



# **Universidad de Chile**

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas  
Departamento de Química Orgánica y Físico Química

## **Efecto de la adición de 6-O-Miristil Sacarosa sobre la bicapa de liposomas de POPC y vesículas de DODAC.**

Profesor Patrocinante:

Dr. Germán Günther S.

Directores:

Dra. Susana Sánchez D.  
Dr. Germán Günther S.

**Memoria para optar al Título de Químico  
CLAUDIA ANDREA TORO VERGARA**

**Santiago de Chile  
2006**

***A mi mami,  
por su amor, paciencia y esfuerzo.***

***A mi hermana,  
por ser mi ejemplo.***

## AGRADECIMIENTOS

Al proyecto Fondecyt 1040573 por el financiamiento de este trabajo.

A los Profes Antonio y Else, por su colaboración y consejos.

A la Profe Susana Sánchez, por su ayuda, sus consejos y su increíble disposición para que mi estadía en Yanquilandia fuera lo menos traumática posible. La Alumna se lo agradecerá siempre.

A mi Vieji querido, te agradezco las miles de horas de entrega y cariño, de bromas odiosas, de esfuerzo por intentar comprender cómo funciona mi cabeza, y de paciencia por soportar que te llamara con todos los apelativos del mundo, menos con los que debería dirigirme hacia un profesor. Te agradezco por enseñarme que el respeto no se basa en logros ni en títulos ni en protocolos, sino que en actitudes. Pero por sobre todas las cosas, te agradezco que hayas sido mi guía. Gracias por confiar en mí (aunque ni tú te lo expliques) y dedicar parte de tu tiempo no sólo a este trabajo, sino a enseñarme sobre la vida, y créeme que si tuviera que decidir nuevamente (a pesar de todos los golpes recibidos) te volvería a elegir.

A mis compañeros de camino, especialmente a Iván, Yoyi, Nati, Poli, Eve. Gracias por las risas y los regalones, las maratones en la biblioteca, las tardes de pasto (aunque escasas en estos últimos años), los Tabos, los happy hours y soportarme en las Jornadas. Por compartir los mismos intereses que nos permitieron crear una historia común tan simple y bonita, que seguro forma parte de lo que soy ahora.

A la Carola que ha estado conmigo desde que tengo memoria. No hay una sola palabra que represente todo lo que tú representas. A la Pata, por quedarse con mi lugar en Bioquímica, y por convertirse en mi apoyo moral en esta última etapa tan odiosa. A la Lore, por cuidarme, quererme y alimentarme siempre que encuentra la ocasión. Gracias por ser la persona más hermosa, fiel y cariñosa que he conocido.

A la Nancy, por su cariño, amistad y consejos y por ayudarme a soportar a este Tatita cuando le vienen los cinco minutos. A los chiquillos del lab, Javierito, Rafa, Manolito y Pobletito, por las tardes de ocio, las chelas, las bromas y hasta por las loqueras. Gracias por hacer del lab un lugar tan especial.

A todos aquellos que de una u otra manera hicieron más llevadera esta eterna etapa. A mi familia por no preguntar “¿Cuánto te falta?”, haciendo que sólo mi conciencia me presionara a terminar esta tesis de una buena vez.

## INDICE

INDICE .....	i
RESUMEN .....	iii
SUMMARY .....	v
INDICE DE FIGURAS .....	vii
1 INTRODUCCIÓN .....	1
2. MATERIALES .....	9
2.1 Reactivos.....	9
2.2 Instrumentación .....	9
3. METODOLOGIAS .....	11
3.1 Preparación de vesículas (liposomas).....	11
3.1.1 Preparación de Vesículas Unilamelares Pequeñas. Método de Ultrasonicación.....	11
3.1.2 Preparación de Vesículas Unilamelares Gigantes. Método de Electroformación. ....	12
3.1.3 Preparación de Vesículas Multilamelares. ....	14
3.1.4 Obtención de vesículas por Extrusión.....	15
3.2 Determinación de propiedades físicas de la membrana. ....	16
3.2.1. Laurdan y polarización generalizada.....	16
3.2.2. Espectroscopía de Fluorescencia .....	18
3.2.3. Microscopía de Fluorescencia Bifotónica.....	19
3.3 Determinación de constantes de velocidad para la extracción de colesterol desde bicapas. ....	21
3.4 Solubilización de liposomas. Determinación de constantes de reparto K y razón efectiva Re.....	23
3.5 Aplicación a un modelo real. Solubilización de eritrocitos con Monomiristil Sacarosa seguida por Microscopía de Fluorescencia Bifotónica. ....	25
4. RESULTADOS Y DISCUSION.....	27
4.1 Caracterización de los sistemas lipídicos. Efecto del radio de curvatura.....	27
4.1.1 Comportamiento de la bicapas de POPC y DODAC frente a la presencia colesterol. ....	29

