

Las vesículas liposomales: obtención, propiedades y aplicaciones potenciales en la biomedicina

M.E. Lanio^{a†}, M.C. Luzardo^a, R. Laborde^a, O. Sánchez^a, Y. Cruz-Leal^a, F. Pazos^a, M. Tejuca^a, A. Valle^a, M.E. Alonso^a, L.E. Fernández^b, C. Alvarez^a

a) Centro de Estudios de Proteínas, Facultad de Biología, UH; mlanio@fbio.uh.cu

b) Centro de Inmunología Molecular, Ciudad de La Habana

† autor para la correspondencia

Recibido el 9/04/2009. Aprobado en versión final el 20/06/2009.

Sumario. Los liposomas han sido empleados como modelos de membrana y vehículos de una gran diversidad de moléculas, con propósitos bioquímicos, nanobiotecnológicos y biomédicos. Considerando la versatilidad de las propiedades físico-químicas de estas vesículas, ellas resultan atractivas para el diseño de vehículos de proteínas, ADN, drogas, etc. En este trabajo, se resumen las tecnologías liposomales y los procedimientos más frecuentemente empleados para el estudio de las características físico-químicas de estas vesículas, tales como: tamaño, rasgos estructurales, estabilidad química y física, propiedades eléctricas y transiciones de fase. Los liposomas se emplean como inmunoadyuvantes al favorecer la direccionalización de los antígenos a las células del sistema inmunológico. En el presente artículo se describen, además, algunos de los resultados obtenidos por nuestro grupo en el estudio de la función inmunomoduladora de los lípidos liposomales con antígenos como el EGFhr, entre otros.

Abstract. Liposomes have been used as membranes models and carriers of enormous diversity of molecules with biochemical, nanobiotechnological and biomedical purposes. Considering the versatility in physico-chemical properties of these vesicles, they are attractive to design vehicles for proteins, DNA, drugs, etc. In this work, we summarize the liposomal technologies and the procedures most frequently used to study the physico-chemical characteristics of these vesicles, such as size, structural features, physical and chemical stability, electric properties and phase transitions. Liposomes are employed as immunoadjuvants due to their ability to address antigens to cells of the immune system. Additionally, the present paper describes results obtained by our group in the study of the immunomodulating properties of liposomal lipids for antigens such as EGFhr, among others.

Palabras clave. Nanotechnology biomedical applications, 87.85.Qr, 87.85.Rs, 81.16.-c

1 Introducción

Los liposomas fueron descubiertos en 1961 por Alec D. Bangham mientras estudiaba un tipo de biomoléculas (los fosfolípidos, PL) y su relación con la coagulación sanguínea¹. Desde entonces, se han convertido en herramientas versátiles en Biología, Bioquímica y Medicina.

Los liposomas son vesículas preparadas artificialmente, de talla nanométrica (aunque algunas pueden alcanzar tamaños mayores) y forma aproximadamente esférica con una fase acuosa interna rodeada por una o más bicapas lipídicas. Bangham descubrió que los PL en agua forman inmediatamente esferas cuyas paredes se encuentran organizadas en bicapas debido a que cada molécula tiene un

terminal hidrosoluble en tanto el otro es hidrofóbico, es decir se trata de moléculas anfífilas². En numerosos artículos de revisión y capítulos de libros se analiza el empleo de los liposomas en la liberación de fármacos, la terapia génica y como inmunoadyuvantes. El uso de los liposomas como *carriers* de fármacos se ha dirigido a reducir los efectos tóxicos colaterales de las drogas en órganos sensibles, tales como corazón y riñones, y a lograr una direccionalización a tejidos específicos tales como los tumores. Por otra parte, la inclusión de lípidos catiónicos en la composición liposomal ha potenciado su capacidad para mediar la transfección en la terapia génica. La racionalidad que existe en el empleo de los liposomas en inmunizaciones y en el diseño de vacunas se basa en su capacidad para liberar la molécula antigénica en células específicas del sistema inmunológico y estimular una respuesta inmune³.

Los liposomas están constituidos por moléculas anfífilas derivadas o basadas en la estructura de los lípidos de las membranas biológicas^{4,5,6,7}. Estos lípidos se forman, generalmente, a partir del enlace éster de dos cadenas hidrocarbonadas con la molécula del glicerol (“glicerolípidos”), o también pueden estar constituidos por la unidad hidrofóbica ceramida (“esfingolípidos”). Esta parte hidrofóbica se une a una cabeza polar hidrofílica que puede contener grupo fosfato (“fosfolípidos”) o algunas unidades azúcares (“glicolípidos”). Las cabezas polares de los lípidos biológicamente relevantes pueden ser *zwitteriónicas*: fosfatidil colina (PC), fosfatidil etanolamina (PE), esfingomielina (SM); cargadas negativamente: ácido fosfatídico (PA), fosfatidil glicerol (PG), fosfatidil serina (PS), fosfatidil inositol (PI), cardiolipina (CL) y glicolípidos cargados negativamente o no. Las cadenas *acilas* saturadas con frecuencia varían en longitud entre 10 y 18 carbonos; las de longitud mayor de 18 carbonos son usualmente insaturadas con uno, dos o tres dobles enlaces en configuración *cis*. Los lípidos cargados positivamente son moléculas sintéticas las cuales son diseñadas para propiciar la condensación del ADN e interactuar con las membranas biológicas con carga neta opuesta³.

