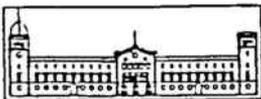


Tesis de Licenciatura

ESTUDIOS FISICOQUIMICOS DE UNA CONSTRUCCION TETRAMERICA (MAP₄VP1), CORRESPONDIENTE A LA SECUENCIA PEPTIDICA (11-25) DE LA PROTEINA VP1 DE LA CAPSIDE DEL VIRUS DE LA HEPATITIS A, CON MODELOS DE MEMBRANA.

Alba Ortiz Rodrigo



UNIVERSIDAD DE BARCELONA



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0701649044

A mi Madre

En memoria de Margui

Expreso mi agradecimiento, en primer lugar a mis directoras, las Dras. M^a Asunción Alsina y I. Haro, sin cuyas directrices no hubiera podido realizar esta tesina.

Agredezco a los Dres. Francesca Reig, Leocadio Rodriguez, M^a Antonia Busquets y Conchita Mestres, su inestimable ayuda en el planteamiento y seguimiento del estudio. Asimismo, todo ello unido a su calidad científica, investigadora y humana sin la cuál hubiera sido posible la ejecución y realización de la misma.

También quiero agradecer a todas las persona del equipo científico del Departamento de Péptidos su apoyo y colaboración, en el día a día del laboratorio: las Dras. M^a José Fonseca y Marta Calvet, Antón Juvé, Aixa Fernández, Angelina Rodriguez, Rita Galantai, Belén Bueno, Alfredo Vara, Itziar Martin, Esther Ardite, Cristina Colomer, Anna Massaguer, Anna Vea, destacando a José Antonio Pérez, Francisco Manuel Mota, Mónica García, Helena Carvajal, Loli Polo y con mención especial para Mari Osuna y Emili Nogués, por lo mucho que he aprendido de ellos.

Así como también, a todos los miembros de la Unidad de Fisicoquímica de la Facultad de Farmacia en general, cuya actitud colaboradora, me ha alentado a seguir hacia adelante siempre.

Finalmente, dedico la presente Tesina a mi madre, abuela, hermanos, amigos, y en especial en memoria de Marguí, sin cuyo interés y apoyo incondicional hubiera sido posible su realización.

A todos vosotros, Gracias.

AMINOACIDOS

A	Ala	Alanina
D	Asp	Acido aspártico
E	Glu	Acido glutámico
G	Gly	Glicina
I	Ile	Isoleucina
K	Lys	Lisina
N	Asn	Asparagina
P	Pro	Prolina
Q	Gln	Glutamina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina

ABREVIATURAS

A	Absorbancia
AA	Aminoácido(s)
AAA	Análisis de aminoácidos
Ac	Anticuerpo(s)
ACN	Acetonitrilo
α	Parámetro de interacción
ANS	Acido 8-anilino-1-naftalensulfónico
CF	Carboxifluoresceína
CL	Cardiolipina
Cl ₃ CH	Cloroformo
DMF	Dimetilformamida
DPH	1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno
DPPC	Dipalmitoil fosfatidil colina
DPPE	Dipalmitoil fosfatidil etanolamina
DPPG	Dipalmitoil fosfatidil glicerol
DSC	Calorimetría diferencial de barrido (Differential Scanning Calorimetry)
ES-MS	Espectrometría de masas por Electrospray
F	Fluorescencia
F _{moc} -AA	Aminoácido N-prottegido con el grupo F _{moc}
ΔG_M^E	Incremento de energía de la mezcla en exceso
ΔH	Entalpía
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
K'	Tiempo de retención
λ	Longitud do onda
lps	Liposomas
MLV	Liposomas multilaminares
P	Polarización de fluorescencia
PBS	Solución tampón fosfato (pH= 7.4)
PG	Fosfatidil glicerol
PF	Fracción empaquetada
PI	Fosfatidil inositol
Pip	Piperidina
PL	Fosfolípido(s)
PM	Peso molecular
π	Presión superficial

π_m	Presión superficial máxima o de saturación
R	Constante de los gases
RMN	Resonancia magnética nuclear
SA	Estearilamina
SUV	Liposomas unilaminares
T	Temperatura
TAC	Solución de acetato sódico (pH= 7.4)
Tc	Temperatura de transición de fase de gel a cristal líquido
TFA	Acido trifluoroacético
UV	Ultravioleta
VHA	Virus de la hepatitis A
Z	Número de coordinación

INDICE

<u>INTRODUCCION</u>	1
1. HEPATITIS A	1
1.1. Etiología	1
1.2. Epidemiología	1
1.3. Clínica	2
2. PROFILAXIS Y TRATAMIENTO	2
2.1. Medidas generales	2
2.2. Medidas específicas	3
2.3. Prespectivas	3
3. VACUNAS SINTETICAS	4
3.1. Selección	4
3.2. Proteína VP1	4
4. ADYUVANTES: POTENCIACION INMUNITARIA	4
4.1. Visión general	4
4.2. Descripción liposomas	7
4.2.1. <u>Composición química</u>	7
4.2.2. <u>Propiedades termotrópicas de los lípidos</u>	9
4.2.3. <u>Métodos de preparación de liposomas</u>	10
4.2.4. <u>Caracterización de los liposomas</u>	14
4.2.5. <u>Interacciones liposomas-células "in vitro"</u>	15
4.2.6. <u>Farmacología de los liposomas</u>	16
5. EL PAPEL DE LA MEMBRANA LIPIDICA EN LA INTERACCION PEPTIDO-RECEPTOR. MODELOS DE MEMBRANA	18
5.1. La membrana lipídica	18
5.2. Visión actual de las interacciones	19
5.3. Modelos de membrana: capas lipídicas monomoleculares	20
5.4. Presión superficial	22
5.5. Estabilidad de los monocapas	24
5.6. Estados de las capas monomoleculares	25
5.7. Cambios de estados de las monocapas	27
5.8. Estudios en monocapas mixtas	27

5.9.	Cálculos termodinámicos	28
6.	ESTUDIO DE LA INTERACCION PEPTIDO-LIPIDO	31
6.1.	La fluorescencia en el estudio de la interacción péptido-lípido	31
6.1.1.	<u>Polarización de fluorescencia</u>	32
6.2.	Calorimetría de barrido diferencial (DSC) en el estudio de la interacción péptido-lípido	34
6.2.1.	<u>DSC de potencia compensada</u>	34
6.3.	El potencial Z	36
	 <u>OBJETIVOS</u>	 39
	 <u>MATERIALES Y METODOS</u>	 41
1.	Materiales	41
1.1.	Instrumentación	41
1.2.	Reactivos y disolventes	43
1.3.	Lípidos	43
1.4.	Soluciones	44
2.	METODOS	44
2.1.	Obtención del sistema MAP₄VP1	44
2.2.	Purificación de carboxifluoresceina	45
2.3.	Preparación, purificación y caracterización de liposomas	45
2.3.1.	<u>Preparación de liposomas SUV</u>	45
2.3.2.	<u>Purificación de los SUV</u>	46
2.3.2.1.	Cromatografía sobre gel de Sephadex ^R	46
2.3.2.2.	Diálisis	47
2.3.3.	<u>Análisis de los liposomas</u>	47
2.3.3.1.	Determinación cuantitativa del fosfolípido	47
2.3.3.2.	Determinación del tamaño de los liposomas	48
2.4.	Técnica instrumental utilizada en los estudios de fluorescencia	48
2.4.1.	<u>Determinación de la fluorescencia de CF</u>	48
2.4.2.	<u>Marcaje de los liposomas</u>	49
2.4.3.	<u>Lectura de polarización de fluorescencia</u>	49
2.5.	Técnica instrumental utilizada en los ensayos de DSC	49
2.6.	Técnica instrumental empleada en monocapas	50
2.6.1.	<u>Instrumento de medida</u>	50
2.6.2.	<u>Elección del disolvente</u>	51

2.6.3.	<u>Isotermas de compresión</u>	53
2.6.4.	<u>Cinéticas de penetración</u>	53
<u>RESULTADOS Y DISCUSION</u>		55
1.	CARACTERIZACION PEPTIDICA	55
1.1.	MAP ₄ VP1	55
2.	ESTUDIOS FISICOQUIMICOS EN MONOCAPAS	57
2.1.	Actividad superficial del MAP ₄ VP1 (11-25)	57
2.2.	Cinéticas de penetración a área constante	61
2.2.1.	<u>Cinéticas de penetración de fosfolípidos puros</u>	61
2.2.2.	<u>Cinéticas de penetración con mezclas de fosfolípidos</u>	68
2.3.	Isotermas de compresión	74
2.3.1.	<u>Isoterma del MAP₄VP1 (11-25)</u>	74
2.3.2.	<u>Isotermas de compresión de fosfolípidos puros, sobre una subfase que contiene MAP₄VP1</u>	75
2.3.2.1.	DPPC	75
2.3.2.2.	PI	75
2.3.2.3.	SA	77
2.3.2.4.	DPPG	77
2.3.2.5.	DPPE	78
2.3.2.6.	CL	78
2.3.3.	<u>Isotermas de compresión de mezclas de fosfolípidos, sobre una subfase que contiene MAP₄VP1</u>	79
2.3.3.1.	DPPC-PI (9:1)	79
2.3.3.2.	DPPC-SA (9:1)	79
2.3.4.	<u>Interacción del MAP₄VP1 con monocapas mixtas. Isotermas de compresión de monocapas mixtas</u>	80
2.3.4.1	DPPC-DPPG subfase PBS y subfase PBS adicionando MAP ₄ VP1	80
2.3.4.1a.	Cálculos termodinámicos	82
2.3.4.2.	DPPC-DPPE subfase PBS y subfase PBS adicionando MAP ₄ VP1	85
2.3.4.2a.	Cálculos termodinámicos	86
2.3.4.3.	DPPC-CL subfase PBS y subfase PBS adicionando MAP ₄ VP1	88
2.3.4.3a.	Cálculos termodinámicos	
3.	ESTUDIOS FISICOQUIMICOS EN BICAPAS (LIPOSOMAS). FLUORESCENCIA Y POLARIZACION DE FLUORESCENCIA	90
3.1.	Interacción del MAP ₄ VP1 con DPPC	90
3.1.1.	<u>MAP₄VP1-SUV DPPC con ANS</u>	90
3.1.2.	<u>MAP₄VP1-SUV DPPC con DPH</u>	91

3.1.3.	<u>MAP₄VP1-SUV DPPC con CF</u>	93
3.2.	Interacción del MAP₄VP1 con 90% DPPC+10% PI	93
3.2.1.	<u>MAP₄VP1-SUV DPPC-10% PI con ANS</u>	93
3.2.2.	<u>MAP₄VP1-SUV DPPC-10% PI con DPH</u>	94
3.3.	Interacción del MAP₄VP1 con 95% DPPC+5% SA	96
3.3.1.	<u>MAP₄VP1-SUV DPPC-5% SA con ANS</u>	96
3.3.2.	<u>MAP₄VP1-SUV DPPC-5% SA con DPH</u>	97
3.3.3.	<u>MAP₄VP1-SUV DPPC-5% SA con CF</u>	99
3.4.	Interacción del MAP₄VP1 con 90% DPPC+10% PG	99
3.4.1.	<u>MAP₄VP1-SUV DPPC-10% PG con ANS</u>	99
3.4.2.	<u>MAP₄VP1-SUV DPPC-10% PG con DPH</u>	100
3.5.	Interacción del MAP₄VP1 con 90% DPPC+10% DPPE	102
3.5.1.	<u>MAP₄VP1-SUV DPPC-10% DPPE con ANS</u>	102
3.5.2.	<u>MAP₄VP1-SUV DPPC-10% DPPE con DPH</u>	103
3.6.	Interacción del MAP₄VP1 con 90% DPPC+10% CL	105
3.6.1.	<u>MAP₄VP1-SUV DPPC-10% CL con ANS</u>	105
3.6.2.	<u>MAP₄VP1-SUV DPPC-10% CL con DPH</u>	106
4.	ESTUDIOS FISICOQUIMICOS EN BICAPAS. CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)	108
5.	ESTUDIOS FISICOQUIMICOS EN BICAPAS. POTENCIAL Z	110
	<u>CONCLUSIONES</u>	113
	<u>BIBLIOGRAFIA</u>	115

INTRODUCCION

INTRODUCCION

1. HEPATITIS A

1.1. Etiología

La Hepatitis A es una enfermedad infecciosa transmisible, de declaración obligatoria en España, producida por un virus hepatotrópico clasificado como Hepatovirus, dentro de la familia Picornaviridae (Francki,1991).

Se trata de partículas esféricas de 28 nm., de simetría icosaédrica, con 32 capsómeros y sin envoltura que poseen una cápside, constituida por 4 proteínas, y un genoma lineal de ARN monocatenario de 25 daltons. Sólo se ha descrito una clase antigénica con respuesta humoral.

1.2. Epidemiología

Su transmisión es de tipo fecal-oral (está comprobada su transmisión por el agua y alimentos, habiéndose sugerido alguna forma de transmisión no fecal (lavados nasofaríngeos, orina) y de transmisión percutánea. El virus de la Hepatitis A (VHA) es estable en medio ácido y resistente al cloroformo y al éter. Es relativamente resistente al calor, manteniéndose estable a 60°C durante 1h e inactivándose parcialmente en 10-12 h. Mantiene su infectividad al menos 30 días cuando se conserva a 25°C y una humedad del 40% y durante años cuando se mantiene en congelación a -20°C. También puede sobrevivir durante días o meses y por períodos relativamente largos en agua dulce, agua salada, suelo y sedimentos marinos, así como en heces desecadas o en superficies de poliestireno, lo que explica su gran difusión. Se inactiva en autoclave a 120°C durante 20 min o por radiación UV, formalina, betapropiolactona, permanganato potásico, yodo y cloro o compuestos clorados, pero no por cloraminas o por ácido percloroacético.

Se puede detectar el virus en las heces de los enfermos y de pacientes asintomáticos, así como anticuerpos específicos anti-VHA en el suero de los mismos. Se ha hallado un posible reservorio en cierto tipo de simios.

La Hepatitis A es una causa importante de morbilidad y ocasional mortalidad, endémica en muchas zonas del mundo (principalmente en países en vías de desarrollo) y epidémica en otras (básicamente en naciones industrializadas), siendo su prevalencia especialmente remarcable en la cuenca mediterránea, donde entre el 75 y el 100% de la población adulta posee anticuerpos anti-VHA, evidencia de haber sido infectado por el

Introducción

virus. Este porcentaje contrasta con las cifras inferiores que corresponden a naciones como Estados Unidos (50%), Australia (55%) o los países escandinavos (13%), por citar unos ejemplos. De esto se podría concluir que en los países donde la sanidad general es más correcta, la enfermedad ve reducidos sus niveles de prevalencia (Saenz González,1991).

1.3. Clínica

El VHA es el responsable de más de una tercera parte de los casos descritos de hepatitis víricas (Sobsey,1988).

En una proporción elevada de casos se da una infección subclínica o anictérica sin sintomatología o con síntomas difusos de afección gripal. En el resto, aproximadamente un 10%, se produce un cuadro de afectación hepática aguda, de rápida evolución, buen pronóstico y escasas complicaciones o tendencia a cronicidad. Por lo que hace referencia a la sintomatología, tras un período de incubación de unas 2-6 semanas, sigue un período preictérico caracterizado por anorexia, náuseas y vómitos, dolores abdominales (epigástrico), fatiga, cefalea, febrícula de 37-38^oC, artralgias,... Luego aparece la típica ictericia, con orinas colúricas y heces hipopigmentadas; los síntomas gastrointestinales persisten y se añade hepatomegalia, acompañada o no de esplenomegalia. Finalmente, el cuadro evoluciona favorablemente hacia las 6-7 semanas en la práctica totalidad de los casos, sin necesidad de tratamiento, con tan sólo medidas sintomáticas, dietéticas y medicamentosas (Piédrola-Angulo,1991). A pesar de que no se han descrito casos de cronicidad, la Hepatitis A puede presentar complicaciones que lleguen a provocar un desenlace fatal, especialmente en personas de edad avanzada y cuando existe concomitancia con otras patologías. Actualmente, los niveles de mortalidad se sitúan en un 0.7% (Frosner,1983). Cabe reseñar el hecho de que se conservan títulos de anticuerpos protectores durante muchos años.

2. PROFILAXIS Y TRATAMIENTO

2.1. Medidas generales

Para evitar su enorme capacidad de difusión podemos llevar a cabo una profilaxis a nivel del mecanismo de transmisión mediante una correcta desinfección, higiene individual, en definitiva, una mejora del saneamiento en general.

2.2. Medidas específicas

La profilaxis con gammaglobulinas humanas constituía, hasta no hace mucho, el único método utilizado contra la enfermedad, debiéndose administrar durante el período de incubación o, como mucho, hasta 6 días después del comienzo de la ictericia, lo que supone un inconveniente en la terapia.

En la actualidad se dispone de la primera vacuna a base de virus de la cepa HM-175 inactivados con formalina (Just,1992), introducida en el mercado por la firma Smith-Kline & French. Esta vacuna es altamente inmunogénica como lo demuestra el hecho de que los niveles de anticuerpos anti-VHA detectados en el suero humano tras la vacunación son del orden de 100 veces mayores que en el caso de las inyecciones de inmunoglobulinas.

Por desgracia, la principal desventaja de trabajar con el VHA es su lenta replicación en cultivos celulares (Cromeans,1987;Provost,1984), con la consiguiente dificultad en la preparación de vacunas ya sea inactivadas o atenuadas, y los elevados costes de producción que de ello se deriva. Así pues, la reciente vacuna inactivada contra la Hepatitis A representa un avance considerable en el control de las infecciones por el VHA en los países desarrollados pero no en las sociedades menos aventajadas donde la Hepatitis A continúa siendo un grave problema de salud pública.

2.3. Perspectivas

Una alternativa a considerar para la producción de una vacuna de menor coste es el uso de nuevas estrategias basadas en la obtención de péptidos sintéticos que incluyan determinantes antigénicos capaces de inducir una respuesta inmune eficaz (Emini,1985;Wheeler,1986) y que son, por tanto, candidatos para una vacuna contra el VHA.

De esta manera, un objetivo primordial de la química de péptidos en el campo de las enfermedades víricas, y en concreto en el de la Hepatitis A, es la síntesis de vacunas eficaces y seguras, capaces de inducir una inmunidad prolongada y, lo que marca la diferencia con respecto a anteriores avances, obtenidas a un precio lo suficientemente reducido como para ser empleadas en regiones donde la Hepatitis A es endémica. Además, con una vacuna sintética se evitarían los efectos secundarios derivados del empleo de productos de procedencia biológica.

Introducción

3. VACUNAS SINTETICAS

3.1. Selección

Para lograr el propósito descrito en el apartado anterior es fundamental la identificación en las proteínas estructurales del VHA de secuencias específicas candidatas que constituyan determinantes antigénicos con capacidad neutralizante de la capacidad infecciosa del virus.

Como la superficie proteica del virión, denominada cápside, es el medio por el que el VHA interacciona con sus receptores y con los anticuerpos en el organismo al que infecta, resulta de una gran validez el conocimiento primario de la estructura de los polipéptidos expuestos en la superficie en el diseño de las vacunas sintéticas.

En este sentido, la cápside del VHA consta fundamentalmente de 3 proteínas estructurales:

- VP1 (300 aminoácidos)
- VP2 (222 aminoácidos)
- VP3 (246 aminoácidos)

siendo la VP1 la que se halla predominantemente expuesta en la superficie vírica. También se ha descrito, basándose en la secuencia genómica, una cuarta proteína VP4, de peso molecular muy inferior al resto de las citadas, pero que hasta el momento no ha sido identificada en los viriones (Melnick,1992).

3.2. Proteína VP1

En la presente tesina se estudia la secuencia peptídica VP1 (11-25) de la cápside viral del HAV. Este fragmento se seleccionó atendiendo al perfil de hidrofilia obtenido aplicando el método de Hopp y Woods (Hopp & Woods,1981) y también, al hecho que inducía anticuerpos neutralizantes contra el virus (Emini y col. 1984).

4. ADYUVANTES: POTENCIACION INMUNITARIA

4.1. Visión general

A pesar de las nuevas perspectivas abiertas por este tipo de vacunas, se sabe con certeza que los péptidos sintéticos inducen respuestas inmunitarias sensiblemente

inferiores a las conseguidas mediante proteínas o virus intactos. Uno de los principales problemas a resolver en el campo de las vacunas sintéticas es la potenciación inmunitaria, es decir, conseguir vacunas suficientemente inmunogénicas.

En este sentido, se han utilizado diferentes adyuvantes para aumentar la respuesta inmune frente a antígenos de procedencia sintética (Van Regenmortel,1988). Además, mediante el empleo de adyuvantes se precisa de menor cantidad de antígeno, con la consecuente reducción de los costes de producción de la vacuna.

La metodología convencional para obtener anticuerpos peptídicos se centra en lograr una inmunización con el péptido conjugado a una proteína conocida o a un portador polimérico sintético, mediante el empleo de un agente de condensación adecuado, con el fin de obtener una estructura macromolecular capaz de desencadenar la respuesta inmune (Bittle,1982). También es un sistema eficaz la inmunización con el péptido sin conjugar, administrado con adyuvante completo de Freund, en el caso de que la longitud del péptido sea de unos 12-20 aminoácidos. Además de las moléculas portadoras clásicas como la seroalbúmina bovina (BSA), la ovoalbúmina (OVA) y la hemocianina de molusco (KLH), existen otras sustancias como la dipalmitoil-lisina y la tripalmitoil-s-gliceril-cisteinil serina que, una vez unidas covalentemente a un péptido, aumentan considerablemente su antigenicidad (Wiesmuller,1992). Sin embargo, todas estas múltiples aproximaciones convencionales que buscan preparar anticuerpos antipéptidos mediante la conjugación de un péptido a una proteína conocida o a un portador polimérico sintético para aumentar la baja inmunogenicidad de los primeros (Sela,1980) presentan ciertos inconvenientes.

Aunque estos materiales son efectivos para producir anticuerpos de localización específicos en animales, son ambiguos en cuanto a composición y estructura. Además, en muchas ocasiones pueden producir efectos indeseables, lo que los hace inadmisibles para ser empleados en una vacuna humana. Por otro lado, el péptido antigénico representa una pequeña proporción del complejo péptido-conjugado, por lo que la inmunidad humoral estaría dirigida fundamentalmente contra otras localizaciones antigénicas del complejo. El exceso molecular del portador puede suprimir también la respuesta de las células B hacia el epítipo de interés (Schutze,1985). Además, la unión al portador puede alterar radicalmente los determinantes inmunogénicos del péptido (Briand,1985).

Por todo ello, es preferible diseñar un sistema químico alternativo de los péptidos sintéticos, con estructura unívoca y que evite la conjugación a proteínas portadoras. Recientemente han sido descritos métodos basados en la polimerización de antígenos peptídicos sintéticos (Di Marchi,1986) y otros métodos especialmente relevante lo constituyen los sistemas "Multiple Antigenic Peptides" (MAP), los cuales fueron inicialmente descritos por Tam (1988).

Los sistemas MAP consisten en un pequeño e inmunológicamente inerte

A pesar de todas las ventajas que presentan los péptidos en este campo, la principal limitación de su uso en forma libre radica en su rápida degradación en los fluidos biológicos a cargo de enzimas biológicas. Con el fin de resolver estos problemas se han desarrollado una gran variedad de sistemas de administración ("delivery systems"): nanopartículas, microesferas, liposomas, polímeros. De todos ellos, los liposomas son los más empleados por su baja toxicidad, fácil obtención y la posibilidad de poder encapsular fármacos (ya sea atrapados en su interior ó unidos covalentemente a ellos). Y también, por su probada capacidad como inmunoadyuvantes de diversos péptidos antigénicos ante una gran variedad de infecciones bacterianas, víricas y protozoicas (Alving,1991).

4.2. Descripción liposomas

Los liposomas fueron descritos por primera vez por Bangham y Horne (Bangham,1964) a mediados de los años sesenta al observar por microscopia electrónica que una suspensión de fosfolípidos de origen celular aislados y purificados formaban vesículas de manera espontánea. Así pues, los liposomas se definen como vesículas lipídicas formadas por una o varias bicapas concéntricas que contienen un espacio acuoso en su interior. Usualmente se clasifican en función de su tamaño, tal y como se muestra en la figura 2, en:

- Grandes:
 - * Unilaminares (tamaño entre 0.4 y 5 micras)
 - * Multilaminares (0.2-2 micras)
- Pequeños:
 - * Unilaminares (20-100 nm)

4.2.1. Composición química

Los liposomas se pueden preparar a partir de una gran variedad de lípidos anfifílicos ó mezclas de lípidos de origen natural o sintético siempre que se hidraten con exceso de agua, siendo los fosfolípidos los más empleados (ver figura 3). No obstante, no todos los lípidos anfifílicos pueden formar liposomas, sino que ha de existir un equilibrio óptimo entre las partes hidrófoba e hidrófila de la molécula. Para aumentar la estabilidad de las preparaciones se suele incorporar un cierto porcentaje de colesterol (ver figura 4).

Introducción

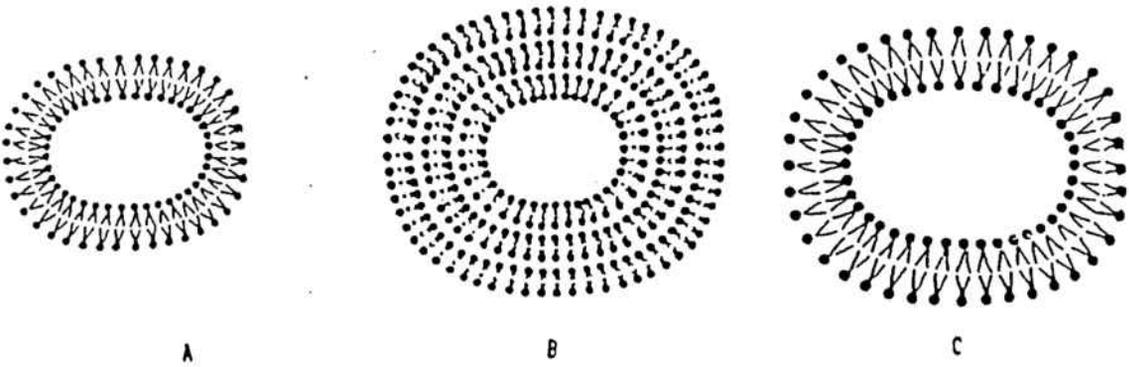


Figura 2: Representación esquemática de varios tipos de liposomas. A) liposomas unilaminares pequeños (SUV), B) liposomas multilaminares (MLV), C) liposomas unilaminares grandes (LUV).

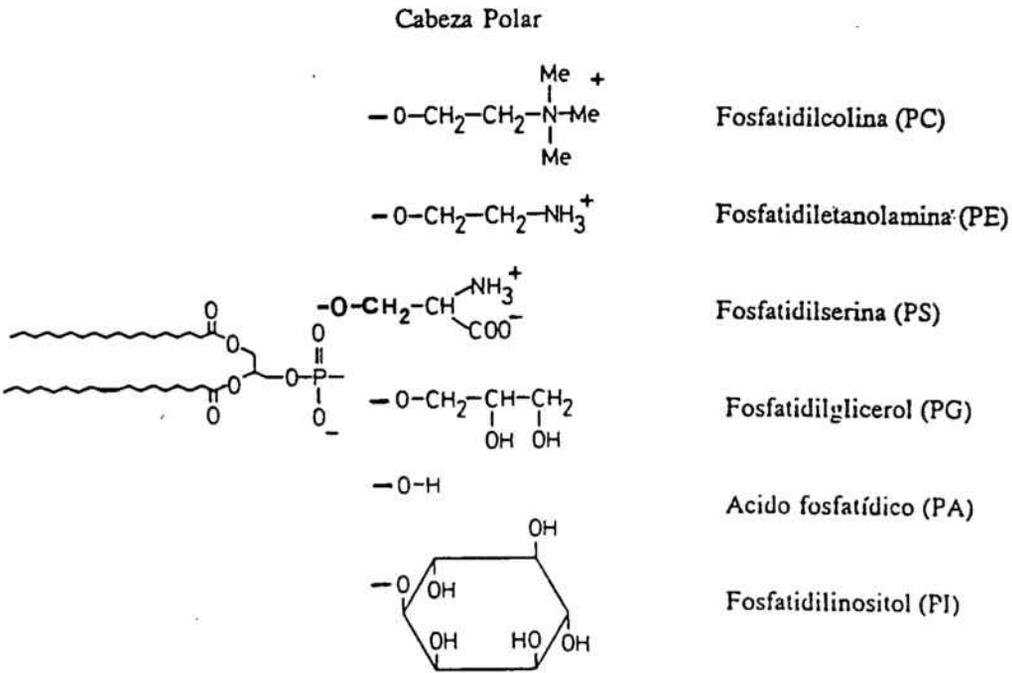


Figura 3: Principales fosfolípidos componentes de los liposomas.

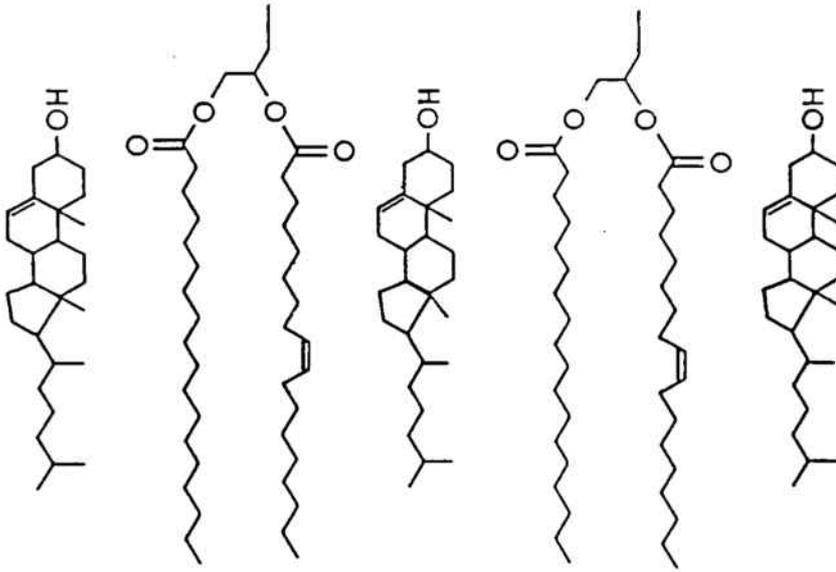


Figura 4: Posición del colesterol en la bicapa lipídica.

4.2.2. Propiedades termotrópicas de los lípidos

Los lípidos presentan transiciones de fase reversibles dependientes de la temperatura. En ellas, las cadenas hidrocarbonadas del fosfolípido sufren una transformación desde un estado denominado gel (bajas temperaturas) a uno más desordenado ó fluido llamado cristal líquido (temperaturas elevadas). Este cambio es un proceso endotérmico que tiene lugar en un intervalo estrecho de temperatura alrededor de una temperatura característica denominada temperatura de transición (T_c), que viene determinada por la naturaleza de las cadenas de ácido graso y de la cabeza polar del fosfolípido (ver tabla 1).

Durante la transición, al aumentar la temperatura, las cadenas hidrocarbonadas del ácido graso pasan de una configuración "trans", donde su libertad de movimiento está restringida, a una isomerización rotacional "trans-gauche" a lo largo de las cadenas de ácido graso que son móviles. Esto provoca una expansión lateral y una disminución en el espesor de la bicapa ya que aumenta el área por molécula de fosfolípido (ver figura 5).

Introducción

Tabla 1: Valores de Tc de los fosfolípidos empleados en el presente trabajo.

TIPO DE LIPIDO	ABREVIATURA	CARGA	Tc (°C)
Dipalmitoil fosfatidil colina	DPPC	0	41
Dipalmitoil fosfatidil etanolamina	DPPE	0	60
Estearilamina	SA	+1	--
Cardiolipina	CL	-2	--
Dipalmitoil fosfatidil inositol	PI	-1	--
Dipalmitoil fosfatidil glicerol	DPPG	-1	41

Durante la preparación de los liposomas es muy importante que la hidratación de los lípidos se haga a una temperatura superior a la Tc del lípido ó mezcla con la que se trabaja. De cara al resultado final, el estado físico de la bicapa afecta profundamente a aspectos de vital importancia en la posible aplicación terapéutica de los liposomas como sistemas portadores de fármacos.

Se sabe que en la proximidad de la Tc la membrana de los liposomas es muy permeable respecto al soluto encapsulado, disminuyendo cuando la temperatura ambiente está por encima de la Tc. Al incorporar colesterol a las bicapas fosfolípídicas se reduce considerablemente la permeabilidad, ya que provoca una desaparición gradual de la transición de fase. Por debajo de la Tc el colesterol tiene un efecto fluidificante débil, y por encima de la Tc disminuye la fluidez. Además reduce la posibilidad de penetración de ciertas proteínas, lo que supone un incremento en la estabilidad de los liposomas. No obstante se sabe que aumenta el diámetro de los SUV aproximadamente un 30% cuando se introduce en una concentración del 50% respecto al total del fosfolípido, no modificándolo cuando está al 20%.

4.2.3. Métodos de preparación de liposomas

En la bibliografía existen numerosos métodos de obtención de liposomas (tabla 2), pudiendo agruparse en 3 grandes grupos:

- Métodos basados en la dispersión mecánica del lípido.

Introducción

- Métodos basados en la dispersión del solvente.
- Métodos basados en la eliminación del detergente.

