

INTRODUCCIÓN

I.1 Introducción

Los fosfolípidos son componentes funcionalmente activos de las membranas biológicas y se encuentran involucrados en las propiedades de las mismas. Se dice que existen más de cien tipos de moléculas de lípidos en una membrana biológica, las cuales a su vez difieren en la composición del ácido graso y de los sustituyentes localizados la cabeza de la molécula, además el contenido de fosfolípido varía de órgano a órgano y de especie a especie. Los fosfolípidos naturales se obtienen de la soya, cerebro de ganado vacuno, etc., y en una solución acuosa forman una estructura cerrada conocida como liposoma.

Los liposomas son estructuras cerradas formadas de una o varias bicapas de lípidos los cuales encapsulan un volumen pequeño del medio en el cual han sido preparados. Su morfología les permite encapsular compuestos solubles en agua en su volumen interno. Por otro lado ya que el modo de preparación de liposomas es sencillo, poseen la habilidad de reproducir la organización y las funciones principales de las células y presentan una similitud con bicapas biológicas. Los liposomas son ampliamente utilizados como modelos de membranas biológicas, por lo que se han convertido en modelos interesantes para llevar a cabo estudios de mecanismo molecular en los seres vivos.

Además los liposomas son los transportadores más eficaces para introducir en las células medicamentos, con un amplio campo de aplicación. Entre algunas de sus aplicaciones tenemos:

- Transportadores para liberación de medicamento
- Liberación controlada de medicamento frente a infecciones de tipo sistémico
- Dirigir inmunomoduladores a las células del sistema inmunitario

- Reducir los efectos secundarios de algunos medicamentos
- Sustitutivos de células en sangre
- Métodos de diagnóstico

El uso como transportador tiene la ventaja de que se puede programar de forma que el medicamento se pueda liberar durante largo tiempo. Tiene una tendencia natural a ligarse a células y tejidos, permite lograr la máxima eficacia terapéutica y reducir los efectos secundarios no deseados.

Químicamente son similares a células que circulan en la sangre con las que son compatibles. Los liposomas conjugados con anticuerpos se unen a células diana con más facilidad que las formas solubles de los anticuerpos. Son un método útil de protección de productos hábiles, no sufren degradación y actúan eficazmente.

El interés de estudio de los liposomas se encuentra en distintos campos, tales como la física, fisicoquímica, farmacología, cosmetología, alimentos, biofísica, bioquímica, entre otros; surgiendo de aquí la necesidad prioritaria de su análisis.

El siguiente trabajo fue realizado con fines de obtener liposomas (vesículas de fosfolípidos) a partir de SOPS (1-Stearoyl-2-oleoyl phosphatidylserine) para observar la influencia de iones monovalentes y divalentes, y de un polielectrolito, con respecto a la forma y tamaño de los liposomas formados. Además de estudiar las características de población de los agregados en función de la concentración de solución salina (NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂), y de la concentración de la solución polimérica (PAH y PSS).

I.2 Objetivos

I.2.1 Objetivo General

Estudiar la influencia de sales mono y divalentes y de una macromolécula sobre vesículas formadas a partir de SOPS.

I.2.2 Objetivos Particulares

Preparar liposomas de SOPS mediante el método de deshidratación-rehidratación y Sonicación.

Estudiar la influencia de varios parámetros como concentración y tipo de sales, polielectrolitos y el efecto de agitación en liposomas de SOPS.

Determinar el tamaño y forma de liposomas de SOPS en un medio con sales monovalentes (KCl, NaCl) y divalentes (CaCl_2 , MgCl_2) mediante las técnicas de Microscopía Óptica y Dispersión Dinámica de la luz.

Determinar el tamaño y forma de liposomas de SOPS cuando se introduce un polielectrolito en el medio acuoso que rodea al liposoma mediante las técnicas de Microscopía Óptica, Dispersión Dinámica de luz y Microscopía Electrónica de Criofractura.

I.3 Justificación

La preparación de liposomas se ha realizado por diferentes métodos como extrusión, electroformación, hidratación, etc. y cada uno de los métodos lleva a obtener liposomas de diferente tamaño y polidispersión de modo que no existe un método único con el que se obtengan liposomas únicos en tamaño y forma. Por otra parte, algunos factores como el pH, temperatura y sales en del solvente llevan a que los liposomas interactúen entre si lo que permite la agregación-fusión. En particular, es bien conocido que el Ca^{+2} está involucrado en muchos fenómenos de fusión de membranas biológicas, ya que existen numerosos trabajos de investigación dedicados a este estudio, [McIntosh, T., 1992].