Los lípidos anfífilos son muy poco solubles en agua como monómeros, con una baja concentración crítica micelar (CCM), oscilando entre 10^{-8} y 10^{-12} M, magnitud que depende de la longitud de las cadenas hidrocarbonadas presentes en sus estructuras. Los anfífilos con una sola cadena hidrocarbonada (lisolípidos, cadenas de ácidos grasos insaturadas, detergentes, etc.) espontáneamente forman agregados en estructuras micelares. Sin embargo, la mayoría de los lípidos derivados de las membranas biológicas tienden a formar bicapas en fase acuosa. Las estructuras lamelares que resultan se sellan en vesículas denominadas liposomas. Atendiendo a las características estructurales, en particular al número de bicapas y al tamaño, los liposomas se pueden clasificar en vesículas multilamelares (del inglés *multilamellar vesicles* MLV, 0.1–10 μm) o unilamelares, estas últimas pueden ser de diámetro pequeño (del inglés *small unilamellar vesicles* SUV, <100 nm), de diámetro grande (del inglés *large unilamellar vesicles* LUV, 100–500

nm) o gigantes (del inglés *giant unilamellar vesicles* GUV, $\geq 1 \mu\text{m}$). Ciertas mezclas lipídicas o lípidos aislados tienden a formar agregados que estructuralmente difieren de la bicapa (morfología de no-bicapa), ejemplo de ellos son las fases hexagonales (H_{II}) o cúbicas (Q)³.

2 Procedimientos más usados en la preparación de liposomas

Las vesículas MLV se obtienen por hidratación, mediante agitación, de una película lipídica previamente formada por evaporación de una solución de los lípidos disueltos en un solvente orgánico, generalmente cloroformo. Esta hidratación debe realizarse por encima de la temperatura de transición de fase de los lípidos. La distribución del tamaño y la lamellaridad de las vesículas MLV es muy heterogénea pero, debido al desarrollo de la tecnología liposomal, se dispone de procedimientos sofisticados que rinden vesículas con un tamaño más homogéneo (Figura 1)^{7,8}.

La sonicación de una suspensión de MLV provoca la ruptura de estas vesículas produciendo SUV con un radio de 30–60 nm, aproximadamente. Los liposomas SUV tienden a experimentar procesos de agregación y fusión debido a la presencia de *defectos* en sus bicapas¹. Extrusiones repetidas de una suspensión de MLV a través de membranas de policarbonato, con poros de tamaño bien definido, producen LUV con un diámetro que puede oscilar entre 80–400 nm, en dependencia de la membrana utilizada en el proceso de extrusión⁷. Otro procedimiento muy rápido para la preparación de liposomas consiste en la disolución de una mezcla lipídica en etanol o éter, la cual es inyectada en una solución tampón apropiada originándose una mezcla heterogénea de SUV, LUV o MLV, en dependencia de la concentración lipídica. El uso de este procedimiento en ocasiones es limitado debido a la baja solubilidad de determinados lípidos en estos solventes⁷. El método de evaporación-inversión de fase (REV, del inglés *reverse phase evaporation method*), basado en la rápida inyección de una solución acuosa en una fase orgánica que contiene los lípidos, rinde vesículas en la suspensión acuosa con 0.1 a 1.0 μm de diámetro y una capacidad de encapsular de hasta un 50%. Los pasos fundamentales de este método son: la sonicación, que resulta en una emulsión “*agua-en-aceite*”, seguida por un secado parcial a un gel semi-sólido que es finalmente, convertido en una suspensión concentrada de vesículas mediante agitación vigorosa⁷.

La encapsulación de biomoléculas lábiles tales como proteínas y ADN en liposomas requiere de métodos reproducibles y que no incluyan etapas drásticas. El procedimiento basado en la deshidratación y rehidratación de vesículas (DRV) desarrollado por Kirby y Gregoriadis⁹ es simple, emplea condiciones suaves y produce vesículas con una elevada eficiencia de encapsulación para una amplia variedad de moléculas. Las vesículas DRV pueden ser producidas a gran escala mezclando una solución acuosa del compuesto a encap-

sular con una suspensión de LUV o SUV “vacíos”. Las etapas de congelación-secado y rehidratación inducen fusión entre membranas adyacentes y el soluto queda atrapado en las vesículas MLV formadas (0.1 a 2.0 μm de diámetro y hasta un 80% de encapsulación)^{3,7,9}.

En el Laboratorio de Biomembranas (LBM) del Centro de Estudio de Proteínas de la Universidad de La Habana (CEP-UH) se ha venido trabajando con diferentes tipos de liposomas desde hace aproximadamente veinte años. Más recientemente, con el empleo de la tecnología DRV hemos estudiado la influencia de la composición lipídica sobre la eficiencia de encapsulación del Factor de Crecimiento Epidérmico humano recombinante (EGFhr) (Figure 2) y la capacidad de retención de estos liposomas¹⁰. Las vesículas DRV compuestas de dipalmitoil PC (DPPC) y colesterol (Ch) mostraron la mayor eficiencia de encapsulación del EGFhr (35%) en comparación con los liposomas constituidos por otras PC diferentes en longitud y nivel de insaturación de las cadenas hidrocarbonadas, tales como PC de yema de huevo (ePC):Ch, PC de soya (sPC):Ch, distearoil PC (DSPC):Ch o dimiristoil PC (DMPC):Ch, todas las preparaciones en una relación equimolar.

La inclusión de estearilamina (SA), una molécula sintética cargada positivamente, o PG a liposomas de ePC:Ch en un 10% (relación molar con respecto al contenido de fosfolípidos), para garantizar la presencia de cargas positivas o negativas en la superficie liposomal, disminuyó la eficiencia de encapsulación de EGFhr en comparación con las vesículas constituidas por componentes *zwitteriónicos* solamente (Figura 2).