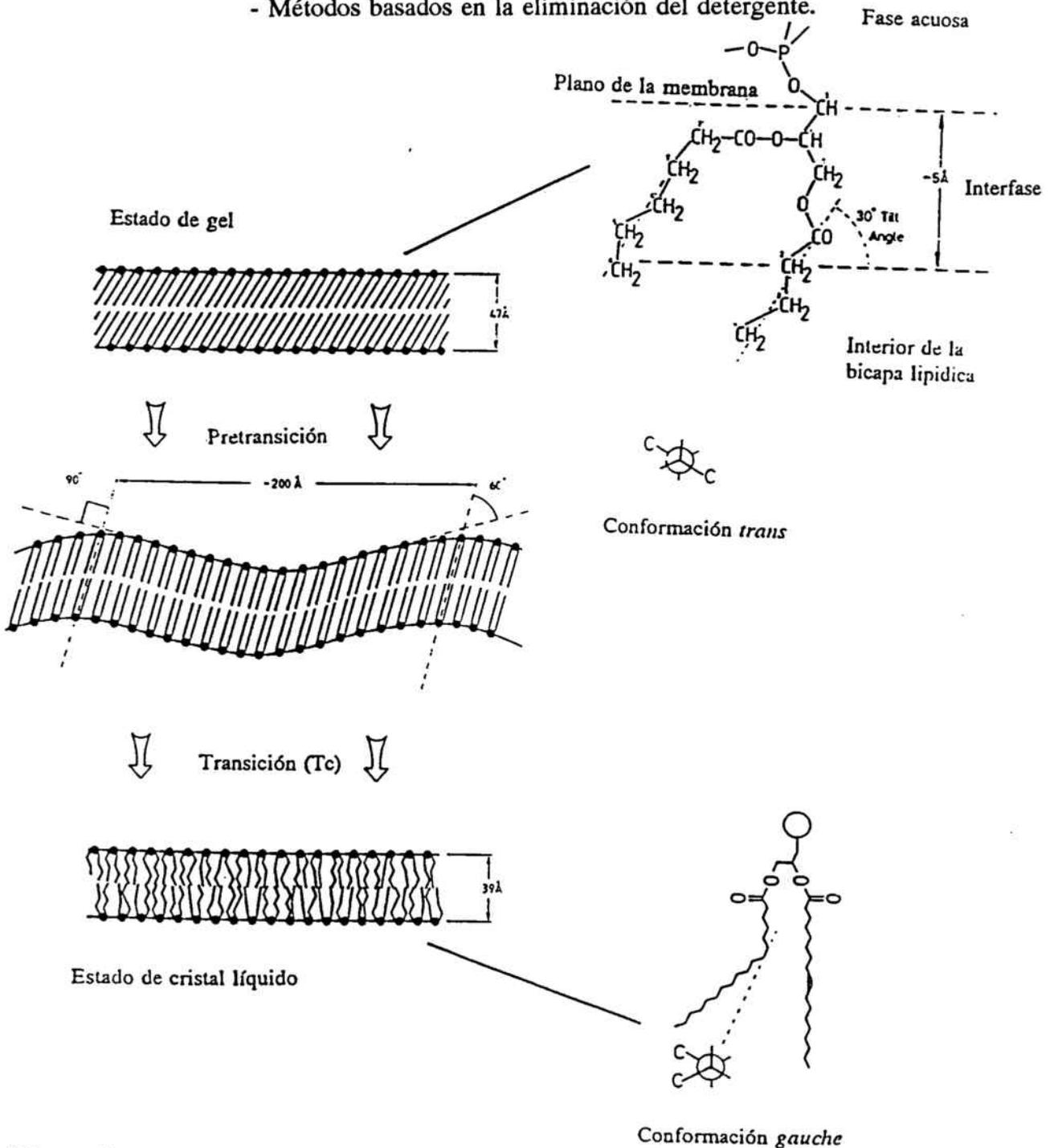


Figura 5: Transición de fase en una bicapa fosfolipídica. Cambios en la fluidez de la bicapa y en la disposición de las cadenas de ácidos grasos que forman parte de los fosfolípidos.

Introducción

Tabla 2: Métodos de preparación de liposomas.

METODOS BASADOS EN LA DISPERSION MECANICA DEL LIPIDO					
Método	Tipo liposoma	Eficacia enc.	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 críticamente de la fuerza iónica del medio	Mayer, 1985
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 homogéneas *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
Extrusión por una French Press	SUV (FPL) 30-80 nm	10-30 %	*Método suave, apto para moléculas lábiles *Poblaciones homogéneas *Mayor estabilidad que los SUV sonicados *Aplicación: reconstitución de proteínas de membrana	*Equipo de elevado precio	Barenholz, 1979 Hamilton, 1980
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, 1979
Deshidratación y rehidratación	DRV <1000	20-70%	*Elevados rendimientos de encapsulación	*Se parte de una preparación de SUV sonicados. *Riesgo de ruptura en medios de diferente osmolalidad.	Kirby, 1984

Método	Tipo liposoma	Eficacia enc.	Ventajas	Inconvenientes	Referencias
Fusión inducida por calcio	LUV 200-1000 nm	10-30%	<ul style="list-style-type: none"> *Método simple *Altos rendimientos de encapsulación *Adecuado para encapsular macromoléculas y virus 	<ul style="list-style-type: none"> *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.).

MÉTODOS BASADOS EN LA DISPERSIÓN DEL SOLVENTE

Método	Tipo liposoma	Eficacia enc.	Ventajas	Inconvenientes	Referencias
Inyección de etanol	SUV 25-100 nm	0.4-1.5%	<ul style="list-style-type: none"> *Mínimo riesgo de degradación del lípido *No se forman aerosoles *Método muy sencillo 	<ul style="list-style-type: none"> *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%	<ul style="list-style-type: none"> *Útil para encapsulación de macromoléculas *No se produce oxidación de los lípidos siempre que se use éter libre de peróxidos. 	<ul style="list-style-type: none"> *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	Unilaminas desde 100 nm a tamaño celular (1000nm)	40-80%	<ul style="list-style-type: none"> *Elevados rendimientos de encapsulación 	<ul style="list-style-type: none"> *Tendencia a la agregación 	Kim, 1981
Evaporación en fase reversa	LUV (REV) 120-500 nm	20-65%	<ul style="list-style-type: none"> *Eficacia de encapsulación reproducible y elevada *Permite emplear gran variedad de fosfolípidos *Adaptable a producción a gran escala *Apto para encapsulación de macromoléculas 	<ul style="list-style-type: none"> *Condiciones severas para moléculas lábiles a disolvente orgánico y a las altas temperaturas empleadas 	Szoka, 1980

Introducción

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

METODOS BASADOS EN LA ELIMINACION DE DETERGENTE					
Método	Tipo de liposoma	Eficacia enc.	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

En este trabajo se han utilizado los liposomas SUV fundamentalmente por el elevado grado de homogeneidad, así como por el pequeño tamaño de las poblaciones obtenidas. Estas propiedades los hacían óptimos, más adecuados, para estudiar los estados de ordenación de los fosfolípidos en las bicapas. En los liposomas preparados por soda se estudió, la fluorescencia y la polarización de fluorescencia. El DSC se realizó con MLV obtenidos. Además los liposomas de DPPC-SA (9.5:0.5) se obtuvieron mediante ciclos de congelación y descongelación, con posterior sonicación.

4.2.4. Caracterización de los liposomas

Una vez preparados los liposomas y purificados mediante la separación del material no encapsulado (cromatografía de gel-filtración, diálisis, centrifugación,...) se procede a su caracterización. Son factores esenciales para el empleo de los liposomas "in vivo" e "in vitro" su tamaño, homogeneidad, porcentaje de encapsulación, eficacia de encapsulación, volumen interno y estabilidad.

El tamaño y la homogeneidad de las preparaciones se determinan por microscopía electrónica (Szoka, 1980) y por técnicas espectroscópicas de dispersión de la luz o quasi-elastic laser light scattering (Wu, 1981).

El porcentaje de encapsulación se refiere a la cantidad de producto encapsulado respecto a la cantidad inicial empleada y se determina, usualmente, por técnicas cromatográficas.

La eficacia de la encapsulación viene dada por la relación moles de producto encapsulados a moles de fosfolípido en los liposomas. El contenido en fosfolípidos

se determina a partir del análisis de fosfato de las muestras (Steward,1980).Éste es un dato importante, puesto que durante la elaboración de los liposomas se producen inevitablemente pérdidas.

El volumen interno se expresa en litros por mol de fosfolípido y da una idea de la capacidad de encapsulación de cada tipo de liposoma. La mejor manera para calcular el volumen interno es medir la cantidad de agua directamente, lo cual se puede hacer bastante convenientemente reemplazando el medio externo por un fluido inerte espectroscópicamente y midiendo a continuación la señal del agua, por ejemplo, mediante RMN (Pidgeon,1986).

La estabilidad se refiere básicamente a aspectos físicos tales como la agregación, la sedimentación y la pérdida de producto encapsulado, y usualmente se determina midiendo la liberación de un marcador fluorescente soluble en agua (carboxifluoresceína, calceína, fluoresceína, fluoresceína-dextrano, por ejemplo) del interior de los liposomas.

En este trabajo se ha utilizado CF,la cuál presenta la propiedad de amortiguación de fluorescencia o quenching (a elevadas concentraciones las soluciones de CF emiten una fluorescencia muy baja debido a interacciones moleculares). Así,se pueden preparar liposomas conteniendo CF encapsulada en su interior (100 mM) (J.N.Weinstein,et al.1977). Al estar la fluorescencia amortiguada en estas condiciones,si se libera un pequeño porcentaje al exterior del liposoma, éste provoca un aumento brusco de la fluorescencia. El porcentaje de ruptura y, por tanto liberación se calcula tomando como referencia la fluorescencia originada por destrucción total del liposoma con un tensioactivo.

4.2.5. Interacciones liposomas-células "in vitro"

El estudio de la interacción liposoma-célula es un modelo que puede aportar mucha información sobre ciertos procesos biológicos, a la vez que permite orientar sobre su aplicabilidad como transportadores de fármacos. Se han propuesto 4 tipos de mecanismos (ver figura 6):

a)- Intercambio lipídico: se produce una transferencia entre las moléculas lipídicas individuales de los liposomas y las de toda la superficie celular, sin que haya contacto entre la célula y el contenido liposomal. Se ha comprobado que el colesterol de los liposomas se intercambia rápidamente con el de las membranas plasmáticas.

b)- Fusión: consiste en la unión de los liposomas a la bicapa de la membrana plasmática y la subsecuente liberación del contenido de las vesículas al espacio citoplasmático. La evidencia más convincente que refuerza este mecanismo es el hecho de que sustancias biológicamente activas e impermeables a membranas celulares pueden ser introducidas en el citoplasma celular cuando son encapsuladas en liposomas.

Introducción

c)- Adsorción: asume la asociación estable de liposomas intactos con la superficie celular de manera que no pueden ser eliminados de ahí por lavados sucesivos. Es bastante sencillo, pero difícil de cuantificar. La adsorción máxima de liposomas de DPPC se produce cerca de la Tc de estos lípidos.

d)- Endocitosis / Fagocitosis: se basa en la ingestión de liposomas intactos en vesículas endocíticas, produciéndose a continuación su liberación en el aparato lisosomal.

Una vez vistos los diferentes procesos planteados, parece obvio que el empleo de liposomas como transportadores de fármacos asegura una eficaz y completa distribución de los mismos hacia los destinos propuestos.

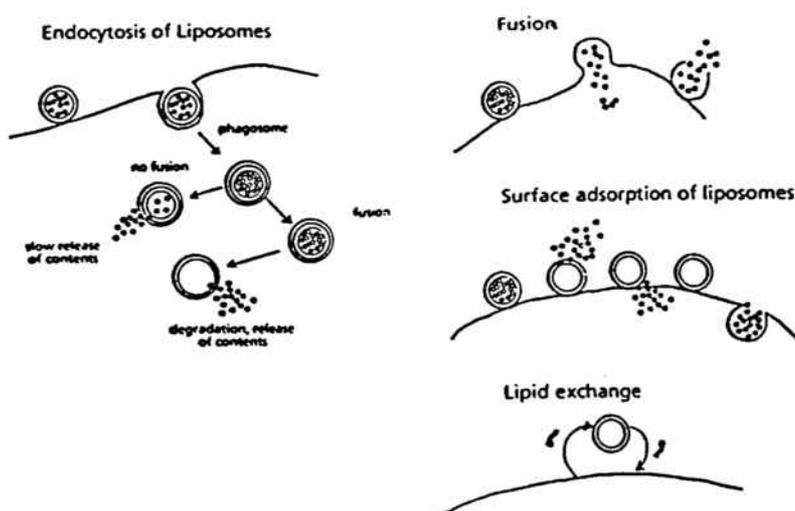


Figura 6: Mecanismos propuestos de interacción liposoma-célula.

4.2.6. Farmacología de los liposomas

La investigación actual en el campo de los liposomas se fundamenta en sus múltiples aplicaciones en el campo de la farmacología, abarcándose varios aspectos complementarios:

a)- **Sistemas de transporte:**

Los liposomas se emplean como sistemas de transporte de origen natural. Estos pueden influir en la distribución y metabolismo de muy variados principios activos. Actualmente, el principal objetivo consiste en buscar un diseño que controle la velocidad de llegada de una molécula activa a un compartimento concreto del organismo, su distribución y localización y la persistencia o velocidad de metabolismo de la misma. Con ello se pretende reducir o eliminar los efectos secundarios de los fármacos por disminución de su nivel en sangre, por la reducción de la dosis evitando la inactivación y excreción prematura y por dirección de los mismos hacia zonas anatómicas o celulares concretas.

b)- **Terapéutica:**

Un principio activo encapsulado en liposomas presenta una serie de ventajas respecto a su uso en forma convencional:

- * **Prolongación de su efecto:** los liposomas permanecen en circulación durante un tiempo mucho más largo que la mayoría de principios activos en forma libre. Su vida media "in vivo" varía de pocos minutos a varios días.

- * **Posibilidad de dirigirlos específicamente al lugar de acción.** Esta dirección se clasifica en anatómica (basándose en el nivel de selectividad y especificidad hacia un órgano, célula o lugar subcelular) y mecanística (ya sea pasiva, donde el sistema retículo endotelial capta de forma natural los liposomas, o activa, la cual supone la alteración de los liposomas por una unión con anticuerpos monoclonales, azúcares, glicolípidos, proteínas,... cambiando la composición o tamaño de manera que alcancen lugares diferentes de los que habitualmente alcanzan (Poste,1983).

- * **Posibilidad de utilizarlos como vehículos de moléculas poco solubles o con problemas de absorción;** es posible encapsular en liposomas principios activos que normalmente no pueden penetrar en células y que, consecuentemente, tienen una actividad reducida.

- * **Protección de sustancias lábiles:** la encapsulación puede proteger el contenido de los liposomas de la acción inmune o enzimática por parte del hospedador.

- * **Reducción de la toxicidad en los tejidos:** se previene la acción tóxica de ciertos fármacos antes de que lleguen al lugar de acción. Así, reducen las reacciones de hipersensibilidad en individuos inmunizados con ciertas proteínas. Además los liposomas no se acumulan en corazón y riñones, como hacen ciertos fármacos (Adriamicina, Doxorubicina) o agentes nefrotóxicos (Anfotericina B), respectivamente.

Introducción

* Posibilidad de usar los liposomas como mimetizantes de la acción de ciertas estructuras celulares. Como ejemplo puede destacarse el empleo de liposomas con hemoglobina encapsulada para el tratamiento de ciertos casos de anemia.

* Efecto adyuvante de los liposomas: se pueden incorporar antígenos con la configuración apropiada a la superficie de los liposomas, incrementándose su poder antigénico y produciéndose una respuesta inmune más grande (Gregoriadis,1989). Estos antígenos unidos a su superficie pueden unirse a múltiples receptores en células B o ser endocitados rápidamente por macrófagos que induzcan una proliferación celular y más producción de anticuerpos.

* Tratamiento terapéutico del dolor: al descubrirse péptidos endógenos capaces de anclarse en el receptor opiáceo y producir el mismo efecto que las moléculas opiáceas (las cuales provocan adicción) se pensó en administrar estas sustancias encapsuladas en liposomas para reducir o evitar su destrucción en presencia de enzimas proteolíticos. Aunque no se conoce el receptor opiáceo en profundidad, se cree que se trata de una proteína que contiene asociado un fosfo o glicolípido (se cree que los fosfolípidos mayoritarios son la fosfatidilserina y los gangliósidos) cuya microviscosidad ó fluidez podría modular la conformación óptima del receptor.

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

5.1. La membrana lipídica

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.

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,..., destacando, entre otras cosas, las interacciones entre lípidos y péptidos considerando su importancia crucial a la hora de determinar la capacidad de estos fragmentos de permanecer unidos a los lípidos y desencadenar así una respuesta inmune en el organismo.

Sargent y Schwyzer (Sargent,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 (ver figura 7). Ambos

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 definitiva, según este modelo, la unión péptido-receptor tiene lugar en etapas, y la energía total de unión es el resultado de las energías de unión correspondientes a cada etapa en concreto.

Para mayor información, dentro del contexto de los adyuvantes que contribuyen a que los péptidos sintéticos vean potenciada su capacidad inmunogénica, se debe tener en cuenta que la respuesta inmunológica depende en gran medida de cómo es presentado el fragmento peptídico a la célula T y lo ya mencionado de que la zona circundante a la membrana impone ciertas conformaciones y orientaciones sobre los péptidos.

5.2. Visión actual de las interacciones

El estudio de las interacciones entre péptidos o proteínas y lípidos ha experimentado un desarrollo considerable en los últimos años, coincidiendo con la puesta a punto de nuevos métodos fisicoquímicos. Este tipo de estudios puede clasificarse atendiendo a dos criterios:

- Sistemas lipídicos modelo

- * Monocapas
- * Bicapas planas
- * Liposomas

- Propiedades de los lípidos y proteínas o péptidos cuyo comportamiento se estudia: según el parámetro cuyo comportamiento se quiera determinar, se elegirá una técnica u otra:

* Fluidez lipídica y/o separaciones de fase: calorimetría diferencial de barrido (DSC), difracción de rayos X, microscopia electrónica, marcadores fluorescentes,...

* Conformación de los péptidos: dicroísmo circular, fluorescencia intrínseca, espectroscopia de IR, RMN,...

Introducción

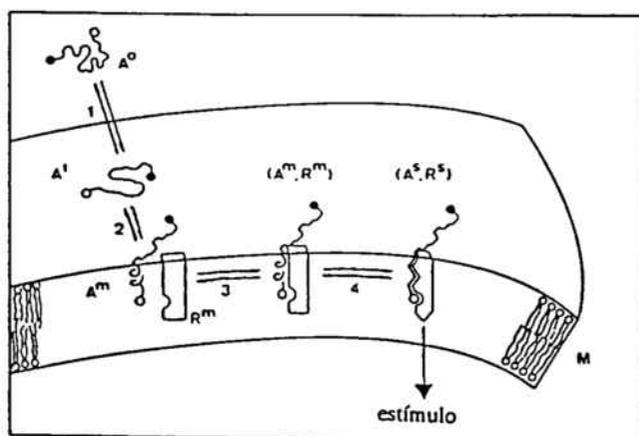


Figura 7: Modelo de interacción de un péptido con su receptor. El péptido en el fluido extracelular, medio acuoso, se encuentra desestructurado (A^0); en contacto con la bicapa lipídica (M) aumenta su actividad superficial por difusión y fenómenos electrostáticos (A^1). El paso 2 incluye rotaciones internas 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 representa 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).

5.3. Modelos de membrana: capas lipídicas monomoleculares

Como ha quedado patente en apartados previos, un gran número de reacciones biológicas transcurren en interfases, constituídas básicamente por lípidos y proteínas, teniendo mucho interés en el funcionamiento de las membranas biológicas y en otros procesos como la digestión de grasa en el intestino, el metabolismo de las lipoproteínas y la respuesta humoral, por ejemplo (Verger,1982).

La bicapa lipídica que constituye la membrana celular juega un destacado papel como superficie que favorece o posibilita la acción de diversas moléculas biológicamente activas (hormonas, enzimas, péptidos opiáceos,...) (Jacobs,1989;Kimura,1992).

Para conocer el funcionamiento de estos procesos tan complejos se han desarrollado diversos sistemas modelo, de los cuales pueden ser destacados especialmente los liposomas o vesículas lipídicas (apartado 4.2.) y las capas lipídicas monomoleculares (monocapas). Estas últimas constituyen un modelo de membrana sencillo, profusamente utilizado para el estudio del comportamiento de los lípidos entre sí o con otras moléculas farmacológicamente activas. En particular los experimentos de penetración en monocapas, permiten determinar las interacciones existentes entre monocapas lipídicas y péptidos y/o proteínas, proporcionando información que puede ser extrapolable a las interacciones que acontecerían entre estos péptidos o proteínas con bicapas lipídicas, como los liposomas y las

membranas celulares (Williams,1989).

Las experiencias realizadas en la interfase aire-agua nos informan sobre la flexibilidad y el carácter tensioactivo de las moléculas objeto del estudio. Este modelo de membrana presenta una ventaja destacable sobre los otros dos existentes (bicapas planas y liposomas), la cual radica en la posibilidad de controlar de forma sencilla la ordenación de las moléculas, cambiando el área molecular y la presión superficial de la monocapa. Los datos obtenidos a partir de la variación de estas medidas dan una información básica acerca de las interacciones lípido-lípido, lípido-subfase o lípido-molécula activa (Verger,1982).

Según la naturaleza de las sustancias se pueden formar dos tipos de monocapas:

a)- Monocapas de adsorción

Muchas sustancias presentan la característica de adsorberse en la interfase aire-agua produciendo un descenso en la tensión superficial del solvente. Este tipo de monocapa se da básicamente en moléculas claramente anfifílicas (es decir, con una parte hidrófila y otra hidrófoba).

La relación entre la concentración de la sustancia en la interfase (o exceso superficial = Γ) y en el seno del líquido (c) viene dada por la ecuación de la isoterma de adsorción de Gibbs:

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

siendo $d\gamma$ la variación de la tensión superficial, dc la variación de la concentración, R la constante de los gases y T la temperatura absoluta.

Partiendo de esta ecuación, Langmuir (Langmuir,1917) concluyó que las moléculas adsorbidas en la interfase aire-agua se comportan, de alguna manera, como las moléculas de los gases perfectos y adquieren un cierto grado de orientación.

b)- Monocapas de extensión

Al extender sobre una solución soporte una sustancia insoluble en él y no volátil (bien depositándola en forma pura o en solución diluida con un disolvente volátil fácilmente eliminable) se forma una película superficial o monocapa de extensión.

Introducción

Al depositar una gota de un líquido A sobre la superficie de otro B, siendo ambos inmiscibles entre sí, puede ocurrir que la gota se extienda espontáneamente sobre la superficie del líquido o que permanezca en la superficie en forma de gota. En el primer caso, el trabajo de adhesión entre los dos líquidos ($W_{A,B}$) es superior al de cohesión entre las moléculas del líquido (W_C). La diferencia entre estos dos valores se denomina coeficiente de extensión de A sobre B (K), el cual 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 estrechamente relacionados con las energías superficiales de los mismos. Se producirá la extensión cuando la tensión superficial del líquido soporte B sea elevada y la correspondiente al líquido a extender A sea baja. La monocapa que así se ha formado será estable si existe un equilibrio adecuado entre los grupos hidrófobo e hidrófilo en las moléculas que la forman, de manera que las características de uno sean suficientes para contrarrestar la atracción que experimenta el otro hacia el soporte acuoso, respectivamente.

5.4. Presión superficial

Las monocapas o capas monomoleculares presentan una tendencia innata a ocupar la mayor superficie posible, razón por la cual ejercen una fuerza determinada sobre cualquier obstáculo que se oponga a su expansión. Primeramente, a esta fuerza se le asignó un origen similar al que ocasiona la presión gaseosa, considerándose como el resultado de la agitación térmica de las moléculas que forman la monocapa. Al chocar con una barrera que se oponga a su expansión, estas moléculas ejercen una determinada presión sobre la misma. De aquí deriva el concepto de presión superficial, que se define como la relación entre la fuerza de empuje y la longitud de la barrera.

La presión superficial es un parámetro relacionado en gran medida con la tensión superficial. Si tenemos 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 realizará una fuerza contra la barrera. Si hacemos avanzar la barrera de forma que se comprima la monocapa, a presión y temperatura constantes, se producirá una variación del potencial termodinámico de Gibbs o entalpía libre (dG), la cual viene dada por la ecuación:

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

donde dS_m y dS_a son las variaciones de la superficie ocupada y la superficie libre, respectivamente. Debido a que la superficie total se mantiene constante, es lógico que:

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

Sustituyendo la ecuación (2) en la (1) obtenemos:

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

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, se puede expresar:

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

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

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

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

Introducción

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

en la que γ_a es la tensión superficial del agua y γ_m es la tensión superficial de ésta tras haber extendido la monocapa.

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

5.5. Estabilidad de las monocapas

La estabilidad de una capa monomolecular viene condicionada por la presión de colapso y por la disolución y evaporación de las moléculas que la constituyen.

Cuando comprimimos una monocapa mediante una barrera móvil, llega un momento en que se produce una expulsión considerable de moléculas de la misma. Si la presión se mantiene constante, el área de la monocapa disminuye, y si es el área lo que permanece constante, entonces desciende la presión: es lo que se conoce como punto de colapso, el cual varía con las condiciones experimentales.

Se define la presión de colapso como la mayor presión a la que se puede comprimir una monocapa sin que se produzca una expulsión manifiesta de las moléculas que la componen. También depende de las condiciones bajo las que se realiza la experiencia (temperatura, tipo de sustancia, velocidad de compresión,...). Cuando la presión en la monocapa sobrepasa este valor, la monocapa se destruye (Ries,1959).

A su vez, las moléculas que forman la monocapa de extensión son susceptibles de ser extraídas de la misma por disolución o por evaporación, con lo que 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 fenómeno de disolución es pequeña, y la velocidad de destrucción de la monocapa viene determinada fundamentalmente por la difusión de las moléculas hacia el líquido soporte.

5.6. Estados de las capas monomoleculares

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

Así pues, se pueden definir monocapas en estado gaseoso, en estado líquido expandido, en estado líquido condensado y en estado sólido. En ellas, y por ese orden, las moléculas se encuentran cada vez más alineadas y empaquetadas, siendo su área molecular cada vez más pequeña al ir comprimiendo, aumentando la fuerza de atracción entre ellas. También en orden creciente aumentan la viscosidad y la presión superficial.

En las representaciones gráficas de presión superficial (mN/m) respecto al área molecular ($\text{nm}^2/\text{molécula}$) a temperatura constante (lo que se conoce como isotermas de compresión) se observa cómo varía la presión superficial en función de la compresión de la capa monomolecular a cargo de la barrera móvil. Esto es indicativo de la compresibilidad de la monocapa (ver figura 8).

Introducción

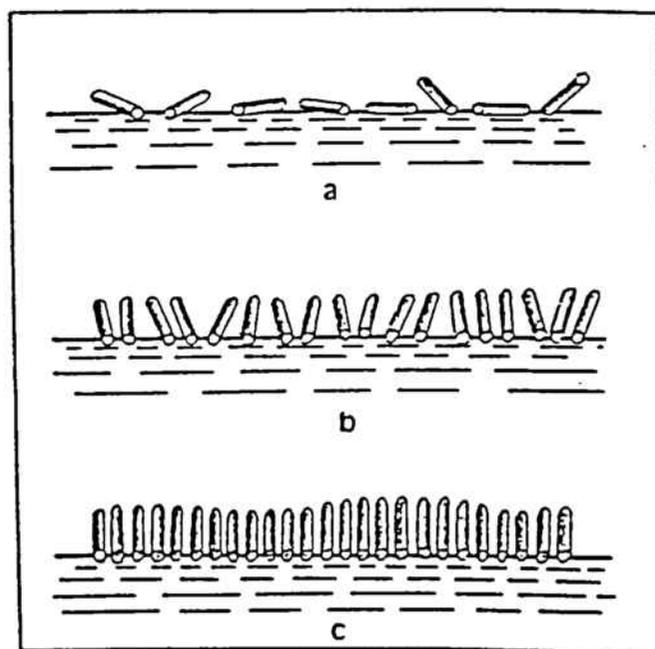
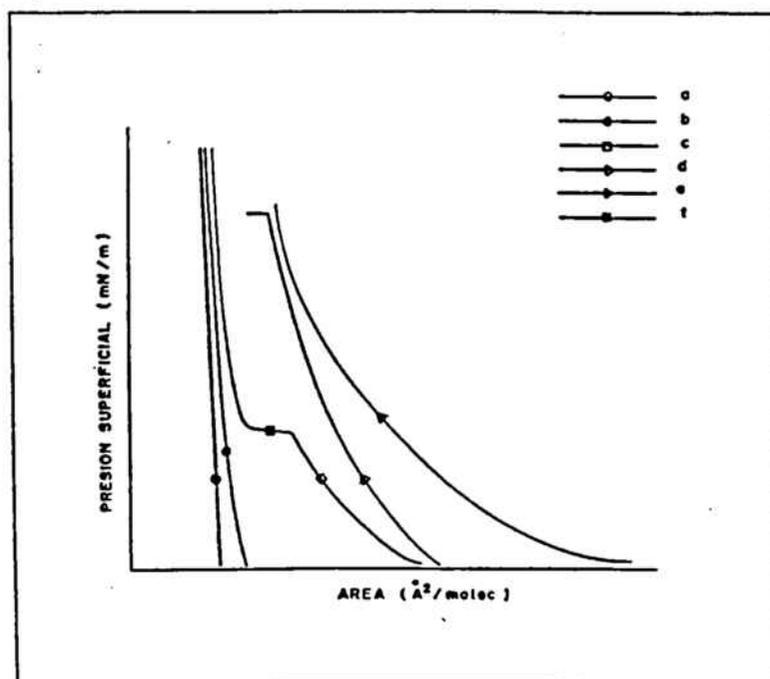


Figura 8: Trazado de isotermas de compresión en distintos estados: a) monocapa sólida, b) estado mesomorfo, c) monocapa que pasa de estado líquido a sólido por compresión, pasando por un estado de transformación t, d) monocapa en estado líquido, y e) monocapa en estado gaseoso. En la parte inferior se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

5.7. Cambios de estado de las monocapas

Tras obtener la isoterma de compresión de una monocapa ideal supuestamente estable para las diferentes zonas de presiones superficiales y áreas ocupadas por molécula, al empezar la compresión, la presión superficial aumenta en relación directa con el aumento de la concentración en superficie, proporcionándonos una representación de tipo hiperbólico. Este tipo de isoterma se corresponde con la de una monocapa en estado gaseoso.

Si continuamos comprimiendo la monocapa, aparece una región donde la presión permanece constante aunque disminuye el área disponible, de forma análoga a la condensación de los gases. La cohabitación de dos fases queda patente al medir el potencial superficial en diferentes puntos de la monocapa. Esta área de transición (horizontal) no se observa en muchos casos.

A continuación aparece el estado líquido escasamente compresible, pero fluido. De acuerdo con algunos autores (Dervichian,1939), entre el estado líquido y el sólido existe un estado intermedio que, por su similitud con los cristales líquidos, se conoce como estado mesomorfo, en donde las moléculas se hallan tan próximas como en el estado sólido, salvo que pueden girar libremente alrededor de su eje.

Finalmente se alcanza el estado sólido, apenas compresible, que constituye la fase más comprimida y de mayor viscosidad. Si proseguimos con la compresión, se alcanza el colapso. En la figura 8 observamos varios tipos de isotermas de compresión así como la disposición que adoptan las moléculas en los distintos estados.

5.8. Estudios en monocapas mixtas

Las monocapas mixtas, constituidas por dos o más componentes, representan un modelo muy válido para el estudio de las interacciones moleculares en un sistema bidimensional orientado debido a su gran analogía con las membranas biológicas.

En este tipo de sistemas se plantean tres alternativas:

a)- Que los componentes constituyentes de la monocapa mixta sean completamente inmiscibles superficialmente.

b)- Que sean totalmente miscibles superficialmente (solución superficial ideal) o

Introducción

c)- Que sean parcialmente miscibles superficialmente.

En el caso a), siempre que la monocapa esté formada por dos componentes, el sistema podrá ser tratado como si la monocapa mixta estuviera formada por dos monocapas en equilibrio. Si el objeto del estudio es el área ocupada por molécula, las películas monomoleculares formadas por dos componentes cumplen la regla de la aditividad:

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

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. Esta regla también rige para el potencial de superficie y para la viscosidad superficial.

Cualquier desviación del cumplimiento de esta regla se ha interpretado como un indicio de la presencia de interacciones entre moléculas o miscibilidad de los componentes (Gaines,1966).

5.9. Cálculos termodinámicos

Desarrollar un estudio termodinámico del sistema objeto del estudio puede ser útil para concluir si los componentes de una película monomolecular mixta presentan un comportamiento ideal desde la perspectiva de su miscibilidad. Como muestra describiremos el tratamiento de Goodrich (Goodrich,1957).

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

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

siendo γ la tensión superficial y S el área de la interfase de separación de ambos medios. Por otro lado, la relación entre las variaciones de energía libre de Gibbs (δG) y de la presión superficial ($d\tau$), a presión y temperatura constantes, es:

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

Centrémonos en el caso concreto de dos monocapas simples, constituidas por dos componentes distintos (1 y 2), sometidas a la misma presión superficial y separadas por una barrera móvil. Cuando levantamos la barrera de separación para favorecer el proceso de mezcla superficial, la variación de energía libre de Gibbs por mol a una presión determinada ($\Delta G_{m\pi}$) vendrá dada por la expresión:

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

donde $G_{1,2}$, G_1 y 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 definido por:

$$\mu_i = \mu_i^0 + RT \cdot \ln X_i$$

y el incremento de la energía libre por mol de la mezcla (ΔG_m^1) vendrá dado por:

$$\Delta G_m^1 = RT \sum_i X_i \ln X_i$$

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 que tiene lugar la mezcla superficial "ideal", podemos afirmar que a esta presión superficial límite se cumple:

Introducción

$$\Delta G_m^1 = RT \cdot (X_1 \ln X_1 + X_2 \ln X_2)$$

Entonces se puede demostrar, según el citado autor, que por debajo de la presión de equilibrio (ESP ó π^e), la ecuación anterior puede escribirse:

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

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. Esta ecuación permite calcular la energía libre de la mezcla a partir de las isothermas 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:

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

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. (Joos, 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. De este modo, para el caso de monocapas mixtas de dos componentes:

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

6. ESTUDIO DE LA INTERACCION PEPTIDO-LIPIDO

Las moléculas de los fosfolípidos presentan un tipo de ordenación según la temperatura a la que se encuentran, tal como se indica en el apartado 4.2.2. Las transiciones entre las varias ordenaciones posibles depende de la temperatura, y son más cooperativas cuanto más puro es el fosfolípido. La principal transición es la que ocurre alrededor de la temperatura de transición de gel a cristal líquido (T_g), la cuál viene asociada a un cambio importante de la fluidez de la bicapa. Este cambio puede medirse de distintas maneras, siendo las más exactas, el análisis térmico diferencial y la variación tanto en intensidad como en la polarización de fluorescencia mediante sondas fluorescentes. En el presente trabajo han sido utilizadas dichas técnicas, y por ello a continuación detallaremos los aspectos teóricos más relevantes de las mismas.