4.1.2 Comportamiento de las bicapas DODAC-Colesterol y POPC-Colesterol frente a la presencia de éster de sacarosa.....	34
4.2 Cinéticas de extracción de colesterol desde bicapas.....	38
4.3 Solubilización de liposomas. ....	46
4.4 Solubilización de eritrocitos. ....	55
5. CONCLUSIONES .....	59
6. BIBLIOGRAFIA .....	61

## RESUMEN

En la industria de los surfactantes es cada vez mayor el interés en la producción y aplicación de compuestos derivados de fuentes renovables, entre los cuales se pueden destacar los ésteres de sacarosa. Estos surfactantes son compuestos biodegradables de baja toxicidad, no sensibilizantes, no alergénicos, adecuados como emulsificantes, emolientes y humectantes. La utilización de diferentes tipos de surfactantes en la extracción de lípidos o como agentes solubilizantes de membranas lipídicas, involucra también el empleo de liposomas como modelos de membrana. En este contexto, es de especial relevancia conocer cómo interactúan los ésteres de sacarosa con la bicapa de vesículas o liposomas.

Los liposomas o vesículas son agregados coloidales formados por una o más bicapas cerradas que incluyen en su interior una pequeña fracción del medio acuoso en el que se encuentran dispersos. Debido a sus características morfológicas y estructurales, los liposomas son utilizados comúnmente como modelos de membrana celular. Por esta razón, la obtención de sistemas que simulen el medio biológico involucra la síntesis de membranas compuestas por mezclas de fosfolípidos y colesterol. Los esteroides son esenciales a nivel regulatorio y estructural en la organización lateral de las membranas celulares. Su presencia afecta de manera importante las propiedades físicas de membranas sintéticas, observándose comportamientos que han sido asociados a la existencia de microdominios en las membranas celulares.

En este trabajo se estudiaron las interacciones entre un éster de sacarosa, surfactante no iónico, y liposomas de distinto tamaño, origen y diferente actividad superficial: 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina, POPC, de origen natural y carácter zwitteriónico y cloruro de dioctadecildimetilamonio, DODAC, molécula anfipática de origen sintético y carga positiva. El éster de sacarosa seleccionado fue el  $\beta$ -D-fructofuranosil-6-O-miristil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (MMS), monoéster de sacarosa derivado del ácido mirístico. Todos los sistemas fueron caracterizados en presencia y ausencia de diferentes proporciones de colesterol. Además, se realizaron estudios cinéticos de extracción de colesterol desde membranas para conocer como la presencia del éster de sacarosa afecta la estructuración y permeabilidad de la bicapa.

También se estudió el proceso de solubilización de los distintos sistemas para evaluar el efecto de la presencia de colesterol sobre los fenómenos de saturación y solubilización de la vesícula por el éster de sacarosa seleccionado. Finalmente, se siguió el proceso de solubilización en modelos reales utilizando eritrocitos humanos.

Los liposomas fueron preparados utilizando técnicas de electroformación, ultrasonificación y extrusión. Para la determinación de las propiedades físicas de la membrana se emplearon metodologías de emisión convencional y de microscopía multifotónica, utilizando como sonda fluorescente el 6-dodecanoil-2-dimetilaminonaftaleno, Laurdan, molécula sensible a los cambios de polaridad de su microentorno, por lo que permite caracterizar bicapas de sistemas microcompartimentalizados.

Los resultados obtenidos permitieron descartar la influencia del radio de curvatura sobre las variaciones en la fluidez de la membrana, en las condiciones de temperatura y composición estudiadas. La presencia de colesterol en los sistemas de trabajo mostró el comportamiento esperado, rigidizando la membrana tanto en el estado líquido-cristalino como en el estado gel.