Resultó de interés la no correlación entre la eficiencia de encapsulación y el tamaño de las vesículas determinado por espectroscopía de correlación fotónica (700-1400 nm). Estos resultados sugirieron que para el EGFhr, la naturaleza de la PC era el factor determinante en la eficiencia de encapsulación de ese polipéptido en DRV. La transformación de las vesículas DRV de DPPC:Ch, con EGFhr encapsulado, a LUV mediante ciclos de extrusión a través de membranas con poros de 100 ó 400 nm redujo la eficiencia de encapsulación de 4-6 veces, aun cuando el proceso de extrusión se realizó en presencia del material no encapsulado. La disminución del porcentaje de encapsulación de los LUV para el EGFhr no fue producto de pérdida de proteína durante el desarrollo del procedimiento¹⁰. Estos resultados contradicen lo informado previamente en relación a la factibilidad de la extrusión de DRV, para lograr una homogeneidad y reducir el tamaño de estas vesículas, sin afectar la eficiencia de encapsulación, siempre que se realice este proceso antes de la purificación de los liposomas¹¹.

Otro método recomendado para la encapsulación pasiva o reconstitución de proteínas lábiles y ligandos anclados en la membrana se fundamenta en la solubilización de los lípidos y las proteínas en presencia de un detergente. La dilución o eliminación del detergente por diálisis, filtración en gel o *bioeads* conduce a la formación de los liposomas, aunque es aún difícil de controlar racionalmente el mecanismo de reconstitución de las proteínas en la

membrana¹². En contraste con los procedimientos de encapsulación pasivos, los activos explotan diferencias en el coeficiente de reparto de las moléculas en función del pH y la fuerza iónica¹³.

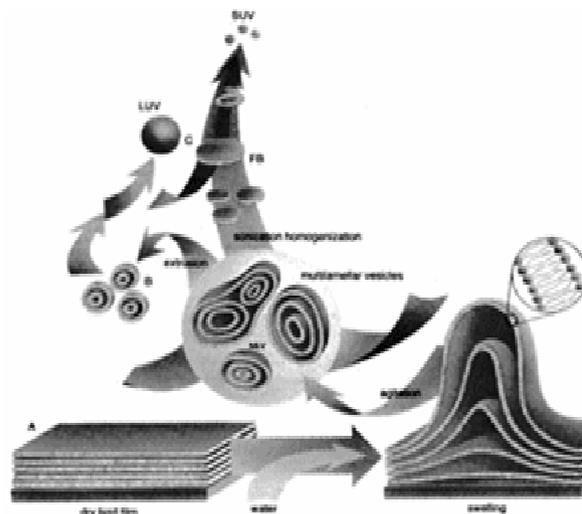


Figura 1. Procedimientos para la obtención de Liposomas (MLV, LUV y SUV). A: Método de dispersión simple para la obtención de MLV, mediante agitación de películas lipídicas hidratadas. B: Método de extrusión de MLV a través de membranas de policarbonato para la obtención de LUV. C: Métodos de sonicación-homogenización de MLV para la preparación de SUV.

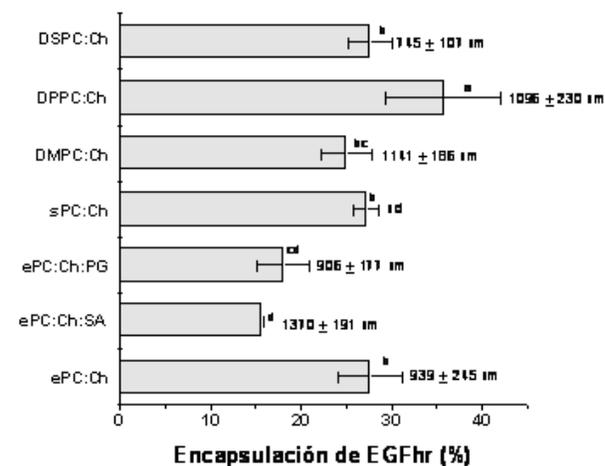


Figura 2. Eficiencia de encapsulación para el EGFhr, de liposomas obtenidos por el método de DRV compuestos de PC de diferentes naturalezas y Ch (relación molar 1:1). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) según la prueba de Rangos Múltiples de Duncan. Las cifras mostradas en cada barra corresponden al tamaño promedio de las partículas (nm) y la desviación estándar, estimado mediante espectroscopía de correlación fotónica¹⁰.

3 Métodos para el estudio de las propiedades físico-químicas de los liposomas

Diversos métodos espectroscópicos han sido empleados en el estudio de agregados lipídicos y en la estimación de sus tamaños¹⁴. La turbidimetría y la dispersión de la luz se basan en el mismo fenómeno físico a pesar de que se requiere instrumentación diferente. La turbidez se mide en espectrofotómetros convencionales determinando la densidad óptica, frecuentemente a 400 nm¹⁵. Aunque con este procedimiento no es posible estimar el tamaño de las partículas, es útil para un chequeo rápido de la reproducibilidad de las preparaciones o para monitorear la solubilización o reconstitución de las vesículas.

Los métodos basados en la dispersión de la luz, en los que la detección de la luz dispersada se realiza en un ángulo de 90° con relación a la luz incidente, son más sensibles. La dispersión de la luz puede ser medida en estado estacionario en un espectrofluorímetro, o de forma dinámica en un instrumento equipado con un láser. Este último método, también conocido como dispersión cuasielástica de la luz o espectroscopía de correlación fotónica, analiza la intensidad de la luz dispersada en milisegundos a través de un análisis de autocorrelación. El movimiento browniano de las partículas induce un ensanchamiento del espectro lo que se relaciona con la forma y tamaño de las partículas¹⁶. La dispersión dinámica de la luz es, por tanto, el método más empleado para estimar el radio hidrodinámico promedio de partículas en suspensión y su índice de polidispersidad y cubre un rango desde unos pocos nanómetros hasta μm ¹⁴.