6.1. La fluorescencia en el estudio de la interacción péptido-lípido

La fluorescencia es una técnica utilizada frecuentemente por su elevada sensibilidad para obtener información sobre el estado de ordenación de los fosfolípidos en las bicapas lipídicas, así como sobre la influencia que otras sustancias, como los péptidos ejercen sobre aquellas. Para realizar este tipo de estudios es preciso incorporar al sistema que se analiza, en nuestro caso liposomas, un fluoróforo o marcador fluorescente. El cuál presenta fluorescencia en función de su estructura y de las características del medio.

La estructura química de estas moléculas se caracteriza por ser rígida y poseer un gran número de dobles enlaces conjugados, de manera que al incidir sobre ellas una radiación electromagnética son capaces de emitir fluorescencia.

En la actualidad existen gran variedad de marcadores fluorescentes, lo que permite una gran versatilidad de análisis, alguno de ellos están indicados en la figura 8.

Introducción

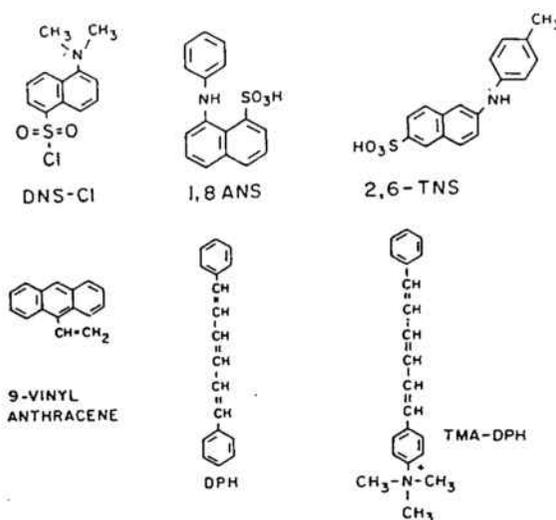


Figura 9 : Estructura química de algunos marcadores fluorescentes.

6.1.1. Polarización de fluorescencia

La polarización de fluorescencia refleja la movilidad de las moléculas fluorescentes dentro de la membrana (Slavik,1982) y puede relacionarse con la fluidez del medio. Esta técnica es más simple y en algunos aspectos presenta ventajas sobre ESR o RMN (Shinitzky y Barenholz,1978).

La polarización se define como la diferencia de intensidad de fluorescencia observada cuando los polarizadores están en paralelo, V_v , y en perpendicular, V_h , en el plano de polarización, dividido por la suma de estas dos intensidades.

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

siendo $G = I_{Hv} / I_{Hh}$, un factor de corrección de la eficacia del detector tanto por la luz polarizada vertical como horizontal. Este factor lo calcula automáticamente el aparato.

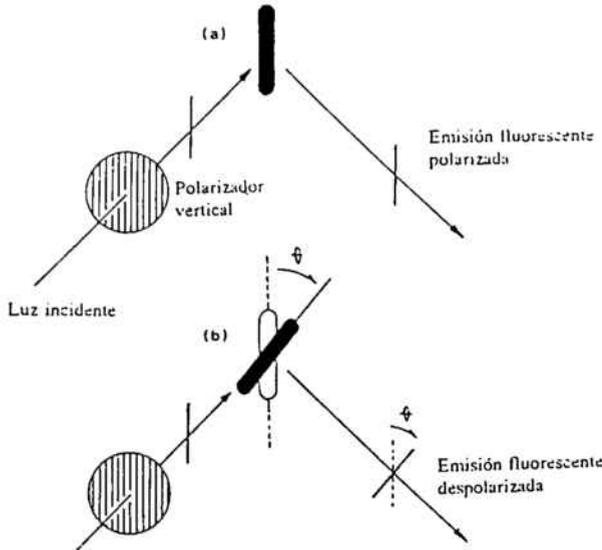


Figura 10 :Principio de la espectroscopia de polarización de fluorescencia. Al excitar un fluoróforo con luz polarizada, si el fluoróforo permanece inmóvil en el estado excitado (10^{-8} seg), la emisión de fluorescencia estará también altamente polarizada (a); si por el contrario, el fluoróforo excitado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

Los fluoróforos empleados en el marcaje de los liposomas han sido, el 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) y el ácido 8-anilino-1-naftalensulfónico (ANS), los cuáles no presentan fluorescencia en H_2O , pero son altamente fluorescentes unidos a membranas lipídicas o liposomas (Shinitzky y Barenholz 1978; Slavik, 1982).

El DPH debido a su carácter hidrofóbico se une específicamente a la zona apolar de los liposomas (Stillwell y col.,1992; Schwarz y col.,1992). Los cambios en la polarización de DPH reflejan cambios en la movilidad de las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos (G.Van Ginkel, et al.,1989), permitiendo observar el comportamiento del cambio de fase, de gel a cristal líquido, y por lo tanto determinar la temperatura de transición. Cuando la bicapa se encuentra en estado gel hay menor movilidad de las bicapas y el DPH tiene menor libertad de movimiento durante el estado excitado, por tanto la polarización que emite es alta. A medida que la temperatura aumenta y se pasa al estado cristal líquido, la movilidad de las bicapas así como la oscilación del DPH también incrementa, en consecuencia la polarización disminuye. Esta disminución es brusca alrededor de la temperatura de transición (B.W.Williams,1990).

El ANS es un marcador fluorescente que interacciona con la región hidrófila de los liposomas (J.Slavik,1982; Joshi et al.,1989) permitiendo evaluar los cambios de fluidez de la membrana, a nivel de la superficie de las cabezas polares de los fosfolípidos (Nam et al.,1989). La polarización de fluorescencia del ANS es dependiente de la temperatura, si bien el proceso de despolarización se produce de modo más suave y sin cambios bruscos alrededor de la T_c (Bashford,1976). Esto se debe a su localización en la zona polar externa de la bicapa, que está inicialmente menos estructurada.

Introducción

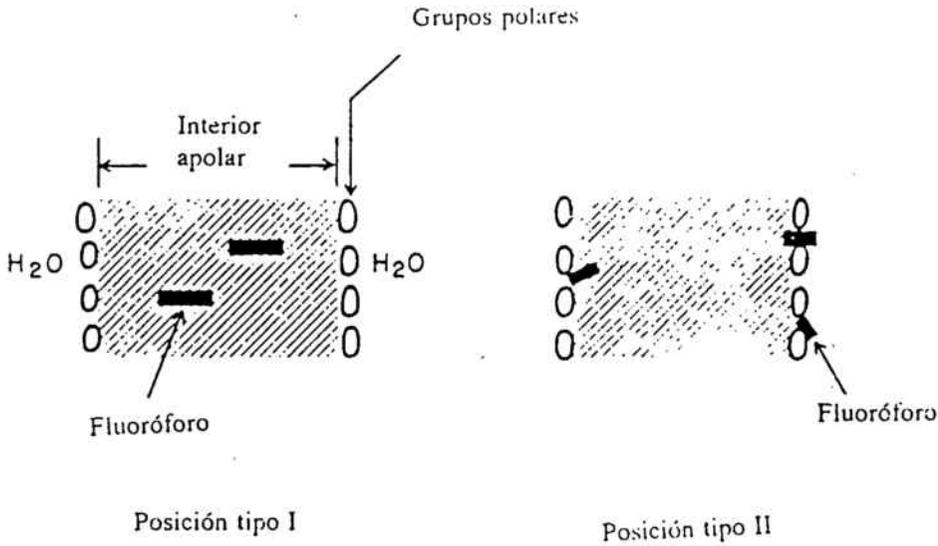


Figura 11 :Disposición teórica de los marcadores fluorescentes.I) DPH y II) ANS.

6.2. Calorimetría de barrido diferencial (DSC) en el estudio de la interacción péptido-lípido

El análisis térmico diferencial es una técnica física para el estudio del comportamiento termotrópico de los fosfolípidos, cuando se induce térmicamente la transición de fase, del estado gel al estado cristal líquido. A través de ésta se pretende estudiar de modo comparativo, como afecta la adición de un porcentaje pequeño de otro fosfolípido y de un péptido al liposoma referencia (constituido por fosfolípido puro), en los parámetros resultantes del termograma.

6.2.1. DSC de potencia compensada

Mediante la técnica se mide el calor diferencial es decir, el calor extra suministrado por el sistema a la muestra (proceso endotérmico) o a la referencia (proceso exotérmico) con el fin de mantener igual la temperatura en ambas muestras, al producirse un cambio de fase en la muestra.

La muestra y la referencia se calientan con fuentes caloríficas independientes. Cuando se alcanza la T_c de los fosfolípidos, el sistema registra una variación de temperatura entre las dos cápsulas de modo que para mantener en ambas la misma temperatura, el sistema administra calor.

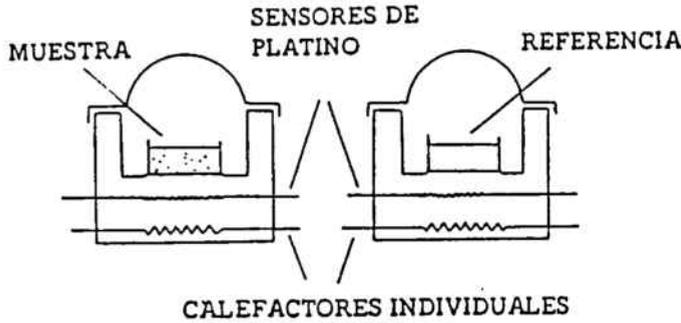


Figura 12 :Modelo de un horno de DSC de potencia compensada.

Es una técnica barata , rápida , lo que permite hacer análisis frecuentes. Su sensibilidad dependerá de que se pueda controlar el pH y la fuerza iónica de la fase acuosa. Con ella se sigue todo el proceso del cambio de fase desde su inicio (T_s) hasta su finalización (T_L). Así como también, el perfil de la transición ,que nos da idea de la pureza del fosfolípido. Además, proporciona información sobre parámetros termodinámicos relacionados con la fase de transición (Mc Elhaney,1982).

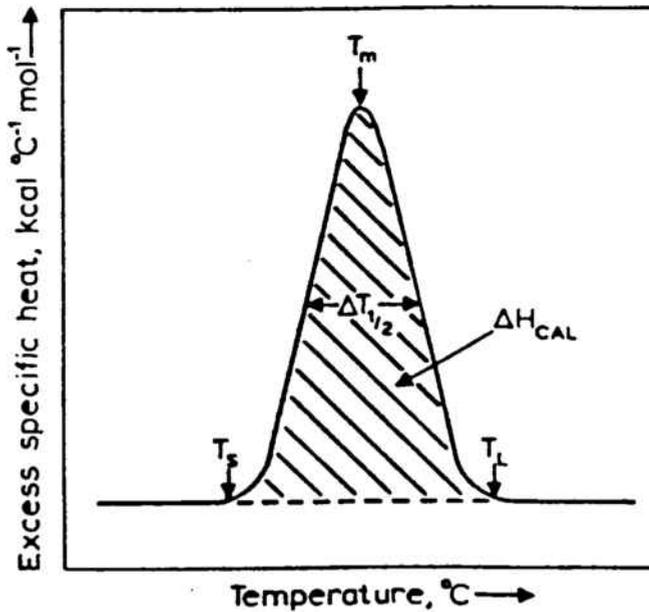


Figura 13 :Representación de una transición de un fosfolípido puro.

Introducción

Siendo T_m la temperatura de transición, es decir a la cuál la cadena alquílica del lípido pasa de estado gel a cristal líquido. En la cuál absorbe calor, y el sistema alcanza la máxima temperatura dentro de la transición.

En el caso de fosfolípidos puros la cooperatividad en la fase de transición de las cadenas alquílicas es de modo simétrico y agudo, al ir introduciendo impurezas, bien sea de lípidos o péptidos, la transición se vuelve asimétrica y deja de ser aguda.

La transición dependerá de la longitud de las cadenas, de su estructura química, tanto de la cola como de la cabeza, y además de la interacción debido al pH y la fuerza iónica de la fase acuosa.

6.3. El potencial zeta

Para entender el comportamiento de las partículas coloidales, entre las que se incluyen los liposomas, el potencial de la superficie es muy útil. Pero es imposible realizar una medida directa de este parámetro en la superficie cargada. En cambio, el potencial del plano de corte o plano de Stern es fácil calcularlo (diferencia de potencial entre la zona eléctricamente neutra y el plano de Stern situado en el inicio de la capa difusa, constituida por contraiones).

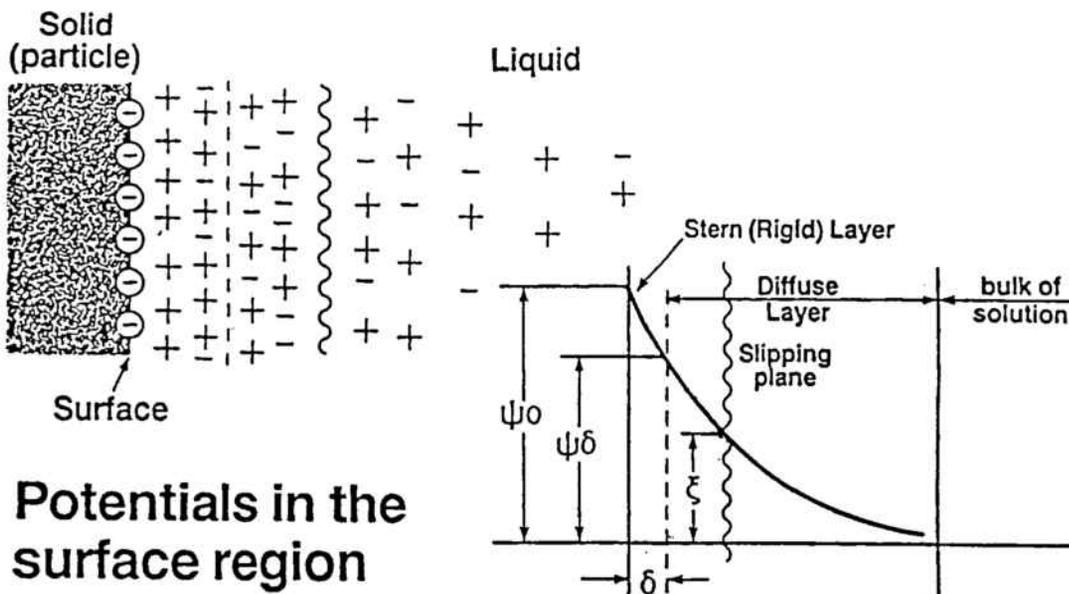


Figura 14 :Potencial superficial de una partícula en el seno de una solución.

Introducción

El potencial zeta es un parámetro utilizado en describir y predecir floculaciones, adhesiones y otras propiedades de los sistemas de partículas. Así pues, se podrá predecir la estabilidad de la suspensión de liposomas.

Este representa la carga efectiva de una partícula, es decir aquella que varía en función de los fenómenos electrocinéticos de la suspensión o bien la que se obtiene de medir el potencial por movilidad electroforética.

La movilidad o movimiento de la partícula en el seno de un campo eléctrico se relaciona con el potencial zeta por la ecuación de Henry.

$$\mu_E = \frac{Ze f(Ka)}{6\pi V}$$

siendo μ_E la movilidad electroforética, ϵ la constante dieléctrica de medio, V la viscosidad del medio, a el radio de la partícula y $1/K$ el grosor de la doble capa.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Dado el proyecto de investigación en el que se engloba el estudio objeto de esta tesis de licenciatura, dentro del campo de la obtención de vacunas sintéticas para la erradicación de la hepatitis A, en el presente trabajo se tratarán los siguientes aspectos:

En primer lugar se empleará como modelo de membrana las capas monomoleculares de los fosfolípidos puros (DPPC, PI, SA, DPPG, DPPE y CL). En ellas se estudiará la interacción del péptido MAP₄VP1 (11-25) con dichos fosfolípidos mediante isotermas de compresión y cinéticas de penetración.

En segundo lugar se expondrá la interacción del mismo péptido con monocapas de mezclas de los fosfolípidos anteriores. Para ello se realizarán las isotermas de compresión y las cinéticas de penetración de los mismos.

A continuación se empleará como modelo de membrana los liposomas SUV de DPPC, DPPC-10% PI, DPPC-5% SA, DPPC-10% PG, DPPC-10% DPPE y DPPC-10% CL. En ellos se estudiará la capacidad del MAP₄VP1 (11-25) para modificar la fluidez de la bicapa, tanto a nivel interno (apolar) como a nivel externo (polar), empleando como técnica la polarización de fluorescencia.

Finalmente, a partir de liposomas MLV de las mismas composiciones indicadas anteriormente se realizarán los termogramas de DSC, con el objetivo de corroborar los estudios de polarización de fluorescencia.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES Y METODOS

1. MATERIALES

1.1. Instrumentación

La síntesis peptídica en fase sólida se realizó de forma manual en una jeringa estéril de polipropileno que contenía la alcoxibencilresina.

Las muestras se pesaron en una balanza analítica Sartorius con una precisión de 10^{-4} o 10^{-5} gramos.

La evaporación de los disolventes se llevó a cabo mediante un rotavapor de la marca Eyela, siendo eliminadas las trazas de disolvente en una bomba de alto vacío modelo EDM 6 de Edwards High Vacuum (BOC Ltd.).

El agua utilizada se purificó por el sistema MilliQ (Millipore) y se filtró posteriormente a través de una membrana Millipore con un diámetro de poro de $0.2 \mu\text{m}$. Las soluciones tamponadas y la solución de acetato sódico (TAC) también se filtraron a través de esta membrana.

Las medidas de pH se hicieron en un pHímetro Crison, modelo micropH 2001, con célula Ingold.

Las agitaciones mecánica y magnética se realizaron mediante agitadores Heidolph DSG 302 y Heidolph MR 2002, respectivamente.

Las preparaciones liposómicas se sonicaron con una sonda de ultrasonidos Vibracell modelo VC 300, de 300 vatios de potencia, dotada de una punta de Ti de 13 mm de diámetro. También se utilizó un baño ultrasónico Selecta.

Las centrifugaciones se realizaron en una centrífuga Beckmann modelo J2-21 (refrigerado a 4°C), provista de un rotor JA-20.1.

Se ha utilizado una liofilizadora Telstar modelo Lioalfa, a una temperatura de -40°C y a un vacío de 0.1 mbars.

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

Materiales y Métodos

Los espectros de masas se llevaron a cabo en el Servicio de Espectrometría de Masas del CID, CSIC de Barcelona, empleando las técnicas FAB-MS (bombardeo con átomos rápidos) y Electrospray.

Los análisis de aminoácidos se practicaron en el Servicio de Análisis de Aminoácidos del CID, CSIC de Barcelona, siguiendo la técnica Pico-TAGTM (Waters).

La cromatografía líquida de alta resolución se realizó en 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 un "loop" de 20 μm . También se empleó un sistema Merck-Hitachi L-6200 intelligent pump con detector de UV Merck L 4000 y provisto de un inyector Rheodyne 7125; el registro e integración de las señales cromatográficas se realizó por medio de un integrador cromatográfico Merck-Hitachi D-2000.

Para la cromatografía en columna de exclusión molecular se utilizaron columnas de vidrio de 30 x 2.5 cm.

Las diálisis de las preparaciones liposómicas se realizaron en membranas para diálisis Visking, 2-18/32" (Medicell interational). Y para las diálisis del péptido se utilizaron membranas spectrum por 6 tubing MrCutoff 1000.

Los tamaños de los liposomas fueron determinados por el método de dispersión de la luz (Dinamic light scatterig, DLS), en un Autosizer Ilc Malvern.

Las incubaciones se realizaron en un baño termostatzado Tempette^R TE-8A (Techne).

Las medidas de fluorescencia y de polarización se leyeron en un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 50 conectado a un ordenador Epson PC A x 2, provisto del programa FL Data Manager.

Los resultados del DSC se obtuvieron con un horno Perkin Elmer DSC-7, una interfase Thermal Analysis Controller TAC 7/DX y conectados a un PC provisto del programa DSC7 Multitasking software version 3.1.

Los resultados del potencial Z se llevaron a cabo en la Facultad de Farmacia, Unidad de Fisicoquímica por el Dr.Estelric mediante un Zetasizer.

Los experimentos con monocapas se llevaron a cabo en un aparato diseñado en el laboratorio de Físico-Química de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona (Valls 1981), según el modelo propuesto por Verger y De Haas (1973) (51).

1.2. Reactivos y disolventes

El ácido acético y el éter dietílico, empleados para lavar y secar la resina, se adquirieron a Merck.

El TFA utilizado para el desanclaje y desprotección de la resina fue suministrado por la casa KaliChemie.

Los eluyentes para la cromatografía líquida de alta resolución fueron: acetonitrilo y TFA (gradient grade).

El agua desionizada fue purificada mediante un sistema Milli-Q (Millipore) hasta que su resistividad fue superior a 18 MΩcm.

El cloroformo utilizado para obtener los liposomas y las soluciones para la realización de cinéticas e isothermas fue de calidad analítica (Panreac) . El THF para solubilizar el DPH fue de calidad para HPLC (Merck).

los fluoróforos utilizados fueron DPH (Fluka), ANS (Sigma) y CF (Eastman Kodak).

Como detergente para romper los liposomas en los ensayos de latencia se empleó Tritón^R X-100 (Fluka).

Para la preparación de solución tamponada de fosfatos (PBS) se utilizó cloruro sódico para análisis, fosfato monosódico dihidrato purísimo y fosfato disódico dihidrato para análisis todos de Panreac. También se usaron molibdato amónico calidad reactivo especial (RS) (Carlo Erba) y vitamina C o ácido ascórbico purísimo para análisis (Fluka), en la preparación de la solución para la prueba de fosfatos. Acetato sódico anhidro para análisis (Merck), para la realización de TAC.

Asimismo se utilizaron anhídrido acético purísimo, ácido acético glacial purísimo, ácido perclórico 70% para análisis de Panreac y urea para análisis (Merck).

1.3. Lípidos

Se emplearon los siguientes lípidos suministrados por sigma: dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC), dipalmitoil-fosfatidilglicerol (DPPG), dipalmitoil-fosfatidiletanolamina (DPPE), colesterol, fosfatidilinositol (PI), estearilamina (SA) y

Materiales y Métodos

fosfatidilglicerol (PG), todos ellos utilizados sin purificación previa.

1.4. Soluciones

Solución de acetato, TAC (pH=7.4): se preparó una solución de acetato sódico 0.25 M y se ajustó hasta el pH requerido con ácido acético 0.1 M.

Solución tampón fosfato, PBS (pH=7.4): se mezclaron 0.28 g de cloruro sódico, 0.23 g de fosfato monosódico dihidrato y 1.15 g de fosfato disódico en 100 ml de agua destilada desionizada por el sistema Milli-Q (Millipore), ajustándose el pH con una solución de hidróxido sódico 0.1 M.

Solución de Tritón X-100: se pesaron 10 g de Tritón y se diluyeron en acetato sódico hasta obtener una solución al 10%.

Solución para la cuantificación del fosfolípido:

La solución A: 2 g de molibdato amónico y 16 ml de ácido perclórico al 70% llevados a 45 ml de agua milli-Q. La solución B: 2 g de ácido ascórbico disueltos en 80 ml de agua. Se mezclaron y se enrasó a 200 ml con agua.

Solución de urea 8 M y tris-HCl 0.1 M: se pesaron 480.5 g de urea y 12.11 g de tris para 1 l de agua.

Solución de NH_4HCO_3 para diálisis: se pesaron 0.788 g de producto para 1 l de agua.

2. METODOS

2.1. Obtención del sistema $\text{MAP}_4\text{VP1}$

A partir de la $\text{MAP}_4\text{VP1}$ -Resina sintetizada en el Lab. péptidos del CSIC se procedió al desanclaje del péptido y eliminación simultánea de los grupos protectores de las cadenas laterales. Para ello se trató la peptidil-resina en un recipiente con TFA/ H_2O (95:5) durante 2h, con agitación cada 10 min. Tras recoger el filtrado y evaporar el ácido con corriente de nitrógeno, se precipitó el péptido con éter dietílico. Se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min (unas 4 ó 5 veces) decantándose el sobrenadante. Finalmente se disolvió el péptido en H_2O y se liofilizó para obtener el producto sólido (crudo).

Una vez obtenido el péptido crudo se procedió a su purificación

mediante diálisis (Spectrum por 6 tubing MrCutoff 1000) ante una solución de urea 8 M y Tris-HCL 0.1 M (pH=8), durante 24h a 4°C (3 cambios); después en una solución de ácido acético 0.1 M durante 8h (2 cambios) para eliminar la urea.

El producto obtenido se liofilizó y caracterizó por HPLC fase reversa, Análisis de Aminoácidos (AAA) y Espectrometría de masas por electrospray (ES-MS).

2.2. Purificación de carboxifluoresceína

La purificación de CF se realizó por cromatografía en columna, tal como se describe a continuación.

Se disolvió 1 g de CF en 5 ml de agua Milli-Q, añadiendo unas lentejas de NaOH hasta la completa disolución, con ayuda de agitación magnética (pH=9). Se neutralizó con HCL diluído hasta pH=7.4, finalmente se enrasó en matraz aforado de 10 ml.

Sobre una columna cromatográfica de Sephadex^R LH 20 se eluyó con agua Milli-Q y se recogieron seis fracciones de 10 ml cada una de color anaranjado.

Se valoró la concentración de CF en cada alícuota por su absorbancia a 490 nm y aplicando la ley de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon b c$$

siendo A la absorbancia, ϵ coeficiente de absorción molar (CF $\epsilon=70000$), b grosor de la cubeta en cm, c la concentración molar.

Las soluciones con mayor concentración de CF se reunieron, se liofilizaron y se guardaron a 4°C.

2.3. Preparación, Purificación y Caracterización de liposomas

2.3.1. Preparación de liposomas SUVs

En primer lugar se prepararon los liposomas multilaminares grandes, MLVs, de DPPC, DPPC-10% PI, DPPC-10% PG, DPPC-10% DPPE, DPPC-10% CL y DPPC-5% SA. Para ello se disolvieron 40 mg de DPPC, para el primero; 36 mg de DPPC y 4 mg del fosfolípido correspondiente para los siguientes; 38 mg de DPPC y 2 mg de SA para

Materiales y Métodos

el último, en un balón de vidrio con 3 ml de cloroformo. Se rotaevaporaron para formar una película en las paredes del balón, durante 30 min. Para eliminar las posibles trazas de disolvente se mantuvieron durante 45 min en la liofilizadora. La película se hidrató con 2 ml de solución de acetato, TAC (pH=7.4); se homogeneizó al baño de ultrasonidos para desprender el fosfolípido de las paredes del balón, y se controló el pH mediante papel indicador. Se llevó a incubación a 10°C por encima de la temperatura de transición según el fosfolípido utilizado. De este modo se obtuvo una suspensión de aspecto lechoso de liposomas (MLVs).

A continuación se sonicó con la sonda de Ti a 100 wats de potencia durante 2 min, y 1 min de reposo con flujo de nitrógeno (8 veces). Seguidamente se centrifugó a 20000 rpm o 50000 g, para separar en el precipitado el titanio y los posibles MLVs del sobrenadante, donde están los SUVs.

El método de preparación es igual para todos los diferentes tipos de SUVs estudiados, a excepción de los liposomas conteniendo un 5% de SA. Al seguir la misma pauta estos precipitaban. Una vez hidratados se solucionó el problema, congelándolos a -70°C durante 5 min y descongelándolos a 60°C durante 5 min, operación que se repitió 5 veces. Después se sonicaron y centrifugaron, obteniéndose los SUVs.

Para los ensayos del potencial Z se siguió la misma pauta de preparación de los SUVs. Pero en vez de sonicarlos, éstos se obtuvieron, utilizando el baño de ultrasonidos por espacio de 2-4h. La concentración final de los liposomas SUVs fue de 7 mg/ml.

Para los ensayos de DSC se emplearon MLVs a una concentración final de 6 mg/100 µl, obtenidos siguiendo la misma pauta de preparación.

Para obtener los liposomas SUVs con CF encapsulada, se siguió la misma pauta, pero en lugar de hidratarlos con TAC se les añadió una solución de CF 60 mM.

2.3.2. Purificación de los SUV

2.3.2.1. Cromatografía sobre gel de Sephadex^R.

Para eliminar la CF no encapsulada se sometió la preparación a una cromatografía en columna. Para ello se hidrataron 8 g de Sephadex^R G-50 con TAC, y se rellenó la columna de 30x2 cm de vidrio. Se depositaron los 2 ml de SUVs preparados y se eluyeron con TAC, recogiendo 6 fracciones de 1 ml, a las cuáles se les determinó la latencia diluyéndolas 500 veces. Las de mayor latencia se reunieron en un matraz y se

enrasaron a 2 ml.

2.3.2.2. Diálisis.

Con el fin de eliminar completamente los restos de CF libre de los liposomas se dializaron durante 24h frente a 250 ml de TAC, bajo agitación continua, cambiando el dializado 1 vez.

2.3.3. Análisis de los liposomas

2.3.3.1. Determinación cuantitativa del fosfolípido

A lo largo del proceso de preparación de los liposomas tienen lugar pérdidas inevitables de fosfolípido por: formación de pequeños aerosoles durante la sonicación, por procesos de centrifugación o diálisis, entre otros motivos. Por ello es fundamental conocer la cantidad de lípido contenido en los liposomas una vez preparados. En este trabajo se siguió el método de M^cClare (1971), que cuantifica el fosfolípido de manera indirecta valorando el contenido de fósforo colorimétricamente. Para ello es necesario preparar:

* Reactivo: soluciones A y B mezcladas isovolumétricamente (ver apartado 1.4 de *Materiales*).

* Solución patrón de fosfatos: como patrón inorgánico se empleó Na_2HPO_4 secado hasta peso constante a 110°C . Se preparó una disolución de $34.67 \mu\text{g/ml}$ en agua (equivalente a $75.70 \mu\text{g/ml}$ de fósforo).

Primeramente se prepararon las disoluciones precisas de la solución patrón de fosfatos para obtener la recta de calibrado. A tal propósito se pipetearon 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, y 1.5 ml de solución estándar en tubos de Pyrex, correspondientes a 2.55, 5.10, 7.65, 10.20 y $15.30 \times 10^{-2} \mu\text{mol}$ de fósforo, respectivamente.

Por otro lado, se prepararon las muestras de liposomas a valorar pipeteando en tubos del mismo tipo que el anterior el volumen de liposomas preciso para conseguir una concentración aproximada de $40 \mu\text{g}$ de fosfolípido/ml.

Seguidamente se liofilizaron los contenidos de todos los tubos, se añadieron 0.5 ml de ácido perclórico al 70% y se dejaron digerir las muestras durante 30 min en un bloque termostatzado a 210°C . Pasado ese tiempo, se dejaron enfriar, se adicionó a

Materiales y Métodos

cada tubo 9.5 ml del reactivo recién preparado (solución A+B), mezclando a continuación. Se calentaron los tubos a 50°C durante 1 h, con lo que apareció un color azul-verdoso estable en los mismos. Tras haberse enfriado las muestras, se leyó la absorbancia a 825 nm en cubetas de plástico.

Todas las muestras se prepararon por duplicado. Se utilizó como blanco un tubo que contenía únicamente todos los reactivos.

2.3.3.2. Determinación del tamaño de los liposomas

Se determinó por Laser Light Scattering. Mediante esta técnica se detecta la dispersión de la radiación debida al movimiento browniano de las partículas en solución o en suspensión. Se determinan los tamaños, porcentaje de población existente para cada uno, en función de la intensidad de luz dispersada por la muestra, así como su polidispersión.

2.4. Técnica instrumental utilizada en los estudios de fluorescencia

2.4.1. Determinación de la fluorescencia de CF

La fluorescencia de una solución de liposomas con carboxifluoresceína se expresa en forma de latencia (ecuación 1). Este parámetro nos da una idea de la CF que se encuentra en el interior de los liposomas respecto a la que se ha liberado. La variación de la fluorescencia a lo largo del tiempo se determinó para muestras de liposomas incubados con péptido o con TAC.

$$\text{Latencia (\%)} = \frac{F_t - F_x}{F_t} * 100 \quad (1)$$

siendo F_t la fluorescencia total después de romper los liposomas con triton X-100 (10%) y F_x la fluorescencia inicial.

Así pues se incubaron en distintos eppendorf 5 μ l de SUVs con CF encapsulada y 1400 μ l de TAC o solución péptidica, a distintas relaciones molares. Con el fin de ver la influencia de los péptidos en la estabilidad de los liposomas.

Transcurridos 15, 30, 45 y 60 min se extrajeron 5 μ l de la mezcla; se diluyeron en 2.5 ml de TAC y se leyó la fluorescencia del medio. Las condiciones de lectura fueron: λ_{exc} = 490 nm, λ_{em} = 520 nm, y las rendijas de excitación como de emisión 5/5. Seguidamente se añadieron a la solución diluida 50 μ l de Triton^R X-100 al 10 %, para romper

los liposomas y determinar la fluorescencia total.