En la mayor parte de las experiencias realizadas, la adición de miristil sacarosa permitió observar efectos diferentes en cada uno de los sistemas estudiados, liposomas de POPC y vesículas de DODAC. Como consecuencia, es posible inferir una ubicación distinta de la sacarosa en la interfase, que dependería fundamentalmente del tamaño de la cabeza de la molécula anfipática que conforma el microagregado.

## SUMMARY

### 6-O-MIRYSTIL SUCROSE ADDITION EFFECT ON BILAYERS OF POPC LIPOSOMES AND DODAC VESICLES.

A great interest in the production and application of compounds derived from natural resources has been shown by the industry of surfactants, among them sucrose esters are outstanding. These are biodegradable compounds of low toxicity, no sensitizing, hypoallergenic and very good as emulsifiers, emollients and humectants. One of the most interesting applications of these compounds is its use in lipid extraction or as solubilizing agents of lipidic membranes. In this field, liposomes are commonly used as a comprehensive tool of many biological mechanisms, as consequence, is necessary to understand the interactions of these kind of surfactants with different bilayers.

Liposomes or vesicles are colloidal aggregates conformed by one or more concentric bilayers that enclose part of the aqueous medium where they are dispersed. Due to their structural characteristics, the liposomes are commonly used mimicking cellular membranes. The obtention of systems that mimics the biological medium involve the preparation of membranes composed by mixtures of phospholipids and cholesterol. The sterols presence is essentials at the regulator and structural level in the lateral organization of cellular membranes. Its presence strongly affects the physical properties of synthetic membranes, the experimentally observed behaviors have been associated to the existence of *rafts* in cellular membranes.

In this work, the interactions between a sucrose ester, nonionic surfactant, and liposomes of different size, origin and different superficial properties were studied: 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (POPC) of natural origin and zwitterionic surface, and Dioctadecyldimethylammonium Chloride (DODAC), amphiphilic molecule of synthetic origin and positive charge. The sucrose ester selected was  $\beta$ -D-fructofuranosyl-6-O-miristyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (MMS), sucrose monoester derivate of miristic acid. All systems were characterized in the presence and absence of different proportions of cholesterol. Furthermore, kinetic studies of cholesterol extraction from membranes were made, in order to distinguish the effect of the presence of sucrose ester on the permeability and structure of the bilayer. Also, the



solubilization process of the different systems was studied, with the aim of evaluate the effect of the cholesterol presence on the saturation and solubilization phenomena. Finally, the solubilization process was followed in real models, using human red blood cells.

Liposomes were prepared using electroformation, ultrasonication and extrusion techniques. To determine the physical properties of the membrane, conventional emission and multiphotonic microscopy methodologies were employed, with 6-dodecanoyl-2-dimethylaminonaphtalene (Laurdan) as fluorescent probe, this compound is able to sense changes in the microenvironment, allowing characterize compartmentalized systems.

According obtained results there is no effect of surface curvature and membrane fluidity, at the temperature and composition studied. The cholesterol presence yields the expected results making more rigid the gel and liquid crystalline phases.

Both studied systems (POPC liposomes and DODAC vesicles) behave in different manner in the presence of MMS, so a dissimilar spatial arrangement of sucrose heads can be proposed for each system, being the location in principle function of the lipidic head size.