La homogeneidad y morfología de los liposomas puede también visualizarse mediante microscopía electrónica (ME)¹⁷⁻¹⁹. LA ME con tinción negativa brinda una visión directa de la distribución del tamaño de las partículas (asumiendo que no hay artefactos debido al pH, iones y osmolaridad), aunque son difíciles de evaluar la lamelaridad y morfología. En la ME con congelación-fractura se expone la superficie hidrofóbica entre dos monocapas y se logran describir rasgos y detalles que la caracterizan. Estas imágenes permiten distinguir la geometría del empaquetamiento de las fases lamelares y hexagonales, así como también la morfología de las rugosidades. Por otra parte, la cri-ME es un procedimiento muy conveniente para visualizar la geometría tridimensional de las estructuras vesiculares atrapadas dentro una capa fina de hielo, aun cuando el contraste es comparativamente bajo.

La estabilidad física de una formulación liposomal se determina por su comportamiento coloidal y su capacidad para retener las moléculas encapsuladas por largos períodos de tiempo, bajo diferentes condiciones experimentales o de almacenamiento. Idealmente, los liposomas deben mantener su integridad con cambios en la fuerza iónica del medio o por dilución, fenómenos a los cuales normalmente se enfrentan al ser administrados *in vivo*. Desde un punto de vista termodinámico, los liposomas convencionales no se encuentran en estado de equilibrio, sino que representan sistemas cinéticamente "atrapados". Por esa razón, sus estructuras son

relativamente estables al efecto de la dilución, mientras que los sistemas termodinámicamente reversibles, como las micelas y las microemulsiones, tienden inmediatamente a la agregación o desintegración²⁰.

Considerando la teoría de Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek, un sistema será estable en soluciones electrolíticas simples si la repulsión electrostática entre dos partículas es superior a las atracciones de van der Waals existentes entre ellas. Por consiguiente, trabajar con liposomas eléctricamente cargados, almacenados a baja fuerza iónica, es una alternativa ventajosa y recomendable. Sin embargo, pueden ocurrir procesos de agregación vesicular, tanto a altas concentraciones lipídicas como en presencia de iones multivalentes con elevadas afinidades por las cabezas polares cargadas (ej, PS con Ca^{2+})^{4,21}.

La adición de carga superficial a las vesículas no siempre resulta en una mayor integridad y estabilidad de las formulaciones. Otros factores como la composición lipídica y la naturaleza del compuesto encapsulado pueden influir en las propiedades de los liposomas. En correspondencia con esto, los DRV de las composiciones lipídicas mencionadas en la Figura 2 exhibieron diferentes eficiencias de retención de EGFhr, cuando fueron almacenados en suspensión a 4°C durante un mes. Los liposomas de mayor capacidad de retención fueron los constituidos por DPPC:Ch, con sólo un 15 % de pérdida de su contenido en el tiempo analizado, en comparación con las otras composiciones ensayadas¹⁰. En este estudio, la adición de lípidos cargados no modificó el comportamiento de los liposomas. Interesante resultó el hecho de que las vesículas no experimentaron cambios en el tamaño y la polidispersidad bajo las condiciones ensayadas, lo que era indicativo de que la liberación del EGFhr de DRV no fue el resultado de fenómenos de agregación-fusión de las vesículas. En consecuencia, se sugirió que la desestabilización de los liposomas cargados con EGFhr era debido a una probable interacción de este polipéptido con la bicapa lipídica.

Mediante la espectroscopía de fluorescencia se han desarrollado diferentes estrategias para el estudio de cambios estructurales que involucran a la bicapa lipídica, tales como: la fusión de membranas, la exposición de dominios hidrofóbicos o su desestabilización y la liberación del contenido vesicular³. Múltiples sondas fluorescentes, altamente sensibles, ya sean hidrosolubles o con anclaje lipídico, se encuentran disponibles para monitorear el escape de contenidos acuosos de las vesículas. Un ejemplo de ello es el análisis de la cinética de recuperación de la fluorescencia de un fluoróforo que experimenta supresión de la emisión fluorescente a elevadas concentraciones (*self-quenching*) o inducida por la presencia de otro cromóforo, como son: la carboxifluoresceína (CF) y el par ANTS y DPX, respectivamente^{3,7}. Este procedimiento nos permitió profundizar en la posible contribución del EGFhr a la desestabilización de las membranas liposomales. Un análisis del curso temporal de la liberación de CF de DRV, en presencia de plasma

sanguíneo o tampón fosfato salino (PBS), evidenció una mayor liberación de este fluoróforo de las vesículas que contenían el EGFhr co-encapsulado para ambas condiciones experimentales ensayadas (Figura 3)¹⁰, lo que sugirió una interacción de este polipéptido con los fosfolípidos de las membranas liposomales.

La liberación del EGFhr de las vesículas liposomales se redujo con la adición a las preparaciones de los azúcares sacarosa, trealosa, maltosa y glucosa²². Este efecto protector ha sido atribuido a que los azúcares reemplazan el agua de hidratación de los grupos polares de los fosfolípidos, y se establecen enlaces de hidrógeno entre sus grupos fosfatos y los hidroxilos de los azúcares²³.