2.4.2. Marcaje de los liposomas

Para el marcaje de los liposomas se tomaron 250 μl de SUVs 0.027 M y 250 μl de solución de DPH (5×10^{-5} M) o ANS (9×10^{-5} M). La proporción de PL/sonda fluorescente fue 1:420; 1:230 para DPH y ANS respectivamente. La preparación se mantuvo durante 1h a 10°C por encima de la T_c del fosfolípido utilizado, resguardados de la luz.

El marcaje de los liposomas conteniendo un 10% de PG se realizó aumentando la cantidad de fluoróforo respecto a la de fosfolípido, es decir a fracciones molares PL/sonda inferiores 1:380; 1:260, para DPH y ANS respectivamente. Lo cual se debió a la dificultad de saturación de los liposomas, ya que los resultados de la polarización de fluorescencia fueron erráticos, sobretodo con el ANS.

2.4.3. Lectura de polarización de fluorescencia

Se tomaron 50 μl de SUVs saturados con marcador fluorescente y se introdujeron en las cubetas de cuarzo para fluorimetría, las cuáles contenían 3 ml de solución peptídica 5×10^{-6} M en el caso del problema o 3 ml de TAC en el caso del estándar (por duplicado).

Las muestras se dejaron equilibrar un mínimo de 10 min, bajo agitación magnética. Las lecturas se realizaron entre los 20°C y 50°C , aumentando en 5°C al principio, y alrededor de la T_c el incremento de temperatura fue de 3°C .

A cada temperatura se realizaron los espectros de Fluorescencia y se efectuaron las lectura de la constante G y de la polarización correlativamente, para cada cubeta y por triplicado.

Para observar las variaciones se representó gráficamente los valores, tanto de Intensidad de fluorescencia como de polarización, frente a la temperatura. Los resultados de la polarización se trataron estadísticamente para conocer si las diferencias eran significativas ($P < 0.05$). Además, los valores de polarización con DPH se ajustaron a la ecuación de una sigmoide, calculándose la primera derivada, con el fin de conocer la T_c .

2.5. **Técnica instrumental utilizada en los ensayos de DSC**

Materiales y Métodos

Se prepararon MLVs de todos los liposomas estudiados, con y sin péptido incorporado, a las mismas proporciones empleadas en las lecturas de fluorescencia, y fijando la cantidad de DPPC en 6 mg. El volumen de cada una de las muestras fue 100 μ l.

Se depositaron 10 μ l de cada muestra en cápsulas de aluminio y a continuación se sellaron. Las medidas calorimétricas se realizaron en un rango, de 20°C a 60°C, a una velocidad de barrido de 5°C/min. Como referencia se empleó H₂O.

2.6. Técnica instrumental empleada en monocapas

2.6.1. Instrumento de medida

Las determinaciones se han realizado con un manómetro superficial del tipo Langmuir cuyo esquema se muestra en la figura 15, diseñado en nuestro laboratorio y que responde a una doble finalidad:

1- Medida y registro continuo de la tensión superficial en función del área ocupada por la monocapa (isotermas de compresión o curvas de presión-área).

2- Registro de los procesos cinéticos en superficie a área y presión superficial constantes.

Según si la determinación efectuada fuese de cinéticas de penetración a área constante o isotermas de compresión, se han empleado dos tipos diferentes de cubetas. Para el primer caso se utilizó una cubeta circular de politetrafluoroetileno (Teflón) de 70 ml de capacidad. Para facilitar la incorporación de sustancias en la subfase, la cubeta dispone de un orificio lateral con el que se pretende no alterar el estado de la monocapa. El reducido tamaño de la cubeta permite disminuir la cantidad de lípido a emplear para formar la monocapa.

Las isotermas de compresión se han realizado en una cubeta fabricada con Teflón, sobre un soporte sólido de acero. La cubeta consta de un compartimento menor o reaccional, que se usa para procesos cinéticos, y uno mayor o reservorio, que es el empleado para las isotermas de compresión. Mide 28.4 cm de largo, 17.45 cm de ancho y 0.625 cm de profundidad, poseyendo una superficie de 495 cm² y un volumen de 310 ml. Sobre los bordes de esta cubeta se desliza una barrera móvil de Teflón sobre un borde de cobre de 0.9 cm de ancho, 22 cm de largo y 3.1 cm de ancho, que posibilita la compresión o expansión de la monocapa, de manera que la superficie que ocupa la monocapa vendrá condicionada por la posición de la barrera móvil.

La tensión ejercida por la lámina de Wilhelmy sobre la electrobalanza se convierte 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. De este modo, es posible registrar gráficamente, y en función del tiempo, los valores de tensión eléctrica (mV) procedentes de la electrobalanza, los cuales son a su vez proporcionales a los valores de tensión superficial del líquido problema.

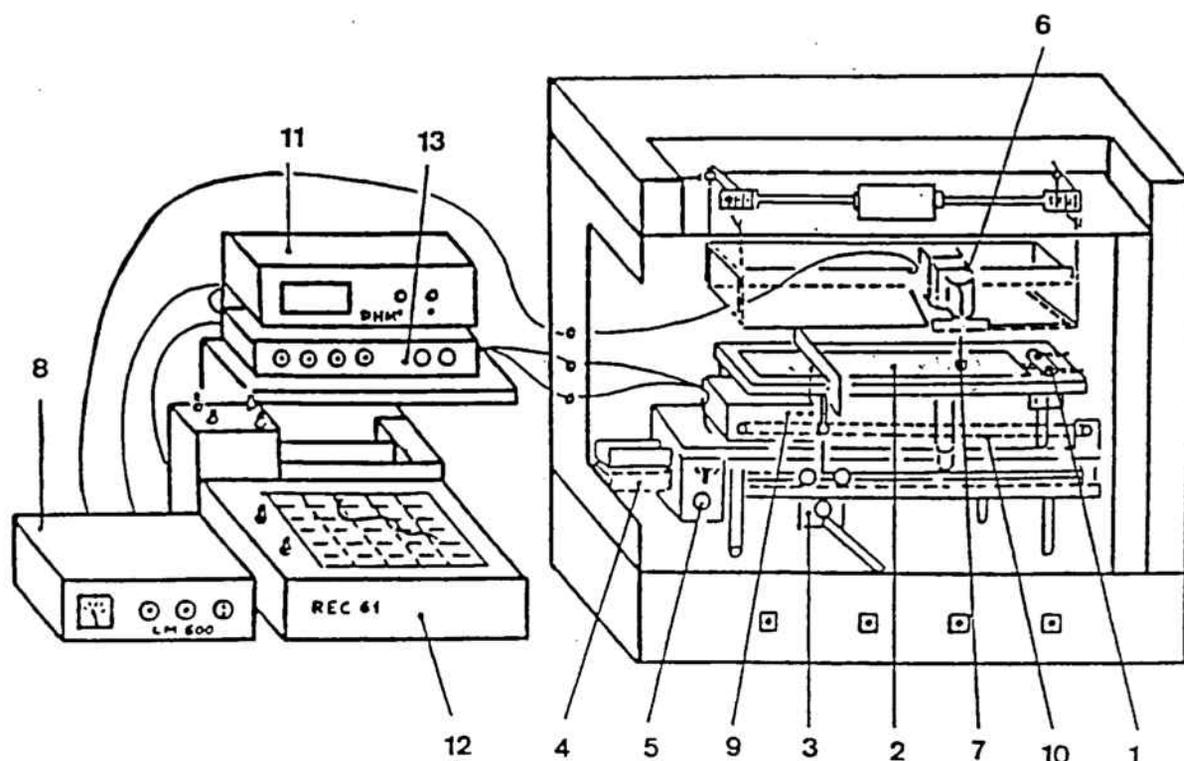
2.6.2. Elección del disolvente

Con el propósito de obtener monocapas óptimas, es necesario considerar el proceso de extensión de la misma, los factores que afectan a su formación y tener evidencia de su estructura molecular. La mayoría de las veces, las sustancias potencialmente formadoras de capas monomoleculares precisan de los llamados disolventes de extensión, que facilitan la determinación de la cantidad de producto a extender. Las características que debería cumplir un disolvente de extensión ideal son:

- * Tener suficiente poder disolvente.
- * Ser químicamente inerte con la sustancia que forma la monocapa y con la subfase.
- * Ser fácilmente purificable.
- * Presentar elevada volatilidad.
- * Ser poco soluble en agua.

Sería deseable que el disolvente facilitase la etapa de extensión y que a continuación desapareciera de la interfase por evaporación. Para ello se escogen disolventes de punto de ebullición entre 40 y 50°C.

El disolvente usado en el presente trabajo para disolver las sustancias formadoras de monocapas fue el cloroformo.



- 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 usa para las isotermas de compresión. 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 control 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 *Readiometer Copenhagen REC 61 Servogrph*.
- 13 Módulos *REA 160 TITRIGRAPH Module* y *REA 260 Derivation Unit*.

Figura 15:Esquema del instrumento de medida utilizado en los estudios con monocapas.

2.6.3. Isotermas de compresión

Primeramente se prepararon, las diferentes soluciones de fosfolípidos puros de DPPC, SA y PI; las mezclas de DPPC-10% PI y DPPC-5% SA; después las mezclas de los fosfolípidos DPPC, DPPE y CL en cloroformo a diferentes fracciones molares de ambos componentes: 100:0, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80 y 0:100. Se llenó el compartimento reservorio con 330 ml de solución tampón pH=7.4 (PBS), con y sin péptido.

Seguidamente 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 a la vez que se desplaza manualmente la barrera de un extremo al otro de la cubeta. Este proceso se repitió en tres ocasiones antes de cada determinación y en diferentes sentidos de avance de la barrera. Luego se conectaron los agitadores mecánicos y se puso la lámina de Wilhelmy en contacto con la superficie de la solución tampón accionando el mecanismo de desplazamiento vertical de la microelectrobalanza.

Tras equilibrar la balanza, o sea, cuando se alcanzó un valor fijo de mV en el potenciómetro, se situó la pluma del registrador en el punto de inicio del papel, que corresponde a una presión superficial nula del mismo. A continuación se extendió mediante microjeringas de precisión Hamilton (de una sensibilidad de $0.1 \mu\text{l}$) un volumen exactamente medido de la solución de lípido o de mezclas lípidos a estudiar. En los estudios con péptido, éste se incorporó previamente unos 5 min aprox. en la subfase.

Una vez transcurrido el tiempo necesario para la estabilización de la monocapa (5 min) se puso en marcha simultáneamente el motor de avance de la barrera móvil y el papel de registro (a una velocidad de $4.2 \text{ cm}\cdot\text{min}^{-1}$), obteniéndose un registro de la variación de mV procedentes de la electrobalanza con respecto al tiempo. Las variaciones de mV fueron luego transformadas en valores de presión superficial (π) en $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ y el tiempo en área molecular en unidades de $\text{nm}^2\cdot\text{moléc}^{-1}$, consiguiéndose así las curvas de presión-área o isothermas de compresión.

La sensibilidad de la electrobalanza fue tal que la variación de $1 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ correspondía a 4.02 mV.

2.6.4. Cinéticas de penetración a área constante

Los estudios de determinación de la actividad superficial del péptido se realizaron en la misma cubeta. Se inyectaron concentraciones variables y crecientes del mismos, determinándose la presión superficial en función del tiempo. La concentración a la que se alcanzó el equilibrio de saturación fue la que se inyectó en los estudios de penetración a área constante.

Materiales y Métodos

Se prepararon disoluciones de los lípidos en cloroformo de concentraciones del orden de 1.40×10^{-3} M. En las determinaciones a área constante se registró el incremento de presión superficial, producto de la incorporación a la superficie de sustancias disueltas previamente en el soporte, frente al tiempo.

Para estos estudios se utilizó una cubeta de 70 ml de capacidad (ver apartado 2.6.1), que contenía la subfase en agitación continua. Sobre ella se sumergió la parte inferior de la lámina de Wilhelmy hasta que se obtuvo en el potenciómetro un valor comprendido entre 294 y 290 mV.

Seguidamente se extendió la monocapa con una microjeringa de forma que la presión superficial inicial (π_i) alcanzase el valor deseado de 5, 10 o 20 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Tras dejar pasar un reducido tiempo de estabilización se procedió a la inyección en la subfase de un volumen concreto (100 μl) de solución de péptido (0.19 mM) y al accionamiento del mecanismo de avance del papel.

RESULTADOS Y DISCUSION

RESULTADOS Y DISCUSION

1. CARACTERIZACION DE LA SINTESIS PEPTIDICA

1.1. MAP₄VP1 (11-25)

La síntesis del MAP₄VP1 (11-25) se ha realizado en fase sólida (en el lab. Péptidos del C.S.I.C) utilizando una resina Wang cuya funcionalización inicial era de 0.8 mEq/g. La incorporación del 1^{er} AA del sistema (F_{moc}-Ala) se llevo a cabo en menor extensión para conseguir una funcionalización de la resina del orden de 0.1 mEq/g. La razón de esta limitación es la de evitar los impedimentos estéricos, que podrían originarse debido al gran volumen del sistema MAP durante su síntesis.

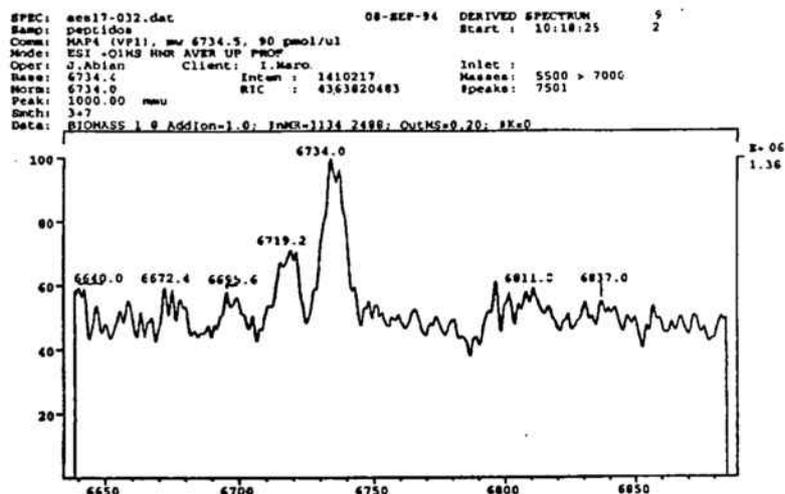
En la síntesis se empleó un triple exceso de AA como de reactivos de condensación , y el tiempo de reacción se prolongó por espacio de 2.5-3 h para asegurar las reacciones. Además se requirieron tratamientos con Pip/DMF más prolongados en las reacciones de desprotección sucesivas de los grupos α -aminos terminales.

Se reaslizaron controles analíticos exhaustivos. El test de ninhidrina en cada acoplamiento, tanto antes como después de él. El core de lysina (Lys₃-Ala) y varios intermedios de sintéticos fueron controlados por AAA y por ES-MS. Se repitió la carga de Ile, 2^a Val, Glu, 1^{er} Thr y 3^{er} Val. Asimismo, fue necesario añadir una pequeña cantidad de DMF a la peptidil-resina junto con cada AA y con los reactivos para asegurar una adecuada consistencia semilíquida. Los problemas expuestos se debieron a la compleja estructura del sistema MAP, puesto que en cierto modo se parece más a una molécula proteica que a una peptídica, ya que su peso molecular es muy elevado.

Al finalizar la síntesis se procedió al secado y desanclaje del MAP₄VP1 (11-25) según el procedimiento descrito en el apartado 2.1. de *Métodos*. Después se dializó el producto obtenido tal como se describe en el apartado 2.2. de *Métodos*, siendo el rendimiento global tras el proceso de purificación de un 36.8 %.

El péptido se carecterizó por ES-MS (figura 16), donde se aprecia un pico mayoritario que corresponde al PM de la estructura sintetizada.

Resultados y Discusión



$[M+H]^+ = 6734.0$
 MAP₄VP1(11-25)

Figura 16 : Espectro de masas correspondiente al MAP₄VP1 (11-25).

También, se realizaron un AAA y un análisis por HPLC de la estructura sintetizada, cuyos resultados se refieren en la tabla 3.

Tabla 3 : Caracterización del sistema MAP₄VP1 (11-25).

Análisis de aminoácidos*	HPLC**
D= 6.5 (8) ; A= 1 (1)	K'= 3.5
E= 9.02 (12); P= 5.94 (8)	
S= 2.1 (4) ; V= 12.37 (12)	
G= 3.08 (4) ; I= 2.72 (4)	
T= 5.1 (8) ; K= 1.25 (3)	

* Valores teóricos entre paréntesis

** Condiciones de HPLC: Spherisorb C-18 (10 μ); elución en gradiente con A= H₂O(0,05%) y B= ACN(0,05%), 20% B hasta un 80% B en 20 min.

2. ESTUDIOS FISICOQUIMICOS EN MONOCAPAS

2.1. Actividad superficial del MAP₄VP1 (11-25)

Estos experimentos se llevaron a cabo en una cubeta de 70 ml de capacidad, tal como se describe en los apartados 2.6 de *Métodos*. Para determinar la presión de saturación se inyectaron volúmenes crecientes de una solución concentrada del péptido MAP₄VP1 (11-25) en una subfase de PBS, registrándose los incrementos de presión superficial durante un período de 60 min. En la figura 17 se observan los incrementos de presión a lo largo del tiempo para diferentes concentraciones del péptido ensayado.

ACTIVIDAD SUPERFICIAL

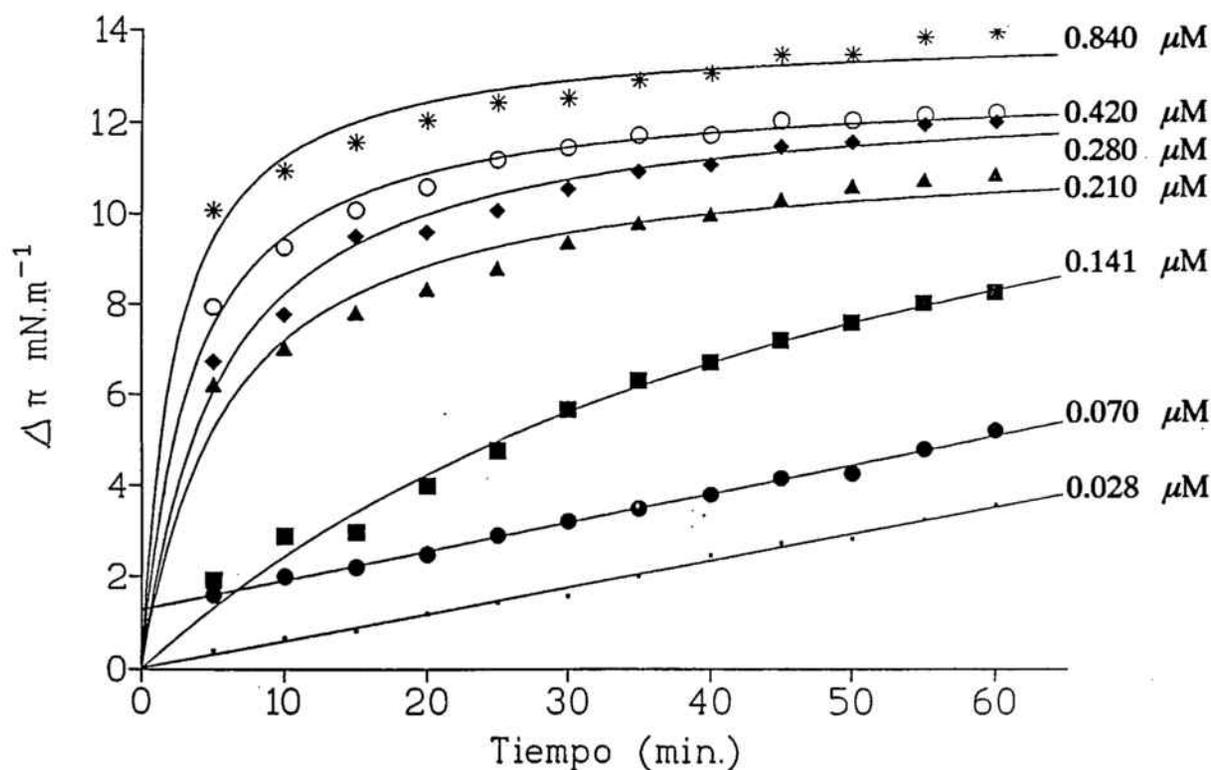


Figura 17 : Incremento de presión superficial inducido por el MAP₄VP1, medido a diferentes concentraciones del mismo en la subfase.

Resultados y Discusión

El proceso se desarrolló muy rápido, ya que después de los primeros 5 min se había alcanzado el 80% de la presión máxima. La incorporación del péptido a la interfase aire-agua depende de la concentración del mismo. La saturación se producía para una concentración peptídica 0.85×10^{-6} M.

Ahora bien, para un mejor conocimiento de como se produce la incorporación de las moléculas del péptido a la interfase se aplicaron las ecuaciones 1 y 2, asumiendo que el incremento de presión es proporcional a la cantidad de moléculas del mismo situadas en la interfase.

$$P = a + bt \quad (1)$$

$$\frac{1}{P} = \frac{K}{P_m t} + \frac{1}{P_m} \quad (2)$$

donde P se mide en mN/m, t es el tiempo en min. El valor de P_m representa la máxima presión conseguida cuando se llega a la saturación y K es el tiempo que se tarda en alcanzar la mitad de la presión máxima, es decir la mitad de la saturación ($t_{1/2}$).

El tratamiento matemático de los resultados indica que a bajas concentraciones (tabla 4), el incremento de la presión está relacionado con el tiempo de forma lineal y la saturación no se alcanza. Pero a altas concentraciones (tabla 5), la relación del incremento de presión-tiempo sigue la ecuación de una hipérbola rectangular (2).

Tabla 4 : Parámetros matemáticos que definen la incorporación del MAP₄VP1 en la interfase aire-agua.

Conc. (μ M)	a (mN/m)	b (mN/m min)	r^2
0.028	0.03 ± 0.06	0.058 ± 0.002	0.992
0.070	1.29 ± 0.05	0.063 ± 0.001	0.996

Tabla 5 :Parámetros matemáticos que definen la incorporación del MAP₄VP1 en la interfase aire-agua.

Conc. (μM)	P_m (mN/m)	K (min)	r^2
0.141	16.03 \pm 1.53	55.7 \pm 9.1	0.983
0.210	11.52 \pm 0.34	6.0 \pm 0.9	0.919
0.280	12.75 \pm 0.26	5.5 \pm 0.6	0.956
0.420	12.82 \pm 0.13	3.5 \pm 0.2	0.977
0.840	13.91 \pm 0.22	2.4 \pm 0.3	0.891

A partir de una concentración 0.21 μM de péptido podemos observar que ΔP pequeños van acompañados de un ligera disminución de K. Esto significa que cuando en la subfase la concentración de péptido es alta, éste se incorporará más rápidamente a la interfase.

En la figura 18 se representa los $\Delta\pi$ superficiales alcanzados por las diferentes concentraciones estudiadas. La curva observada se ajusta a la ecuación de una hipérbola rectangular de tipo:

$$P = \frac{(P_m \cdot t)}{(K + t)}$$

siendo P_m Presión máxima y K Tiempo que tarda en alcanzar $P_m/2$.

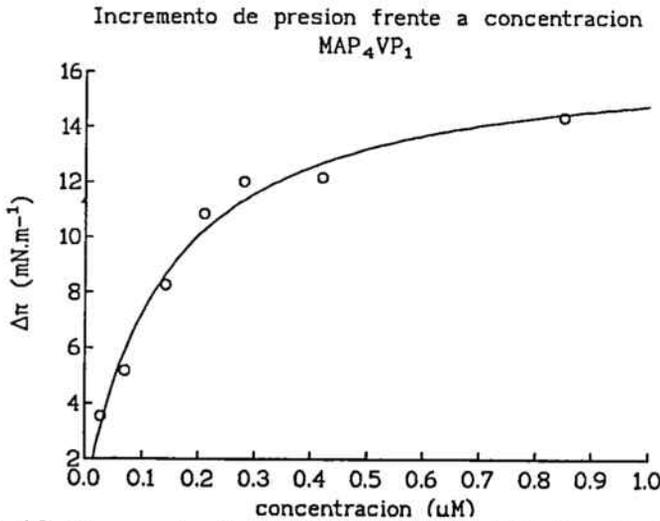


Figura 18 :Incremento de presión superficial a 60 min inducido por el MAP₄VP1,medido a diferentes concentraciones del mismo en la subfase.

Resultados y Discusión

Tabla 6 : Parámetros del tratamiento matemático de la curva de la figura 18.

P_m (mN/m)	K (min)	r^2
16.55±0.84	0.13±0.02	0.979

A continuación se aplicó la ecuación que define la isoterma de adsorción de Gibbs (3), para el cálculo del exceso superficial del péptido en la interfase con respecto a su concentración en la subfase. También, se determinó el área por molécula (4), ver tabla 7.

$$\Gamma = -\frac{1}{RT} \cdot \frac{\Delta P}{\Delta \ln C} \quad (\text{mol/cm}^2) \quad (3)$$

$$\text{Area} = \frac{1}{N\Gamma} \quad (\text{nm}^2/\text{molec.}) \quad (4)$$

donde R vale 8.3×10^7 mN/Kmol, T= 294 K, ΔP es el incremento de presión, C es la concentración de péptido en la subfase y $N= 6.023 \times 10^{23}$ molec./mol.

Los valores de C, Γ , Area se muestran en la tabla 7. A partir de dichos valores se puede ver que la presión de saturación se alcanzó para una presión superficial de 12 mN/m, la cuál corresponde a un exceso (Γ) de 2.39×10^{-11} cm²/mol.

Tabla 7 :Exceso superficial y área por molécula de MAP₄VP1 a diferentes concentraciones iniciales.

Concentración (μM)	Exceso Γ (mol/cm ²)	Area (nm ²)/molec.
0.028	6.38×10^{-12}	26
0.070	9.70×10^{-12}	17
0.141	1.60×10^{-11}	10
0.21	2.14×10^{-11}	7
0.28	2.39×10^{-11}	6.9
0.42	2.54×10^{-11}	6.5
0.85	3.05×10^{-11}	5

2.2. Cinéticas de penetración a área constante

2.2.1. Cinéticas de penetración de fosfolípidos puros

Las cinéticas de penetración a área constante del MAP₄VP1 se realizaron en monocapas lipídicas de DPPC, PI, SA, DPPG, DPPE y CL. La cantidad inyectada del péptido fue $0.28 \mu\text{M}$, la cuál es ligeramente inferior a la concentración a la que se alcanzó la presión de saturación. Se detectó una clara interacción del péptido con las monocapas de todos los fosfolípidos. En todos los casos existe una dependencia entre el incremento de presión superficial máximo y la presión inicial estudiada a 5,10 y 20 mN/m.

En los registros obtenidos para la DPPC de la figura 19 se observa, que a la presión inicial de 5 mN/m los máximos de $\Delta\pi$ superficial se alcanzan en los primeros 30 min. En cambio, a las presiones iniciales de 10 y 20 mN/m la incorporación del péptido a la interfase aire-agua se realiza de modo gradual.

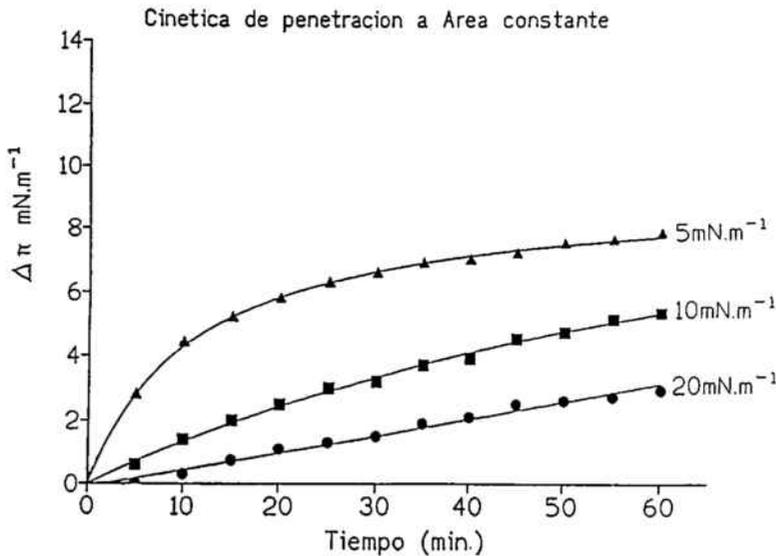


Figura 19 : Incremento de la presión superficial a las presiones iniciales de 5,10 y 20 mN/m de DPPC .La concentración de péptido en la subfase era $0.28 \mu\text{M}$.

La curva obtenida a 5 y 10 mN/m siguen un modelo de ecuación hiperbólica, mientras que la curva a 20 mN/m sigue la ecuación de una recta. Todos los parámetros matemáticos se detallan en la tabla 8.

Resultados y Discusión

Tabla 8 : Parámetros matemáticos obtenidos de las curvas para la DPPC con MAP₄VP1 a las presiones superficiales iniciales de 5,10 y 20 mN/m.

π_0 (mN/m)	P_m (mN/m)	K (min)	r^2
5	9.11±0.08	11.21±0.35	0.998
10	12.75±0.93	84.77±9.26	0.996
π_0 (mN/m)	a (mN/m)	b (mN/m min)	r^2
20	- 0.10±0.08	0.053±0.002	0.982

En el caso de fosfatidilinositol, los registros del $\Delta\pi$ superficial obtenidos a las presiones estudiadas se muestran en la figura 20.

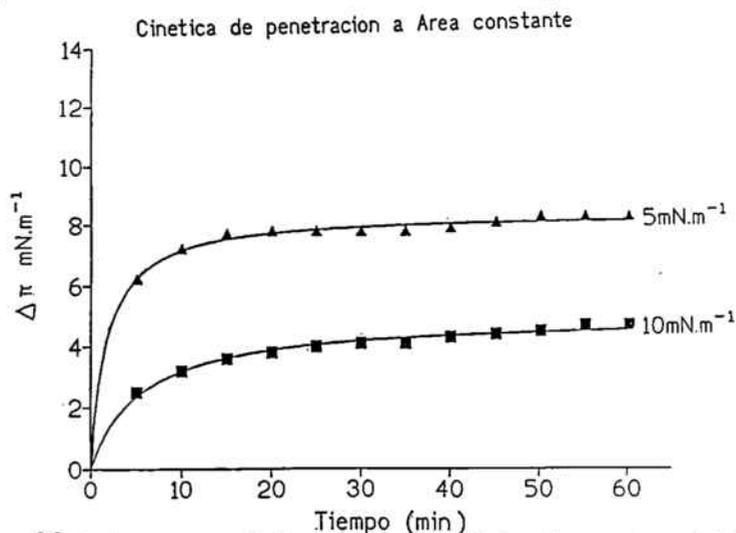


Figura 20 : Incremento de la presión superficial a las presiones iniciales de 5,10 y 20 mN/m de PI. La concentración de péptido en la subfase era 0.28 μ M.

En ellas se observa que los máximos del incremento de presión se alcanzaron en los primeros 10 min, dando idea de una incorporación rápida del péptido a la monocapa de PI. Estas curvas siguen la ecuación de una hipérbola, cuyos parámetros se detallan en la tabla 9.

Tabla 9 : Parámetros matemáticos obtenidos de las curvas para PI con MAP₄VP1 a las presiones superficiales iniciales de 5,10 y 20 mN/m.

π_0 (mN/m)	P_m (mN/m)	K (min)	r^2
5	8.42±0.07	1.76±0.16	0.948
10	4.95±0.08	5.51±0.50	0.969

A la presión inicial de 20 mN/m para el PI no se produce ninguna variación en el incremento de presión superficial. Este comportamiento ya se observó para otro tipo de moléculas peptídicas.

En el caso de la Estearilamina, las cinéticas de penetración a área constante son similares para las π superficiales iniciales de 10 y 20 mN/m ensayadas, como puede verse en la figura 21. En todas ellas los máximos de $\Delta\pi$ superficial se alcanzaron en los primeros 15 min. Ahora bien, para 5 mN/m la incorporación del péptido es más elevada y la saturación a los 60 min no se alcanza. Las curvas siguen un modelo de ecuación hipérbolica y los parámetros se muestran en la tabla 10.

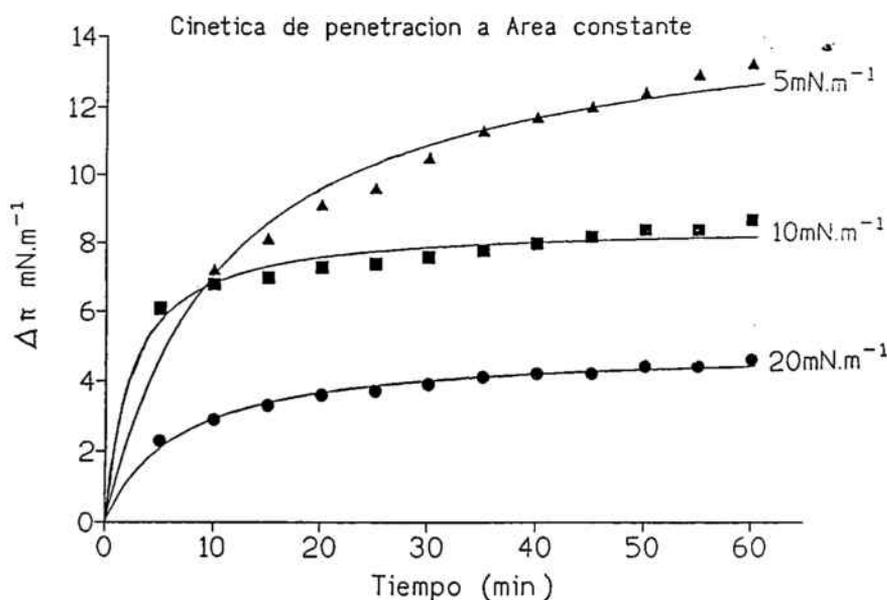


Figura 21 : Incremento de la presión superficial a las presiones iniciales de 5,10 y 20 mN/m de SA. La concentración de péptido en la subfase era 0.28 μ M.