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Estructura general de los ésteres de sacarosa, ( $R = (CH_2)_nCH_3$ ).....	1
Figura 2	Estructura general de un fosfolípido .....	4
Figura 3	Estructura del colesterol .....	7
Figura 4	Estructura química de las moléculas estudiadas.....	8
Figura 5	Esquema de la cámara de formación de GUV. La ampliación inferior muestra el alambre de Pt después de la formación de vesículas .....	13
Figura 6	Esquematación de la formación de vesículas multilamelares.....	14
Figura 7	Estructura molecular del Laurdan, y su ubicación en la membrana .....	17
Figura 8	Desplazamiento espectroscópico del Laurdan .....	18
Figura 9	Medición de GP en un microscopio de dos canales. La parte superior de la figura muestra como los canales filtran las regiones del azul y el rojo en el espectro del Laurdan. En la parte inferior izquierda se observan las imágenes entregadas por ambos canales y la imagen de GP que entrega el software Sim-FCS. Entre las imágenes de ambos canales puede apreciarse el rango de colores que representa la escala de GP desde el azul (fase líquido cristalina) hasta el rojo (fase gel). La parte inferior derecha muestra el histograma de GP entregado por el software, con la escala de GP en el eje X .....	21
Figura 10	Estructura de la $\beta$ -ciclodextrina (A) y posibles estructuras de la HDL utilizada (B y C) .....	22
Figura 11	(A) Comparación del comportamiento de liposomas de POPC pequeños ( $\bullet$ ), extruidos ( $\circ$ ) y gigantes ( $\Delta$ ) con un 10% mol MMS, a 25°C. (B y C) Comparación entre liposomas de POPC pequeños y gigantes con un 20% mol MMS (B) y un 30% mol MMS (C) a 25°C. $[líp]_{TOT} = 1 \text{ mM}$ .....	29
Figura 12	Diagrama de fases experimental para el sistema DPPC-colesterol .....	31
Figura 13	(A) Curva de calibración para SUV de POPC a 25° C ( $\bullet$ ) y 37° C ( $\circ$ ). (B) Curva de calibración para SUV de DODAC a 25° C ( $\bullet$ ) y 40° C ( $\circ$ ). $[líp]_{TOT} = 1 \text{ mM}$ .....	32
Figura 14	Efecto de la adición de colesterol y MMS sobre $T_m$ de SUV de DODAC a ( $\bullet$ ) 14% mol col, ( $\blacktriangle$ ) 40% mol col y ( $\circ$ ) 14% mol col-20% mol MMS. $[líp]_{TOT} = 1 \text{ mM}$ .....	35

Figura 15	(A) Comportamiento de SUV de POPC en función de concentración de MMS a (●) 0%, (○) ~10%, (▲) ~20%, (Δ) ~30% y (▼) ~45% mol col. (B) Comportamiento de SUV de DODAC en función de la concentración de MMS a (●) 0%, (○) ~5%, (▲) ~15% y (Δ) ~30% mol col. Ambos gráficos a 25° C, [líp] <sub>TOT</sub> = 1mM .....	37
Figura 16	(A). Cinética de salida de colesterol para SUV de POPC, a 37° C seguida a través de espectrofluorescencia. [líp] <sub>TOT</sub> = 0.2 mM, [βCd] = 1 mM. (B). Cinética de salida de colesterol desde GUV de POPC a 37° C seguida mediante microscopía bifotónica. [líp] <sub>TOT</sub> = 5,0 μM, [βCd] = 0.27 mM. Ambos con un ~30% mol de colesterol .....	39
Figura 17	(A). Cinética de extracción de colesterol desde SUV de POPC. [líp] <sub>TOT</sub> = 0.5 mM, [β-Cd] = 6.525 mM, ~30% mol colesterol. (B). Efecto del aumento en la concentración de β-Cd sobre una solución 0.2 mM de POPC con ~30% mol colesterol: (—) 1mM β-Cd, (—) 1.5 mM β-Cd, (—) 2 mM β-Cd y (—) 2.6 mM β-Cd. Ambos experimentos seguidos por espectrofluorescencia a 37° C Desplazamiento espectroscópico del Laurdan.....	41
Figura 18	Cinéticas de salida de colesterol desde GUV de POPC con ~30% mol colesterol, a 37°C, seguidas por microscopía bifotónica. (●) HDL (0.35 μM), (○) β-Cd (0.25 mM) y (▲) <i>m</i> -β-Cd (0.25 mM). [GUV] = 5 μM.....	42
Figura 19	(A). Cinéticas de salida de colesterol desde SUV de POPC con ~30% mol de colesterol, a 37°C, seguidas por espectrofluorescencia. (B). Intensidades a 440 nm (—) y a 490 nm (—) en la misma experiencia.....	45
Figura 20	Cinéticas para SUV de DODAC seguidas por espectrofluorescencia, a 40°C. (A) [DODAC] = 0.25 mM, ~ 30% mol colesterol, [βCd] = 1 mM; (B) [DODAC] = 0.2 mM, ~ 30% mol colesterol, [βCd] = 4.4 mM; (C) [DODAC] = 0.2 mM, ~ 15% mol colesterol, [βCd] = 13.2 mM; (D) dispersión seguida por UV a 40°C, [DODAC] = 0.2 mM, ~ 5% mol colesterol, [βCd] = 13 mM.....	46
Figura 21	(A). Variación de GP en función de la concentración de MMS en SUV de POPC en ausencia de colesterol, seguida por espectrofluorescencia.[POPC] = 0.4 mM, 25°C.(B). Variación de GP en función de la concentración de MMS en SUV de DODAC con ~5% mol colesterol, seguida por espectrofluorescencia. [DODAC] = 0.4 mM, 25°	