La preparación de partículas liposomales sin carga y recubiertas con polímeros hidrofílicos no iónicos, tales como el polietilenglicol (PEG), resulta en vesículas estables que muestran bajos niveles de interacciones no-específicas y de agregación, producto de que las barreras estéricas previenen la proximidad y el contacto³.

Las propiedades eléctricas de la superficie de los liposomas pueden ser evaluadas mediante microelectroforesis. Este procedimiento permite la estimación del potencial ζ y la densidad de carga superficial como parámetros característicos^{21,24}. Aun los liposomas no cargados de PC pura exhiben un potencial ζ en un amplio rango de fuerzas iónicas³. En la mayoría de las soluciones electrolíticas el potencial ζ de PC tiende a ser negativo debido a la presencia de una capa de aniones adsorbida a los dipolos originados en las cabezas polares zwitteriónicas. El potencial ζ es sensible a las transiciones de fase de los lípidos, a la adsorción de anfífilos y proteínas, a la estabilización estérica con PEG no cargado y a las modificaciones de la superficie, de manera general. Por consiguiente, es un parámetro muy útil para monitorear la estabilidad de las vesículas liposomales y para verificar la reproducibilidad de diferentes lotes de una misma preparación.

La estabilidad química de los lípidos durante el almacenamiento es otro aspecto que requiere atención, especialmente lo relacionado con la hidrólisis y, en el caso de las cadenas lipídicas insaturadas, los procesos oxidativos que estas estructuras pueden experimentar⁷. Los liposomas pueden ser almacenados ya bien sea congelados en suspensión o liofilizados, pero es esencial re-evaluar su distribución de tamaño, morfología y cantidad de soluto encapsulado antes de su uso. La adición de crioprotectores, tales como la trealosa, es recomendable para evitar transiciones de fase y fusión de membranas¹³.

Para la caracterización de la identidad de los lípidos, pureza y concentración, la espectrometría de masa MALDI-TOF ofrece ventajas en comparación con los métodos cromatográficos convencionales, como las cromatografías en placa fina, líquida y gaseosa²⁵. La cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC) también se emplea con frecuencia en el análisis químico de las mezclas lipídicas liposomales después de su almacenamiento o simplemente como control de calidad

de las preparaciones.

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) se emplea para determinar la temperatura de inicio de la fusión de las cadenas lipídicas y otras transiciones de fase⁷, y el área bajo la curva (es decir, la entalpía, H) es representativa de la cooperatividad del proceso. Dado que la temperatura de transición es sensible a la presencia de aditivos en la bicapa, este es un parámetro recomendado para monitorear interacciones droga-lípidos y para detectar impurezas y productos de hidrólisis.

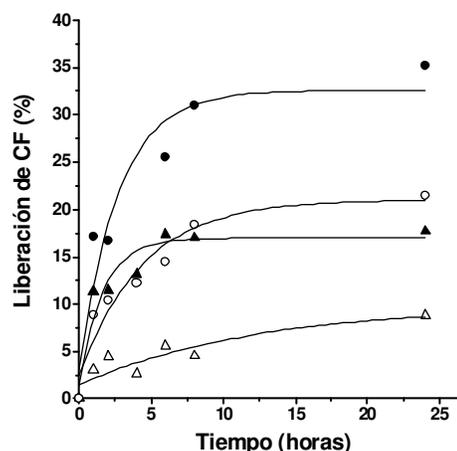


Figura 3. Liberación de CF de liposomas DRV, con y sin EGFhr encapsulado, en presencia de plasma sanguíneo o PBS a 37°C. La CF fue encapsulada en DRV de ePC:Ch en presencia o ausencia de EGFhr. Los liposomas se incubaron con plasma sanguíneo o PBS a una relación de volumen 1:5 (liposoma: plasma/PBS) con el propósito de evaluar la interacción del polipéptido con la bicapa lipídica a partir de la integridad de las vesículas. Se tomaron alícuotas a diferentes intervalos de tiempo durante 24 horas para las medidas de fluorescencia. (●)EGFhr+CF+Plasma, (○)EGFhr+CF+PBS, (▲) CF+Plasma, (△) CF+PBS.

La calorimetría de titulación de alta sensibilidad puede aportar, además, parámetros termodinámicos exactos del reparto de una molécula en la membrana. En nuestro grupo, con el empleo de este procedimiento, se observó una disminución significativa del ΔH de la transición de fase en membranas liposomales de DPPC y DSPC que contenían EGFhr sin afectación de la temperatura de transición¹⁰. Estos resultados reforzaron la idea de una interacción selectiva del EGFhr con los lípidos liposomales, provocando probablemente la separación de los grupos polares en la zona interfacial de la bicapa y una disminución de las interacciones electrostáticas entre los grupos fosforilcolina de las moléculas fosfolipídicas adyacentes. Estos resultados y los presentados en la Figura 3 permitieron explicar las causas de la disminución de la eficiencia de retención de los liposomas que contenían EGFhr bajo las condiciones de almacenamiento ensayadas¹⁰.

Las espectroscopías de resonancia magnética nuclear (RMN) y de resonancia paramagnética electrónica (EPR)

son herramientas potentes para examinar las características estructurales y de movimientos locales en las bicapas lipídicas. Estos métodos brindan información no sólo de la morfología de los lípidos, sino también de los detalles de la arquitectura local³. La señal de RMN-³¹P (estado sólido) permite identificar la presencia de fases lamelares, hexagonales y micelares/cúbicas. El orden y movilidad local de segmentos moleculares individuales pueden ser estudiados con la incorporación selectiva de deuterio para el análisis por RMN-²H o con el marcaje con el radical nitróxido mediante EPR. Las características de los espectros de RMN-²H de las cadenas *acilas* de los lípidos son útiles para distinguir las fases gel y fluida y el estado líquido-ordenado. Por otra parte, el análisis de las cabezas polares lipídicas deuteradas ha mostrado que el alineamiento de sus momentos dipolares refleja con elevada sensibilidad la asociación de moléculas cargadas y de agua con la superficie de la membrana. De manera similar, la penetración y localización de moléculas hidrofóbicas, así como también la conformación, orientación y perturbación local de un péptido anfifílico y una proteína transmembrana pueden describirse en detalles mediante RMN del estado sólido³.