Resultados y Discusión

Tabla 10 : Parámetros matemáticos obtenidos de las curvas para SA con MAP₄VP1 a las presiones superficiales iniciales de 5,10 y 20 mN/m.

π_0 (mN/m)	P_m (mN/m)	K (min)	r^2
5	14.98±0.64	11.29±1.72	0.939
10	8.53±0.17	2.48±0.43	0.846
20	4.90±0.09	6.76±0.61	0.972

Las cinéticas de penetración a las presiones iniciales ensayadas para la DPPG se muestran en la figura 22. La incorporación del péptido a la monocapa es muy dependiente de la presión superficial inicial. A 5 mN/m es muy rápida, alcanzándose en los primeros 10 min el mayor $\Delta\pi$ superficial. A las presiones de 10 y 20 mN/m, la incorporación es de modo gradual.

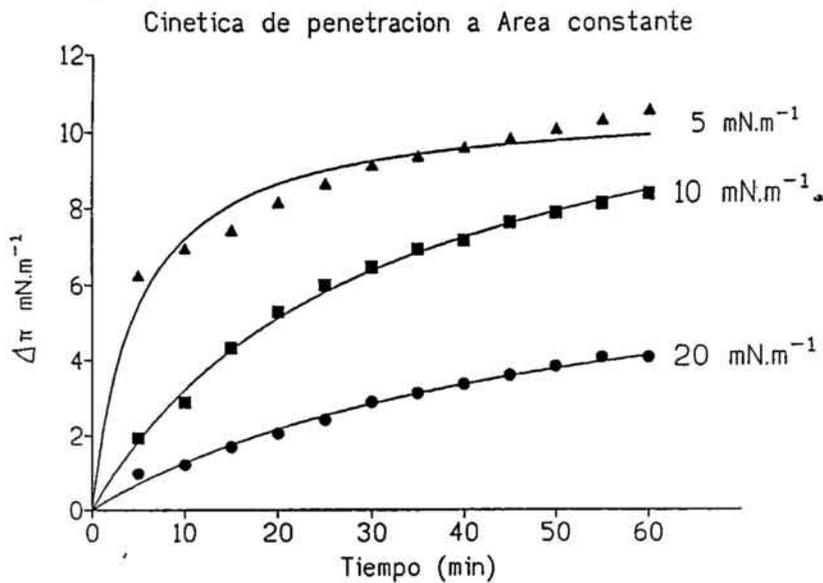


Figura 22 : Incremento de la presión superficial a las presiones iniciales de 5,10 y 20 mN/m de DPPG. La concentración de péptido en la subfase era 0.28 μ M.

Todos los registros siguen una ecuación hiperbólica, cuyos parámetros se detallan en la tabla 11.

Tabla 11 : Parámetros matemáticos obtenidos de las curvas para DPPG con MAP₄VP1 a las presiones superficiales iniciales de 5, 10 y 20 mN/m.

π_0 (mN/m)	P_m (mN/m)	K (min)	r^2
5	10.76±0.3	4.89±0.79	0.898
10	12.65±0.42	29.40±2.02	0.996
20	7.59±0.71	50.33±7.89	0.987

En el caso de la DPPE como puede verse en la figura 23, los registros cinéticos fueron muy diferentes a las presiones de 5, 10 y 20 mN/m. Para la presión de 5 mN/m la incorporación es muy rápida al principio y se alcanza la saturación en el transcurso de los primeros 40 min. A las presiones iniciales de 10 y 20 mN/m, la incorporación es de modo gradual. Lo cual hace suponer que existe una relación lineal de incorporación del péptido a la monocapa. Pero al aplicar el tratamiento matemático, todas las curvas siguen la ecuación de una hipérbola. Los datos se detallan en la tabla 12.

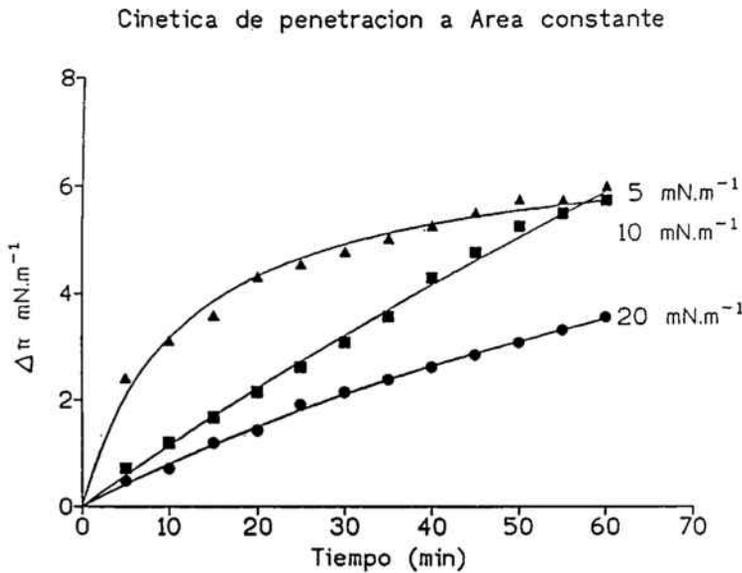


Figura 23 : Incremento de la presión superficial a las presiones iniciales de 5,10 y 20 mN/m de DPPE. La concentración de péptido en la subfase era 0.28 μ M.

Resultados y Discusión

Tabla 12 : Parámetros matemáticos obtenidos de las curvas para DPPE con MAP₄VP1 a las presiones superficiales iniciales de 5, 10 y 20 mN/m.

π_0 (mN/m)	P_m (mN/m)	K (min)	r^2
5	14.98±0.64	11.29±1.72	0.939
10	8.53±0.17	2.48±0.43	0.846
20	4.90±0.09	6.76±0.61	0.972

Las cinéticas de penetración con cardioplipina a las presiones iniciales de 5 y 10 mN/m son similares. Estas reflejan una rápida incorporación del péptido a la monocapa, alcanzándose los máximos del $\Delta\pi$ superficial en los primeros 15 min. A 20 mN/m se observa un tiempo de inducción de unos 30 min. Transcurrido este tiempo la incorporación del péptido es gradual, como puede verse en la figura 24.

Cinetica de penetracion a Area constante

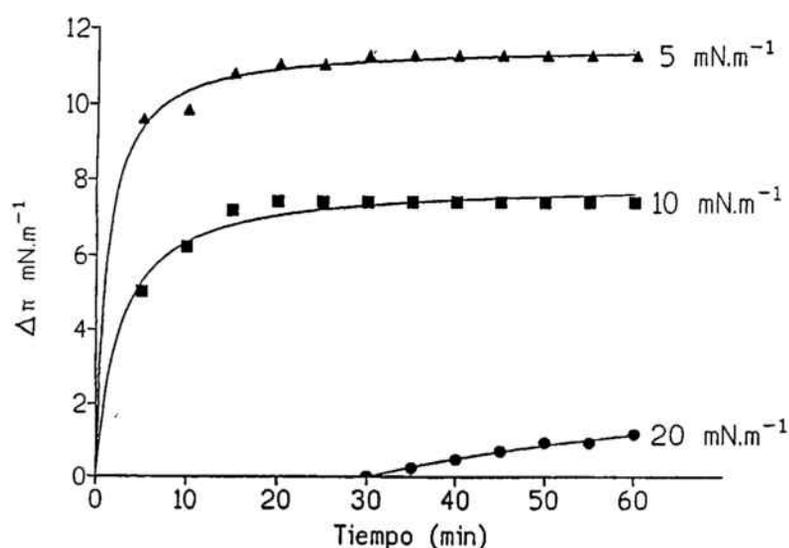


Figura 24 : Incremento de la presión superficial a las presiones iniciales de 5,10 y 20 mN/m de CL. La concentración de péptido en la subfase era 0.28 μM .

Al aplicar el tratamiento matemático a las cinéticas todas siguen la ecuación de una hipérbola. Los parámetros de las mismas se muestran en la tabla 13.

Tabla 13 : Parámetros matemáticos obtenidos de las curvas para CL con MAP₄VP1 a las presiones superficiales iniciales de 5, 10 y 20 mN/m.

π_0 (mN/m)	P_m (mN/m)	K (min)	r^2
5	6.87±0.22	11.61±1.20	0.977
10	33.86±9.01	283.3±85.9	0.997
20	11.37±1.3	130.9±19.3	0.997

En general, la presencia de monocapas de fosfolípidos a las diferentes presiones superficiales en las cinéticas de penetración a área constante se manifiesta reduciendo la presión máxima alcanzada. Así pues, para todos las monocapas a excepción de la de estearilamina tienen un efecto negativo en la actividad superficial del péptido. Este comportamiento es común para moléculas hidrofóbicas.

La monocapa formada por SA al tener carga positiva interaccionará electrostáticamente con el péptido, ya que éste tiene carga negativa. Por lo tanto, el MAP₄VP1 se incorporará a la interfase produciendo un mayor $\Delta\pi$ superficial.

A 5 mN/m de presión inicial los $\Delta\pi$ superficial fueron decreciendo en el siguiente orden SA, CL, DPPG, PI, DPPC y DPPE. Este comportamiento puede atribuirse a la carga de los fosfolípidos. Ahora bien, para las monocapas de los fosfolípidos PI, DPPG y CL, podría explicarse el efecto expansionante a pesar de ser ambos negativos, porque a 5 mN/m de presión superficial las moléculas en las isoterms de compresión se encuentran en estado líquido expandido y permiten la incorporación de moléculas peptídicas.

INCREMENTO DE PRESION SUPERFICIAL
0.28 μ M MAP-VP1

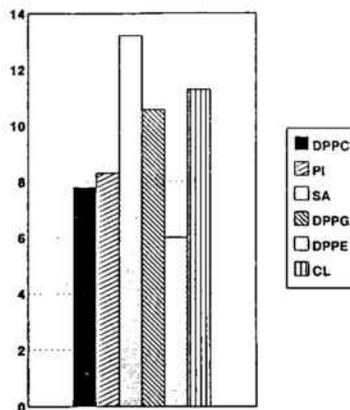


Figura 25 : Comparación de los $\Delta\pi$ superficial de los diferentes fosfolípidos puros a 5 mN/m, cuando la concentración de péptido en la subfase era de 0.28 μ M.

Resultados y Discusión

A 10 y 20 mN/m, los $\Delta\pi$ superficial fueron decreciendo en el siguiente orden SA, DPPG, CL, DPPE, DPPC y PI. En este caso, el volumen del grupo hidrófilo parece ser el factor regulador del $\Delta\pi$ superficial, junto con el factor carga.

2.2.2. Cinéticas de penetración con mezclas de fosfolípidos

De igual modo que en el anterior apartado se llevaron a cabo las cinéticas de penetración a área constante del MAP₄VP1 al extender monocapas de las siguientes mezclas de fosfolípidos, DPPC-PI (9:1), DPPC-SA (9:1), DPPC-DPPG (9:1), DPPC-DPPE (9:1), DPPC-CL (9:1). Para todas ellas continúa existiendo una elevada influencia de la presión superficial estudiada a 5, 10 y 20 mN/m sobre la presión superficial máxima alcanzada, cuando la concentración del péptido inyectada fue de 0.28 μM .

En la figura 26 se muestran los registros del $\Delta\pi$ superficial a las presiones iniciales estudiadas de 5, 10 y 20 mN/m para las monocapas de composición 90% DPPC- 10% PI. A 5 mN/m la incorporación del péptido a la monocapa fue rápida, alcanzándose los máximos de $\Delta\pi$ superficial en los primeros 30 min. A 10 y 20 mN/m de π superficial inicial la incorporación fue paulatina.

Cinetica de penetracion a Area constante

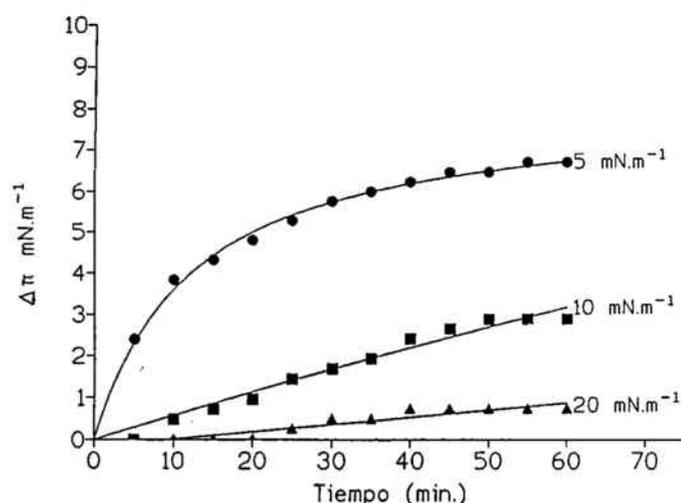


Figura 26 : Incremento de la presión superficial a las presiones iniciales de 5,10 y 20 mN/m para la composición 90% DPPC- 10% PI. La concentración de péptido en la subfase era 0.28 μM .

En la tabla 14 se citan los parámetros matemáticos obtenidos al ajustar las curvas a las ecuaciones, hipérbola y recta, según sea la presión superficial inicial estudiada.

Tabla 14 : Parámetros matemáticos obtenidos de las curvas para la composición 90% DPPC - 10% PI con MAP₄VP1, a las presiones superficiales iniciales de 5,10 y 20 mN/m.

π_0 (mN/m)	P_m (mN/m)	K (min)	r^2
5	8.2±0.1	12.6±0.8	0.992
π_0 (mN/m)	a (mN/m)	b (mN/m min)	r^2
10	- 0.08±0.12	0.056±0.003	0.968
20	- 0.16±0.07	0.017±0.002	0.880

Los registros cinéticos para la mezcla de DPPC-SA (9:1) se citan en la figura 27. En ellos se observa que los máximos de $\Delta\pi$ superficial a las presiones de 5 y 10 mN/m se alcanzaron en los primeros 40 min, mientras que a 20 mN/m fue antes, sobre los 20 min.

Cinetica de penetración a Área constante

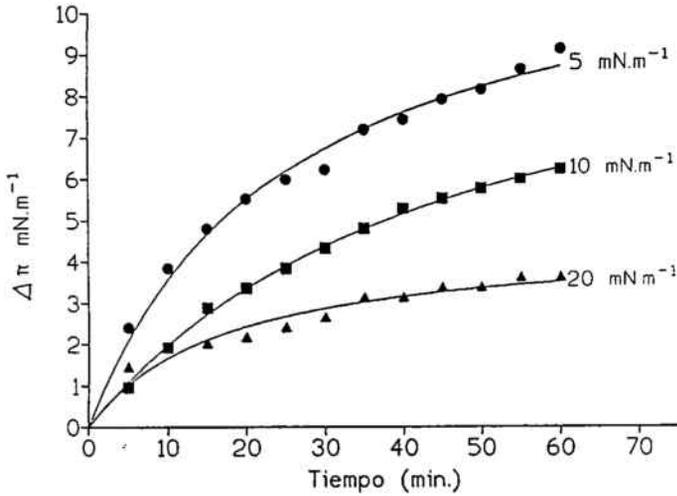


Figura 27 : Incremento de la presión superficial a las presiones iniciales de 5,10 y 20 mN/m para la composición 90% DPPC- 10% SA. La concentración de péptido en la subfase era 0.28 μ M.

En la tabla 15 vienen reflejados los parámetros matemáticos obtenidos al ajustar las curvas a la ecuación de una hipérbola.

Resultados y Discusión

Tabla 15 : Parámetros matemáticos obtenidos de las curvas para la composición 90% DPPC- 10% SA con MAP₄VP1 a las presiones superficiales iniciales de 5, 10 y 20 mN/m.

π_0 (mN/m)	P_m (mN/m)	K (min)	r^2
5	12.2±0.5	24.4±2.6	0.984
10	11.1±0.3	45.5±2.6	0.998
20	4.5±0.3	16.9±3.6	0.914

En el caso de DPPC-DPPG (9:1), los registros cinéticos se muestran en la figura 28. La incorporación del péptido a la interfase fue rápido, y los máximos $\Delta\pi$ superficial se alcanzaron en los primeros 20 min, a la presión inicial de 5 mN/m. A las presiones de 10 y 20 mN/m se observa una incorporación gradual.

Cinética de penetración a Area constante

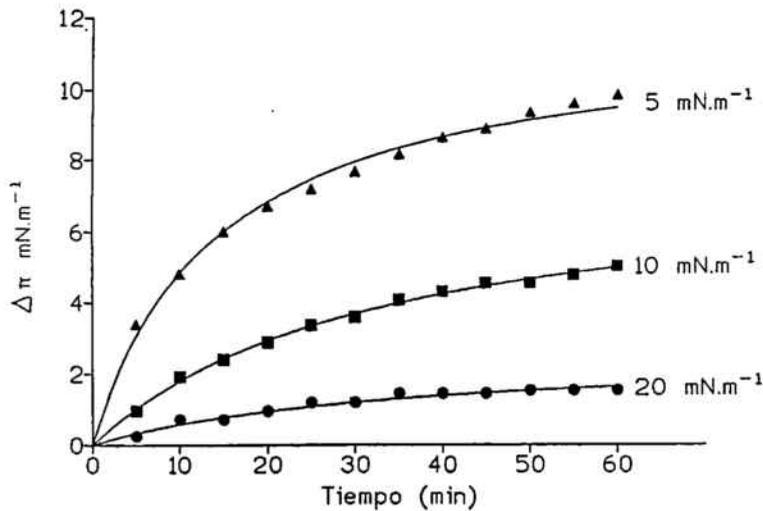


Figura 28 : Incremento de la presión superficial a las presiones iniciales de 5,10 y 20 mN/m para la composición 90% DPPC- 10% DPPG. La concentración de péptido en la subfase era 0.28 μ M.

Todas las cinéticas siguen una ecuación hiperbólica, cuyos parámetros matemáticos se citan en la tabla 16.

Tabla 16 : Parámetros matemáticos obtenidos de las curvas para la composición 90% DPPC- 10% DPPG con MAP₄VP1 a las presiones superficiales iniciales de 5, 10 y 20 mN/m.

π_0 (mN/m)	P_m (mN/m)	K (min)	r^2
5	11.77±0.3	14.33±1.05	0.991
10	7.78±0.23	33.21±1.9	0.998
20	2.56±0.27	33.85±7.05	0.978

Al estudiar el $\Delta\pi$ superficial a las presiones iniciales 5, 10 y 20 mN/m para DPPC-DPPE (9:1) se observó una incorporación similar para todas ellas. Los máximos de $\Delta\pi$ superficial se alcanzaron en los primeros 30 min, tal como se muestra en la figura 29. Las cinéticas siguen la ecuación de una hipérbola y sus parámetros matemáticos vienen en la tabla 17.

Cinetica de penetracion a Area constante

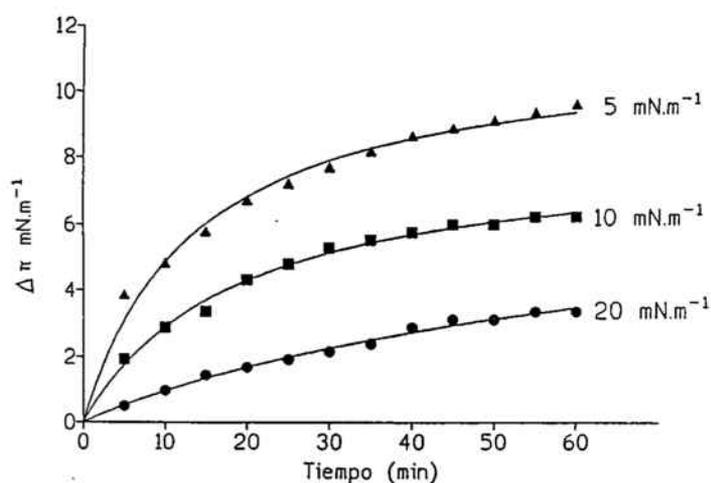


Figura 29 : Incremento de la presión superficial a las presiones iniciales de 5,10 y 20 mN/m para la composición 90% DPPC- 10% DPPE. La concentración de péptido en la subfase era 0.28 μ M.

Tabla 17 : Parámetros matemáticos obtenidos de las curvas para la composición 90% DPPC- 10% DPPE con MAP₄VP1 a las presiones superficiales iniciales de 5, 10 y 20 mN/m.

π_0 (mN/m)	P_m (mN/m)	K (min)	r^2
5	11.52±0.35	13.72±1.39	0.978
10	8.39±0.23	19.04±1.46	0.991
20	7.41±0.68	68.04±10.1	0.990

Resultados y Discusión

En el caso de DPPC-CL (9:1) los registros cinéticos de la figura 30 muestran una incorporación del péptido a la monocapa muy rápida a 5 mN/m, mientras a 10 y 20 mN/m ésta es gradual. También, a 20 mN/m existe un tiempo de inducción.

Cinetica de penetración a Area constante

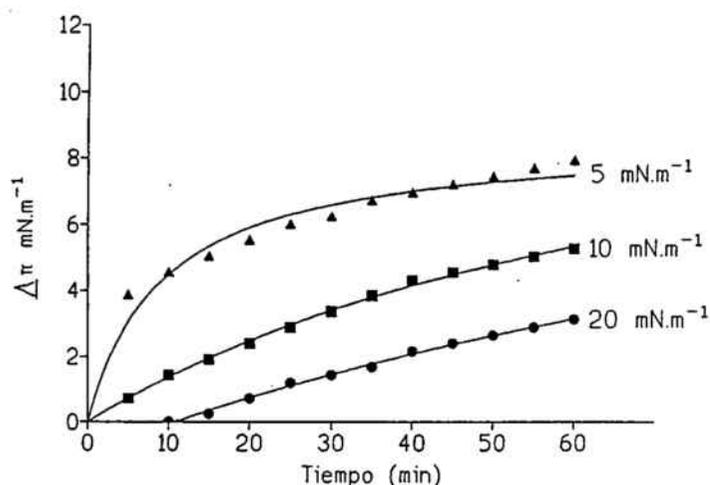


Figura 30 : Incremento de la presión superficial a las presiones iniciales de 5,10 y 20 mN/m para la composición 90% DPPC- 10% CL. La concentración de péptido en la subfase era 0.28 μM .

En la tabla 18 se citan los parámetros matemáticos de las curvas de DPPC-CL (9:1), las cuales siguen una ecuación hiperbólica, donde el tiempo de inducción es $t_0 = 10,8 \pm 0.64$ a 20 mN/m de presión inicial.

Tabla 18 : Parámetros matemáticos obtenidos de las curvas para la composición 90% DPPC- 10% CL con $\text{MAP}_4\text{VP1}$ a las presiones superficiales iniciales de 5, 10 y 20 mN/m.

π_0 (mN/m)	P_m (mN/m)	K (min)	r^2
5	8.6 ± 0.35	9.21 ± 1.5	0.923
10	12.68 ± 0.69	82.10 ± 6.8	0.997
20	12.10 ± 2.67	140.60 ± 40.8	0.996

En general, al estudiar el $\Delta\pi$ superficial de las cinéticas de penetración a área constante de las mezclas de fosfolípidos se observa un menor $\Delta\pi$ superficial, comparándolo con el mismo valor para los fosfolípidos puros. A excepción de las mezclas DPPC-DPPE (9:1) y DPPC-CL (9:1). Aparentemente, las monocapas de las mezclas están más condensadas que la de los componentes puros, y por tanto el péptido tiene más dificultades para incorporarse a la interfase (ver figura 31).

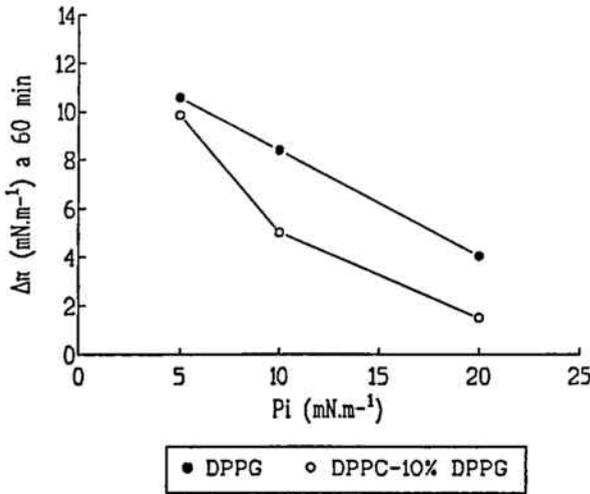


Figura 31 : $\Delta\pi$ superficial para la composición de 100% DPPG y 90% DPPC-10% DPPG a 5, 10 y 20 mN/m de π superficial inicial. La concentración de péptido en la subfase era de 0.28 μ M.

La estearilamina da un $\Delta\pi$ superficial mayor (ver figura 32), y las mezclas negativas con PI y DPPG tienen un comportamiento similar.

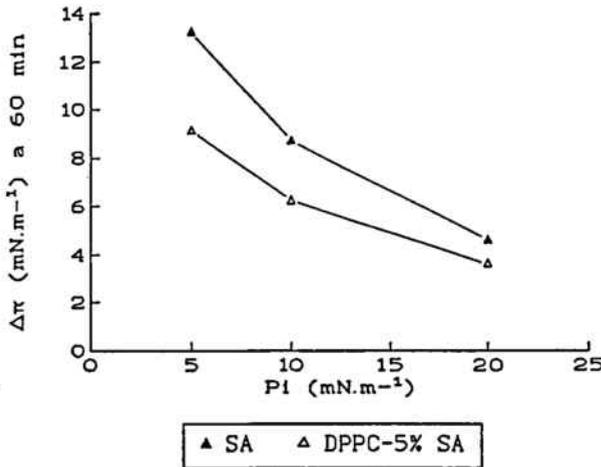


Figura 32 : $\Delta\pi$ superficial para la composición de 100% SA y 90% DPPC-10% SA a 5, 10 y 20 mN/m de π superficial inicial. La concentración de péptido en la subfase era de 0.28 μ M.

A 10 y 20 mN/m el $\Delta\pi$ superficial fue mayor para la mezcla de carga positiva, los neutros (DPPC y DPPE) y después los de carga negativos, como se aprecia en la figura 31. La presencia de la DPPC en un porcentaje del 90% regula las interacciones electrostáticas, mientras que para los fosfolípidos negativos se evidencia un efecto repulsivo con el MAP₄VP1.

Resultados y Discusión

A 5 mN/m de presión superficial no se observa ninguna relación entre $\Delta\pi$ superficial y carga, por tanto influirán otros factores.

2.3. Isotermas de compresión

2.3.1. Isoterma del MAP₄VP1 (11-25)

Se comprobó la capacidad para formar monocapas estables extendiendo dicho péptido sobre una subfase de PBS y registrando los cambios de presión superficial durante la compresión. La curva área-presión observada se correspondía con una monocapa en estado líquido expandido (figura 33), alcanzando el colapso a 20 mN/m, siendo este valor independiente de la cantidad de péptido extendida.

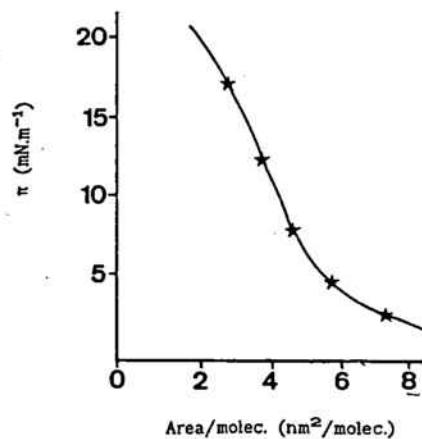


Figura 33 : Isoterma de compresión del MAP₄VP1 (11-25).

Tabla 19 : Características superficiales de la isoterma de compresión del MAP₄VP1.

Moléculas de péptido extendido	Presión superficial inicial (mN/m)	Área (nm ²)/Molécula			
		5 mN/m	10 mN/m	15 mN/m	20 mN/m
6×10^{15}	1.92	6.15	4.25	3.25	2.06
9×10^{15}	2.4	4.25	3.33	2.41	1.16
12×10^{15}	3.36	3.75	2.93	2.00	0.81

En la tabla observamos que la cantidad de péptido extendido tiene influencia en la presión superficial inicial de la monocapa. Este incremento en la presión superficial inicial antes de la compresión ha sido observado para péptidos hidrofóbicos (M.A Alsina,1993).

Al ser este péptido soluble en agua se estudió la posibilidad de su solubilización parcial, mediante el paro de la barrera de compresión a una determinada presión superficial durante 30 min. Al registrarse la presión superficial no se obtuvo ningún cambio. Lo cual indica que las moléculas del péptido permanecen en la interfase.

2.3.2. Isotermas de compresión de fosfolípidos puros,sobre una subfase que contiene MAP₄VP1

La capacidad del péptido para interactuar con monocapas de fosfolípidos puros se estudió en un modelo dinámico. Para ello se extendieron monocapas de los siguientes fosfolípidos DPPC, PI, SA, DPPG, DPPE y CL, a una presión superficial inferior a 0.5 mN/m sobre una subfase de PBS. A la cuál se adicionó una solución de péptido,siendo la concentración del mismo 0.059 μM . Tras la compresión se calculó el área por molécula medida a 5,10 y 20 mN/m, y también los mismos valores obtenidos en ausencia de péptido.

2.3.2.1. DPPC

En la figura 34 se muestra la influencia de la presencia del péptido en los valores del área por molécula de la isoterma de compresión de DPPC.

A baja presión el péptido es capaz de interactuar con la monocapa, induciendo una clara expansión de la misma. Pero al comprimir las diferencias se reducen considerablemente, no modificando la presión del colapso.

2.3.2.2. PI

En el caso del fosfatidilinositol, a baja presiones el péptido expansiona la monocapa de PI, mientras que a altas presiones la comprime. La presencia del péptido no modifica la ordenación de los estados de las moléculas en la isoterma y tampoco afecta a la presión de colapso, tal como se observa en la figura 34.

Resultados y Discusión

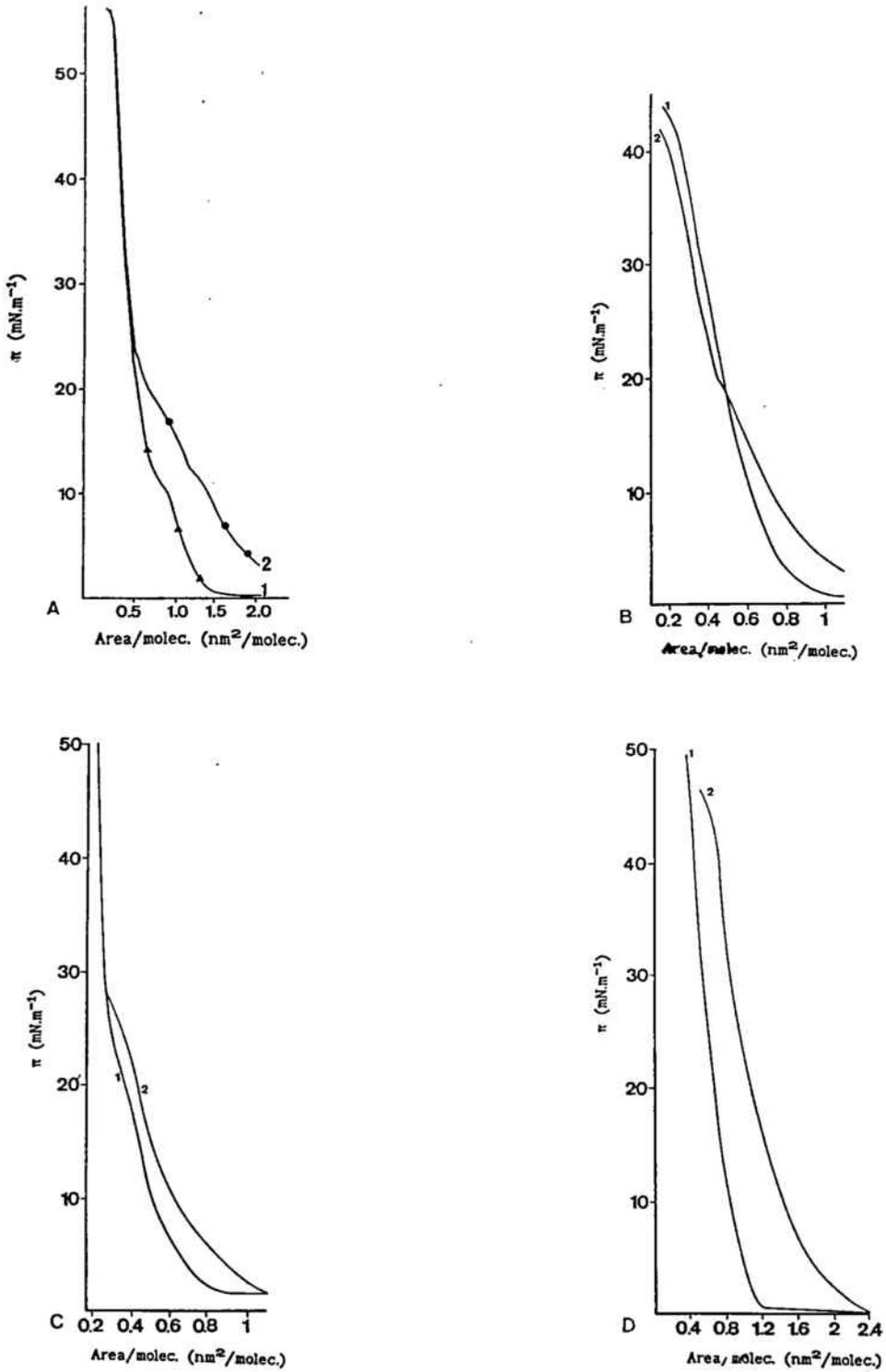


Figura 34 :Isoterma de compresión del fosfolípido (a-DPPC; b-PI; c-SA; d-DPPG) extendida sobre PBS (1) o sobre una solución de MAP₄VP1 0,06 μM (2).