C. Los gráficos insertos en la esquina superior corresponden a la variación de GP en función del inverso de la concentración de MMS, en ambos casos.....	47
Figura 22 Solubilización de SUV de POPC seguida por absorción UV a 400 nm, a 25°C. $[\text{Íp}]_T = 0.2 \text{ mM}$ , $[\text{MMS}] = 1.4 \text{ mM}$ . ( — ) 0 %, ( — ) ~10%, ( — ) ~20%, ( — ) ~30% y ( — ) ~45% mol colesterol.....	49
Figura 23 Solubilización de SUV de POPC y DODAC seguida por espectrofluorescencia. $[\text{Íp}]_T = 0.2 \text{ mM}$ , ~30% mol colesterol, 25° C.....	50
Figura 24 Determinación de $\text{Re}^{\text{sat}}$ y $\text{Re}^{\text{sol}}$ para SUV de POPC con ~20% mol colesterol a 25° C, de acuerdo a la Ec. (4). (●) $C_{\text{sat}}^C$ y (○) $C_{\text{Sol}}^C$ .....	51
Figura 25 Razones efectivas surfactante a lípido para saturación superficial $\text{Re}^{\text{ss}}$ (▲), saturación $\text{Re}^{\text{sat}}$ (○) y solubilización $\text{Re}^{\text{sol}}$ (●) de vesículas de DODAC en presencia de MMS, en función de la concentración de colesterol, 25° C.....	53
Figura 26 Imágenes de intensidad (sup.) y GP (inf.) para el proceso de solubilización de SUV de POPC con 1µM de MMS. 25° C.....	54
Figura 27 Efecto estomatocitogénico del MMS sobre eritrocitos humanos, partiendo desde equinocitos y desde discos bicóncavos. Hematocrito final al 0,2%, 37° C.....	57
Figura 28 Valores de GP durante la interacción de eritrocitos (con morfología de equinocito con MMS). Hematocrito al 0,2%, 1µM Lau, 37°C.....	58

## 1 INTRODUCCIÓN

Debido a la creciente necesidad de disminuir el impacto sobre el medio ambiente y la salud, la industria de los surfactantes ha mostrado cada vez mayor interés en la producción y aplicación de compuestos derivados de fuentes renovables. Los surfactantes naturales son, en su mayoría, ésteres de ácidos grasos cuyo grupo polar corresponde a un azúcar o a un aminoácido [1]. Entre los tensoactivos conformados por azúcares, se destacan principalmente los alquilglucósidos y los ésteres de sacarosa. Gracias a sus excepcionales características de biodegradabilidad, baja toxicidad y excelente biocompatibilidad, los ésteres de sacarosa han motivado un creciente interés en los últimos años, pues ofrecen una atractiva alternativa frente a otros surfactantes no iónicos como los derivados de óxidos de etileno. Entre las principales áreas de aplicación, se pueden mencionar la industria alimenticia, farmacéutica y agrícola, pues además de su baja toxicidad, estos compuestos son adecuados como emulsificantes, emolientes y humectantes [2-6]. A nivel tecnológico, el uso de surfactantes representa una nueva alternativa en el tratamiento de enfermedades pulmonares [7], en la extracción y solubilización de lípidos y en el transporte de drogas [8].

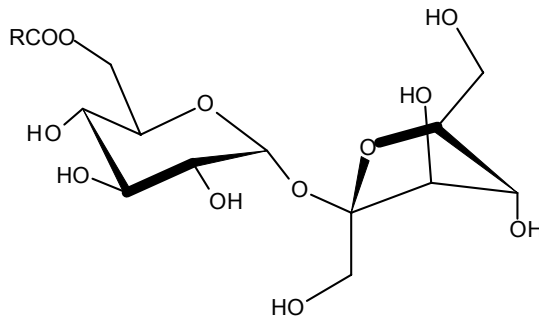


Figura 1. Estructura general de los ésteres de sacarosa, ( $R = (CH_2)_nCH_3$ ).

