácter electrostático, ya que los incrementos de presión superficial son muy similares en todos los casos, sin importar la composición de la monocapa. Por otra parte, la penetración a los 30 minutos siempre resulta algo mayor cuando la fosfatidilcolina utilizada es hidrogenada, sin embargo los valores de π_m son muy similares; en general, en las monocapas con HPC, los valores de $t_{1/2}$ son más elevados, indicando una penetración más gradual.

En el caso de monocapas empaquetadas a una presión superficial de 20 mN.m^{-1} , presión que se considera similar a la existente en los liposomas, la interacción en los distintos tipos de monocapas es menos importante (figura 53), pero las cinéticas descritas son del mismo tipo que las obtenidas en monocapas de $\pi_i = 5 \text{ mN.m}^{-1}$.

Composición	$\pi_m \text{ (mN.m}^{-1}\text{)}$	$t_{1/2} \text{ (min)}$
HPC	20.88	20.84
PC	16.19	7.89
HPC/COL	18.53	8.23
PC/COL	14.42	8.02
HPC/COL/SM	21.02	17.37
PC/COL/SM	11.87	1.09
HPC/COL/PS	20.11	15.66
PC/COL/PS	15.87	2.46
HPC/COL/PI	13.55	10.99
PC/COL/PI	11.52	1.73
HPC/COL/G	15.70	0.52
PC/COL/G	14.47	1.40

Tabla 37: Presiones máximas alcanzadas y tiempos medios de saturación aplicando la ecuación /1/ a la penetración de hGH en monocapas lipídicas de diferentes composiciones.

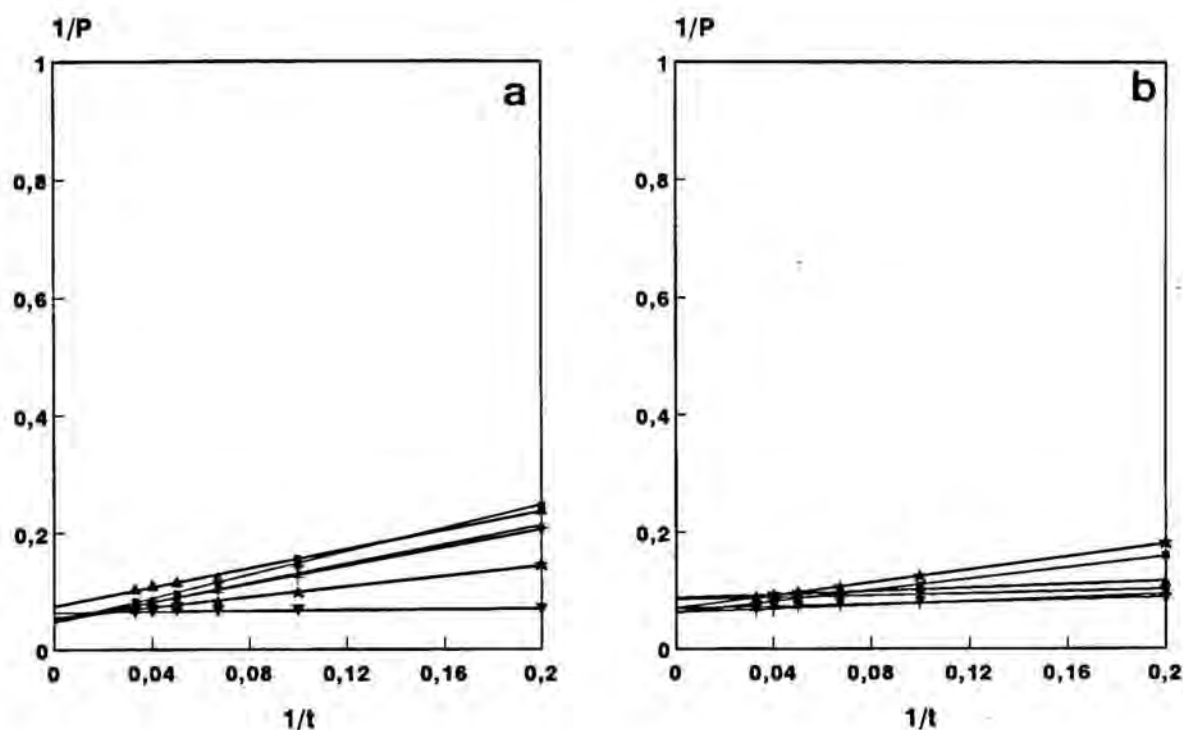


Figura 95: Linealización de los incrementos de presión superficial en función del tiempo calculados mediante la expresión $1/t$ para la penetración de hGH en monocapas lipídicas de diferentes composiciones. ■ PC, ★ PC/COL ♦ PC/COL/SM, + PC/COL/PS, ▼ PC/COL/G, ▲ PC/COL/PI. a) lecitina hidrogenada (saturada); b) lecitina de huevo (insaturada). $1/P$ m.mN⁻¹; $1/t$ min⁻¹

hGH no forma monocapas por si sola, sin embargo, al inyectarla en la subfase de tampón acetato pH=7.4 en la que se ha extendido previamente una monocapa de DPPC, la hormona provoca la expansión de la monocapa a la vez que traslada la transición de fase característica de la DPPC a presiones más elevadas y aparece una nueva transición de fase a presión de 26.5 mN.m⁻¹ (figura 61).

Según Jacobs y White (1989), la unión de ciertos aminoácidos de una proteína o péptido a la superficie de la membrana celular constituye un paso previo a la inserción. Según esto, la interfase lipídica actuaría como una superficie catalítica para la formación de estructura secundaria helicoidal o de tipo β , mediante la energía proveniente del efecto hidrofóbico de la interacción. Estos autores sugieren el mecanismo de inserción de proteínas

multihelicoidales en membranas lipídicas que se representa en la figura 96. En primer lugar, la proteína se encuentra mayoritariamente desordenada (es la situación más frecuente a la salida del ribosoma); ciertos segmentos de la misma, denominados *stays* y constituidos por aminoácidos a la vez muy polares e hidrofóbicos (Trp, Arg, Lys, Tyr), se asocian fuertemente a la superficie de la bicapa. Al producirse esta interacción con la membrana, se incrementan las posibilidades de que grupos amida y carbonilo se encuentren e inicien la formación de una hélice α . Asimismo, la estructuración se ve también favorecida por la reducción en la superficie accesible de los residuos, lo que origina un descenso de energía libre de unas 2 Kcal/mol por residuo.

En este estudio, Jacobs y White destacaron que no era necesaria la penetración del péptido en el interior hidrocarbonado de la bicapa para manifestar una interacción de carácter hidrófobo con la misma. La única condición necesaria es que el grupo hidrofóbico sea "apartado" del medio acuoso, a fin de disminuir la entropía desfavorable debida a la ordenación de las moléculas de agua que lo rodean. Esta condición puede cumplirse con la penetración del péptido en la superficie de la bicapa, determinada por las cabezas polares de fosfolípido.

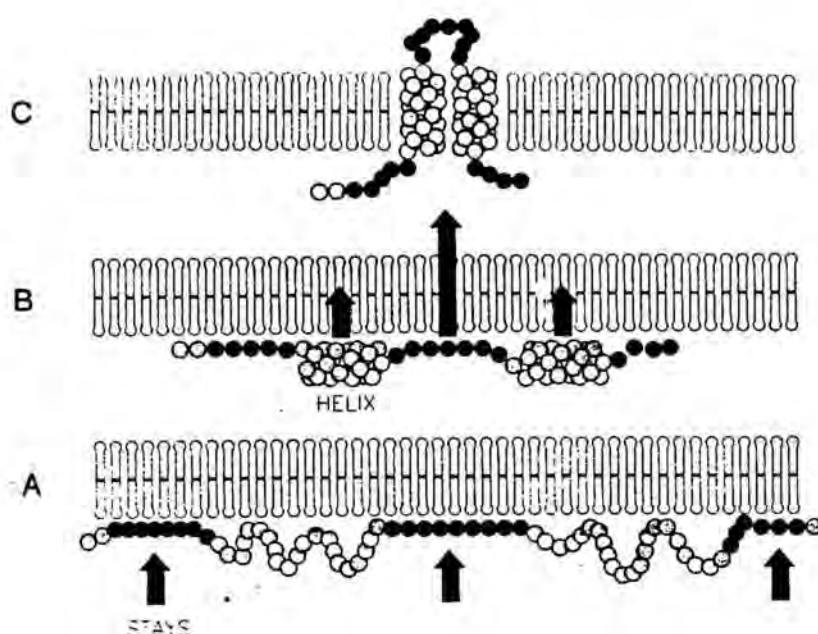


Figura 96: Esquema hipotético de interacción de una proteína con la bicapa lipídica por formación de hélices α . a) Unión de ciertas regiones de la cadena (*stays*) a la superficie lipídica; b) Formación de estructuras de hélice α ; c) las zonas de anclaje o *stays* de mayor polaridad pueden cruzar la membrana junto con las regiones más apolares de las hélices. Según Jacobs y White, 1989.

Extendiendo estas ideas al caso particular de hGH, podemos concluir que esta hormona no penetra en el interior de las bicapas lipídicas, sino que la interacción tiene lugar en la superficie de la membrana; en esta interacción, el lípido induce cambios conformacionales en la hormona, consistentes fundamentalmente en un incremento en la estructura helicoidal. Probablemente esta sea la conformación activa de hGH, capaz de unirse a su receptor específico y desencadenar la respuesta biológica, puesto que existen evidencias de que la unión a los lípidos que constituyen la membrana celular es requisito necesario para la actividad de muchos péptidos (toxina colérica, encefalinas, tirotropina, así como diversas hormonas peptídicas) (Epand et al., 1983; Segrest, 1990). Las zonas de anclaje a la superficie (*stays*) podrían ser las correspondientes a los giros β , ya que estas zonas coinciden con regiones externas de la proteína. En este caso, la interacción no incluiría el tercer paso consistente en la penetración de las hélices α formadas en el interior apolar de la bicapa (figura 96c), ya que la estructura globular de la hormona representa un impedimento estérico a la penetración. Esta misma observación fue hecha por Gavilanes et al (1985), que comprobaron que la histona H1 interaccionaba con liposomas de DPPC experimentando un incremento del contenido en hélice α , pero la interacción era mucho más importante si la proteína se encontraba desnaturalizada.



5. INTERACCION DE preS(120-145) CON MODELOS DE MEMBRANA

PreS(120-145) es un fragmento peptídico perteneciente a la proteína de la cubierta del virus de la hepatitis B (HBV). Este péptido es capaz de unirse a anticuerpos específicos inducidos contra el virus HBV en el hombre (Neurath, 1984).

Como se explica en la Introducción, en el mecanismo de la respuesta inmune intervienen linfocitos B y T, y ambos deben reconocer al antígeno para llegar a la formación de anticuerpos específicos. El péptido preS(120-145) presenta en su estructura zonas antigénicas o epítomos capaces de ser reconocidos por linfocitos B (epítomo B) y T (epítomo T), lo que explica en parte su elevada inmunogenicidad.

La estructura secundaria de preS(120-145), según el método de predicción de Chou y Fasman (1978), consiste en hélice α entre los aminoácidos 126 y 132, hoja β entre los residuos 120-145 y 137-141, y giro β entre los residuos 133-136 y 142-145.

MQWNSTALHQALQDPRVRGLYLPAGG¹⁴⁵
 sssssshhhhhhhttttsssstttt

Según la escala de Kyte y Doolittle (1982), preS(120-145) tiene un caracter marcadamente hidrófilo (figura 97), con un valor medio por residuo de aminoácido de + 0.825. Aplicando el algoritmo de Berzofsky, el segmento 127-133 presenta un índice de anfipaticidad relevante, con A.S. = 15.58*.