4 Entrega de moléculas a las células mediante liposomas: función como inmunoadyuvantes

Los mecanismos mediante los cuales los liposomas se desintegran y liberan su contenido, una vez que interactúan con la superficie de las células, son aún especulativos. Las moléculas pueden simplemente escapar de los liposomas y atravesar la membrana plasmática por difusión o formación de poros. De manera alternativa, estas vesículas pueden fusionarse con la membrana plasmática o pueden ser tomadas por las células mediante endocitosis o fagocitosis. En estos dos últimos eventos los liposomas pueden experimentar degradación en el entorno relativamente ácido del endosoma o fagosoma, o pudieran fusionarse directamente con la membrana endosomal o lisosomal³.

La ruta del procesamiento intracelular de los liposomas es relevante para el diseño de sistemas de liberación de moléculas a las células tales como: drogas, antígenos, ADN, oligonucleótidos antisentido (*antisense*), etc. *In vitro*, los liposomas convencionales son capaces de liberar proteínas en los compartimentos endosomales-lisosomales. De manera que, para el caso de los antígenos, las vesículas liposomales favorecen el procesamiento de estas moléculas en el interior de las células presentadoras de antígenos profesionales (APC), y la presentación de los péptidos inmunodominantes derivados de ellas, en las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase II (MHC II)²⁶, induciendo una respuesta inmune preferentemente humoral (anticuerpos). Las ventajas fundamentales de los liposomas como inmunoadyuvantes se resumen en: (i) la capacidad de mimetizar patógenos al transportar grandes cantidades de

antígenos a las APC, (ii) la posibilidad de co-encapsular antígenos junto con moléculas inmunoestimuladoras, (iii) la flexibilidad en cuanto a la modificación de sus propiedades físico-químicas con el propósito de una mayor efectividad, y (iv) el hecho de ser biodegradables y no tóxicas²⁷.

Un estudio realizado con preparaciones liposomales DRV que encapsulan el EGFhr conjugado o no a P64k, proteína con función *carrier*, demostraron la eficiencia de estas partículas liposomales para inducir en ratones una respuesta de anticuerpos anti-EGFhr (IgG), cuantitativa y cualitativamente superior, en comparación con el único adyuvante actualmente aceptado para uso en humanos, Al(OH)₃^{28,29}. Además, en los animales que recibieron DRV/EGFhr se observó una mayor sobrevida al ser retados con células del tumor ascítico de Ehrlich, en relación a los animales que recibieron Al(OH)₃/EGFhr, lo que sugiere la funcionalidad de la respuesta humoral inducida por estas partículas³⁰.

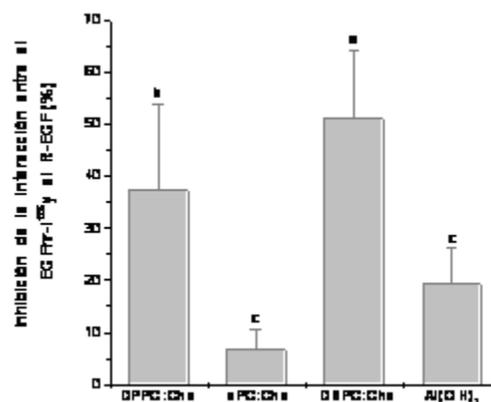


Figura 4. Inhibición de la interacción entre el EGFhr y su receptor por el suero de los animales inmunizados con EGFhr-P64k encapsulado en DRV o adsorbido en Al(OH)₃. La ordenada representa el porcentaje de inhibición de la interacción EGFhr/ R-EGF, derivado de los anticuerpos anti-EGFhr presentes en el suero de los animales inmunizados. Como fuente de receptores se utilizaron membranas de placenta humana. Ratones NMRI se inmunizaron a los 0 y 28 días por vía intramuscular, con 10 µg de EGFhr conjugado a P64k encapsulado en DRV o adsorbido en Al(OH)₃. Para el ensayo se extrajo el suero de los animales (n = 7) a los 90 días (dilución 1:5). Como control y para el cálculo del porcentaje de inhibición se utilizaron sueros de animales no inmunizados y un exceso de EGFhr no radiactivo (control de máximo bloqueo o inhibición de la interacción EGFhr¹²⁵/R-EGF). Letras desiguales indican diferencias significativas, según la prueba de Rangos Múltiples de Duncan ($p < 0.05$)^{10,30}.

En el estudio de la posible función de los lípidos liposomales como inmunomoduladores de la respuesta de anticuerpos anti-EGFhr, se demostró que los DRV constituidos por PC saturadas y Ch fueron más eficientes que los liposomas de PC insaturada y Ch, no sólo en términos de los títulos de anticuerpos, sino también en la capacidad de estos anticuerpos de inhibir la interacción del EGFhr con su receptor (Figura 4)^{10,30}. La importancia del

Ch, lípido de relativa abundancia en el reino animal, para la función inmunoadyuvante de los liposomas fue evidente al observar que la respuesta inmune humoral contra alérgenos del ácaro *Dermatophagoide siboney* resultaba favorecida hacia un patrón de respuesta de tipo no alérgico con preparaciones liposomales de DPPC conteniendo Ch³⁰. Las explicaciones mecanísticas de estos resultados experimentales son aún muy especulativas.