Así, es importante estudiar la influencia de sales divalentes en la estructura y forma de vesículas de SOPS y la posible agregación-fusión entre ellas y compararlas con la influencia de sales monovalentes. Por otro lado, es necesario buscar un medio con un contraste óptico adecuado si se realizan experimentos de Microscopía Óptica. El trabajo de tesis contempla realizar este tipo de experimentos. Así que la influencia de sales mono y divalentes se hará en un medio con una proporción sacarosa/glucosa óptima para tener un buen contraste óptico.

De la misma manera que se ha estudiado la influencia de sales en liposomas de fosfolípidos, en la literatura científica encontramos muchos estudios de la interacción de liposomas con macromoléculas como polímeros, proteínas y coloides. Las proteínas han sido utilizadas desde décadas por ser componentes fundamentales de los seres vivos ya que regulan muchísimas de sus funciones. Los péptidos han sido utilizados de igual forma para estudiar la difusión sobre y a través de las membranas de liposomas como es el caso de los péptidos CPP (cell penetrating peptides) y los péptidos WALP (Tryptophan (W) - Alanine (A) - Leucine (L) - Peptides), [Yeagle, P., 2005].

Por otra parte los polielectrolitos, tienen implicaciones fuertes en biología molecular y en la célula. En su relación con los liposomas, los polielectrolitos han sido usados para funcionalizar liposomas de modo que estos puedan ser estabilizados y usados como vectores de medicamentos. En teoría, el polielectrolito funcionará cubriendo con varias capas el liposoma y serán menos sensitivos a parámetros externos como la presión osmótica y la temperatura. Ahora bien, puesto que un polielectrolito tenderá a desplegarse en el medio acuoso, la adición de sales apantallará las interacciones electrostáticas de los iones del polielectrolito y permitirán que su configuración cambie a una forma de “pelota estadística”, [Yeagle, P., 2005].

En este trabajo se estudia la interacción de polielectrolitos, como el PAH (Poly(Allylamine Hydrochloride)), que ha sido utilizado en varios sistemas con fosfolípidos y en combinación con polielectrolitos aniónicos como el PSS (Poly(Styrene-Sulfonate)), para cubrir liposomas con capas alternas que puedan estabilizarlas y protegerlas. Pocos estudios se han realizado con SOPS y estos polielectrolitos para estudiar la interacción fosfolípido-macromolécula de modo que este fosfolípido aniónico lo consideramos para realizar nuestro estudio. De igual forma, en el laboratorio de Biofísica y Fluidos Complejos del Departamento de Física de la Universidad de Sonora se tienen estudios previos de liposomas formados con mezclas utilizando este fosfolípido, lo cual nos sirve como base de comparación,[López-Oyama, A. 2006] .

La justificación del presente trabajo de tesis se fundamenta en base a los siguientes puntos: 1) se estudia la influencia de sales en la estructura y forma de los liposomas, 2) se estudia la influencia del polielectrolito sin sales añadidas, 3) se estudia el efecto combinado de las condiciones con sales y polielectrolitos para tener caracterizado el proceso y posibles interacciones liposoma-polielectrolito. Lo anterior representa una base para estudios posteriores que nos lleven al encapsulamiento de macromoléculas biológicas como proteínas o péptidos que puedan liberarse en el interior de la célula. Cada proceso debe ser bien definido y

los parámetros físico-químicos controlados. La temperatura, concentración de sales, concentración de moléculas, proporción glucosa/sacarosa para tener un contraste óptico óptimo para realizar los estudios de Microscopía Óptica, método de preparación, tiempo de sonicación, etc. deben ser bien medidos y determinados de forma que el proceso completo hasta llegar al estudio de la interacción fosfolípido-macromolécula quede estructurado. Pensamos que un estudio como el presente donde se utilizan las técnicas experimentales de Microscopía Óptica, Dispersión Dinámica de la Luz y Microscopía Electrónica de Criofractura contribuirá a una formación básica del estudiante para futuros trabajos de investigación a nivel posgrado.