Al determinar la estructura secundaria de preS(120-145) en solución acuosa por dicroísmo circular, el espectro presenta una magnitud de elipticidad baja (fig. 76). Según Abergel (1989), este tipo de espectros son característicos de una estructura predominante aperiódica y/o de giro β . El análisis cuantitativo según el método de Chang (1978) confirma que el espectro obtenido se ajusta mejor a una combinación de estructura aperiódica (48%), hoja β (22%), y giro β (28%).

* A.S. = *Amphipatic Score* o índice de anfipaticidad, significativo para valores superiores a 10 (De Lisi y Berzofsky, 1985)

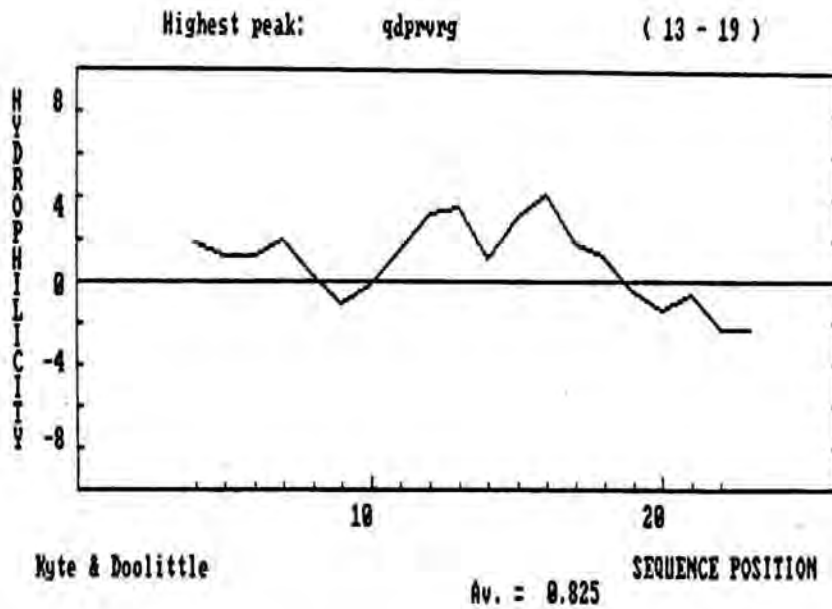


Figura 97: Perfil de hidrofília de preS(120-145) según la escala de Kite y Doolittle (1982)

Como se deduce de lo expuesto hasta ahora, los resultados de CD obtenidos para preS(120-145) se contradicen con la estructura secundaria predicha según el método de Chou y Fasman (1978), sobre todo en lo referente al contenido en hélice α ; esto es debido a que muchas veces los métodos derivados de estadísticas de estructuras de proteínas enteras cristalizadas no se adaptan a la predicción de la conformación de un péptido en solución.

Para explicar el reconocimiento de una proteína (en este caso la proteína de cubierta de HBV), por anticuerpos inducidos contra un péptido (preS(120-145)), se ha postulado la hipótesis de que dichos anticuerpos son inducidos por una conformación concreta del péptido, similar a la del epítipo en la proteína. Según esta idea, el péptido inmunogénico en solución exhibiría, al menos potencialmente y sobre todo al interaccionar con el receptor, unas conformaciones preferentes. Los mejores péptidos inmunógenos son probablemente propensos a plegarse, adoptando una conformación preferente que puede quedar estabilizada al interaccionar con el receptor situado en la membrana de los linfocitos B. Muy posiblemente, al igual que en el caso de las hormonas peptídicas, la membrana lipídica induce en el péptido conformaciones y orientaciones preferentes que facilitan la unión con el receptor (Sargent y Schwyzer, 1986; Jacobs y White, 1989). Así pues, el receptor interaccionará predominantemente con las moléculas de péptido asociadas a la membrana. Para conocer cuales son estas conformaciones biológicamente activas de preS(120-145), se ha investigado su interacción con liposomas y

monocapas como modelo de membrana.

En primer lugar, al incubar el péptido con liposomas DPPC-SUV a una relación molar lípido/péptido de 37:1, se observa una ligera tendencia a la estructuración del péptido, que se refleja en el espectro de CD en un incremento de $[\Theta]_{222}$, lo que se traduce en un incremento de estructura en hélice α , si bien la conformación predominante es de tipo giro β (30.5%), hoja β (18%) y aperiódica (47%). Asimismo, se determinó el espectro en TFE, solvente que favorece la formación de hélice α , a fin de examinar la posibilidad de que esta conformación pueda inducirse al interaccionar el péptido con los linfocitos y el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), en un entorno limitado al agua (Abergel et al., 1989). En estas condiciones, el espectro obtenido presenta dos mínimos, a 207 y 222 nm, característicos de estructura en hélice α (22%); no obstante, continúan predominando las estructuras de giro β (31%) y aperiódica (38%).

Estas mismas conformaciones observadas para preS(120-145), fueron descritas también por Abergel et al (1989) para el péptido K16F, correspondiente a un epítipo T de HIV-1. En solución acuosa y a pH neutro, este péptido presenta una conformación de tipo aperiódico (35%), hoja β (55%) y giro β (10%), mientras que en TFE adopta un 40% de hélice α , manteniéndose la proporción de estructura desordenada. En este punto es importante destacar que se han descrito en la literatura numerosos casos de péptidos inmunógenos que interaccionan con los linfocitos y el CMH adoptando estructura de hélice α anfipática (Gras-Masse et al., 1988), lo que llevó a proponer que esta estructura favorecía la interacción del antígeno con el receptor de las células T por la mitad polar de la hélice, y con la célula presentadora de antígeno por la mitad apolar. En el presente estudio de interacción de preS(120-145) con liposomas se ha observado que este péptido interacciona adoptando una estructura secundaria anfipática, con una importante proporción de giros β . Este mismo hecho, además de con el epítipo K16F (Abergel et al, 1989), ha sido observado con dos citocromos C de paloma (Ogasawara et al., 1989) entre otros péptidos inmunógenos.

Estos resultados indican que la tendencia a la conformación en hélice α no es un requisito indispensable para que un péptido sea inmunógeno. Sin embargo, el carácter anfipático del epítipo T puede favorecer o acelerar la unión al CMH que se encuentra embebido en la

membrana, ya que el entorno también anfipático que constituye la membrana celular se inducirán en el péptido conformaciones preferentes cuya unión al receptor requerirá una mínima energía, ya que la búsqueda sería bidimensional, mientras que si el péptido estuviese desordenado en solución, la búsqueda sería en tres dimensiones (Segrest et al, 1990; Abergel et al, 1989; Sargent y Schwyzer, 1986; Kaiser y Kézdy, 1987). Por otra parte, la elevada proporción de giros β resulta lógica, ya que estas zonas se corresponden en general con máximos de hidrofília de la secuencia, y por tanto están situadas en la superficie, más accesibles, constituyendo regiones de unión de los antígenos.

El espectro de fluorescencia de preS(120-145) en tampón acetato pH 7.4 ($\lambda_{em}=280$ nm), muestra una banda centrada en 355 nm, lo que supone un desplazamiento de 5 nm respecto al máximo de emisión de N-acetil-triptofanamida, que es de 360 nm en estas mismas condiciones. Esto indica que preS(120-145) en solución acuosa no se encuentra totalmente desestructurado, ya que el triptófano no está expuesto al solvente. Estos resultados coinciden con el espectro de CD, que muestra aproximadamente un 50% de estructura ordenada.

En presencia de liposomas de DPPC en estado de gel (20°C), preS(120-145) presenta una importante capacidad de interacción. A la relación molar DPPC/péptido de 500:1, el máximo de fluorescencia se desplaza casi 15 nm, mientras que la fluorescencia relativa se triplicaba (fig. 65). Estos resultados se producen al penetrar el péptido en el entorno hidrófobo determinado por las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos del liposoma. Los importantes cambios observados en la fluorescencia del péptido pueden ser debidos a la capacidad del mismo de adoptar estructuras secundarias anfipáticas, tal como se ha descrito anteriormente; Surewicz y Epan (1984), comprobaron que la pentagastrina y otros péptidos análogos estructurales en cuya secuencia se alternaban aminoácidos hidrófobos e hidrófilos, poseían mayor afinidad por los liposomas de DPPC. Asimismo, diversos autores han destacado la importancia de las estructuras secundarias anfipáticas en la interacción péptido-lípido, considerando estas estructuras, inducidas por la membrana, como las biológicamente activas. Algunos ejemplos son la β -endorfina y la melitina, que adoptan estructura de hélice α anfipática (Prendergast et al., 1982; Wu et al., 1979), así como los fragmentos de la apolipoproteína E 129-169 y 263-286 (Sparrow et al., 1992); el análogo de la somatostatina SMS 201-995 interacciona con liposomas de POPG mediante la formación de estructura de

hoja β anfipática (Beschiaschvili y Seelig, 1991). Por otra parte, la fluorescencia de preS(120-145) en mezclas de tampón y TFE se modifica en el mismo sentido que al añadir liposomas: disminución de λ_{em} e incremento de la fluorescencia relativa (figura 67). Este incremento era significativamente inferior al que se producía al interaccionar con liposomas, sin embargo esto es debido a las propiedades de captación de electrones del TFE, que determinan una disminución de la fluorescencia del péptido, tal como ocurría con LHRH o SRIF. Por el contrario, en este caso el aumento de la intensidad de fluorescencia causado por la estructuración del péptido en TFE contraresta en cierta medida este efecto de *quenching* característico del TFE.

Al efectuar la incubación a 50 °C, se observa que preS(120-145) no presenta afinidad por los liposomas DPPC-SUV en estado de cristal líquido, ya que las propiedades de fluorescencia del péptido no se modifican. Este mismo hecho ocurre con la somatostatina y la GHRH(1-29), y ha sido observado por otros autores con diferentes péptidos (Kimura, 1992; Yagi, 1990; Jain, 1982; Surewicz, 1984). La causa de esta interacción preferencial con liposomas en estado de gel podría ser la existencia de defectos de membrana que se forman en los liposomas en este estado, y que constituyen zonas energéticamente favorables a la interacción. Las bases de esta teoría se detallan en el apartado de la discusión correspondiente a la somatostatina.

Como consecuencia de la penetración en el interior de la membrana lipídica, preS(120-145) modifica de manera importante la transición de fase de la DPPC, tal como se deduce de los estudios de despolarización de liposomas DPPC-SUV marcados con DPH (figura 68). Al insertarse en los liposomas, el péptido ejerce un efecto rigidificante que es significativo en un intervalo de temperaturas de aproximadamente entre 30 y 60 °C; además, la T_c de los liposomas se incrementa 1 °C en presencia del péptido, y el proceso de transición se produce en un intervalo más estrecho de temperaturas, indicando una mayor cooperatividad del proceso. Hasta el momento, estos resultados son cualitativamente iguales que los obtenidos para GHRH(1-29), pero de menor magnitud. Sin embargo, mientras que la hormona también altera la fluidez del liposoma a nivel de superficie polar, preS(120-145) no modifica el empaquetamiento de las moléculas de fosfolípido a este nivel, como se desprende de la observación de las curvas de despolarización de liposomas DPPC-SUV marcados con ANS

(figura 69).