Un reto en el campo de la vacunología es el diseño de sistemas de liberación de antígenos a las APC que induzcan o potencien una respuesta inmune celular mediada por linfocitos T citotóxicos (CTL) específica a antígenos, con relevancia para la prevención y tratamiento de enfermedades inducidas por patógenos intracelulares y células tumorales. Para la inducción de una respuesta CTL se requiere que el antígeno sea procesado y presentado por las APC vía las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I (MHC I). Esto, en buena medida, condiciona que el antígeno tenga acceso al citosol de las APC. Las vesículas liposomales, al ser endocitadas por las APC, pueden mediar la presentación de antígenos por MHC I, pero no siempre de manera eficiente. Con la intención de hacer más eficiente esta función se han diseñado liposomas sensibles al pH ácido endosomal³¹. Algunas toxinas formadoras de poro de origen bacteriano, encapsuladas en liposomas, han sido también usadas para el diseño de sistemas de liberación de antígenos al citosol celular con el propósito de potenciar la respuesta CTL³².

Nuestro grupo ha purificado y estudiado extensivamente dos isotoxinas proteicas producidas por la anémona marina *Stichodactyla helianthus*, Sticholysinas I y II (St I y St II), las cuales son proteínas que forman poros en las membranas y carecen del aminoácido *cisteína*³³⁻³⁶. Atendiendo a la homología funcional con las toxinas formadoras de poros de origen bacteriano, fue posible presuponer que ellas exhibieran la capacidad de modular la respuesta inmune mediada por CTL. *In vivo*, vesículas liposomales de DPPC y Ch, que co-encapsulaban St y ovoalbúmina (OVA) como antígeno modelo, fueron capaces de potenciar, aún más, la respuesta CTL específica al antígeno en ratones, en comparación con las preparaciones liposomales que sólo contenían el antígeno. St IW11C, una variante mutante de StI en la cual el aminoácido Trp¹¹¹ ha sido re-emplazado por el aminoácido Cys, es capaz de formar un dímero reversiblemente inactivo, estabilizado por enlaces disulfuro. Esta Sticholysina mutada indujo también una potente respuesta inmune CTL contra OVA cuando se administró co-encapsulada con el antígeno. De hecho, la preparación Liposoma/St+OVA confirió protección, en un escenario preventivo, a ratones retados con células tumorales que expresan OVA (resultados no publicados). Estas propiedades inmunomoduladoras de Sts, encapsuladas en liposomas, probablemente se asocien con su estructura molecular particular y propiedades membranotrópicas.

Referencias

1. A. Bangham, "A correlation between surface charge and coagulant action of phospholipids. *Nature*, 23, 1197-1198 (1961)
2. A. Bangham, "Membrane models with phospholipids". *Prog Biophys Mol Biol*. 18, 29-95 (1968)
3. A. S. Ulrich, "Biophysical Aspects of Using Liposomes as Delivery Vehicles," *Bioscience Reports*, 22, 129-150 (2002)
4. D. D. Lasic, "Liposomes in Gene Delivery," (CRC Press, Boca Raton, 1997)
5. O. G. Mouritsen and K. Jorgensen, "A new look at lipid-membrane structure in relation to drug research," *Pharm. Res.* 15, 1507-1519 (1998)
6. I. M Hafez. and P. R. Cullis, "Roles of lipid polymorphism in intracellular delivery," *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47,139-148 (2001)
7. R. New, "Liposomes—A Practical Approach," edited by B. D. H. D. Rickwood, Vol. 58 (IRL Press at Oxford University Press, 1994)
8. F. Frezard, "Liposomes: from biophysics to the design of peptide vaccines," *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32,181-189. (1999)
9. C. Kirby and G. Gregoriadis, "Dehydration-rehydration vesicles: a simple method for high yield drug entrapment in liposomes," *Biotechnology* 2, 979-984 (1984)
10. M. E. Lanio, M. C. Luzardo, C. Alvarez, Y. Martínez, L. Calderón, M. E. Alonso, B. Zadi, G. Gregoriadis, D. Q. Craig, A. Disalvo, "Humoral immune response against epidermal growth factor encapsulated in dehydration rehydration vesicles of different phospholipid composition," *J Liposome Res.* 18, 1-19 (2008)
11. G. Gregoriadis, "Liposomes as immunoadjuvants and vaccine carriers: antigen entrapment". *Immunomethods* 4, 210-216 (1994)
12. M. Ollivon, S. Lesieur, C. Grabielle-Madelmont, M. Paternostre, "Vesicle reconstitution from lipid-detergent mixed micelles". *Biochim. Biophys. Acta.* 1508, 34-50 (2000)
13. E. C. A. Winden, N. J. Zuidam, D. J. A. Crommelin, "Strategies for large scale production and optimized stability of pharmaceutical liposomes developed for parenteral use". In: *Medical Applications of Liposomes*, edited by D. D. Lasic and D. Papahadjopoulos (Elsevier Science, 1998)
14. F. M. Goni. and A. Alonso, "Spectroscopic techniques in the study of membrane solubilization, reconstitution, and permeabilization by detergents". *Biochim. Biophys. Acta.* 1508, 51-68 (2000)
15. N. Smyth Templeton and D. D. Lasic, "New directions in liposome gene delivery", *Mol. Biotechnol.* 11, 175-80 (1999).
16. A. J. Jin, D. Huster, K. Gawrisch, R. Nossal, "Light scattering characterization of extruded lipid vesicles", *Eur. Biophys. J.* 28, 187-199 (1999)
17. H. W. Meyer and W. Richter, "Freeze-fracture studies on lipids and membranes", *Micron.* 32, 615-44 (2001)
18. H. W. Meyer, M. Westermann, M. Stumpf, W. Richter, A. S. Ulrich, C. Hoischen, "Minimal radius of curvature of lipid bilayers in the gel phase state correspond to the dimension of biomembrane structures "caveolae". *J. Struct. Biol.* 124, 77-87 (1998)
19. A. S. Ulrich, W. Tichelaar, G. Förster, O. Zschörnig, S. Weinkauff, H.W. Meyer, "Ultrastructural characterization of peptide-induce membrane fusion and peptide self-assembly in the lipid bilayer", *Biophys. J.* 77, 829-841 (1999)
20. H. Chung, T.W. Kim, M. Kwon, I.C. Kwon, S. Y.