2.3.2.3. SA

La presencia de $\text{MAP}_4\text{VP1}$ en la isoterma de compresión de estearilamina le induce una clara expansión a bajas presiones. En cambio, a altas presiones éste no la modifica. Los estados de ordenación de la molécula no varía a presión superficial elevada, pero a bajas presiones desaparece la fase líquido expandido. Y ya desde un mínimo de presión superficial inicial, la molécula permanece en estado líquido condensado, como se observa en la figura 34.

2.3.2.4. DPPG

Cuando el fosfolípido estudiado fué el DPPG se observó que la presencia del péptido expandiona la monocapa a todas las presiones superficiales. También en este caso no se modifica el estado de ordenación de sus moléculas. La presión de colapso se alcanzó a presiones más bajas cuando $\text{MAP}_4\text{VP1}$ se encontraba en la subfase, tal como se muestra en la figura 34.

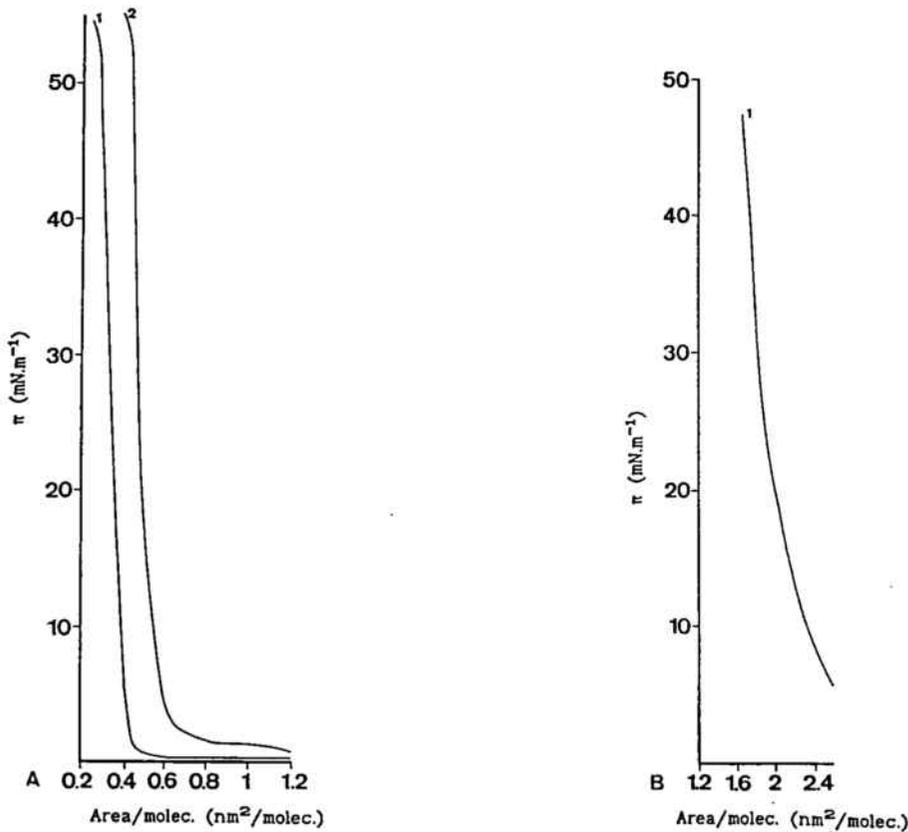


Figura 35 :Isoterma de compresión de (a-DPPE; b-CL) extendida sobre PBS (1) o sobre una solución de $\text{MAP}_4\text{VP1}$ $0,06 \mu\text{M}$ (2).

Resultados y Discusión

2.3.2.5. DPPE

La incorporación del péptido a la monocapa de DPPE origina una ligera expansión en la isoterma de compresión. Al igual que en el caso anterior tampoco se modifican los estados de ordenación de las moléculas, ver figura 35.

2.3.2.6. CL

Al observar la figura 35, la incorporación del péptido a la monocapa de cardiolipina practicamente no la modifica.

En la tabla 20 se representan los $\Delta\pi$ superficial alcanzados por los distintos fosfolípidos estudiados a las presiones de 5, 10 y 20 mN/m.

Tabla 20 :Incrementos del área en monocapas de fosfolípidos inducidos por la presencia de MAP₄VP1 en la subfase de PBS, medidos a diferentes presiones superficiales.

P(mN/m)	Δ Area / molécula x 10 ² (nm ² /molec.)					
	DPPC 2.44 10 ¹⁶ molec.	PI 4.39 10 ¹⁶ molec.	SA 4.5 10 ¹⁶ molec.	DPPG 1.19 10 ¹⁶ molec.	DPPE 1.19 10 ¹⁶ molec.	CL 1.19 10 ¹⁶ molec.
5	54.5	24	20	88.37	17.78	0
10	36.7	11.8	14.9	61.82	13.4	5.29
20	0	0	9.97	44	8.89	0

La cardiolipina ocupa más área pero al ser un fosfolípido doble no se puede comparar con los otros.

La influencia del MAP₄VP1 en las isotermas de compresión nos viene más influenciado por los estados de ordenación de las moléculas a las diferentes presiones superficiales, que por la carga de los mismos.

A bajas presión superficial, el péptido es capaz de insertarse en la monocapa induciendo una clara expansión. Esta es más evidente para los fosfolípidos de DPPG y DPPC. Al ir comprimiendo la monocapa las diferencias en las isotermas debidas al péptido se reducen. A excepción de la DPPG, la cuál también a altas presión expande la monocapa.

2.3.3. Isotermas de compresión de mezclas de fosfolípidos, sobre una subfase que contiene MAP₄VP1

2.3.3.1. DPPC-PI (9:1)

La presencia del péptido en la monocapa de DPPC-PI induce una ligera compresión a lo largo de todas las presiones superficiales estudiadas. El péptido no influye en el estado de ordenación de las moléculas en la isoterma, como se aprecia en la figura 36.

2.3.3.2. DPPC-SA (9:1)

Al igual que en el caso anterior el MAP₄VP1 no modifica el estado de ordenación de las moléculas de la isoterma. A lo largo de las presiones superficiales estudiadas la presencia del péptido induce una ligera expansión (figura 36).

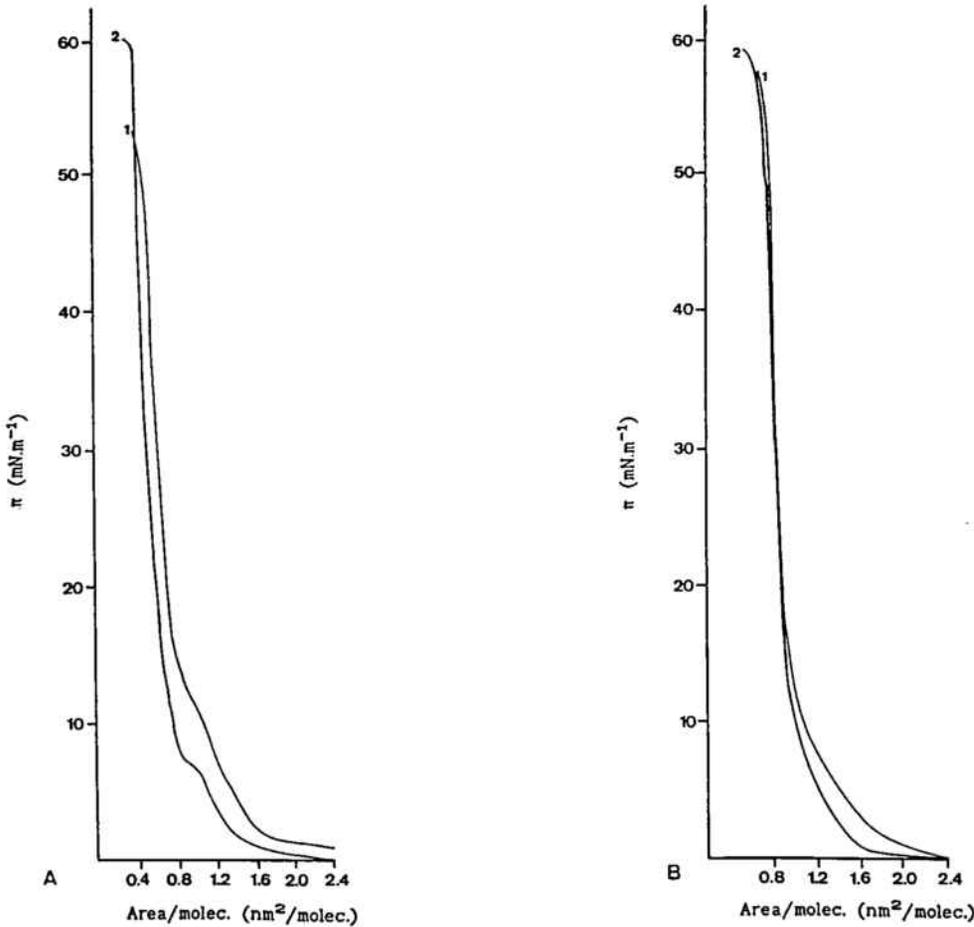


Figura 36 :Isoterma de compresión de (a- DPPC-PI (9:1); b- DPPC-SA (9:1)) extendida sobre PBS (1) o sobre una solución de MAP₄VP1 0,06 μ M (2).

Resultados y Discusión

2.3.4. Interacción del MAP₄VP1 con monocapas mixtas. Isotermas de compresión de monocapas mixtas.

2.3.4.1. DPPC-DPPG subfase PBS y subfase PBS adicionando MAP₄VP1

Se realizaron las isotermas de compresión de monocapas simples de DPPC, DPPG y de las monocapas mixtas obtenidas al mezclar diferentes fracciones molares de los mismos, tanto en subfase PBS como en subfase PBS a la cual se adicionó 0.28 μM de MAP₄VP1.

En la figura 38a se representan las isotermas obtenidas al extender 1.19 $\cdot 10^{16}$ moléculas de la serie de soluciones lipídicas sobre subfase PBS. Como puede observarse en la figura, al extender las monocapas mixtas muestran un carácter intermedio al de las monocapas que las originaron. Debe destacarse el hecho experimental que la presencia de DPPG haga desaparecer la meseta de transición (o fase) de la DPPC cuando la fracción molar es 0.2 de DPPG.

Para interpretar las interacciones lípido-lípido en monocapa se utilizaron las desviaciones respecto a una mezcla ideal, representando las áreas por moléculas a diferentes π superficiales frente a las fracciones molares de los componentes. Si nos da una línea recta, se dice que cumple la regla de la aditividad, y los componentes son completamente miscibles o inmiscibles.

En la figura 37 se representan los valores de las áreas moleculares, obtenidos a las presiones superficiales de 5, 10 y 20 mN/m para las diferentes fracciones molares DPPC-DPPG en subfase PBS. No se observa practicamente desviaciones de la linealidad.

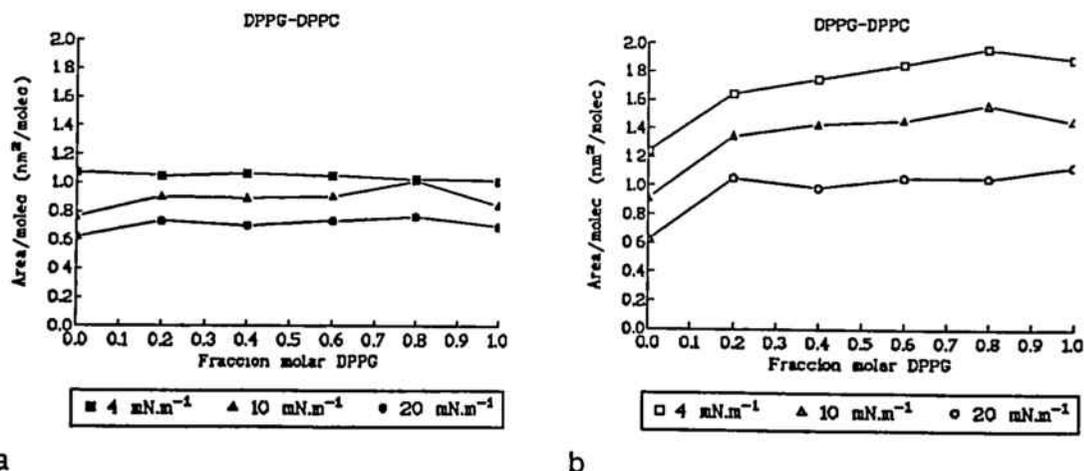


Figura 37 : Variación del área molecular media (a 5, 10 y 20 mN/m) frente a la composición, para monocapas mixtas DPPC-DPPG (a-subfase PBS; b-subfase PBS+ MAP₄VP1)

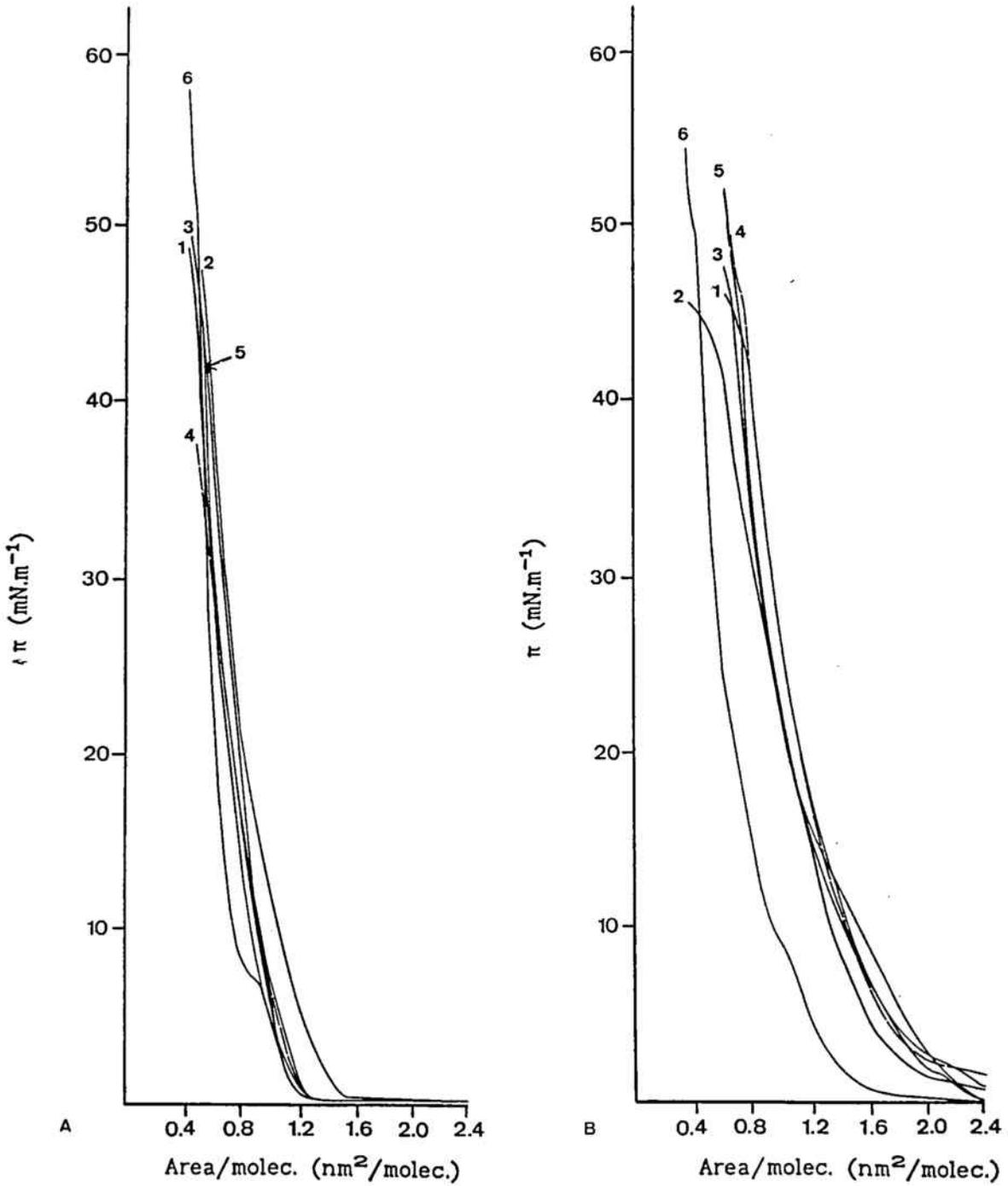


Figura 38 : Isotermas de compresión de monocapas mixtas DPPC-DPPG a diferentes fracciones molares 1-DPPG; 2- DPPC-DPPG (0.2:0.8); 3- DPPC-DPPG (0.4:0.6); 4- DPPC-DPPG (0.6:0.4); 5- DPPC-DPPG (0.8:0.2); 6- DPPC; a- subfase PBS y b- subfase PBS+MAP₄VP1.

Resultados y Discusión

Las isothermas obtenidas sobre subfase adicionada de péptido se muestran en la figura 38b. Se observa en las isothermas de composición mixtas un carácter intermedio al de las isothermas que las originaron. Los estados de ordenación de las moléculas para las diferentes composiciones son similares, portanto la presencia del péptido no las modifica. Pero produce una expansión en todos los casos y una modificación de la presión de la transición que la aumenta cuando la monocapa es la DPPC. Sólo presentan presión de colapso las isothermas de los componentes puros. La expansión de las isothermas en subfase PBS adiconada del péptido es más acusada que en subfase PBS.

La influencia de la composición de la monocapa, sobre los valores de las áreas moleculares medios a difarentes presiones superficiales se representa en la figura 37b. Las desviaciones de la linealidad a todas las presiones estudiadas fueron positivas. El mayor Δ área ($\text{mn}^2/\text{molec.}$) fue para la fracción molar 0,2 DPPG, después se incremento gradualmente.

Para evaluar los efectos de esta interacción se realizaron los cálculos termodinámicos.

2.3.4.1a. Cálculos Termodinámicos

Las energías libres de exceso de las mezclas (ΔG_M^E) a presiones diferentes se calcularon por el método de Goodrich (ecuación 1).

$$\Delta G_M^E = \int_{\pi-0}^{\pi} A_{1,2} d\pi - N_1 \int_{\pi-0}^{\pi} A_1 d\pi - N_2 \int_{\pi-0}^{\pi} A_2 d\pi \quad (1)$$

donde $A_{1,2}$ es el área molar media en la monocapa mixta, A_1 y A_2 representan las áreas molares en las monocapas puras, N_1 y N_2 son las fracciones molares de los componentes puros.

El cálculo del parámetro de interacción en el punto de colapso combina las ecuaciones simplificadas de Margules, con la expresión termodinámica de ΔG_M^E en función de la fracción molar. Así se obtienen una expresión que relaciona el parámetro interacción con el valor de la variable en exceso para una composición determinada de la monocapa.

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

donde X_1 y X_2 son fracciones molares

La energía de interacción ΔH se ha calculado siguiendo el método desarrollado por Joos y col.

$$\Delta H = RT \frac{\alpha}{Z} \quad (3)$$

siendo Z el número de coordinación. Este se calcula según el modelo de Quikenden y Tan, a partir de la ecuación 4. La cuál nos da la fracción empaquetada (PF).

$$PF = 0.907 \frac{A_{mc}}{A_m} \quad (4)$$

siendo A_{mc} el área por molécula en el punto de colapso de la mezcla y A_m el área por molécula para cada una de las presiones intermedias.

Las energías de exceso de las mezclas (ΔG_M^E) calculadas son pequeñas. Las mayores desviaciones de la idealidad representan valores de energías libre de exceso menores que RT (592 cal/mol a 25°C).

A partir de los datos de la tabla 21 se observa, que sobre subfase PBS el comportamiento es ideal, ya que el ΔG_M^E es $< RT$. Pero en subfase PBS a la cuál se adicionó el péptido este valor es ligeramente superior y positivo, debido a la incorporación de las moléculas de MAP_4VP1 a la monocapa. Estos valores de desviación positivos sólo se dan a la presión superficial de 20 mN/m y para fracciones molares bajas (0.2 y 0.4).

Resultados y Discusión

Tabla 21 : Parámetros fisicoquímicos de las mezclas DPPC-DPPG,a 10 y 20 mN/m de presión superficial.

Fracción molar de DPPG	ΔG_M^E (cal/mol)	α	Z	ΔH (cal/mol)
20 mN/m				
subfase PBS				
0.2	206.82	2.21	-	-
0.4	165.45	1.18	-	-
0.6	162.86	1.16	-	-
0.8	471.33	5.04	-	-
subfase PBS + 0.28 μ M sol. peptídica (MAP ₄ VP1)				
0.2	810.58	8.66	2	2533.06
0.4	615.82	4.39	2	1282.96
0.6	599.05	4.27	2	1248.02
0.8	404.22	4.32	2	1263.19
10 mN/m				
subfase PBS				
0.2	43.46	0.46	-	-
0.4	52.89	0.38	-	-
0.6	51.85	0.37	-	-
0.8	273.89	2.93	-	-
subfase PBS + 0.28 μ M sol. peptídica (MAP ₄ VP1)				
0.2	340.35	8.66	2	1063.58
0.4	314.23	2.24	2	654.64
0.6	356.12	2.54	2	741.92
0.8	261.86	2.8	2	818.32

2.3.4.2. DPPC-DPPE subfase PBS y subfase PBS adicionado MAP₄VP1

Se realizaron las isothermas de compresión de monocapas simples de DPPC y DPPE, y las isothermas correspondientes a las diferentes fracciones molares de los mismos, en subfase PBS y también, en subfase PBS a la cuál se adicionó 0.28 μ M de péptido.

En la figura 40a se representan las isothermas obtenidas al extender 4.35 10^{16} moléculas de las distintas fracciones molares en la subfase PBS. Como puede observarse, el comportamiento de los estados de ordenación de las mismas a bajas presiones pasan de líquido expandido a líquido condensado, y altas presiones están en estado sólido, alcanzándose la presión de colapso tanto para los componentes puros como para sus mezclas.

Para interpretar las interacciones de dichas mezclas se representaron las áreas moleculares a las presiones iniciales superficiales de 5, 10 y 20 mN/m frente a su fracción molar. En la figura 39a se observaron para todas ellas ligeras desviaciones respecto a la idealidad. A 5 mN/m la desviación fue más acusada.

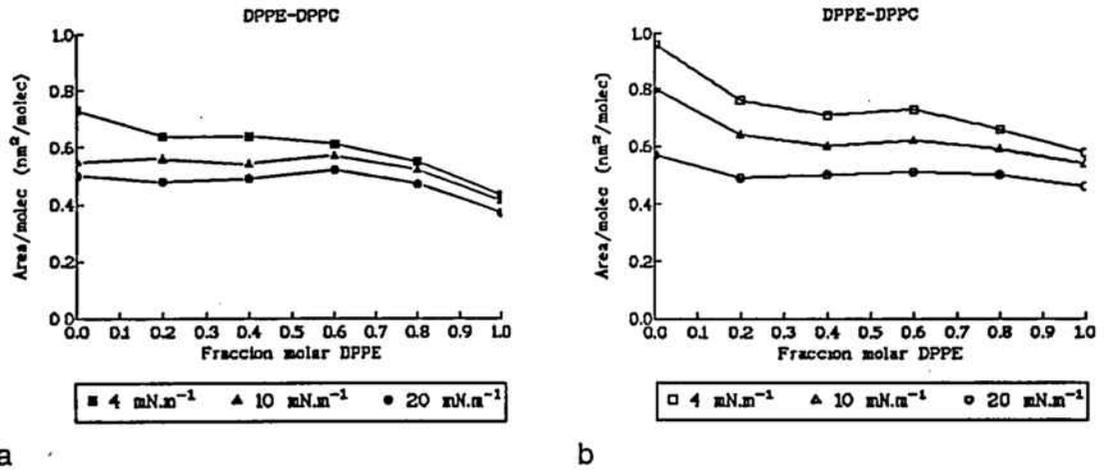


Figura 39 :Variación del área molecular media (a 5, 10 y 20 mN/m) frente a la composición, para monocapas mixtas DPPC-DPPE (a-subfase PBS; b-subfase PBS+ MAP₄VP1)

Cuando se adicionó a la subfase el péptido se obtuvieron las isothermas de compresión de la figura 40b. No cambian los estados de ordeación de las moléculas, sí bien se encuentran mucho más expandidas y a bajas presiones presentan presión superficial inicial. La fase de transición de la DPPC aparece a presiones superficiales más elevadas.

La influencia de la composición de la monocapa sobre los valores de

Resultados y Discusión

las áreas a las presiones superficiales estudiadas se representaron en la figura 39b. Se observan desviaciones negativas de la idealidad, a las presiones de 5 y 10 mN/m éstas son marcadas. En cambio a 20 mN/m el comportamiento fue similar al observado en subfase PBS.

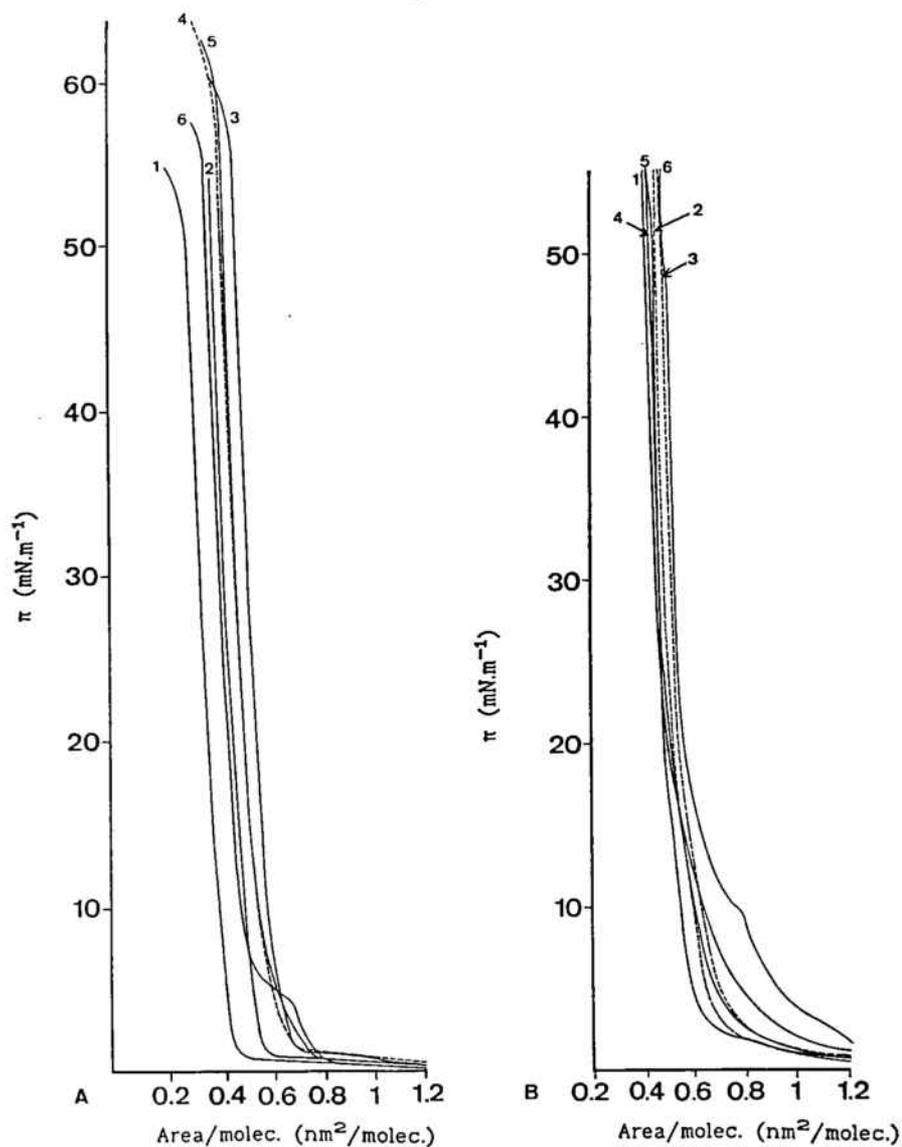


Figura 40 :Isothermas de compresión de monocapas mixtas DPPC-DPPE a diferentes fracciones molares 1-DPPE; 2- DPPC-DPPE (0.2:0.8); 3- DPPC-DPPE (0.4:0.6); 4- DPPC-DPPE (0.6:0.4); 5- DPPC-DPPE (0.8:0.2); 6- DPPC; a- subfase PBS y b- subfase PBS+MAP₄VP1.

Para evaluar mejor estos resultados se realizaron los cálculos termodinámicos.

2.3.4.2a. Cálculos termodinámicos

Tabla 22 : Parámetros fisicoquímicos de las mezclas DPPC-DPPE, a 10 y 20 mN/m de presión superficial.

Fracción molar de DPPG	ΔG_M^E (cal/mol)	α	Z	ΔH (cal/mol)
10 mN/m				
subfase PBS				
0.2	8.17	0.09	4	12.77
0.4	38.08	0.27	4	39.66
0.6	97.38	0.69	4	101.44
0.8	74.87	0.80	4	116.99
subfase PBS + 0.28 μ M sol. peptídica (MAP ₄ VP1)				
0.2	-132.91	-1.42	4	-415.33
0.4	-147.99	-1.05	4	-154.16
0.6	-17.21	-0.12	2	-35.84
0.8	-15.63	-0.12	4	-24.42
20 mN/m				
subfase PBS				
0.2	23.33	0.25	4	36.45
0.4	101.02	0.72	4	105.23
0.6	243.08	1.73	4	253.18
0.8	190.55	2.04	4	297.74
subfase PBS + 0.28 μ M sol. peptídica (MAP ₄ VP1)				
0.2	-221.58	-2.37	4	-346.22
0.4	-220.90	-1.57	4	-230.1
0.6	2.47	0.02	4	2.57
0.8	-4.7	-0.05	4	-7.05

Resultados y Discusión

A todas las presiones estudiadas los ΔG_M^E en subfase PBS fueron $< RT$ y positivos, por tanto, siguen un comportamiento ideal. Ahora bien, al incorporar péptido a la subfase éstos resultaron ser negativos, pero no son significativos ya que también son $< RT$.

2.3.4.3. DPPC-CL subfase PBS y subfase PBS adicionando MAP₄VP1

Las isothermas de compresión se obtuvieron al extender $1.95 \cdot 10^{16}$ moléculas de las diferentes fracciones molares de DPPC-CL y de los componentes puros. En subfase PBS, los estados de ordenación pasan de estado líquido expandido a líquido condensado, alcanzándose la π de colapso sin pasar por estado sólido. La π de transición para DPPC desaparece cuando la fracción molar de cardiolípinina es de 0.2. La isoterma de compresión tanto de la CL pura como de la fracción molar 0.8 de CL presentan presión superficial inicial de 2.16 y 1.92 mNm^{-1} , respectivamente. En la isoterma de CL pura desaparece la fase líquido expandido y en todo el trazado el estado de ordenación de las moléculas es líquido condensado, con una π de colapso de 47.5 mNm^{-1} .

Cuando en la subfase se adicionó el péptido, los estados de ordenación no cambian y hay una actividad superficial inicial de la fracciones de CL 0.6 (0.96 mNm^{-1}), 0.8 (1.92 mNm^{-1}), 1 (5.76 mNm^{-1}). La π de colapso es de 47.0 mNm^{-1} .

La influencia de la composición de las monocapas sobre los valores de las áreas moleculares se representaron en la figura 41. Las desviaciones de la idealidad son positivas para cada una de la presiones superficiales estudiadas (excepto para la fracción molar 0.6 CL), tanto en subfase PBS como en subfase PBS a la cual se adicionó péptido. En subfase PBS a 5 mN/m la desviación fue más acusada. La incorporación del péptido a la subfase origina un incremento del área por molécula a las presiones superficiales estudiadas. De todos modos, el incremento no es significativo, porque al evaluar los valores mediante los cálculos termodinámicos, éstos se encuentran dentro de los valores admitidos como ideales.

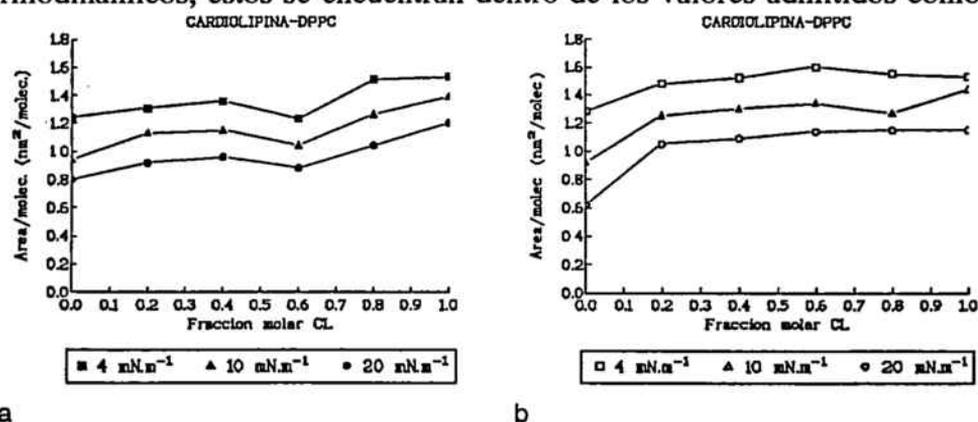


Figura 41: Variación del área molecular media (a 5, 10 y 20 mN/m) frente a la composición, para monocapas mixtas DPPC-CL (a-subfase PBS; b-subfase PBS+MAP₄VP1).

2.3.4.3.a Cálculos termodinámicos

Tabla 23 : Parámetros fisicoquímicos de las mezclas DPPC-CL, a 10 y 20 mN/m de presión superficial.