A pesar de la elevada afinidad de preS(120-145) por los liposomas neutros de DPPC, como resultado de esta interacción no se altera la integridad de la membrana lipídica, ya que no se observa salida de CF encapsulada (fig. 77). Únicamente cuando la relación molar lípido/péptido es de 1:1, se detecta un 6% de CF libre, liberación que se produce de forma brusca, y que puede explicarse como resultado de defectos transitorios producidos en la bicapa durante las fases iniciales de unión del péptido (Nam et al., 1989).

Pasando ahora a los estudios de interacción con monocapas, destaca en primer lugar que el péptido preS(120-145) extendido en subfase de PBS (pH=7.4) forma isoterma en estado gaseoso, con una transición de fase a $9.2 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (fig. 78). Estas monocapas no son muy estables, ya que la presión máxima alcanzada es de tan sólo $16.8 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$; sin embargo, se han obtenido valores similares con otros péptidos, como la melitina ($21.1 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$) y la mielina entre otros (Fidelio et al., 1986).

El área ocupada por molécula en el punto de colapso, es de 1.68 nm^2 . Teniendo en cuenta este valor, y según los estudios realizados por Fidelio et al (1986), podemos proponer que el péptido adopta una conformación de tipo hélice α dispuesta perpendicularmente a la interfase, o bien una estructura de tipo *loop* o "tirabuzón", en la cual dos hojas β antiparalelas estarían unidas por un giro β .

Las isoterma mixtas preS(120-145)/DPPC a diferentes relaciones molares presentan un comportamiento intermedio entre los componentes puros (fig. 80); la transición de fase observada en la monocapa de preS(120-145) pura continua apareciendo en las monocapas mixtas, pero se desplaza a valores de presión más elevados en función del contenido en DPPC. Los valores de energía libre de la mezcla en exceso (ΔG_M^E) a 10 y $20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ resultan positivos, apuntando a que las mezclas son algo menos estables que los componentes puros (tabla 26). Sin embargo, la miscibilidad es prácticamente ideal excepto para las relaciones molares DPPC/preS(120-145) 0.6:0.4 y 0.4:0.6 a la presión inicial de $20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. En estos casos, ΔG_M^E en valor absoluto es significativamente mayor que RT ($591.3 \text{ cal}\cdot\text{mol}^{-1}$ a 25°C), por lo que en estas relaciones molares la mezcla no es ideal. El hecho de que en la

mayor parte de las isothermas, la miscibilidad sea prácticamente ideal, sugiere que la presencia de DPPC no modifica de manera importante la estructura del péptido, posiblemente debido a que éste ya habría adoptado una estructura secundaria definida al ser depositados en la interfase aire/agua a partir de una solución orgánica, estructura que se haría más estable al ir incrementado la presión superficial. La penetración del péptido inyectado bajo una monocapa de DPPC se traduce en un incremento del área ocupada por molécula, incremento que no es muy importante y que disminuye al aumentar la presión. Según Rafalsky (1990), esto es indicativo de secuencias peptídicas que se unen superficialmente a la monocapa formando estructura β .

Resumiendo todos los datos obtenidos de la interacción de preS(120-145) con lípidos, puede decirse que la unión del péptido a la membrana transcurre con la penetración en el interior hidrófobo de la bicapa y sin desestabilizar la estructura de la misma. Como se ha expuesto anteriormente en este apartado, la superficie de la membrana actúa como inductor de estructuras secundarias anfipáticas en los péptidos biológicamente activos, ya sean de tipo hélice α o hoja β (Jacobs y White, 1989). Así, la unión del péptido a la superficie constituye un primer paso a la posterior inserción en la bicapa gracias al fuerte gradiente de energía libre que conduce la cara apolar del péptido hacia el interior apolar de la membrana. En este caso, la interacción que tiene lugar sería comparable a la del glucagon. Esta hormona peptídica de 29 aminoácidos también adopta una estructura secundaria anfipática al interaccionar con liposomas de DMPC en estado de gel, concretamente hélice α (Kimura, 1992). Como resultado de esta interacción, el glucagon se sitúa paralelamente a la superficie de los liposomas, con la cara apolar penetrando en el interior apolar de la bicapa y la cara polar en contacto con el exterior acuoso; de esta manera, cada molécula de péptido interacciona con un número elevado de moléculas de fosfolípido, reduciendo su movilidad. Sin embargo, la penetración no es muy profunda, por lo que no se produce una solubilización o lisis de la estructura vesicular, como sí ocurriría en aquellos péptidos que penetraban perpendicularmente en la bicapa, como la dinorfina(1-13) (Kimura et al., 1992) o la GHRH(1-29) descrita en capítulos anteriores, entre otros. La fluorescencia del glucagon se incrementa de manera importante como consecuencia de esta interacción, al igual que ocurre en el caso de preS(120-145).

Para el caso de preS(120-145), la interacción con liposomas de DPPC en estado de gel puede ser del mismo tipo, es decir una interacción de caracter superficial. En este caso, la membrana induce en el péptido estructuras secundarias anfipáticas de tipo β (hoja β y giro β) o hélice α , y en esta conformación el péptido se dispone paralelo a la superficie de la bicapa, reduciendo la movilidad de las cadenas de ácido graso de las moléculas de fosfolípido situadas a su alrededor y con las regiones apolares penetrando en el interior apolar, como se deduce del incremento de fluorescencia y del *blue shift* del triptófano, pero no de manera profunda, y todo ello sin afectar significativamente la orientación de las cabezas polares de colina. Una posibilidad, apoyada por los estudios de interacción con monocapas lipídicas, es que el péptido presente dos regiones con estructura en hoja β capaces de penetrar por la cara hidrófoba en el interior apolar de la bicapa, unidas por un giro β , que quedaría en el exterior.

En este modelo de interacción hay un punto que parece contradictorio, ya que el péptido es capaz de modificar la fluidez del liposoma en el interior apolar sin alterar la de las cabezas polares de fosfolípido, sin embargo hay que tener en cuenta que la despolarización del ANS es menos sensible a las interacciones que la del DPH, ya que desde el inicio del experimento, es decir alrededor de 18 °C, la movilidad de la zona polar es superior a la de las cadenas de ácidos grasos, lo que se traduce en una menor polarización para la primera. Esto hace que pequeñas variaciones de polarización en presencia del péptido puedan pasar desapercibidas.

6. INTERACCION DE LOS LIPOPEPTIDOS ESTEAROIL-preS(120-145), COLANOIL-preS(120-145) Y PAM₃CSS-preS(120-145) CON MODELOS DE MEMBRANA

A pesar de la elevada inmunogenicidad encontrada para preS(120-145), los péptidos sintéticos siempre inducen respuestas inmunes considerablemente inferiores a las obtenidas con la proteína completa o el virus intacto (Neurath et al., 1984b). Por este motivo se utilizan inmunoadyuvantes, como los liposomas, que son capaces de incrementar el carácter inmunogénico de un péptido que se encuentre encapsulado o unido covalentemente a ellos y sin embargo no son inmunogénicos por si mismos (Gregoriadis, 1990). Los tres lipopéptidos derivados de preS(120-145) se sintetizaron con la finalidad de incrementar el carácter hidrófobo del mismo y facilitar así su incorporación en liposomas, aumentando de esta manera su inmunogenicidad.

6.1. INTERACCION DE ESTEAROIL-preS(120-145) CON MODELOS DE MEMBRANA

La incorporación de un ácido graso como elemento de conjugación de un antígeno ha sido utilizada con éxito con péptidos de la proteína S de HBV (Woods, 1984). Por este motivo, además del ya comentado de incrementar el carácter hidrofóbico del péptido, se incorporó una molécula de ácido esteárico a preS(120-145) (Rabanal et al. 1991).

Estearoil-preS(120-145) tiene un efecto mucho más importante que el péptido original en la fluidez y en el comportamiento de transición de fase de los liposomas DPPC-SUV. En presencia del lipopéptido, la T_c se incrementa unos 2°C, al mismo tiempo que disminuye la libertad de movimiento de las moléculas de ácidos grasos del liposoma, tanto en estado de gel como de cristal líquido (figura 70). Este efecto de disminución de la fluidez va acompañado de un incremento en la cooperatividad del proceso de transición. Por otra parte, también se modifica en el mismo sentido la fluidez a nivel de la superficie polar del liposoma (figura 71). Estos resultados pueden interpretarse como la formación de dominios de moléculas de fosfolípido de movilidad restringida alrededor de las moléculas de lipopéptido

insertado.

Es interesante destacar que, mientras que como hemos visto en el apartado anterior, preS(120-145) no modifica de manera significativa la fluidez de los liposomas a nivel de superficie polar, se derivado con ácido esteárico, de caracter marcadamente más apolar, sí interacciona, provocando una rigidificación de las moléculas de fosfolípido en la región determinada por las cabezas polares. Esto puede ser debido a que en este último caso lo que realmente estemos observando sea la superposición de dos fenómenos, ya que el ANS que se encuentra unido al liposoma podría interaccionar también con el lipopéptido por la parte correspondiente al ácido esteárico.

Estos datos indican una penetración del lipopéptido en el interior de la bicapa lipídica. Sin embargo, al igual que ocurre con preS(120-145), esta penetración no va acompañada de una desestabilización importante de la estructura del liposoma, ya que como se observa en la figura 77, para una relación molar DPPC/estearoil-preS(120-145) de 44:1 se observa la liberación de menos del 10% de CF en liposomas de DPPC, liberación que probablemente sea debida a defectos transitorios producidos en la primeras etapas de la interacción.

En lo que se refiere a la capacidad de formar monocapas, el lipopéptido extendido sobre PBS forma isothermas muy estables en estado líquido expandido a presiones inferiores a $20 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$; a $22 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ se produce una transición de fase, mientras que a presiones más elevadas la isoterma adopta el estado sólido (fig. 78). El área molecular determinada a $30 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ es superior a la correspondiente al péptido original. El área ocupada por molécula es de 2.54 nm^2 ; teniendo en cuenta los estudios de Fidelio et al (1986), y sabiendo que el área ocupada por la sección de una hélice α es de 1.6 nm^2 , y la ocupada por la sección de una hoja β de $0.7 \text{ nm}^2 \cdot \text{molec}^{-1}$, es decir 2.3 nm^2 entre las dos estructuras, podemos considerar la existencia, además, de un giro en el punto de unión entre el primer aminoácido del péptido (M^{120}) y la cadena alquílica de ácido esteárico. A este giro le correspondería un área de 0.18 nm^2 (correspondiente a la sección transversal de la cadena alquílica), valor que sumado a los 2.3 nm^2 anteriores coincide con el área por molécula calculada experimentalmente.

Las isothermas mixtas del lipopéptido estearoil-preS(120-145) con DPPC presentan un

comportamiento ideal (figura 83). Según se indica en la tabla 28, ΔG_M^E en valor absoluto no es significativamente diferente que RT (591.3 cal.mol⁻¹ a 25°C), indicativo de una mezcla ideal o bien de una total separación de fases. El hecho de que en las isotermas de diferentes proporciones molares péptido/lípido, la miscibilidad fuese prácticamente ideal, sugiere que la presencia de DPPC no modifica de manera importante la estructura del péptido, posiblemente debido a que éste ya habría adoptado una estructura secundaria definida al ser depositado en la interfase a partir de una solución orgánica, estructura que se haría más estable al ir incrementado la presión superficial, tal como ocurría con preS(120-145).

Al inyectar el lipopéptido bajo una monocapa de DPPC extendida sobre PBS, éste penetra en la monocapa, incrementando el área ocupada por molécula. Esta expansión de la monocapa disminuye al aumentar la presión, llegando casi a anularse a presiones elevadas (50 mN.m⁻¹). Este comportamiento no puede explicarse como una solubilización del lipopéptido, ya que, como se ha visto anteriormente, éste forma monocapas muy estables, sino a que a estas elevadas presiones forma monocapas mixtas más estables que las correspondientes a cada uno de los componentes.