- Jeong, "Oil components modulate physical characteristics and function of the natural oil emulsions as drug or gene delivery system". *J. Control Release* 71, 339–350 (2001)
21. M. N. Jones, "The surface properties of phospholipid liposome systems and their characterisation", *Adv. Colloid Interface Sci.* 54, 93–128 (1995)
 22. M. C. Luzardo, Y. Martínez, L. Calderón, C. Álvarez, M. E. Alonso, E. A. Disalvo, M. E. Lanio, "Características de la encapsulación de EGF, P64k y el conjugado de ambas proteínas en liposomas obtenidos mediante congelación-descongelación". *Biotechn. Apl.* 19, 147-152 (2002)
 23. M. C. Luzardo, F. Amalfa, A. M. Núñez, S. Díaz, A. C. Biondi de López, E. A. Disalvo, "Effect of Trehalose and Sucrose on the Hydration and Dipole Potential of Lipid Bilayers". *Biophys J.* 78, 2452-2458 (2000)
 24. S. P. Radko and A. Chrambach, "Capillary electrophoresis of subcellular-sized particles", *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 722, 1–10 (1999)
 25. B. Hutchins, "Characterization of plasmids and formulations for non-viral gene therapy". *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2, 131–135 (2000)
 26. L. Leserman and N. Barois, "Major histocompatibility complex class II molecules, liposomes and antigen presentation". In: *Medical Applications of Liposomes*, edited by D. D. Lasic and D. Papahadjopoulos (Elsevier Sciences, 1998)
 27. L. Leserman "Liposomes as Protein Carriers in Immunology". *Journal of Liposome Research* 14, 175–189 (2004)
 28. Y. Martínez, M. C. Luzardo, L. Calderón, I. F. Pazos, C. Álvarez, M. E. Alonso, M. E. Lanio, "Liposomas: Efecto Potenciador sobre la Respuesta Inmune Anti-hrEGF". *Biotechn. Apl.* 20, 95-101 (2003)
 29. M. C. Luzardo, Y. Martínez, L. Calderón, M. E. Lanio, M. E. Alonso, "Anticuerpos IgG1, IgG2a e IgG2b y respuesta de hipersensibilidad retardada (HR) en ratones NMRI inmunizados con EGFhr conjugado o no a P64k y encapsulado en liposomas". *Revista Biología* 17, 143-148 (2003)
 30. M. C. Luzardo, L. Calderón, Y. Martínez, A. Labrada, E. Facenda, C. M. Álvarez, I. P. Pazos, J. de León, M. E. Alonso, M. E. Lanio, "Lípidos liposomales como inmunoadyuvantes del factor de crecimiento epidérmico humano recombinante y de los alérgenos principales del ácaro *Dermatophagoide si-boney*". *Biotechn. Apl.* 23 (4), 330-336 (2006)
 31. M. Rao and C. R. Alving, "Class I presentation of liposomal antigens". In: *Medical Applications of Liposomes* edited by D. D. Lasic and D. Papahadjopoulos (Elsevier Sciences, 1998)
 32. G. Dietrich, J. Hess, I. Gentschev, B. Knapp, S. H. E. Kaufmann, W. Goebel, "From evil to good: a cytolytic in vaccine development". *Trends Microbiol.* 9 (1), 23-28 (2001)
 33. M. E. Lanio, V. Morera, C. Alvarez, M. Tejuca, T. Gomez, F. Pazos, V. Besada, D. Martinez, V. Huerta, G. Padron, M. A. Chavez, "Purification and characterization of two hemolysins from *S. helianthus*". *Toxicon* 39, 187-194 (2001)
 34. D. Martínez, A. M. Campos, F. Pazos, C. Álvarez, M. E. Lanio, F. Casallanovo, S. Schreier, R.K. Salinas, C. Vergara, E. Lissi, "Properties of St I and St II, two isotoxins isolated from *S. helianthus*: a comparison", *Toxicon* 39, 1547-1560 (2001)
 35. M. Tejuca, M. Dalla-Serra, M. Ferreras, M. E. Lanio, G. Menestrina, "The mechanism of membrane permeabilization by Sticholysin I, a cytolytic isolates from the venom of the sea anemone *Stichodactyla helianthus*", *Biochemistry* 35, 14947-14957 (1996)
 36. C. Alvarez Valcarcel, M. Dalla Serra, C. Potrich, I. Bernhart, M. Tejuca, D. Martinez, F. Pazos, M. E. Lanio, G. Menestrina, "Effects of Lipid Composition on Membrane Permeabilization by Sticholysin I and II, Two Cytolysins of the Sea Anemone *Stichodactyla helianthus*". *Biophys J.* 80, 2761–2774 (2001).