Fracción molar de DPPG	ΔG_M^E (cal/mol)	α	Z	ΔH (cal/mol)
10 mN/m				
subfase PBS				
0.2	92.74	0.99	2	289.8
0.4	73.15	0.52	2	152.4
0.6	-205.63	-1.46	2	-428.4
0.8	28.83	0.31	2	90.9
subfase PBS + 0.28 μ M sol. peptídica (MAP ₄ VP1)				
0.2	245.32	2.62	2	766.64
0.4	202.65	1.44	4	211.09
0.6	227.36	1.62	2	473.68
0.8	35.5	0.38	2	55.48
20 mN/m				
subfase PBS				
0.2	191.81	2.05	2	599.4
0.4	49.54	0.35	2	103.2
0.6	-458.5	-3.27	2	-955.2
0.8	-73.9	-0.79	2	-230.94
subfase PBS + 0.28 μ M sol. peptídica (MAP ₄ VP1)				
0.2	630.1	6.73	2	1969.06
0.4	517.73	3.69	4	539.3
0.6	485.43	3.46	4	505.66
0.8	95.43	1.02	4	149.11

Resultados y Discusión

Los valores de ΔG_M^E fueron $< RT$ tanto a 10 como a 20 mN/m, pero en presencia del péptido estos fueron más elevados.

3. ESTUDIOS FISICOQUIMICOS EN BICAPAS (LIPOSOMAS). FLUORESCENCIA Y POLARIZACION DE FLUORESCENCIA

3.1. Interacción del MAP₄VP1 con DPPC

3.1.1. MAP₄VP1-SUV DPPC con ANS

La interacción del MAP₄VP1 con las bicapas de fosfolípido de DPPC a nivel de su cabeza polar se estudió, empleando el 8-Anilino-naftalen sulfonato sódico, ANS, como marcador fluorescente. En esta serie de experimentos se determinó la intensidad de fluorescencia, la posición del máximo de la banda de emisión y la variación de la polarización en función de la temperatura. Se pudo comprobar que los espectros del ANS disminuían en intensidad al aumentar la temperatura, pero la λ_{max} no variaba, permanecía constante. Este dato sugiere la no existencia de interacción entre las moléculas de MAP₄VP1 y el ANS. Lo cual es lógico, puesto que ambos compuestos presentan carga eléctrica negativa. Asimismo, la polarización medida a diferentes temperaturas (figura 42) tampoco permite apreciar diferencias significativas aplicando el estudio de la t de Student.

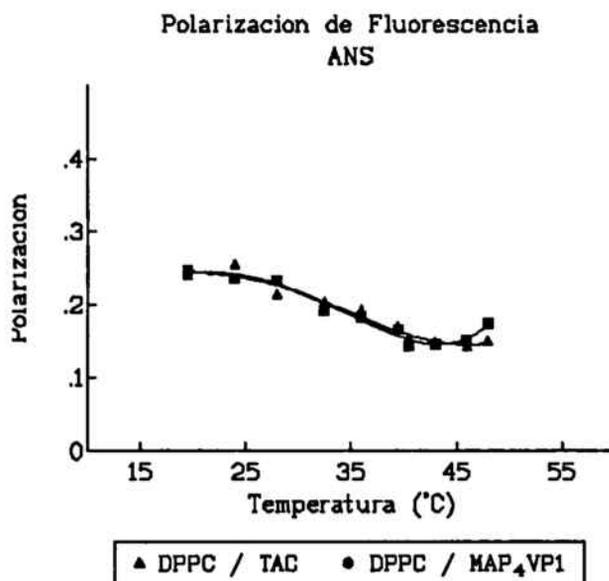


Figura 42 :Polarización de fluorescencia de liposomas SUVs de DPPC incubados con fluoróforo, ANS, cuando interaccionaron con TAC o con MAP₄VP1.

3.1.2. MAP₄VP1-SUV DPPC con DPH

Para determinar la influencia del MAP₄VP1 en las bicapas de fosfolípidos a nivel de las cadenas alquílicas se empleó como marcador fluorescente el 6-difenil-8-hexatrieno, DPH. Tal como se indica en la parte experimental de este estudio se utilizaron liposomas unilaminares, SUV, cuyo diámetro oscilaba alrededor de 100 nm. Los liposomas saturados con DPH se incubaron con el MAP₄VP1, empleándose como referencia las mismas preparaciones que en ausencia del péptido.

Se determinó la intensidad de fluorescencia y la polarización de estas muestras en función de la temperatura. Asimismo, a partir de los espectros de fluorescencia obtenidos se calcularon las λ a las cuales aparecían los máximos de emisión de fluorescencia correspondientes al DPH. Al mismo tiempo se pudo comprobar, que la presencia del péptido al aumentar la temperatura no influía en la posición de estos máximos. Lo cual indica que el péptido no afecta a la polaridad del entorno de la molécula fluorescente.

También, se pudo comprobar que la presencia de MAP₄VP1 disminuía ligeramente el rendimiento cuántico del DPH. Si bien, las diferencias entre estos valores no llegan al 6.8%. Portanto, la fluorescencia disminuye al aumentar la temperatura. Estos resultados se pueden apreciar en la figura 43.

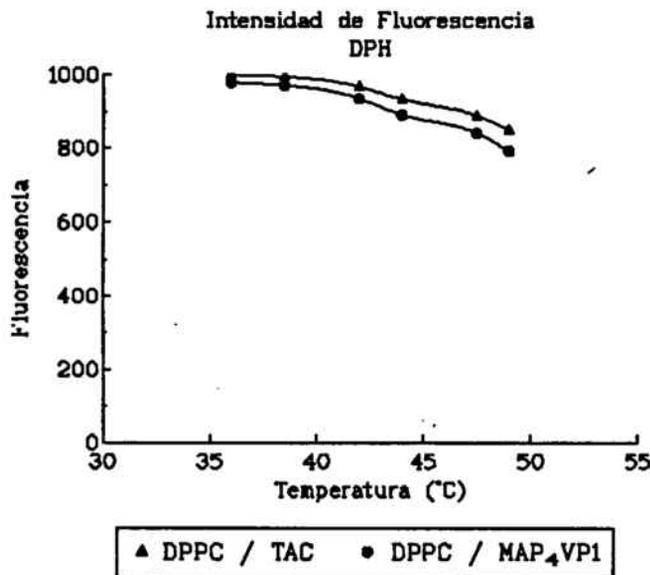


Figura 43 :Intensidad de fluorescencia de los liposomas SUVs de DPPC con el fluoróforo, DPH, cuando fueron incubados con MAP₄VP1 y con TAC.

Sin embargo, los valores de polarización de fluorescencia en presencia o ausencia del péptido indican, que éste es capaz de interactuar con las bicapas lipídicas disminuyendo su rigidez. En la figura 43 se puede apreciar esta tendencia a lo largo de todo

Resultados y Discusión

el intervalo de temperaturas estudiado.

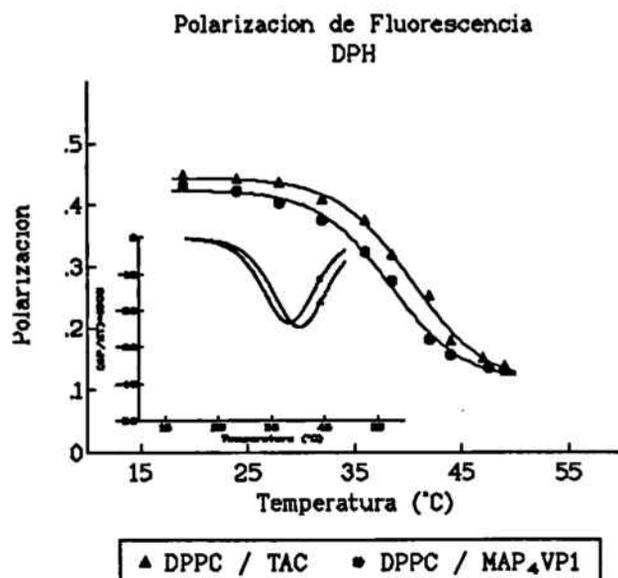


Figura 44 :Polarización de fluorescencia de liposomas SUV de DPPC incubados con fluoróforo, DPH,cuando interaccionaron con TAC o con MAP₄VP1.

Los valores de polarización de fluorescencia se ajustaron a una sigmoide, cuya ecuación es del tipo siguiente:

$$P = A + \frac{(B-A) \cdot 10^{D \cdot T}}{10^{D \cdot C} + 10^{D \cdot T}}$$

donde A es el valor inferior de la curva, B es el valor más alto, C es la abscisa del punto de inflexión (temperatura de transición) y D es el coeficiente de Hill, relacionado con la pendiente de la curva.

Los parámetros obtenidos al ajustar los valores experimentales a dicha ecuación , se refieren en la tabla 24.

Tabla 24 :Parámetros obtenidos tras el tratamiento matemático de las curvas de polarización de fluorescencia de los SUVs de DPPC marcados con DPH.

	A	B	C	D	r ²
DPPC TAC	0.1091	0.4439	40.33	-0.1278	0.996
DPPC MAP ₄ VP1	0.114	0.0107	38.29	-0.1311	0.997

A partir de los valores de la primera derivada, tal como viene reflejado en el inserto de la figura 44, se pudo calcular la temperatura de transición de DPPC en presencia o ausencia del péptido, 38.3°C y 40.3°C respectivamente.

Productos	T _c (°C)	IC del 95%
DPPC / TAC	40.3	39.1 - 41.6
DPPC / MAP ₄ VP1	38.3	37.3 - 39.2

3.1.3. MAP₄VP1-SUV DPPC con CF

La capacidad desestabilizadora del péptido respecto a los SUV de DPPC se estudió empleando vesículas cargadas con carboxifluoresceína. Este marcador fluorescente presenta el fenómeno de quenching, es decir a concentraciones superiores a 50 mM no da prácticamente señal de fluorescencia. En cambio, por debajo de este valor la relación fluorescencia-concentración es lineal.

Los estudios de estabilidad se llevaron a cabo incubando liposomas cargados con CF (200 mM) con solución estándar de MAP₄VP1 (1.5x10⁻⁵ mM). Se midió la latencia de estas preparaciones a diferentes tiempos, y se pudo comprobar un ligero aumento, de modo que al cabo de 120 min se había producido una liberación del orden del 90%. Estos bajos valores de latencia indican que el péptido no es capaz de insertarse suficientemente en las bicapas para liberar CF. Lo cual está de acuerdo con las interacciones detectadas a nivel intermedio mediante la sonda de DPH.

3.2. **Interacción del MAP₄VP1 con 90% DPPC+10% PI**

3.2.1. MAP₄VP1-SUV DPPC-10% PI con ANS

A nivel de la bicapa externa, la interacción del MAP₄VP1 con vesículas de DPPC conteniendo un 10% de fosfatidilinositol, se midió como en el caso anterior, previa saturación de las mismas con ANS.

Comparando los valores de intensidad de fluorescencia de este fluoróforo para los liposomas con y sin fosfatidilinositol se puede apreciar, que la presencia de un fosfolípido cargado negativamente reducía la asociación del ANS con las vesículas. Esta reducción oscila entre un 11% y un 39%, aumentando en función de la temperatura.

Resultados y Discusión

Asimismo, la presencia del péptido también reducía la intensidad de fluorescencia. Esta variación disminuye en función de la temperatura pasando de un 26% a un 11%. Por otra parte, la λ_{\max} no varía en ninguna de las muestras ensayadas.

En cuanto a la viscosidad de las bicapas se pudo comprobar, que la presencia de PI tiene un efecto fluidificante, mientras que la adición de MAP₄VP1 a los liposomas con un 10% de PI no modifica el movimiento de las cadenas alquílicas. Estos resultados vienen representados en la figura 45.

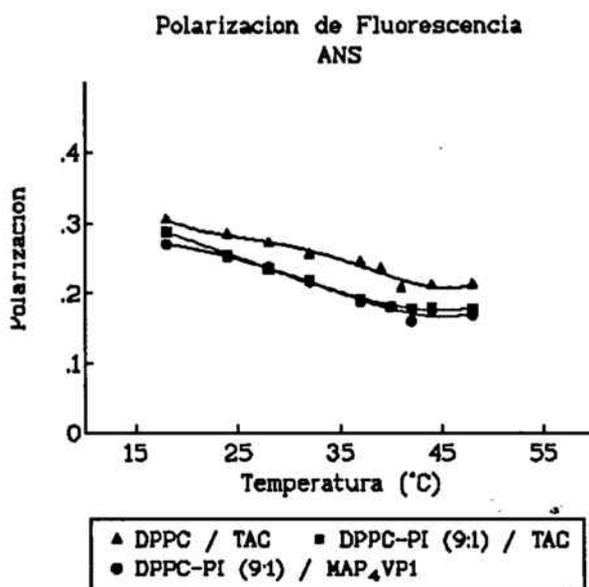


Figura 45 :Polarización de fluorescencia de liposomas SUVs de DPPC y DPPC-PI (9:1) incubados con fluoróforo, ANS, cuando interaccionaron con TAC o con MAP₄VP1.

3.2.2. MAP₄VP1-SUV DPPC-10% PI con DPH

Los liposomas conteniendo un 10% de PI muestran tras ser saturados con DPH valores de intensidad de fluorescencia similares a los de DPPC pura. Este efecto se pudo observar también en presencia de MAP₄VP1. En ambos tipos de liposomas la intensidad de fluorescencia disminuye al aumentar la temperatura.

En cambio, cuando se comparan los valores de polarización de fluorescencia de los mismos, la presencia de PI disminuye de modo notable los valores de este parámetro, indicando en consecuencia que su presencia fluidifica las bicapas y reduce la temperatura de transición de los liposomas. Estos valores se pueden apreciar en la figura 46.

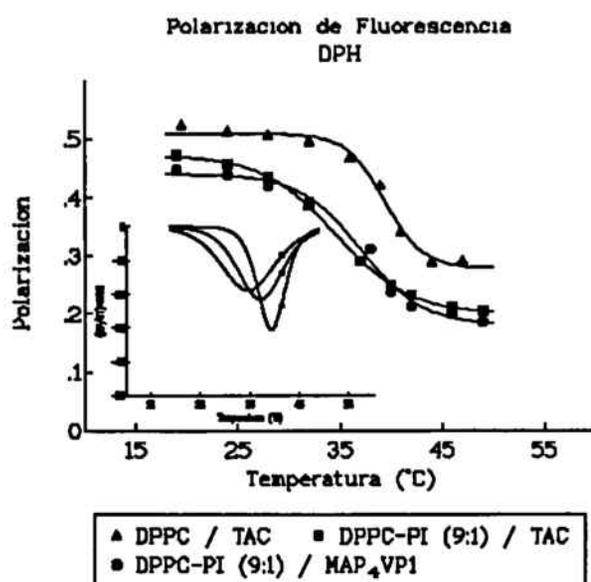


Figura 46 :Polarización de fluorescencia de liposomas SUVs de DPPC y DPPC-PI (9:1) incubados con fluoróforo, DPH, cuando interaccionaron con TAC o con MAP₄VP1.

Los valores experimentales se ajustaron a la ecuación de una sigmoide, cuyos parámetros se citan en la tabla 25.

Tabla 25 :Parámetros obtenidos tras el tratamiento matemático de las curvas de polarización de fluorescencia de los SUVs de DPPC y DPPC-PI (9:1) marcados con DPH.

	A	B	C	D	r ²
DPPC TAC	0.2788	0.5088	39.42	-0.2318	0.990
DPPC-PI TAC	0.1992	0.4726	34.67	-0.1204	1.000
DPPC-PI MAP ₄ VP1	0.1793	0.4399	37.15	-0.1448	0.990

A partir de los valores de la primera derivada del inserto de la figura 46, se observó que la temperatura de transición de los SUV de DPPC disminuía al adicionarle un 10% de PI a los mismos. Sin embargo, cuando se adicionaba al sistema $1.5 \cdot 10^{-5}$ mM MAP₄VP1 se pudo comprobar como el péptido inducía una pequeña rigidificación de las bicapas, aumentando en 2.6°C la T_c.

Resultados y Discusión

Productos	T° (°C)	IC del 95%
DPPC / TAC	39.5	38.4 - 40.5
DPPC-PI / TAC	34.7	34.3 - 35.0
DPPC-PI / MAP ₄ VP1	37.1	35.4 - 38.9

3.3. Interacción del MAP₄VP1 con 95% DPPC+ 5% SA

3.3.1. MAP₄VP1-SUV DPPC-5% SA con ANS

La intensidad de fluorescencia de los liposomas conteniendo estearilamina y saturados con ANS muestran una tendencia a la disminución de la fluorescencia mucho mayor que en los casos anteriores. En la figura 47 viene representada la evolución de esta magnitud en función de la temperatura. En todos los casos aparece un mínimo alrededor de 41°C, que se recupera lentamente a temperaturas superiores.

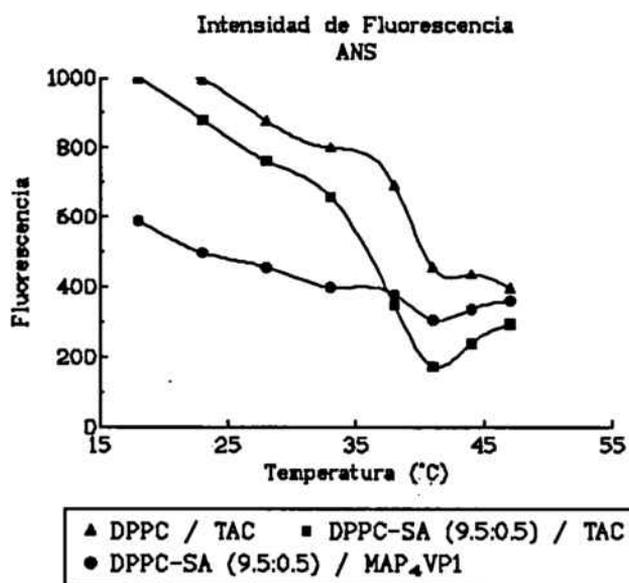


Figura 47 :Intensidad de fluorescencia de los liposomas SUVs de DPPC y DPPC-SA (9.5:0.1) con el fluoróforo, ANS, cuando fueron incubados con MAP₄VP1 y con TAC.

Al comparar los valores de polarización de fluorescencia de los tres tipos de liposomas se comprobó que la presencia de SA induce un máximo alrededor de 40°C. Esta discontinuidad también se observó en presencia del péptido, aunque en este caso a temperatura alrededor de 37-38°C. En cambio, la curva correspondiente a liposomas de

DPPC sigue un trazado normal, de lenta disminución al aumentar la temperatura. El máximo de polarización encontrado para la DPPC-5% SA/ANS coincide con el mínimo de fluorescencia, con lo cual no se puede averiguar con exactitud que este incremento de polarización refleje una movilidad de la zona polar de las bicapas, sino tal vez sea un artefacto.

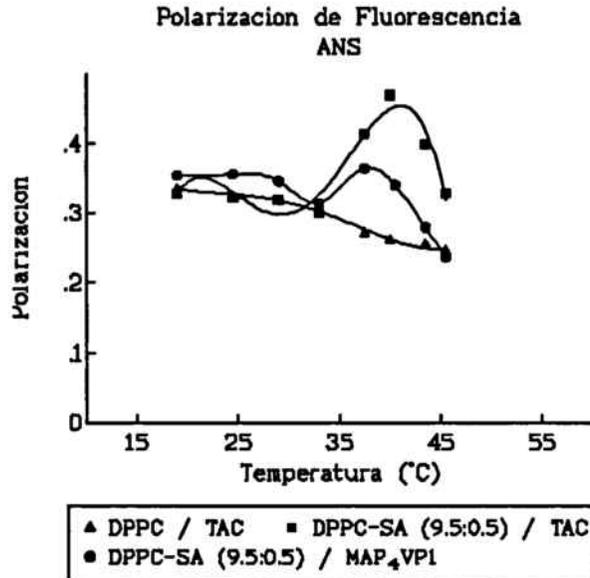


Figura 48 :Polarización de fluorescencia de liposomas SUVs de DPPC y DPPC-SA (9.5:0.5) incubados con fluoróforo, ANS, cuando interaccionaron con TAC o con MAP₄VP1.

3.3.2. MAP₄VP1-SUV DPPC-5% SA con DPH

La intensidad de fluorescencia del DPH en los liposomas de DPPC siempre fue más elevada que en presencia de SA. No obstante, en ambos casos se producía una disminución de este parámetro en función de la temperatura. Al igual cuando se adicionó el péptido a los liposomas con SA también se producía una disminución de la fluorescencia y ésta fue más acusada a partir de valores superiores a 40°C. Sin embargo, en ningún caso se puede observar modificación de la λ_{em} .

Comparando las curvas P/T se puede comprobar, que la presencia SA produce siempre valores de polarización de fluorescencia superiores. Lo cual es indicativo de un efecto rigidificante en las cadenas alquílicas de las bicapas. En cambio, cuando al sistema DPPC-5% SA se le añade MAP₄VP1, la presencia del péptido reduce de modo significativo la polaridad del sistema, sugiriendo una ligera fluidificación de las mismas, tal como se muestra en la figura 49.

Resultados y Discusión

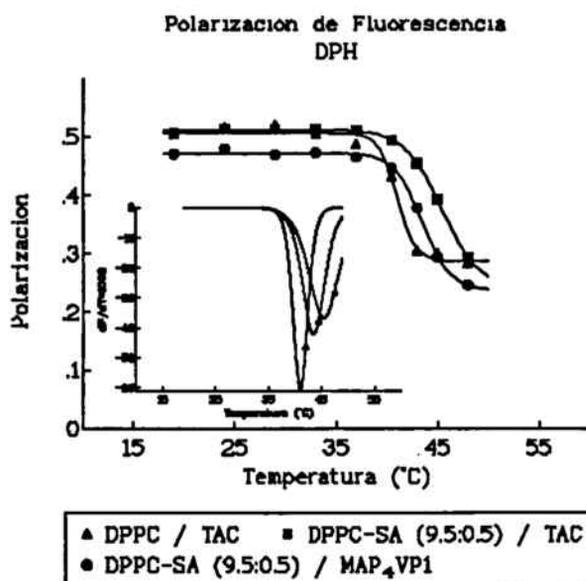


Figura 49 :Polarización de fluorescencia de liposomas SUVs de DPPC y DPPC-SA (9.5:0.5) incubados con fluoróforo, DPH, cuando interaccionaron con TAC o con MAP₄VP1.

Los valores experimentales se ajustaron a la ecuación de una sigmoide, cuyos parámetros se detallan en la tabla 26.

Tabla 26 :Parámetros obtenidos tras el tratamiento matemático de las curvas de polarización de fluorescencia de los SUVs de DPPC y DPPC-SA (9.5:0.5) marcados con DPH.

	A	B	C	D	r ²
DPPC TAC	0.2872	0.5055	41.03	-0.4839	0.991
DPPC-SA TAC	0.2390	0.5113	45.45	-0.2344	0.999
DPPC-SA MAP ₄ VP1	0.2371	0.4713	43.50	-0.3129	0.998

Los valores de las temperaturas de transición de las muestras ensayadas son:

Productos	T° (°C)	IC del 95%
DPPC / TAC	41.0	40.4 - 41.7
DPPC-SA / TAC	45.5	44.7 - 46.2
DPPC-SA / MAP ₄ VP1	43.5	43.1 - 43.8

3.3.3. MAP₄VP1-SUV DPPC-5% SA con CF

Dado el comportamiento anómalo del MAP₄VP1 con SUV-ANS, donde la polarización de fluorescencia aumentaba a partir de una determinada temperatura (T>35 °C) se diseñó un estudio con CF a fin de determinar si las anomalías podían ser debidas a una disrupción o disolución parcial de la bicapa.

Los resultados obtenidos indican un incremento de permeabilidad paulatino al aumentar de la temperatura. Asimismo se aprecia un cambio de pendiente del proceso alrededor de las mismas temperaturas encontradas en el fenómeno de polarización con ANS.

3.4. **Interacción del MAP₄VP1 con 90% DPPC+10% PG**

3.4.1. MAP₄VP1-SUV DPPC-10% PG con ANS

La presencia de un fosfolípido ácido, como el fosfatidilglicerol, en los liposomas de DPPC disminuye la capacidad de asociación del ANS a las vesículas. Este hecho se comprobó comparando la intensidad de fluorescencia de las vesículas de DPPC pura o conteniendo 10% de PG. Cuando se adicionó MAP₄VP1 al sistema y a pesar del carácter negativo de este péptido, la asociación de ANS con las cabezas aumentó ligeramente dando valores intermedios de fluorescencia. En la Figura 50 se aprecian con detalle estos hechos.

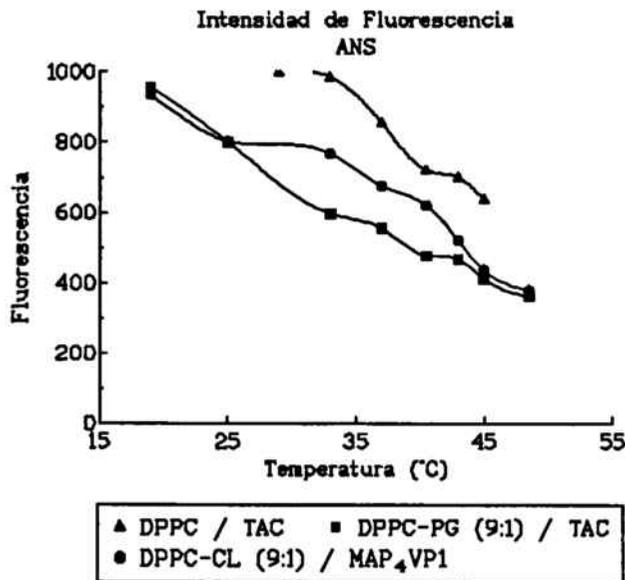


Figura 50 :Intensidad de fluorescencia de los liposomas SUVs de DPPC y DPPC-PG (9:1) con el fluoróforo, ANS, cuando fueron incubados con MAP₄VP1 y con TAC.

Resultados y Discusión

Al comparar la silueta de los espectros de ANS y la posición del máximo de emisión se comprobó, que la presencia del péptido induce un blue Shift (desplazamiento a λ menores) dependiente de la temperatura, el cual llega a ser como máximo de 8 nm.

Por otra parte la presencia de PG en la composición del liposoma producía una ligera rigidificación de las bicapas. Esta rigidificación viene aumentada a bajas temperaturas por la presencia de MAP₄VP1; pero alrededor de 30°C se produce una inversión del fenómeno, siendo el valor de polarización DPPC-10% PG/MAP₄VP1 inferior al del DPPC-10%PG.

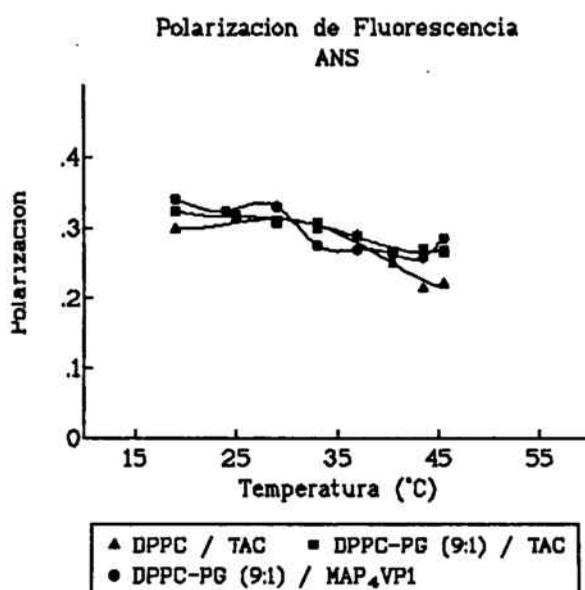


Figura 51 :Polarización de fluorescencia de liposomas SUVs de DPPC y DPPC-PG (9:1) incubados con fluoróforo, ANS, cuando interaccionaron con TAC o con MAP₄VP1.

3.4.2. MAP₄VP1-SUV DPPC-10% PG con DPH

La incubación de DPH con liposomas de DPPC con un 10%PG dió lugar a muestras de fluorescencia. Los valores de fluorescencia para el sistema conteniendo DPPC resultaron ser en todos los casos inferiores a aquellos encontrados conteniendo PG. Para estos mismos liposomas, la presencia del péptido dió lugar a valores más elevados de fluorescencia a lo largo de todo el rango de temperaturas estudiado.

Comparando los valores de polarización de fluorescencia obtenidos, para los liposomas de estas composiciones se pudo comprobar, que la presencia de un 10% PG reducía la polarización. Lo cual indica, que la movilidad de las bicapas lipídicas está incrementada. Cuando al sistema se adicionó MAP₄VP1 los valores de la polarización

variaron ligeramente. Esto sugiere un efecto fluidificante aditivo del péptido respecto al efecto de la PG.

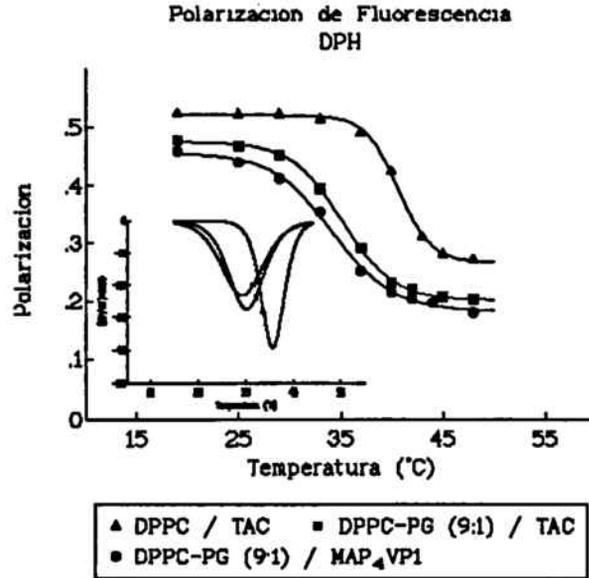


Figura 52 :Polarización de fluorescencia de liposomas SUVs de DPPC y DPPC-PG (9:1) incubados con fluoróforo, ANS, cuando interaccionaron con TAC o con MAP₄VP1.

Los valores experimentales se ajustaron a la ecuación de una sigmoide, cuyos parámetros se muestran en la tabla 27.

Tabla 27 :Parámetros obtenidos tras el tratamiento matemático de las curvas de polarización de fluorescencia de los SUVs de DPPC y DPPC-PG (9:1) marcados con DPH.

	A	B	C	D	r ²
DPPC TAC	0.2666	0.5210	40.68	-0.2683	0.999
DPPC-PG TAC	0.2013	0.4751	35.18	-0.1749	1.000
DPPC-PG MAP ₄ VP1	0.1823	0.4556	34.24	-0.1480	0.998

Los valores de las temperaturas de transición obtenidos con la primera derivada (inserto figura 52) para las muestras ensayadas son:

Resultados y Discusión

Productos	T° (°C)	IC del 95%
DPPC / TAC	40.7	40.3 - 41.1
DPPC-PG / TAC	35.2	34.9 - 35.5
DPPC-PG / MAP ₄ VP1	34.2	33.4 - 35.0

3.5. Interacción del MAP₄VP1 con 90% DPPC-10% DPPE

3.5.1. MAP₄VP1-SUV DPPC-10% DPPE con ANS

La presencia de un 10% DPPE en los liposomas de DPPC saturados con ANS producía un ligero incremento de la fluorescencia del sistema, siendo este efecto más acusado a T>35°C-45°C. Al adicionar MAP₄VP1 al sistema se producía un incremento anómalo de la fluorescencia, también en el mismo intervalo de temperatura, el cuál llega a ser máximo a 40°C. A partir de esta temperatura disminuye de manera regular.

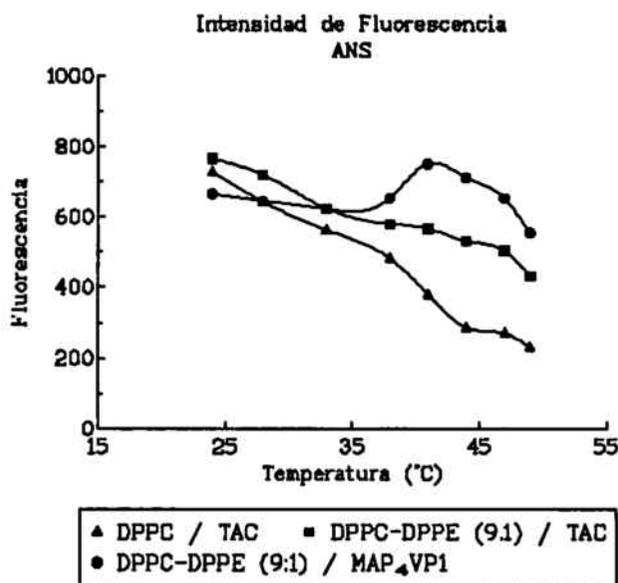


Figura 53 :Intensidad de fluorescencia de los liposomas SUVs de DPPC y DPPC-DPPE (9:1) con el fluoróforo, ANS, cuando fueron incubados con MAP₄VP1 y con TAC.

Los valores de polarización de fluorescencia en estos mismos ensayos indican que la adición de DPPE aumenta la rigidez de las bicapas lipídicas, dando lugar a valores de polarización más elevados, pero no parece producirse ningún cambio en la orientación o localización de las moléculas de ANS, ya que las siluetas de ambas curvas son

similares. Cuando al sistema se adiciona el péptido se produce una disminución notable de los valores de polarización a cualquier temperatura, alcanzándose un valor mínimo alrededor de la T_c de la DPPC. Estas tendencias se pueden apreciar con detalle en la figura 54.