Teniendo en cuenta los resultados de interacción con liposomas y de penetración en monocapas, podría proponerse el siguiente modelo de interacción: estearoil-preS(120-145) penetraría en la bicapa lipídica sin desestabilizarla; probablemente la cadena de ácido esteárico, debido a su marcado carácter hidrófobo, penetraría más profundamente en el interior apolar de la bicapa o monocapa, disponiéndose paralelamente a las cadenas de ácido palmítico y favoreciendo el empaquetamiento de las mismas. Por otra parte, el fragmento peptídico adoptaría una estructura secundaria anfipática de tipo hélice α y hoja β , y interaccionaría a nivel de superficie polar, aunque podría penetrar parcialmente en el interior hidrófobo. Este tipo de interacción también fue descrita por Rafalski et al (1990) para una serie de péptidos de 23 aminoácidos pertenecientes a la proteína de superficie gp41 de HIV (Rafalski et al., 1990); según estos autores, las secuencias con estructura de hélice α se insertaban en el interior hidrófobo de las bicapas, mientras que las secuencias de estructura en hoja β interaccionaban con la superficie polar. Sin embargo, la penetración del segmento con estructura helicoidal en el interior de la bicapa no podría ser muy importante, ya que esto produciría una fuerte desestabilización del liposoma (Epand et al., 1985; Mc Lean et al.,

1991a y 1991b), cosa que no ocurre con estearoil-preS(120-145).

6.2. INTERACCION DE COLANOIL-preS(120-145) CON MODELOS DE MEMBRANA

El ácido colánico es un producto natural estructuralmente muy similar al colesterol que es compatible con la metodología de síntesis SPPS. El colesterol estabiliza las bicapas lipídicas, haciéndolas más resistentes al ataque de las lipoproteínas de alta densidad presentes en el plasma. De esta manera, la vida media de los liposomas administrados *in vivo* aumenta, facilitando así que el antígeno encapsulado pueda alcanzar los macrófagos del RES.

La incorporación de colanoil-preS(120-145) a liposomas DPPC-SUV tiene un efecto rigidificante en la superficie de la membrana, como se desprende del incremento de la polarización del ANS (fig. 73), así como en el interior hidrófobo de la misma, tal como se observa en los estudios de despolarización del DPH (fig. 72); este efecto es significativo a temperaturas comprendidas entre unos 10°C inferiores a la T_c y aproximadamente 5°C superiores. Como en el caso del estearoil derivado, también aquí puede ocurrir una interacción entre el ANS, marcador fluorescente situado en la superficie polar del liposoma, y la fracción lipídica del lipopéptido, lo que explicaría el incremento de polarización del ANS que no ocurría con el péptido original, a pesar de ser marcadamente más polar.

Como consecuencia de esta interacción, la T_c se incrementa algo más de 1 °C respecto a la de los liposomas puros de DPPC, y la transición se produce en un intervalo más estrecho de temperaturas, como ocurría en el estearoil derivado. También en este caso, estos cambios en la fluidez del liposoma pueden explicarse por la formación de dominios lipídicos ricos en lipopéptido y dominios de fosfolípido puro. La zona de separación entre ambos dominios podría actuar como un canal para la liberación de CF, liberación que, como se observa en la figura 77, se produce de manera gradual. Según Nan et al. (1989), una salida inicial y brusca de CF, con posterior estabilización, sería debida a perturbaciones de carácter transitorio producidos en las primeras fases de la interacción, mientras que una salida gradual de CF se debería a la formación de defectos de membrana o *cracks* (Jain et al., 1982).

Colanoil-preS(120-145) extendido sobre PBS forma monocapas de características similares a las del estearoil derivado. Teniendo en cuenta el área ocupada por molécula a una presión de 30 mN.m^{-1} , que es de $2.3 \text{ nm}^2.\text{molec}^{-1}$, la estructura adoptada por colanoil-preS(120-145) en la interfase agua-aire, podría estar constituida por una combinación de hélice α y hoja β unidas por un giro β . Los aminoácidos intermedios Arg¹⁶ y Arg¹⁸ actuarían como zonas hidrófilas de unión con la cara acuosa de la interfase. La estructura propuesta se explica teniendo en cuenta que el valor del área ocupada por molécula de lipopéptido coincide aproximadamente con la suma de la sección de una hélice α (1.6 nm^2) y de una hoja β (0.7 nm^2). Probablemente, ésta sea la conformación con la que el lipopéptido interacciona con las monocapas de DPPC, ya que las isothermas mixtas de ambos componentes a diferentes proporciones molares, presentan un comportamiento casi ideal (fig. 85). Los valores de ΔG_M^E son positivos, indicando que las mezclas son algo menos estables que los componentes puros. La interacción es mayor a 20 mN.m^{-1} que a 10 mN.m^{-1} , comportamiento poco usual, pero que puede ser debido a que a 20 mN.m^{-1} las monocapas mixtas se encuentran alrededor de la transición de fase. Colanoil-preS(120-145) es también capaz de insertarse en una monocapa de DPPC cuando se inyecta el lipopéptido en la subfase, incrementando el área ocupada por molécula respecto a una monocapa pura de DPPC (figura 79).

El modelo de interacción de colanoil-preS(120-145) con DPPC sería muy similar al propuesto para estearoil-preS(120-145), aunque con algunas matizaciones. Al igual que ocurría con el ácido esteárico, la fracción hidrófoba determinada por el ácido colánico penetraría en la región apolar de la bicapa lipídica. Teniendo en cuenta la posición que adopta el colesterol en la bicapa (Introducción, apartado 2.1.), el núcleo esteroideo del colánico se situaría a lo largo de aproximadamente los primeros 10 átomos de carbono de la cadena de ácidos grasos de los fosfolípidos, reduciendo la libertad de movimiento de los mismos; sin embargo, la molécula de colánico se encuentra unida covalentemente a preS(120-145), por lo que en lugar de estar alineada paralelamente a las cadenas de ácido graso en el centro de la bicapa, como ocurría con el colesterol, se encontraría situada en la zona del grupo éster de los fosfolípidos. El péptido adoptaría una estructura secundaria anfipática de tipo hélice α y hoja β , interaccionando a nivel de superficie polar, aunque podría penetrar parcialmente en el interior hidrófobo, de la misma manera que en el derivado del esteárico.

Por otra parte, recordando las propiedades del colesterol, cuando éste forma parte de la bicapa lipídica en proporciones inferiores al 50 mol% no se distribuye homogéneamente, sino que se forman dos fases, una rica en colesterol y otra con una baja proporción de esta molécula. Si este hecho se aplica a colanoil-preS(120-145), permite explicar la formación de defectos de membrana, causantes de la liberación de CF.

6.3. INTERACCION DE Pam₃CSS-preS(120-145) CON MODELOS DE MEMBRANA

La tripalmitoil-glicerilcisteinil-seril-serina (Pam₃CSS) es un compuesto perteneciente al extremo N-terminal de la principal lipoproteína de *Escherichia coli* (lipoproteína de Brawn); este compuesto interviene en los procesos de anclaje a la membrana celular, internalización en el citoplasma y activación de macrófagos. Además, Pam₃CSS es un mitógeno activador de células B y de linfocitos T citotóxicos (Tc) (Deres, 1989; Prass et al., 1987). Gracias a estas propiedades, fragmentos peptídicos unidos covalentemente a Pam₃CSS inducen una potente respuesta inmune sin ir acompañados de un inmunoadyuvante. Un ejemplo es el fragmento 135-154 de la proteína VP1 del virus de la fiebre aftosa (Krug et al., 1989).

A diferencia de lo que ocurría con los anteriores lipopéptidos derivados de preS(120-145), al incorporarse a liposomas unilaminares de DPPC, Pam₃CSS-preS(120-145) no modifica la fluidez de la bicapa en la superficie polar del liposoma (fig. 75). Sin embargo, sí se modifica la fluidez en el interior hidrófobo (fig. 74); Pam₃CSS-preS(120-145) favorece el empaquetamiento de las moléculas de ácidos grasos por encima y por debajo de la Tc, incrementando significativamente esta última temperatura en algo menos de 2°C, sin embargo la transición de gel a cristal líquido tiene lugar en un intervalo de temperaturas aproximadamente igual al de los liposomas puros. Además, la interacción de éste lipopéptido con liposomas de DPPC, así como de DPPC/COL 1:1, transcurre sin que se produzca una ruptura de la estructura de la membrana. No se detecta CF libre en el medio para una relación molar lípido/lipopéptido de 44:1 (figura 77).

Por otra parte, Pam₃CSS-preS(120-145) forma monocapas menos estables que los anteriores lipopéptidos, y sin cambio de fase. El área ocupada por molécula a la presión de 30 mN.m⁻¹

es de $2.3 \text{ nm}^2 \cdot \text{molec}^{-1}$, valor que se podría considerar como una estructura secundaria combinación de hélice α y hoja β , al igual que en el derivado de ácido colánico, siempre según las indicaciones de Fidelio et al (1986). Al comparar estos resultados con los descritos por Grass (1987) para lipopéptidos derivados de Pam₃CSS, se observa que Pam₃CSS-preS(120-145) forma monocapas más expandidas; estas diferencias son debidas a que los fragmentos peptídicos estudiados por estos autores constan de un número muy reducido de aminoácidos, por lo que no pueden adoptar una estructura secundaria estable.

En lo que se refiere a las monocapas mixtas de DPPC con este lipopéptido, se observa un comportamiento prácticamente ideal (figura 87); la incorporación de Pam₃CSS-preS(120-145) expande las monocapas de DPPC; la energía libre en exceso de la mezcla (ΔG_M^E) tiene siempre un valor positivo, indicando que las mezclas son algo menos estables que los componentes puros. En la isoterma correspondiente a una relación molar DPPC/lipopéptido 0.8:0.2, se observa una desviación positiva de la idealidad bastante importante, que podría indicar la existencia de separación lateral de fases entre los componentes de la monocapa; sin embargo, este efecto únicamente es visible a presiones superficiales bajas, en las que la monocapa se encuentra en estado fluido ($5 \text{ y } 10 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$); a mayores presiones superficiales no se observan desviaciones de la linealidad, indicando o bien una mezcla ideal de ambos componentes, o bien una total separación de fases (Prass et al., 1987). Al inyectar este lipopéptido bajo una monocapa de DPPC, no se observa penetración (fig. 79). Esta falta de interacción no es esperable, dado el carácter marcadamente hidrofóbico del derivado. Sin embargo, durante el proceso de síntesis y purificación, esta molécula proporciona tiempos de retención en el análisis por HPLC muy inferiores a lo esperado atendiendo a su composición química. Una explicación posible a este comportamiento puede ser la tendencia a formar agregados distintos de mono o bicapas. De este modo, se vería reducida la cantidad de péptido libre en solución, capaz de interaccionar con la monocapa lipídica.

Krug et al (1989) unieron el fragmento 135-154 de la proteína VP1 del virus de la fiebre aftosa a Pam₃CSS. Según estos autores, el conjugado se unía a la bicapa lipídica con las tres moléculas de ácido graso insertadas en la misma, de manera que el antígeno peptídico, con estructura de hélice α anfipática, quedaría en la parte externa, accesible a las células inmunocompetentes. Teniendo en cuenta la similitud de este conjugado con Pam₃CSS-

preS(120-145) en cuanto a número de aminoácidos (19 y 25 respectivamente), y en cuanto a estructura secundaria de caracter anfipático, puede pensarse en un modelo de interacción similar para ambos lipopéptidos. Como se representa en la figura 98, las tres moléculas de ácido palmítico de la porción Pam₃CSS penetrarían en la región hidrófoba de la bicapa, disponiéndose paralelamente a las moléculas de ácido palmítico del liposoma y favoreciendo el empaquetamiento; la cisteína se situaría en la zona superficial del liposoma, al mismo nivel que el esqueleto de glicerol de las moléculas de DPPC y sin modificar el empaquetamiento de las cabezas polares de fosfatidilcolina. Por último, la fracción peptídica preS(120-145) se dispondría paralela a la superficie de los liposomas, con la cara polar en contacto con el medio externo acuoso y la cara apolar penetrando en el interior de la bicapa de manera poco profunda, al igual que ocurría con preS(120-145).

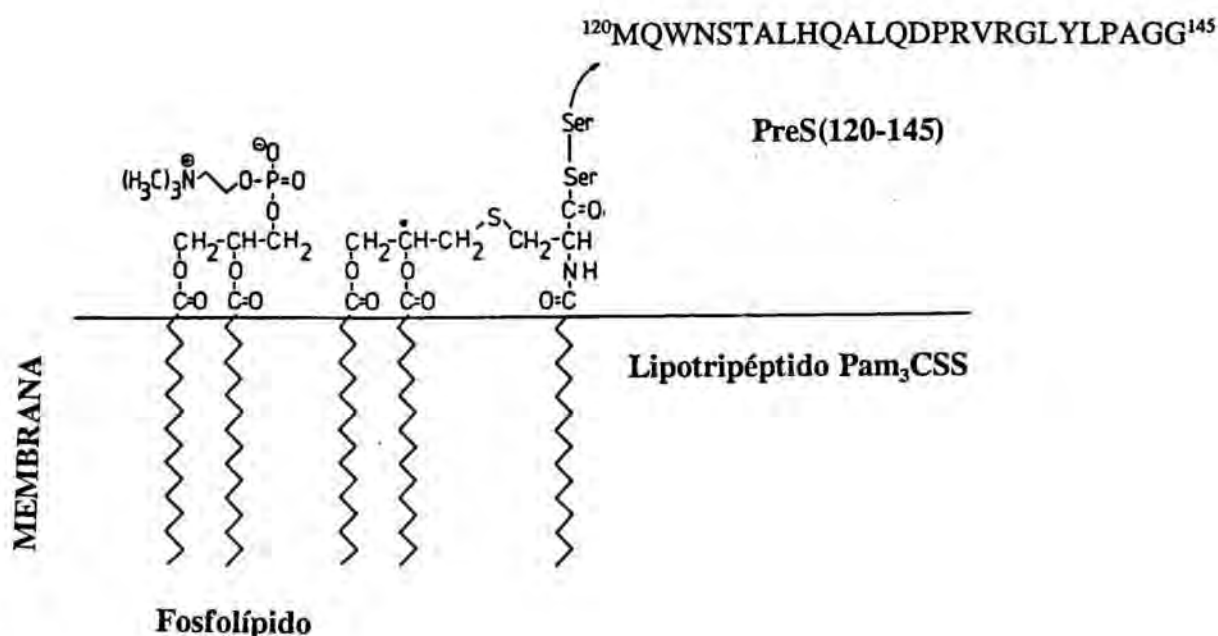


Figura 98: Modelo de interacción del lipopéptido Pam₃CSS-preS(120-145) con una membrana lipídica de DPPC (adaptado de Krug et al, 1989).

CONCLUSIONES

1) En los experimentos de seguimiento de la fluorescencia intrínseca de péptidos y proteínas en presencia de lípidos, los valores de fluorescencia obtenidos han sido corregidos de los efectos de dilución, dispersión de la luz y filtro interno. La validez de estas correcciones ha sido comprobada empleando N-acetil-triptofanamida y N-acetil-tirosinamida como patrones.

2) Se han optimizado las condiciones de obtención de liposomas DPPC-SUV marcados con DPH y con ANS. Determinando la despolarización de estos liposomas al incrementar la temperatura y en presencia de los distintos péptidos, se ha podido conocer la influencia de los mismos en la fluidez de las bicapas diferenciando entre zona polar y apolar. Mediante ajustes matemáticos por regresión no lineal se ha determinado la T_c en cada caso, así como la amplitud del proceso de transición de fase.

3) Interacción de la somatostatina con modelos de membrana:

3.1) En solución acuosa, SRIF presenta un cierto grado de estructuración, predominando la estructura de giro β .

3.2) En presencia de liposomas DPPC-SUV en estado de gel, SRIF penetra en el interior apolar de la bicapa, causando una disminución de la fluidez de las cadenas de los ácidos grasos y un incremento de la T_c . La conformación más probable adoptada por el péptido unido a la bicapa está constituida por un giro β que posibilita la formación de una estructura de hoja β antiparalela, en la que se incluyen los aminoácidos aromáticos, y que es la que penetra en el interior de la bicapa, y un extremo hidrófilo donde se sitúan los aa Ala, Gly y el puente disulfuro.

3.3) En TFE se pone de manifiesto más claramente que la interacción de SRIF transcurre con un incremento de la estructura de hoja β .

3.4) La hormona no interacciona con liposomas DPPC-SUV en estado de cristal-líquido.

3.5) La unión de SRIF no causa una desestabilización de las bicapas.

3.6) La interacción es de naturaleza hidrofóbica, tanto si se emplean liposomas o monocapas como modelo de membrana.

3.7) Las monocapas mixtas SRIF/DPPC presentan un comportamiento ideal.

4) Interacción de LHRH con modelos de membrana:

4.1) Debido a la alternancia de aa polares y apolares, LHRH adopta una estructura secundaria en hoja β que le confiere gran tendencia a la formación de dímeros, por lo que la intensidad de fluorescencia disminuye a causa de la interacción Trp-Trp.

4.2) En presencia de liposomas en estado de gel, estos dímeros formados por las moléculas de LHRH recubren las vesículas causando su agregación.

4.3) Al no penetrar de manera importante en el interior de los liposomas, LHRH no modifica la fluidez de la bicapa ni la temperatura de transición; asimismo, no causa perturbación alguna en la permeabilidad de los mismos, independientemente de la carga eléctrica de los lípidos.

4.4) Los experimentos de penetración en monocapas de diferentes composiciones lipídicas corroboran el modelo de interacción propuesto, mostrando la escasa inserción de LHRH independientemente de la carga eléctrica de los lípidos, sobre todo a $\pi_1=20$ mN.m⁻¹, presión equivalente a la de los liposomas.

5) Interacción de GHRH(1-29) con modelos de membrana:

5.1) En solución acuosa, GHRH(1-29) se encuentra mayoritariamente desestructurada; sin embargo, la predicción de estructura secundaria muestra una elevada tendencia a formar hélice α ; por otra parte, la hormona presenta una importante tendencia a formar estructuras de carácter anfipático.

5.2) GHRH(1-29) interacciona con liposomas DPPC-SUV en estado de gel, adoptando una estructura de hélice α que penetra perpendicularmente a la superficie de la bicapa, insertándose en el interior de la misma por el extremo N-terminal, mientras que el C-terminal interacciona con las cabezas polares de colina. La interacción es de carácter mayoritariamente hidrofóbico, como se deduce de los experimentos de liberación de CF y de penetración en monocapas, empleando en ambos casos fosfolípidos de diferentes cargas eléctricas. Sin embargo, sí hay una cierta interacción electrostática que estabiliza la hélice α insertada.

5.3) Como consecuencia de la interacción, se produce una disminución de la fluidez del liposoma tanto en la zona delimitada por las cadenas de ácidos grasos como en la que determinan las cabezas polares de los fosfolípidos. La T_c se incrementa 2°C y el proceso de transición se hace más cooperativo.

5.4) Al penetrar en las vesículas, la hormona provoca la rotura de la estructura vesicular, formándose micelas mixtas que conservan la estructura básica en bicapa.

6) Interacción de hGH con modelos de membrana:

6.1) En presencia de liposomas DPPC-SUV en estado de gel y en TFE, hGH adopta una estructura predominante de hélice α . La hormona no penetra de manera profunda en el interior de las bicapas lipídicas, de manera que no altera la fluidez en el interior de las mismas, pero sí tiene un efecto rigidificante en la superficie polar. Las zonas de anclaje de la hormona a la superficie lipídica serían las correspondientes a giros β .

6.2) La interacción es de carácter hidrófobo y transcurre sin que se altere la permeabilidad de los liposomas.

6.3) hGH no forma monocapas en la interfase agua-aire, pero es capaz de penetrar de manera importante en monocapas lipídicas de diferentes composiciones. Además, provoca la expansión de una monocapa de DPPC extendida en la interfase aire-agua cuando se inyecta bajo la misma.

7) Interacción de preS(120-145) con modelos de membrana:

7.1) En solución acuosa, preS(120-145) presenta una estructura secundaria mayoritariamente β y aperiódica.

7.2) El péptido forma isotermas no muy estables. El área ocupada por molécula a una presión equivalente a las de los liposomas es consistente con una estructura secundaria de hélice α o bien dos hojas β antiparalelas unidas por un giro β , formando un *loop*.

7.3) Al interaccionar con liposomas DPPC-SUV en estado de gel, el péptido adopta una estructura secundaria anfipática combinación de hélice α y hoja β . La tendencia a formar hélice α se pone de manifiesto con más fuerza en TFE. Al penetrar en el interior de la bicapa, preS(120-145) causa una disminución de la fluidez de las moléculas de fosfolípido en la zona determinada por las colas hidrófobas de los ácidos grasos, incrementando la T_c y la cooperatividad de la transición.

7.4) preS(120-145) no desestabiliza las vesículas, ya que no se libera CF encapsulada de manera importante. Además, provoca una expansión poco importante

del área ocupada por molécula al ser inyectado en bajo una monocapa de DPPC. Esto da idea de una penetración poco profunda en las bicapas.

7.5) preS(120-145) no penetra en liposomas de DPPC a una temperatura superior a la T_c .

8) Interacción de estearoil-preS(120-145) con modelos de membrana:

8.1) En presencia de estearoil-preS(120-145), disminuye la fluidez de los liposomas DPPC-SUV tanto en la región polar como en el interior apolar de las bicapas. La T_c y la cooperatividad de la transición se incrementan significativamente.

8.2) Esta penetración no va acompañada de una ruptura de la estructura vesicular.

8.3) El lipopéptido forma monocapas muy estables en la interfase aire/agua. Las isotermas mixtas con DPPC muestran un comportamiento ideal, sugiriendo que la estructura secundaria del lipopéptido no se modifica sustancialmente en presencia de la DPPC.

9) Interacción de colanoil-preS(120-145) con modelos de membrana:

9.1) La incorporación de colanoil-preS(120-145) a liposomas DPPC-SUV tiene un efecto rigidificante en la superficie y en el interior hidrófobo de la membrana. Además, se produce un incremento de la T_c y la transición tiene lugar en un intervalo más estrecho de temperaturas.

9.2) Como resultado de la interacción, se forman defectos de membrana en las bicapas.

9.3) Colanoil-preS(120-145) forma monocapas estables en las que la fracción peptídica, a la presión de 30 mN.m^{-1} , adopta estructura secundaria de hélice α y hoja β unidas por un giro β . Probablemente esta conformación se mantiene en las monocapas mixtas con DPPC.