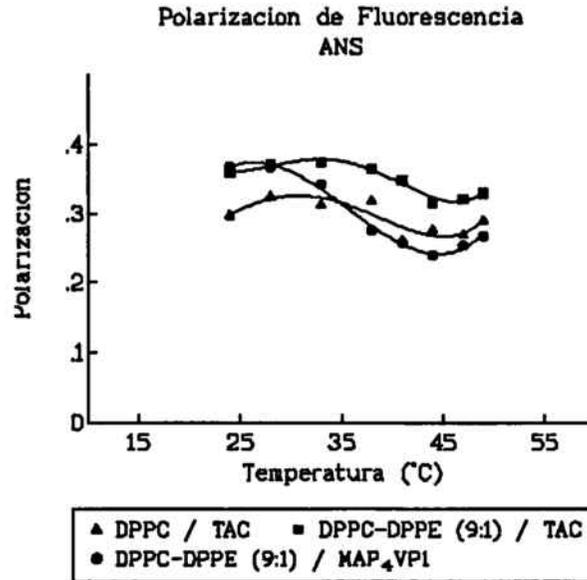


Figura 54 :Polarización de fluorescencia de liposomas SUVs de DPPC y DPPC-DPPE (9:1) incubados con fluoróforo, ANS, cuando interaccionaron con TAC o con MAP₄VP1.

3.5.2. MAP₄VP1-SUV DPPC-10% DPPE con DPH

La incubación de liposomas conteniendo DPPC y mezclas de DPPC-DPPE (9:1) con DPH dió lugar a muestras cuya fluorescencia disminuía con la temperatura, siendo la fluorescencia de los liposomas con DPPE superior a los estándares. Esta diferencia puede ser debida al menor volumen de la cabeza polar de la DPPE que permitiría una mayor y mejor incorporación y localización del DPH entre las cadenas alquílicas. Cuando se adiciona MAP₄VP1, la intensidad de fluorescencia disminuye sin llegar a los valores de la DPPC pura.

La posición de los máximos de emisión del espectro del DPH no varían con la temperatura. Lo cual sugiere, que el sistema es estable y que las moléculas fluorescentes están localizadas en la bicapa lipídica.

La polarización de este marcador en estos sistemas indica que la presencia de DPPE rigidifica las membranas. En cambio, la presencia de péptido produce una fluidificación de las bicapas especialmente a $T < T_c$.

Resultados y Discusión

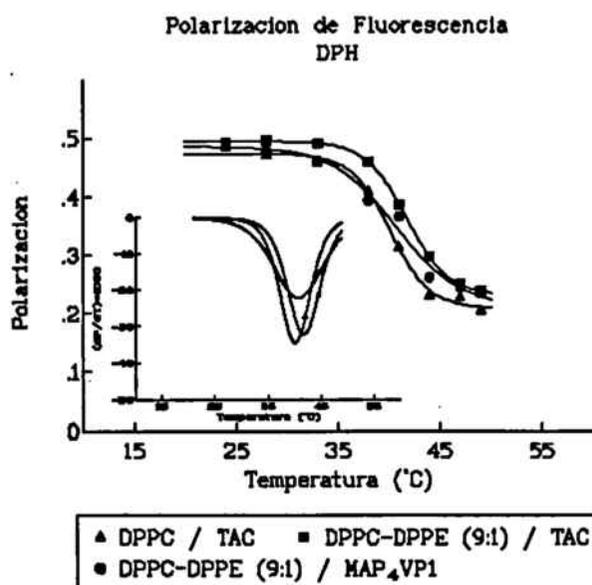


Figura 55 :Polarización de fluorescencia de liposomas SUVs de DPPC y DPPC-DPPE (9:1) incubados con fluoróforo, DPH, cuando interaccionaron con TAC o con MAP₄VP1.

Al ajustar las curvas de polarización de fluorescencia a la ecuación de la sigmoide se pudieron calcular T_0 las cuales están representadas en el inset de la figura 55. Los parámetros característicos de las ecuaciones se refieren en la tabla 28.

Tabla 28 :Parámetros obtenidos tras el tratamiento matemático de las curvas de polarización de fluorescencia de los SUVs de DPPC y DPPC-DPPE (9:1) marcados con DPH.

	A	B	C	D	r^2
DPPC TAC	0.2079	0.4740	40.16	-0.2263	0.995
DPPC- DPPE TAC	0.2299	0.4948	41.08	-0.2118	1.000
DPPC- DPPE MAP ₄ VP1	0.2098	0.4861	40.77	-0.1386	0.985

Siendo las temperaturas de transición de las muestras ensayadas:

Productos	T _c (°C)	IC del 95%
DPPC / TAC	40.2	39.2 - 41.1
DPPC-DPPE / TAC	41.8	41.6 - 41.9
DPPC-DPPE / MAP ₄ VP1	40.8	38.0 - 43.5

3.6. Interacción MAP₄VP1 con 90% DPPC-10% CL

3.6.1. MAP₄VP1-SUV DPPC-10% CL con ANS

La intensidad de fluorescencia de los liposomas compuestos por DPPC conteniendo respectivamente un 10% de cardiolipina y $1.5 \cdot 10^{-5}$ mM MAP₄VP1, depende en todos los casos de la T, siendo máxima para los liposomas de DPPC en todo el rango de T estudiado. La presencia de CL disminuye considerablemente este valor, y la presencia combinada de CL-MAP₄VP1 conduce a valores de fluorescencia intermedios, apreciándose una discontinuidad alrededor de la T_c de la DPPC pura.

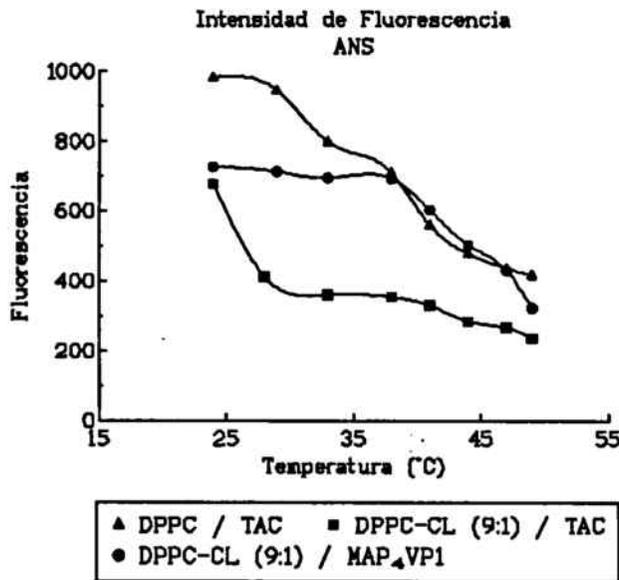


Figura 56 : Intensidad de fluorescencia de los liposomas SUVs de DPPC y DPPC-CL (9:1) con el fluoróforo, ANS, cuando fueron incubados con MAP₄VP1 y con TAC.

En este caso, la posición del máximo de emisión situado alrededor de 465 nm prácticamente no varía, en ninguna de las muestras ensayadas. Lo cual indica que el entorno hidrófobo de las moléculas de ANS no se modifica con la temperatura.

Resultados y Discusión

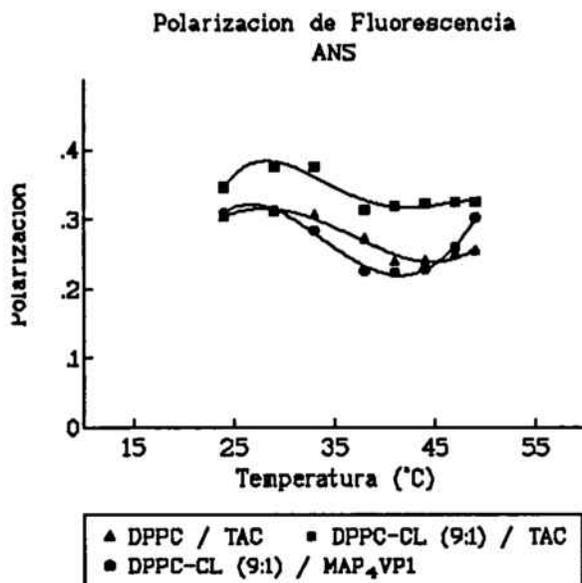


Figura 57 :Polarización de fluorescencia de liposomas SUVs de DPPC y DPPC-CL (9:1) incubados con fluoróforo, ANS, cuando interaccionaron con TAC o con MAP₄VP1.

La presencia de un 10% CL en el medio induce una rigidificación de las bicapas. En cambio, cuando al sistema se le añade el péptido, éste contrarresta dicho efecto. En este caso los valores de polarización de fluorescencia son parecidos a los de DPPC pura. El fenómeno es bastante usual en el tipo de muestras y composiciones que se han descrito a lo largo de este trabajo. En todas los experimentos se aprecia la tendencia hacia un valor mínimo de polarización situado alrededor de 40°C, observándose a T superiores, una ligera recuperación en el valor de la polarización.

3.6.2. MAP₄VP1-SUV DPPC-10% CL con DPH

Al comparar todos los valores de intensidad de fluorescencia de las muestras se comprobó que la presencia del péptido disminuye esta variable de modo gradual al aumentar la temperatura. Asimismo, tampoco se produce ninguna variación en la posición del máximo de fluorescencia.

La presencia de un pequeño porcentaje de cardiolipina en el fosfolípido aumenta la rigidez de la membrana, a temperatura superior a la T_c de la DPPC. Sin embargo, la temperatura de transición se altera ligeramente. La presencia de MAP₄VP1 en el sistema reduce los valores de polarización, a temperatura inferior a la T_c de la DPPC. Lo cual es indicativo de un aumento en la fluidez de la membrana.

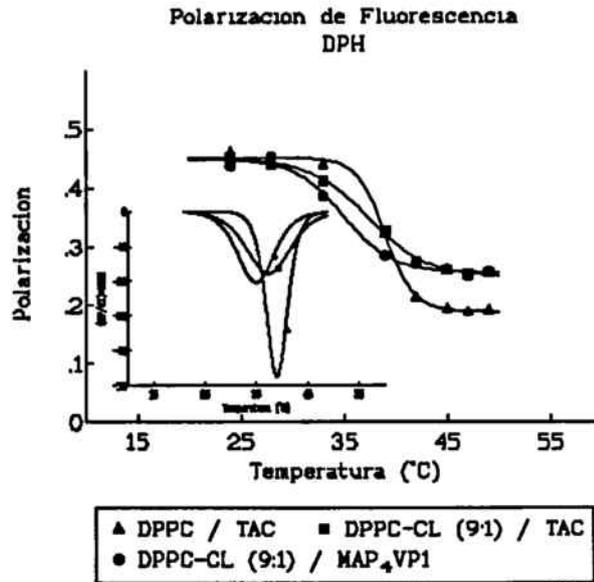


Figura 58 :Polarización de fluorescencia de liposomas SUVs de DPPC y DPPC-CL (9:1) incubados con fluoróforo, DPH, cuando interaccionaron con TAC o con MAP₄VP1.

Al ajustar los valores experimentales a la ecuación de una sigmoide, se obtienen los parámetros de la tabla 29.

Tabla 29 :Parámetros obtenidos tras el tratamiento matemático de las curvas de polarización de fluorescencia de los SUVs de DPPC y DPPC-CL (9:1) marcados con DPH.

	A	B	C	D	r ²
DPPC TAC	0.1879	0.4509	39.04	-0.3146	0.998
DPPC-CL TAC	0.2478	0.4498	37.43	-0.1533	0.997
DPPC-CL MAP ₄ VP1	0.2558	0.4492	34.98	-0.1833	0.992

A partir de la primera derivada, las cuales se representan en el inserto de la figura 58 se obtienen los valores de las temperaturas de transición de las muestras ensayadas.

Resultados y Discusión

Productos	T _c (°C)	IC del 95%
DPPC / TAC	39.1	38.6 - 39.5
DPPC-CL / TAC	37.4	36.3 - 38.6
DPPC-CL / MAP ₄ VP1	35.0	33.2 - 36.8

4. ESTUDIOS FISICOQUIMICOS EN BICAPAS. CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)

La presencia de pequeñas cantidades de moléculas extrañas puede actuar disminuyendo o aumentando la T_c de los fosfolípidos. En el presente caso hemos tomado como fosfolípido referencia DPPC, y se han determinado las alteraciones en la T_c inducidas por la presencia de pequeñas proporciones de PI, SA, PG, DPPE y CL. Una vez establecidos los espectros de DSC de las mismas, también se ha estudiado la influencia del MAP₄VP1 en la T_c de estas composiciones.

Como se aprecia en la figura 59, la presencia de un 10% de PI, PG y CL induce una disminución en la T_c de la DPPC, lo cual sugiere un ligero efecto fluidificador de las bicapas. En cambio, la presencia de DPPE aumenta la T_c de la referencia, indicando una mayor rigidificación de las cadenas alquílicas. Los espectros de DSC correspondientes a mezclas de DPPC-SA (9.5:0.5) dan una transición apreciable. Este efecto coincide con las interacciones elevadas determinadas mediante las sondas fluorescentes.

T _c (°C)	DPPC	DPPC-PI	DPPC-SA	DPPC-PG	DPPC-DPPE	DPPC-CL
PL	41.5	39.73	50.68	38.95	42.63	40.4
PL/PEPTIDO	41.93	39.26	50.58	37.85	42.99	39.35

De modo análogo se ha determinado el efecto del MAP₄VP1 en el comportamiento térmico de las muestras anteriores. Los resultados obtenidos indican que no existe un comportamiento regular para todos ellos. En algunos casos la presencia del péptido incrementa la T_c mientras que en otros la disminuye. Este comportamiento viene reflejado en la figura 60.

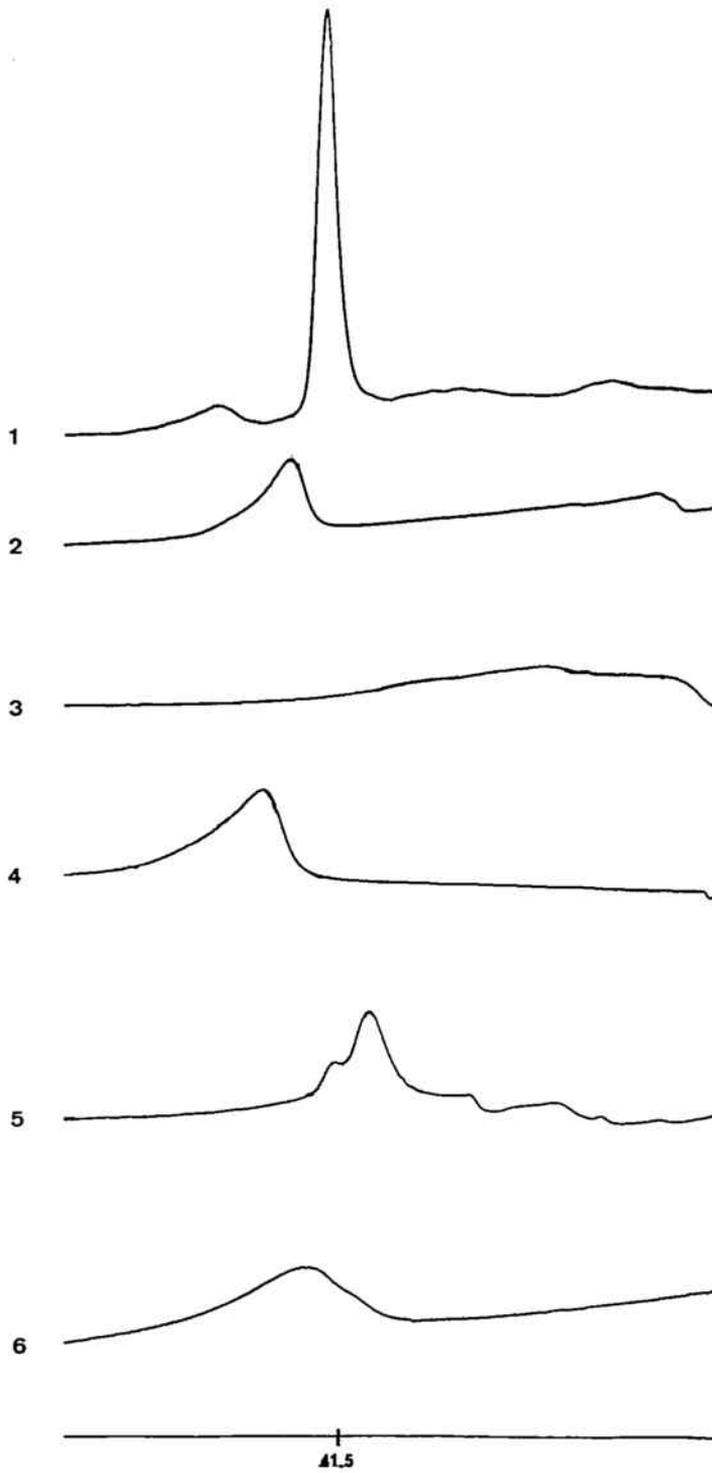


Figura 59 : Termogramas de DSC. 1-DPPC; 2- DPPC-PI; 3- DPPC-SA; 4- DPPC-PG; 5- DPPC-DPPE; 6- DPPC-CL.

Resultados y Discusión

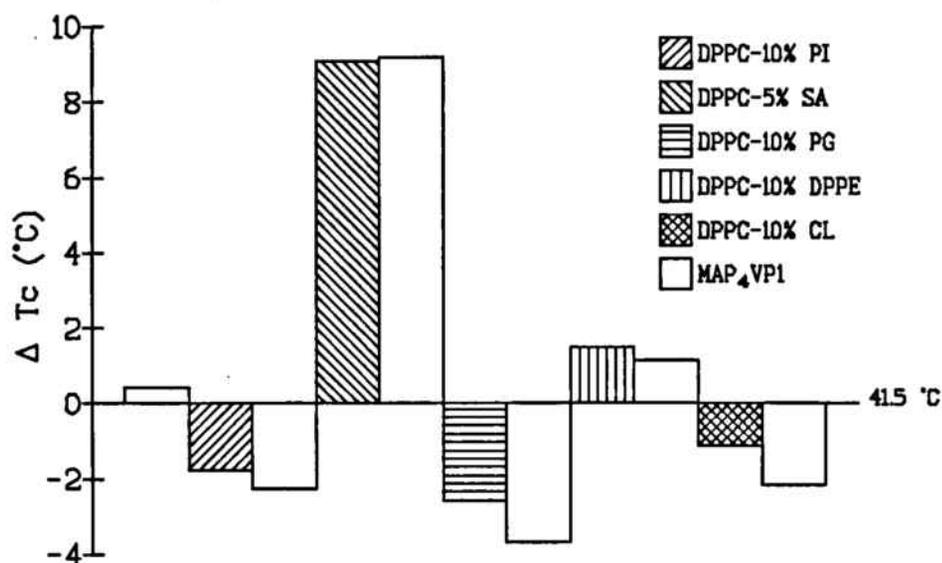


Figura 60 : Incrementos en la T_c de los diferentes MLV respecto al MLV referencia (DPPC) cuya $T_c = 41.5^\circ\text{C}$. Las barras en blanco representan los incrementos producidos por la presencia del $\text{MAP}_4\text{VP1}$ en los distintos MLV estudiados.

5. ESTUDIOS FISICOQUIMICOS EN BICAPAS. POTENCIAL Z

Es corrientemente aceptado que el potencial de superficie de los SUV influye extraordinariamente en su estabilidad física, por lo referente a agregación, fusión, captación de moléculas extrañas a nivel del empaquetamiento de los lípidos. En el presente trabajo creimos conveniente calcular este parámetro para las diferentes composiciones de PL. En la tabla 30 se indican estos valores para las diferentes composiciones estudiadas.

Tabla 30 : Potencial Z de los SUV de diferente composición estudiados.

Composición lipídica	Potencial Z
DPPC- 10% PI	- 7.32±0.68 mV
DPPC- 10% PG	-10.63±1.76 mV
DPPC- 10% CL	- 5.47±2.10 mV
DPPC- 10% DPPE	- 1.88±1.42 mV
DPPC- 5% SA	+20.57±4.58 mV

Resultados y Discusión

Estos valores son del mismo orden que los descritos en la literatura para liposomas de tamaño similar (200 nm).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

La construcción peptídica estudiada, MAP₄VP1 (11-25) forma monocapas estables. La isoterma de compresión del MAP₄VP1 presenta presión de colapso.

La presencia en la subfase del MAP₄VP1 no cambia los estados de ordenación de las moléculas en las isotermas de compresión de los fosfolípidos puros. Su efecto es una expansión de las mismas.

La miscibilidad del péptido estudiado con fosfolípidos sigue prácticamente la regla de la aditividad, siendo las desviaciones respecto a ella, así como las energías de mezcla, prácticamente nulas. La presencia de éste en la subfase no modifica la miscibilidad. Si bien, las áreas por molécula son mayores debido a la expansión que produce su presencia en la subfase.

El MAP₄VP1 presenta actividad superficial y la curva obtenida se ajusta a la ecuación de una hipérbola.

El péptido interacciona en general, con fosfolípidos ordenados tanto en monocapas como en bicapas. La intensidad de la interacción es de tipo electrostático.

La presencia de una elevada intensidad de carga en las bicapas lipídicas tiene un efecto negativo sobre las interacciones con el péptido y fluoróforos, bloqueando el acceso de las moléculas externas al interior de la bicapa.

Los estudios de polarización de fluorescencia realizados con el fluoróforo DPH frente a TAC mostraron que los liposomas SUV con un pequeño porcentaje de fosfolípido negativo (PI, PG, CL) fluidificaban la bicapa lipídica; con un porcentaje de fosfolípido positivo (SA) y neutro (DPPE), el efecto es el contrario, es decir, rigidifica la bicapa lipídica.

Los estudios de polarización de fluorescencia con DPH realizados frente al MAP₄VP1 (11-25) mostraron un efecto fluidificante para todos, excepto para los liposomas SUV con un 10% de PI.

Al realizar los estudios de polarización de fluorescencia con la sonda fluorescente ANS frente a TAC, éstos mostraron una rigidificación de la bicapa lipídica, excepto para los liposomas SUV con un porcentaje pequeño de PI, que la fluidifica.

Conclusiones

Cuando se realizaron los estudios anteriores frente al péptido, éstos mostraron en general un aumento de la fluidez de la bicapas. Ahora bien, en el caso de los liposomas SUV con SA y PG disminuían el efecto rigidificante de la bicapa lipídica.

Los estudios con DSC corroboraron los resultados de polarización de fluorescencia con sonda fluorescente DPH frente a TAC, es decir, para los MLV con un pequeño porcentaje de fosfolípido negativo disminuía la temperatura de transición respecto al liposoma MLV referencia (DPPC). Este hecho indica un aumento en la fluidez de la bicapa lipídica. En el caso de los liposomas MLV con porcentajes de fosfolípidos positivo y neutro, la temperatura de transición aumenta respecto al liposoma MLV de referencia. Por tanto se rigidifican la bicapas lipídicas.

Los estudios de DSC de liposomas MLV con MAP₄VP1 (11-25) incrementan en magnitud el valor de la temperatura de transición (T_c) obtenido, para el caso de los liposomas MLV anteriores. Así pues, en unos caso rigidifica y en otros fluidifica aún más.

Los ensayos realizados con CF encapsulada en SUV de DPPC indican que las interacciones estudiadas se sitúan prioritariamente a nivel de la mitad externa de la bicapa, no produciéndose ni solubilizaciones ni destrucción de la misma. En cambio, en el caso de los SUV DPPC- 5% SA se produce un incremento de permeabilidad paulatino al aumentar la temperatura.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

Alving, C.R., 1991. Liposomes as carriers of antigens and adjuvants. *J. of Immunological Methods*, **140**:1-13.

Bangham, A.D. & Horne, R.W., 1964. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *J. Mol. Biol.*, **8**: 660-668.

Bittle, J.L., Houghten, R.A., Alexander, H., Shinnick, T.M., Sutcliffe, J.G., Lerner, R.A., Rowlands, D.J. & Brown, F., 1982. Protection against foot-and-mouth-disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. *Nature* (London), **298**:30-33.

Bashford, L., Morgan, Ch.G. & Radda, G.K., 1976. Measurement and interpretation of fluorescence polarization in phospholipids dispersions. *Biochem. Biophys Acta*, **426**:157-172.

Briand, J.P., Muller, S. & Van Regenmortel, M.H.V., 1985. Synthetic peptides as antigens: pitfalls of conjugation methods. *J. Immunol. Methods*, **78**:59.

Cromeans, T., Sobsey, M.D. & Fields, H.A., 1987. Development of a plaque assay for a cytopathic, rapidly replicating isolate of hepatitis A virus. *J. Med. Virol.*, **22** (1):45-56.

Dervichian, D.G., 1939. A new technique for spreading of proteins and spreading number. *Nature*, **144**:25-34.

Devaux, H., 1912. Oil films on water and Hg. *J. Phys.*, **2**:699-734.

Di Marchi, R., Brooke, G., Gale, C., Cracknell, V., Doel, T. & Mowat, N., 1986. Protection of cattle against foot-and-mouth disease by a synthetic peptide. *Science* **232**:639-641.

Emini, E.A., Hughes, J.V., Perlow, D.S. & Boger, J., 1985. Induction of Hepatitis A virus neutralizing antibodies by a virus specific synthetic peptide. *J. Virol.*, **55**:836-839.

Fields, G.B. & Noble, R.L., 1990. Solid-phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int. J. Peptide Protein Res.*, **35** (3):161-214.

Bibliografia

Francis, M.J., Hastings, G.Z., Brown, F., Mc Dermod, J., Lu, Y.-A. & Tam, J.P., 1991. Immunological evaluation of the multiple antigen peptide (MAP) system using the major immunogenic site of foot-and-mouth disease virus. *Immunology* 73:249.

Francki, R.I.B., Fauquet, M., Knudson, D.L.K. & Brown, F. *Classification and Nomenclature of Viruses*. Springer-Verlag, Wien, 1991.

Frosner, G.G. En *Viral hepatitis: Laboratory and Clinical Science*, pp.201-213. F. Deinhardt, J. Deinhardt (eds), Marcel Dekker, Inc., New York, 1983.

Gaines, G.L., 1966. The properties of liquid surfaces. En *Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces*. Ed. Interscience publishers. Library of Congress Catalog Card Number 65-26218, pp 24-25.

Goodrich, F.C., 1957. *Proceedings of the 11th International Congress on Surface Activity*, Butterworths, London 85.

Gregoriadis, G., Tan, L. & Xiao, Q. The immunoadjuvant action of liposomes: role of structural characteristics. En Gregoriadis, G., Allison, A.C. & Poste, G.: *Immunological Adjuvants and Vaccines*. NATO ASI Series. Series A: Life Sciences 179:79-94. Plenum Press, New York, 1989.

Hopp, T.P. & Woods, K.R., 1981. Prediction of protein antigenic determinants from aminoacid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:3824-3828.

Jacobs, R.E. & White, S.H., 1989. The nature of the hydrophobic binding of small peptides at the bilayer interface: Implications for the insertion of transbilayer helices. *Biochemistry*, 28:3421-3437.

Joos, P. & Demel, R.A., 1969. The interaction energies of cholesterol and lecithin in spread mixed monolayers at the air-water interface. *Biochim. Biophys. Acta*, 183:447-457.

Joshi, U.M., Kodavanti, P.R.S., Lockard, V.G. & Mehendale, H.M., 1989. Fluorescence studies on binding of amphiphilic drugs to isolated lamellar bodies: relevance to phospholipidosis. *Biochem. Biophys Acta*, 1004:309-320.

Just, M., Berger, R., Drechster, H., Brantschen, S. & Glück, R., 1992. A single vaccination with an inactivated hepatitis A liposome vaccine induces protective antibodies after only two weeks. *Vaccine*, 10:737.

- Kimura, S. & Erne, D.R., 1992. Interaction of glucagon with artificial lipid bilayer membranes. *Int. J. Peptide Protein R.*, **39**:431-442.
- Langmuir, I., 1917. The constitutions and fundamental properties of solids and liquids. *J. Amer. Soc.*, **39**:1848-1906.
- McElhaney, R.N., 1982. *Chem. Phys. Lipids*, **30**:229-259.
- Melnick, J.L., 1992. Properties and classification of hepatitis A virus. *Vaccine*, **10** (1):524-526.
- Merrifield, R.B., 1963. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **85**: 2149-2154.
- Nam, K-Y., Kimura, S., Imanishi, Y. & Fujiki, H., 1989. Distribution of tumors promoters in lipid membranes and changes in membrane structure. *Biophysical Chemistry*, **34**:43-53.
- Pidgeon, C., Hunt, A.H. & Dittrich, J., 1986. Formation of multilayered vesicles from water/organic-solvent (w/o) emulsions: theory and practice. *Pharm. Res.*, **3** (1):23-34.
- Piédrola-Angulo, G. "Virus de las hepatitis". En: Pumarola, A. *et al. Microbiología y Parasitología Médica*, 2ª ed., pp.704-706. Ed. Salvat, Barcelona, 1991.
- Posnett, D.N., Mc Grath, H. & Tam, J.P., 1988. A novel method for producing anti-peptide antibodies. *J. Biol. Chem.*, **263**:1719.
- Poste, G., 1983. Liposome targeting in vivo: Problems and opportunities. *Biol. Cell*, **47**:19.
- Provost, P.J. En *Hepatitis A*, ed. R.J. Gerety, Academic Press, Inc.(NY), 1984, pp 245-261.
- Ries, H.E. & Kimbal, W.A., 1959. *Proceedings of the 2nd International Congress of Surface Activity*, Vol. 1:75.
- Robertson, B.H., Brown, V.K., Holloway, B.P., Khanna, B. & Chan, E., 1989. Structure of the hepatitis A virion: identification of potential surface-exposed regions. *Arch. Virol.*, **104**:117-128.

Bibliografía

Saenz González, M.C. & González Celador, R. "Infecciones por enterovirus, poliomiелitis, hepatitis A y hepatitis E. En: Piedrola Gil, G.; et al. *Medicina Preventiva y Salud Pública*, 9ª ed., pp.465-470. Ed. Masson-Salvat Científica, Barcelona, 1991.

Sargent, D.F. & Schwyzer, R., 1986. Membrane phase as catalyst for peptide-receptor interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**:5774-5778.

Schutze, M.P., Leclerc, C., Jolivet, M., Audibert, F. & Chedid, L., 1985. Carrier-induced epitopic suppression, a major issue for future synthetic vaccines. *J. Immunol.*, **135**:2319.

Schwarz, S.M., Lambert, A.S. & Medow, M.S., 1992. Octogeny of proximal colon basolateral membrane lipid composition and fluidity in the rabbit. *Biochem. Biophys. Acta*, **1107**:70-76.

Sela, M. & Arnon, R. En *New Developments with Human and Veterinary Vaccines*, eds. Mizrahi, A., Hertman, I., Klingberg, M.A. & Kohn, A. (Liss, New York), 1980, pp.315-323.

Slavik, J., 1982. Anilinonaphtalene sulfonate as a probe of membrane composition and function. *Biochim. Biophys. Acta*, **694**:1-25.

Sobsey, M.D., Shields, P.A., Hauchman, F.S., Davis, A.L., Rullman, V.A. & Bosch, A. En *Viral Hepatitis and Liver Disease*, pp.121-124, Alan R. Liss Inc., New York, 1988.

Steward, J.C., 1980. Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. *Anal. Biochem.*, **104**:10-14.

Stillwell, W., Ehringer, W. & Wassall, S.R., 1992. Interaction of α -tocopherol with fatty acids in membranes and ethanol. *Biochem. Biophys. Acta*, **1105**:237-244.

Szoka, S., Olson, F., Health, T., Vail, W., Mayhew, E. & Papahadjopoulos, D., 1980. Preparation of unilamellar liposomes of intermediate size (0.1-0.2 micrometers) by a combination of reverse-phase evaporation and extrusion through polycarbonate membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, **601**:559.

Tam, J.P., 1988. Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:5409.

Tam, J.P. & Lu, Y.-A., 1989. Vaccine engineering: enhancement of immunogenicity of synthetic peptide vaccines related to hepatitis in chemically defined models consisting of T and B-cell epitopes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9084.

Tam, J.P., Clavijo, P., Lu, Y.-A., Nussenzweig, V, Nussenzweig, R. & Zavala, F., 1990. Incorporation of T and B epitopes of the circumsporozoite protein in a chemically defined synthetic vaccine against malaria. *J. Exp. Med.* 171:299.

Van Grinkel, G., et al., 1989. The membrane fluidity concept revised by polarized fluorescence spectrometry on different model membrane containing unsaturated lipid and sterols. *Biochem. Biophys. Acta*, 71:23.

Van Regenmortel, M.H.V., Briand, J.P., Muller, S., Plaué, S. En *Synthetic Polypeptides as Antigens*, Vol 19. Ed. Burdon, R.H. y Knippenberg, P.H., Elsevier Science Publishers, B.V., Amsterdam, 1988.

Verger, R. & Pattus, L., 1982. Lipid-protein interactions in monolayers. *Chemistry and Physics of Lipids*, 30:189-227.

Verger, R. & De Haas, G.H., 1982. Lipid-protein interactions in monolayers. *Chemistry and Physics of lipids*, 30:189-227.

Weinstein, J.N., et al., 1977. Liposome-cell interaction: transfer and intracellular release of a trapped fluorescent marker. *Science*, 195:489.

Wheeler, C.M., Robertson, B.H., Van Nest, G., Dino, D., Bradley, D.W. & Fields, H.A., 1986. Structure of the hepatitis A virion: peptide mapping of the capsid region. *J. Virol.*, 58:307.

Wiesmuller, K.H., Bessler, W.G. & Jung, G., 1992. Solid-phase peptide synthesis of lipopeptide vaccines eliciting epitope-specific B-, T-helper and T-killer cell response. *Int. J. Peptide Protein Res.*, 40:255-260.

Williams, N.A. & Weiner, N.D., 1989. Interactions of small polipeptides with dimyristoilphosphatidilcholina monolayer: effect of size and hydrophobicity. *International Journal of Pharmaceutics*, 50:261-266.

Williams, B.W., Scotto, A.W. & Stubbs, C.D., 1990. Effect of proteins on fluorophore life time heterogeneity in lipid bilayers. *Biochemistry*, 29:324-8.

Bibliografja

Wu, P., Tin, G.W. & Baldeschiwieber, J.D., 1981. Phagocytosis of carbohydrate-modified phospholipid vesicles by macrophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 2033-2037.