10) Interacción de Pam₃CSS-preS(120-145) con modelos de membrana:

10.1) Al interaccionar con liposomas DPPC-SUV, Pam₃CSS-preS(120-145) causa una disminución de la movilidad de las colas de los ácidos grasos, incrementando la T_c pero sin alterar el intervalo de temperaturas en que tiene lugar la transición. Probablemente, las tres cadenas de ácido palmítico penetran en la bicapa,

disponiéndose paralelamente a las moléculas de ácido palmítico del liposoma.

10.2) No se detecta salida de CF encapsulada en liposomas en presencia del lipopéptido.

10.3) Las monocapas formadas por Pam₃CSS-preS(120-145) en la interfase aire/agua son menos estables que las de los anteriores lipopéptidos. Las monocapas mixtas con DPPC tienen tendencia a ser menos estables que las correspondientes a los componentes puros. Por otra parte, el lipopéptido no penetra en una monocapa de DPPC al ser inyectado en la subfase. Este comportamiento sugiere la formación de agregados capaces de reducir la concentración de lipopéptido en solución.

BIBLIOGRAFIA

- Abergel, Ch, Loret, E. y Claverie, J.M.: Conformational analysis of T immunogenic peptides by circular dichroism spectroscopy. *Eur. J. Immunol.*, **19**: 1969-1972 (1989)
- Reig, F., Busquets, M. A., Haro, I., Rabanal, F. y Alsina, M. A.: Interaction of opiate molecules with lipid monolayers and liposomes. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **81**(5): 1-5 (1992)
- Araiso, T. y Koyama, T.: A picosecond fluorescence study of the cone angle of the wobbling motion of rod-like fluorophore in lipid bilayers. *Chemistry and Physics of Lipids*, **50**: 105-108 (1989).
- Bach, D., Vinkler, Ch., Miller, I. R. y Caplan, S. R.: Interaction of furosemide with lipid membranes. *J. Membrane Biol.* **101**: 103-111 (1988).
- Badley, R. A.: Fluorescent probing of biological membranes. En *Modern Fluorescence Spectroscopy*, Vol. 2, pp. 129-158, Ed. Wehry, E. L., Plenum Press, New York (1976).
- Bailey, P. D.: The structure of LHRH. En *An Introduction to Peptide Chemistry*, capítulo 7, pp. 152-166. Ed. Wiley, J. & Sons, Chichester, England (1990).
- Bayliss, W. M. y Starling, E. H.: On the causation of the so-called "peripheral reflex secretion" of the pancreas. *Proc. R. Soc. Lond. (Biol.)*, **69**: 352-353 (1902).
- Bangham, A. D. y Horne, R. W.: Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *J. Mol. Biol.*, **8**: 660-668 (1964).
- Bangham, A. D., Standish, M. M. y Miller, N.: Cation permeability of phospholipid model membranes: effects of narcotics. *Nature*, **208**: 1295-1297 (1965).
- Bangham, A. D., Hill, M. W. y Miller, N. G. A.: Preparation and use of liposomes as models of biological membranes. En *Methods in Membrane Biology*, Vol. I: pp. 1-68. Korn, E. D. Ed. New York: Plenum Press (1974).
- Barenholz, Y., Amselem, S. y Lichtenberg, D.: A new method for preparation of phospholipid vesicles (liposomes). French Press. *FEBS Lett.*, **99**: 210-214 (1979).
- Barlett, G. R. J.: Phosphorous assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.*, **234**: 466-468 (1959).
- Bashford, L., Morgan, Ch. G. y Radda, G. K.: Measurement and interpretation of fluorescence polarisations in phospholipid dispersions. *Biochim. Biophys. Acta*, **426**: 157-172. (1976).
- Bashford, C. L.: An introduction to spectrophotometry and fluorescence spectrometry. En *Spectrophotometry & Spectrofluorimetry, a practical approach*, pp. 1-22. Ed. Harris, D. A. & Bashford, C. L., IRL Press, Oxford (1987)

- Batzri, S. y Korn, E. D.: Single bilayer liposomes prepared without sonication. *Biochim. Biophys. Acta*, **298**: 1015-1019 (1973).
- Beschiaschvili, G. y Seelig, J.: Peptide binding to lipid membranes. Spectroscopic studies on the insertion of a cyclic somatostatin analog into phospholipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta*, **1061**: 78-84 (1991).
- Brazeau, P., Vale, W., Burgus, R., Ling, N., Butcher, M., Rivier, J. y Guillemin, R.: Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science*, **179**: 77-79 (1973).
- Brems, D. N.; Brown, P. L. y Becker, G. W.: Equilibrium denaturation of human growth hormone and its cysteine-modified forms. *The Journal of Biological Chemistry*, **265**(10): 5504-5511 (1990).
- Brunner, J., Skrabal, P. y Hauser, H.: Single bilayer vesicles prepared without sonication. Physico-chemical properties. *Biochim. Biophys. Acta*, **455**: 322-331 (1976).
- Cabiaux, V., Goormaghtigh, E., Wattiez, R., Falmagne, P. y Ruyschaert, J-M. Secondary structure changes of diphtheria toxin interacting with asolectin liposomes: an infrared spectroscopy study. *Biochimie*, **71**: 153-158 (1989).
- Cetel, N. S., Rivier, J., Vale, W. y Yen, S. S. C.: The dynamics of gonadotropin inhibition in women induced by an antagonistic analog of gonadotropin-releasing hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **57**: 52 (1983).
- Cowgill, R. W.: Fluorescence and protein structure. X. Reappraisal of solvent and structural effects. *Biochem. Biophys. Acta*, **133**: 6-18 (1967).
- Cserhati, T. y Szögyi, M.: Interactions of phospholipids with proteins, peptides and aminoacids. New advances 1987-1989. *Int. J. Biochem.*, **23** (2): 131-145 (1991).
- Cullis, P. R. y De Kruijff, B.: Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, **559**: 399-420 (1979).
- Chapman, D.: Phase transitions and fluidity characteristics of lipids and cell membranes. *Q. Rev. Biophys.*, **8**: 185-235 (1975).
- Charrier, J. y Martal, J.: Growth hormones. 1. Polymorphism. (Minireview). *Reprod. Nutr. Dévelop.*, **28**(4A): 857-887 (1988).
- Chen, R. F.: Fluorescence of proteins and peptides. En *Practical Fluorescence*, ed. Guilbault, G. G., Marcel Dekker, Inc., New York (1990).
- Chou, P. Y. y Fasman, G. D.: Empirical predictions of protein conformation. *Ann. Rev. Biochem.*, **47**: 251-276 (1978).

- De Kroon, A. I., Soekarjo, M. W., De Gier, J. y De Kruijff, B.: The role and hydrophobicity in peptide-lipid interaction: a comparative study based on tryptophan fluorescence measurements combined with the use of aqueous and hydrophobic quenchers. *Biochemistry*, **29**: 8229-8240 (1990).
- Deamer, D. y Bangham, A. D.: Large volume liposomes by an ether vaporization method. *Biochim. Biophys. Acta*, **443**: 629-634 (1976).
- De Lisi y Berzofsky, J. A.: T-cell antigenic sites tend to be amphipathic structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 7048-7052 (1985).
- Deres, K., Schild, H., Weismüller, K. H., Jung, G. y Rammensee, H. G.: *In vivo* priming of virus-specific cytotoxic T lymphocytes with synthetic lipopeptide vaccine. *Nature*, **342**: 561-564 (1989).
- Dervichian, D. G.: A new technique for the spreading of proteins and the spreading number. *Nature*, **144**: 629-630 (1939).
- Deshpande, S. S. y Damodaran, S.: Conformational characteristics of legume 7S globulins as revealed by circular dichroic, derivative u.v. absorption and fluorescence techniques. *Int. J. Peptide Protein Res.*, **35**: 25-34 (1990).
- Devaux, H.: Oil films on water and Hg. *J. Phys.* **2**: 699-734 (1912).
- Dohlman, H. G., Caron, M. G., Stader, C. D., Amlaiky, N., Lefkowitz, R. J.: Identification and sequence of a binding site peptide of the beta-2-adrenergic receptor. *Biochemistry*, **27**: 1813-1817 (1988).
- Dufourq, J., Faucon, J. F., Maget-Dana, R., Pileni, M. P. y Helene, C.: A fluorescence study of the binding of oligopeptides containing aromatic and basic residues to phospholipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, **649**: 67-75 (1981).
- Dyson, H. J., Satterthwait, A. C., Lerner, R. A. y Wright, P. E.: Conformational preferences of synthetic peptides derived from the immunodominant site of the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* by ^1H NMR. *Biochemistry*, **29**: 7828-7837 (1990).
- Epand, R. M., Epand, R. F., Orlowski, R. C., Schlueter, R. J., Boni, L. T. y Hui, S. W.: Amphipathic helix and its relationship to the interaction of calcitonin with phospholipids. *Biochemistry*, **22**: 5074-5084 (1983).
- Epand, R. M., Epand, R. F., Hui, S. W., He, N. B. y Rosenblatt, M.: Formation of water-soluble complex between the 1-34 fragment of parathyroid hormone and dimyristoylphosphatidylcholine. *Int. J. Peptide Protein Res.*, **25**: 594-600 (1985).
- Fauchère, J. L., Charton, M., Kier, L. B., Verloop, A. y Pliska, V.: Amino-acid side chain parameters for correlation studies in biology and pharmacology. *Int. J. Peptide Protein Res.*, **32**: 269-278 (1988).

- Fidelio, G. D., Austen, B. M., Chapman, D. y Lucy, J. A.: Properties of signal-sequence peptides at an air-water interface. *Biochem. J.*, **238**: 301-304 (1986).
- Forge, A., Knowles, P. F. y Marsh, D.: Morphology of egg phosphatidylcholine-cholesterol single-bilayer vesicles, studied by freeze-tech electron microscopy. *J. Membr. Biol.*, **41**: 249-263 (1978).
- Frenette, M., Knibiehler, M., Baty, D., Géli, V., Pattus, F., Verger, R. y Lazdunski, C.: Interactions of colicin A domains with phospholipid monolayers and liposomes: relevance to the mechanism of action. *Biochemistry* **28**(6), 2509-2514 (1989).
- Fry, D. W., White, C. y Goldman, D. J.: Rapid separation of low molecular weight solutes from liposomes without dilution. *Anal. Biochem.*, **90**: 809-815 (1978).
- Fujisawa, S., Kadoma, Y. y Komoda, Y.: ^1H and ^{13}C NMR studies of the interaction of eugenol, phenol, and triethyleneglycol dimethacrylate with phospholipid liposomes as a model system for odontoblast membranes. *J. Dent. Res.* **67**(11): 1438-1441 (1988).
- Gaines, G. L.: The properties of liquid surfaces. En *Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces*, pp. 24-25. Ed. Interscience Publishers. Library of Congress Catalog Card Number 65-26218. USA (1966).
- Gasset, M., Martinez, A., Oñaderra, M. y Gavilanes, J.: Study of the interaction between the antitumour protein α -sarcin and phospholipid vesicles. *Biochem. J.*, **258**: 569-575 (1989).
- Gavilanes, F., Gomez-Gutierrez, J., Aracil, M., Gonzalez-Ros, J. M., Farregut, J. A., Guerrero, E. y Peterson, D. L.: Hepatitis B surface antigen. Role of lipids in maintaining the structural and antigenic properties of protein components. *Biochem. J.*, **265**: 857-864 (1990).
- Gavilanes, J., Lizarbe, M. A., Munico, A. M. y Oñaderra, M.: Interaction of dipalmitoyl-phosphatidylcholine with calf-thymus histones H1. *Int. J. Peptide Protein Res.* **26**: 187-194 (1985).
- Geiger, R. y König, W.: Configurational Modification of peptide hormones. En *Chirality and Biological Activity*, Capítulo 21, pp. 229-236. Alan R. Liss, Inc. (1990).
- Goodrich, F. C. *Proceedings of the 11th International Congress on Surface Activity*, Butterworths, London 85 (1957).
- Gras-Masse, H., Jolivet, M., Drobercq, H., Aubert, J. P., Beachey, E. H., Audibert, F., Chedid, L. y Tartar, A.: Influence of helical organization on immunogenicity and antigenicity of synthetic peptides. *Molecular Immunology*, **25**(7): 673-678 (1988).
- Gregoriadis, G., da Silva, H. y Florence, A. T.: A procedure for the efficient entrapment of drugs in dehydration-rehydration liposomes (DRVs). *International Journal of Pharmaceutics*, **65**: 235-242 (1990).

- Gregoriadis, G.: Immunological adjuvants: a role for liposomes. *Immunology Today*, **11** (3): 89-97 (1990).
- Gremlich, H. U., Fringeli, U. P. y , R. Schwyzer: Conformational changes of Adrenocorticotropin peptides upon interaction with lipid membranes revealed by infrared attenuated total reflection spectroscopy. *Biochemistry*, **22**: 4257-4264 (1983).
- Gröningsson, K. y Abrahamsson, M.: Somatostatin. En *CRC Handbook of HPLC for the Separation of Amino Acids, Peptides and Proteins*, Vol. II, pp. 221-245 (1984).
- Guillemin, R., Brazeau, P., Böhlen, P., Esch, F., Ling, N. y Wehrenberg, W. B.: Growth hormone-releasing factor from a human pancreatic tumor that caused acromegaly. *Science*, **218**: 586-587 (1982).
- Guo, L. S. S., Radhakrishnan, R. y Redemann, C. T.: Adhesion of positively charged liposomes to mucosal tissues. *Journal of Liposome Research*, **1**: 319-327 (1990).
- Gust, I. D., Burrell, C. J., Coulepis, A. G., Robinson, W. S. y Zuckerman, A. J.: Taxonomic classification of human hepatitis B virus. *Intervirology*, **25**: 14-29 (1986).
- Hanssens, I., Houthuys, C., Herreman, W. y Van Cauwelaert, F. H.: Interaction of α -lactalbumin with dimyristoyl phosphatidylcholine vesicles. I. A microcalorimetric and fluorescence study. *Biochim. Biophys. Acta*, **602**: 539-557 (1980).
- Harano, Y., Ohgaku, S., Hidaka, H., Takatsuki, K. y Shigeta, Y.: Efficacy of combined insulin and somatostatin infusion for the treatment of experimental diabetic ketoacidosis. *Horm. Metab. Res.*, **11**: 338-342 (1979).
- Hauser, H. y Shipley, G. G.: Interactions of monovalent cations with phosphatidylserine bilayer membranes. *Biochemistry*, **22**: 2171-2178 (1983).
- Hauser, H. y Gains, N.: Spontaneous vesiculation of phospholipids: a simple and quick method of forming unilamellar vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 1683-1687 (1982).
- Hitzemann, R. J.: Effect of Ganglioside-G_{M1} on the order of phosphatidylcholine-cholesterol multilamellar liposomes. A fluorescence polarization study. *Chemistry and Physics of Lipids*, **43**: 25-38 (1987).
- Holzman, T. F., Dougherty, J. J., Brems, D. N. y MacKenzie, N. E.: pH-induced conformational states of bovine growth hormone. *Biochemistry*, **29**: 1255-1261 (1990).
- Holladay, L. A. y Puett, D.: Somatostatin conformation: evidence for a stable intramolecular structure from circular dichroism, diffusion, and sedimentation equilibrium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**(4): 1199-1202 (1976).
- Hopp, T. P. y Woods, K. R.: Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**: 3824-3828 (1981).

- Houbre, D., Schindler, P., Trifileff, E., Luu, B. y Duportail, G.: Selectivity of lipid-protein interaction with myelin proteolipids PLP and DM-20. A fluorescence anisotropy study. *Biochim. Biophys. Acta*, **1029**: 136-142 (1990).
- Huang, C. H.: Studies on phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics. *Biochemistry*, **8**: 344-352 (1969).
- Jacobs, R. E. y White, S. H.: The nature of the hydrophobic binding of small peptides at the bilayer interface: Implications for the insertion of transbilayer helices. *Biochemistry*, **28**: 3421-3437 (1989).
- Jain, M. K., Rogers, J., Simpson, L. y Gierasch, L.: Effect of tryptophan derivatives on the phase properties of bilayers. *Biochim. Biophys. Acta*, **816**: 153-162 (1985).
- Jain, M. K., Egmond, M. R., Verheij, H. M., Apitz-Castro, R., Dijkman, R. y De Haas, G.: Interaction of phospholipase A2 and phospholipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta*, **688**: 341-348 (1982).
- Johnson, S. M. y Buttress, N.: The osmotic insensitivity of sonicated liposomes and the density of phospholipid-cholesterol mixtures. *Biochim. Biophys. Acta*, **307**: 20-26 (1973).
- Jonas A. y Mason, W. R.: Interactions of dipalmitoyl- and dimyristoylphosphatidylcholines and their mixtures with Apolipoprotein A-I. *Biochemistry*, **20**: 3801-3805 (1981).
- Joos, P. y Demel, R. A.: The interaction energies of cholesterol and lecithin in spread mixed monolayers at the air-water interface. *Biochim. Biophys. Acta*, **183**: 447-457 (1969).
- Kagawa, Y. y Racker, E.: Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, **246**: 5477-5487 (1971).
- Kaiser, E. T. y Kézdy, F. J.: Amphiphilic secondary structure: design of peptide hormones. *Science*, **223**: 249-255 (1984).
- Kaiser, E. T. y Kézdy, F. J.: Peptides with affinity for membranes. *Ann. Rev. Biophys. Chem.*, **16**: 561-581 (1987).
- Kaiser, E. T.: Design of amphiphilic peptides. En *Protein Engineering*, Capítulo 17, pp. 193-199. Ed. Alan R. Liss, Inc. (1987).
- Katsu, T., Tasaka, K. y Fujita, Y.: Effect of Compound 48/80 on the phase transition membrane temperature and permeability of liposomal membrane. *Chem. Pharm. Bull.*, **32**(3): 1228-1231 (1984).
- Khoobehi, B., Payman, G. A., McTurnan, W. G., Niesman, M. R. y Magin, R. L.: Externally triggered release of dye and drugs from liposomes into the eye. *Ophthalmology*, **95**: 950-955 (1988).

- Kim, S. y Martin, G. M.: Preparation of cell-size unilamellar liposomes with high captured volume and defined size distribution. *Biochim. Biophys. Acta*, **646**: 1-9 (1981).
- Kimura, S., Erne, D. y R.: Interaction of glucagon with artificial lipid bilayer membranes. *Int. J. Peptide Protein Res.*, **39**: 431-442 (1992).
- Kirby, C. y Gregoriadis, G.: Dehydration-rehydration vesicles: a simple method for high yield drug entrapment in liposomes. *Biotechnology*, **2**: 979-984 (1984).
- Killian, J. A., Keller, R. C. A., Struyvé, M., de Kroon, A. I., Tommassen, J. y de Kruijff, B.: Tryptophan fluorescence study on the interaction of the signal peptide of the *Escherichia coli* outer membrane protein PhoE with model membranes. *Biochemistry* **29**: 8131-8137 (1990).
- Kroon, D. J., Kupferberg, J. P., Kaiser, E. T. y Kézdi, F. J.: Mechanism of lipid-protein interaction in lipoproteins. A synthetic peptide-lecithin vesicle model. *J. Am. Chem. Soc.*, **100**: 5975-5977 (1978).
- Krug, M., Folkers, G., Haas, B., Hess, G., Wiesmüller, K-H., Freund, S. y Jung, G.: Molecular dynamics of the α -helical epitope of a novel synthetic lipopeptide food-and-mouth disease virus vaccine. *Biopolymers*, **28**: 499-512 (1989).
- Kyte, J. y Doolittle, R. F.: A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.*, **157**: 105-132 (1982).
- Joshi, U. M., Kodavanti, P. R. S., Lockard, V. G. y Mehendale, H. M.: Fluorescence studies on binding of amphiphilic drugs to isolated lamellar bodies: relevance to phospholipidosis. *Biochim. Biophys. Acta*, **1004**: 309-320 (1989).
- Lakowicz, J. R.: Protein Fluorescence, En *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Cap. 11, pp. 341-382, Plenum Press, New York (1983a).
- Lakowicz, J. R.: Introduction to fluorescence, En *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Cap. 1, pp. 1-18, Plenum Press, New York (1983b).
- Lakowicz, J. R.: Instrumentation for fluorescence spectroscopy, En *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Cap. 2, pp. 19-49, Plenum Press, New York (1983c).
- Lang, U., Karlaganis, G., Vogel, R. y Schwyzer, R.: Hormone-receptor interactions. Adrenocorticotrophic hormone binding site increase in isolated fat cells by phenoxazones. *Biochemistry*, **13**: 2626-2633 (1974).
- Langmuir, I.: The constitution and fundamental properties of solids and liquids. *J. Amer. Chem. Soc.* **39**: 1848-1906 (1917).
- Lawaczeck, R., Kainosho, M. y Chan, S. I.: The formation and annealing of structural defects in lipid bilayer vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, **443**: 313-330 (1976).

- Lee, S., Mihara, H., Aoyagi, H., Kato, T., Izumiya, N. y Yamasaki, N.: Relationship between antimicrobial activity and amphiphilic property of basic model peptides. *Biochim. Biophys. Acta*, **862**: 211-219 (1986).
- Limberg, B. y Kommerell, B.: Somatostatin after failure of cimetidine for acute bleeding ulcers. *Lancet*, **2**: 764-767 (1979).
- London, E.: A fluorescence-based detergent binding assay for protein hydrophobicity. *Anal. Biochem.*, **154**: 57-63 (1986).
- Marché, P., Montenay-Garestier, T., Hélène, C. y Fromageot, P.: Conformational characteristics of luliberin. Circular dichroism and fluorescence studies. *Biochemistry*, **15**(26): 5730-5737 (1976).
- Martinez del Pozo, A., Gasset, M., Oñaderra, M. y Gavilanes, J. G.: Conformational study of the antitumor protein α -sarcin. *Biochim. Biophys. Acta*, **953**: 280-288 (1988).
- Matsuo, H., Baba, Y., Nair, R. M. G., Arimura, A. y Schally, A. V. y Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed aminoacid sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **43** (6): 1334-1337 (1971).
- Mayer, L. D., Hope, M. J., Cullis, P. R. y Janoff, A. S.: Solute distributions and trapping efficiencies in freeze-thawed multilamellar vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, 1985, **817**: 193-196.
- Mayer, L. D., Hope, M. J., Cullis, P. R.: Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. *Biochim. Biophys. Acta*, 1986, **858**: 161-168.
- Mayhew, E. Lazo, R., Vail, W. J., King, J. y Green, A. M.: Characterization of liposomes prepared using a microemulsifier. *Biochim. Biophys. Acta*, **775**: 169-174 (1984).
- McLean, L. R., Hagaman, K. A., Owen, T. J. y Krstenansky, J. L.: Minimal peptide length for interaction of amphipathic α -helical peptides with phosphatidylcholine liposomes. *Biochemistry*, **30**: 31-37 (1991a).
- McLean, L. R., Hagaman, K. A., Owen, T. J. , Payne, M. H., Davidson, W. S. y Krstenansky, J. L.: Examination of the peptide sequence requirements for lipid-binding. Alternative pathways for promoting the interaction of amphipathic α -helical peptides with phosphatidylcholine. *Biochim. Biophys. Acta*, **1086**: 106-114 (1991b).
- Milhaud, J., Mazerski, J., Bolard, J. y Dufourc, E. J.: Interaction of filipin with dimyristoilphosphatidylcholine membranes studied by ^2H -NMR, circular dichroism, electronic absorption and fluorescence. *Eur. Biophys. J.*, **17**, 151-158 (1989).

- Mollay, C. y Kreil, G.: Fluorometric measurements on the interaction of melittin with lecithin. *Biochim. Biophys. Acta*, **316**: 196-203 (1973)
- Nam, K-Y., Kimura, S., Imanishi, Y. y Fujiki, H.: Distribution of tumor promoters in lipid membranes and changes in membrane structure. *Biophysical Chemistry*, **34**: 43-53 (1989).
- Neurath, A. R., Kent, S. B. H. y Strick, N.: Location and chemical synthesis of a pre-S gene coded immunodominant epitope of hepatitis B virus. *Science*, **224**: 392-395 (1984).
- Neurath, A. R., Kent, S. B. H., Strick, N., Stark, D. y Sprone, P.: Genetic restriction of immune responsiveness to synthetic peptides corresponding to sequences in the preS region of the Hepatitis B virus (HBV) envelope gene. *J. Med. Virol.*, **17**:119-125 (1985)
- New, R. R. C.: Introduction. En *Liposomes, a practical approach*, Ed. New, R. R. C., Capítulo 1, pp. 1-33, IRL Press, Oxford, England (1990a).
- New, R. R. C.: Characterization of liposomes. En *Liposomes, a practical approach*, Ed. New, R. R. C., Capítulo 3, pp. 105-160, IRL Press, Oxford, England (1990b).
- New, R. R. C., Black, C. D. V., Parker, R. J., Puri, A. y Scherphof, G. L.: Liposomes in biological systems. En *Liposomes, a practical approach*, Ed. New, R. R. C., Capítulo 6, pp. 221-251, IRL Press, Oxford, England (1990c).
- Ogasawara, K., Maloy, W. L., Beverly, B. y Schwartz, R. H.: Functional analysis of the antigenic structure of a minor T cell determinant from pigeon cytochrome c. *J. Immunol.*, **142**: 1448 (1989).
- Ojcus, D. M. y Young, J. D. E.: Cytolytic pore-forming proteins and peptides: is there a common structural motif?. *TIBS*, 225-229 (1991)
- Oldfield, E. y Chapman, D.: Dynamics of lipids in membranes. Heterogeneity and the role of cholesterol. *FEBS Lett.*, **23**: 285-297 (1972).
- Olson, F., Hunt, C. A., Szoka, F. C., Vail, W., Mayhew, E. y Papahdjopoulos, D.: Preparation of unilamellar liposomes of intermediate size (0.1-0.2 μm) by a combination of reverse-phase evaporation and extrusion through polycarbonate membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, **601**: 559 (1980).
- Papahadjopoulos, D., Vail, W. J., Jacobson, K. y Poste, G.: Choleate lipid cylinders: formation by fusion of unilamellar lipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, **394**: 483-491 (1975).

Paul, P. K. C., Dauber-Osguthorpe, P., Campbell, M. M. y Osguthorpe, D. J.: A novel β -turn location in an LHRH antagonist: a combined conformational search and molecular dynamics study. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **165**(3): 1051-1058 (1989).

Payne, N. Y., Timmins, P., Ambrose, C. V., Ward, M. W. y Ridgeway, F.: Proliposomes: a novel solution to an old problem. *J. Pharm. Sci.*, **75**: 325-329 (1986).

Petersen, K. G., Zeisel, H. J. y Kerp, L.: The immune response to GHRH, relationship to conformation. *Horm. metabol. Res.*, **21**:427-430 (1989).

Popot, J-L. y Engelman, D. M.: Membrane protein folding and oligomerization: the two-stage model. *Biochemistry*, **29**(17): 4031-4037 (1990).

Prass, W., Ringsdorf, H., Bessler, W., Wiesmüller, K. y Jung, G.: Lipopeptides of the N-terminus of *Escherichia coli* lipoprotein: synthesis, mitogenicity and properties in monolayer experiments. *Biochim. Biophys. Acta*, **900**: 116-128 (1987).

Quickenden, T. J. y Tan, G. K.: Random packing in two dimensions and the structure of monolayers. *J. Colloid. Interf. Sci.*, **48**(3): 382 (1974)

Rabanal, F., Haro, I., Reig, F. y García-Antón, J. M.: Solid phase synthesis of potential antigenic peptides and new lipopeptides of hepatitis B virus. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 945-952 (1991).

Rabanal, F., Haro, I., Reig, F. y García-Antón, J. M.: Continuous-flow solid phase synthesis of antigenic peptides of hepatitis B virus. *Int. J. Pep. Prot. Res.*, **36**: 26 (1990).

Rafalski, M., Lear, J. D. y De Grado, W. F.: Phospholipid interactions of synthetic peptides representing the N-terminus of HIV gp41. *Biochemistry*, **29**: 7917-7922 (1990)

Reddy, R., Zhou, F., Nair, S., Huang, L. y Rouse, B. T.: In vivo cytotoxic T lymphocyte induction with soluble proteins administered in liposomes. *The Journal of Immunology*, **148**: 1545-1589 (1992).

Ries, H. E. y Kinball, W. A.: Proceedings of the 2nd International Congress of Surface Activity, Vol. 1: 75 (1959)

Sargent, D. F. y , R.: Membrane phase as catalyst for peptide-receptor interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 5774-5778 (1986).

Sargent, D. F., Bean, J. W. y Schwyzer R.: Conformation and orientation of regulatory peptides on lipid membranes. Key to the molecular mechanism of receptor selection. *Biophysical Chemistry*, **31**: 183-193 (1988)

Sculier, J. P., Brassine, C., Laduron, C., Delcroix, C. y Hollaert, C.: Phase I study, with pharmacokinetic analysis, of intravenous administration of 6-aminochrysene entrapped in sonicated liposomes in patients with advanced cancer. *Journal of Liposome Research*, **1**: 177-193 (1989).

Schwyzler, R.: Molecular mechanism of opioid receptor selection. *Biochemistry*, **25**: 6335-6342 (1986).

Seelig, J. y MacDonald, P. M.: Phospholipids and proteins in biological membranes. ^2H NMR as a method to study structure, dynamics, and interactions. *Acc. Chem. Res.*, **20**: 221-228 (1987)

Segrest, J. P., De Loof, H., Dohlman, J. G., Brouillette, Ch. G. y Anantharamaiah, G. M.: Amphipathic helix motif: Classes and properties. *PROTEINS: Structure, function and genetics*, **8**: 103-117 (1990).

Senior, J. y Gregoriadis, G.: Stability of small unilamellar liposomes in serum and clearance from the circulation: the effect of the phospholipid and cholesterol components. *Life Sci.*, **30**: 2123-2136 (1982).

Shinitzky, M., Dianoux, A. C., Gitler, C. y Weber, G.: Microviscosity and order in the hydrocarbon region of micelles and membranes determined with fluorescent probes. I. Synthetic micelles. *Biochemistry*, **10**(11): 2106-2112 (1971).

Sikorski, A. F., Michalak, K. y Bobrowska, M.: Interaction of spectrin with phospholipids. Quenching of spectrin intrinsic fluorescence by phospholipid suspensions. *Biochim. Biophys. Acta*, **904**: 55-60 (1987)

Singer, S. J. y Nicolson, G. L.: The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**: 720-731 (1972).

Surewicz, W. K. y Epand, R. M.: Role of peptide structure in lipid-peptide interactions: a fluorescence study of the binding of pentagastrin-related pentapeptides to phospholipid vesicles. *Biochemistry*, **23**: 6072-6077 (1984)

Sutherland, E. W.: Studies on the mechanism of hormone action. *Science*, **177**: 401-408. (1972).

Szoka, S. y Papahadjopoulos, D.: Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **9**: 467-508 (1980a).

Szoka, S., Olson, F., Heath, T., Vail, W., Mayhew, E. y Papahadjopoulos, D.: Preparation of unilamellar liposomes of intermediate size (0.1-0.2 μm) by combination of reverse phase evaporation and extrusion through polycarbonate membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, **601**: 559-571 (1980b).

Szoka, S. y Papahadjopoulos, D.: Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**: 4194-4198 (1978).

Tamura, K., Higashi, Y. y Suzuki, A.: Studies of fluorescence depolarization at high pressures of dimyristoylphosphatidylcholine liposomes containing poly(γ -benzyl-L-glutamate), *Chemistry and Physics of Lipids*, **48**: 169-175 (1989).

Thulborn, K. R. y Sawyer, W. H.: Properties and the locations of a set of fluorescent probes sensitive to the fluidity gradient of the lipid bilayer. *Biochim. Biophys. Acta*, **511**: 125-140 (1978).

Uemura, A., Kimura, S. y Imanishi, Y.: Investigation on the interactions of peptides in the assembly of liposome and peptide by fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta*, **729**: 28-34 (1983).

Van Regenmortel, M. H. V., Briand, J. P., Muller, S. y Plaue, S. En *Synthetic polipeptides as antigens*, vol. 19. Ed. Burdon, R. H. y Knippenberg, P. H., Elsevier Science Publishers B. V. Amsterdam (1988).

Veliçelebi, G., Patthi, S. y Kaiser, E. T.: Design and biological activity of analogs of growth hormone releasing factor with potential amphiphilic helical carboxyl termini. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 5397-5399 (1986).

Verger, R. y Pattus, F.: Lipid-protein interactions in monolayers. *Chemistry and Physics of Lipids* **30**: 189-227 (1982).

Verhallen, P.F.J., Demel, R. A., Zwiers, H. y Gispen, W. H.: Adrenocorticotrophic hormone (ACTH)-lipid interactions. Implications for involvement of amphipathic helix formation. *Biochim. Biophys. Acta* **775**: 246-254 (1984).

Warren, G. B., Toon, P. A., Birdsall, N. J., Lee, A. G., Metcalfe, J. C.: *Reversible lipid titrations of the activity of pure adenosine triphosphate-lipid complexes*. *Biochemistry*, **13**: 5501-5507 (1974).

Wenstein, J. N., Magin, R. L., Yatvin, M. B., Zaharko, D. S.: Liposomes and local hyperthermia: selective delivery of methotrexate to heated tumors. *Science*, **204**: 188-191 (1979).

Williams, N. A. y Weiner, N. D.: Interactions of small polypeptides with dimyristoylphosphatidylcholine monolayers: effect of size and hydrophobicity. *International Journal of Pharmaceutics*, **50**: 261-266 (1989).

Wu, P., Tin, G. W. y Baldeschiwieber, J. D.: Phagocytosis of carbohydrate-modified phospholipid vesicles by macrophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 2033-2037 (1981).

BIBLIOGRAFIA

Yagi, Y., Kimura, S. y Imanishi, Y.: Interaction of Gramicidin S with lipid bilayer membrane. *Int. J. Peptide Res.*, **36**: 18-25 (1990).

Zhou, N. E., Mant, C. T. y Hodges, R. S.: Effect of preferred binding domains on peptide retention behavior in reversed-phase chromatography: amphipathic α -helices. *Peptide Research*, **3**(1): 8-19 (1990)

Zumbuehl, O. y Weder, H. G.: Liposomes of controllable size in the range of 40 to 180 nm by defined dialysis of lipid/detergent mixed micelles. *Biochim. Biophys. Acta*, **640**: 252-262 (1981).