Los surfactantes o tensoactivos están formados por un grupo polar hidrofílico, iónico o neutro, y un grupo apolar hidrofóbico, constituido por una o más cadenas hidrocarbonadas. La presencia de ambos grupos determina el comportamiento anfipático de este tipo de compuestos. En el caso de los ésteres estudiados, el grupo

polar corresponde a una molécula de sacarosa, por lo que se clasifican como surfactantes no iónicos.

En medio acuoso, las moléculas anfipáticas tienden a organizarse minimizando las interacciones entre la porción hidrofóbica y el medio polar que las rodea, formando de manera espontánea diversos tipos de microagregados que se encuentran en equilibrio con los monómeros en solución. La morfología de los microagregados depende, en primera instancia, de la geometría de la molécula anfipática que los constituye, considerando factores como el volumen de la cabeza y el largo de la cola, lo que ha definido un parámetro que permite predecir, de acuerdo a consideraciones de mínima energía, que forma será la más probable para el agregado en solución acuosa. Este parámetro se conoce como parámetro de empaquetamiento crítico,  $P$  [9]. Los ésteres de sacarosa presentan una geometría de tipo cónica, y los microagregados que conforman son llamados micelas. La formación de estos agregados sucede espontáneamente por sobre una concentración determinada del surfactante en solución, conocida como concentración micelar crítica, cmc.

Cuando los detergentes se encuentran en solución a una concentración mayor que su cmc, comienzan a solubilizar gradualmente las membranas lipídicas, conocidas como liposomas. Los liposomas son utilizados como vehículos transportadores de drogas, y su solubilización en presencia de detergentes permite la liberación gradual de la droga transportada, en lugares específicos del organismo. Por lo anterior, la utilización de surfactantes de origen natural se convierte en una alternativa mucho más atractiva frente a otro tipo de compuestos y como consecuencia, el conocimiento de las interacciones entre estos surfactantes y los liposomas se convierte en un tema de gran relevancia para el desarrollo de nuevas aplicaciones.

Los liposomas o vesículas son agregados coloidales formados por una o más bicapas cerradas que incluyen una pequeña fracción del medio acuoso en el que se encuentran dispersos. Estos agregados pueden ser preparados con lípidos obtenidos de fuentes naturales o de origen sintético, cuya estructura química confiere características específicas a la bicapa, determinando su interacción con el medio. Su

utilización en el estudio de mecanismos biológicos se debe principalmente a propiedades tales como estructura, composición química y tamaño. Para el caso particular de las vesículas formadas por lípidos naturales, habitualmente conocidas como liposomas, se añaden además de las propiedades mencionadas anteriormente, características tales como biocompatibilidad, biodegradabilidad e inmunogenicidad. Estas características permiten el uso de liposomas en el transporte de drogas y otras aplicaciones de valor terapéutico (inmunoadyuvantes en vacunas, transporte de enzimas y en manipulación genética) [10-15]. En la industria de los cosméticos, los liposomas son ampliamente utilizados debido a su capacidad de solubilizar sustancias hidrofílicas en el compartimiento acuoso interno y además, ser una matriz biocompatible con sustancias hidrofóbicas, a diferencia de geles y cremas que emplean aceites, alcoholes y tensoactivos, en algunos casos irritantes para la piel [16].

Las características estructurales y funcionales de los liposomas se deben, fundamentalmente a las propiedades de las moléculas que los conforman, en este caso, los fosfolípidos. La topología general de un fosfolípido presenta también, al igual que cualquier otro surfactante, dos regiones con características opuestas que le otorgan un carácter anfipático, responsable del comportamiento de estas especies en medio acuoso. La mayoría de los fosfolípidos presenta una geometría cilíndrica que induce la formación de estructuras del tipo bicapa. En términos generales, cualquier molécula anfipática con esta geometría podrá formar bicapas, por lo que el estudio de sistemas microcompartimentalizados de este tipo no queda restringido sólo a los fosfolípidos. Entre otros compuestos, destacan las sales de amonio cuaternarias de cadena larga, que además presentan actividad antibacteriana. Sin embargo, algunos de estos anfífilos sintéticos cargados son coloidalmente inestables y se agregan rápidamente en presencia de sales monovalentes, razón por la cual su estudio en condiciones que simulen el medio biológico es escaso [16].

Las características químicas de los fosfolípidos son consecuencia de la estructura química de las cadenas hidrocarbonadas derivadas de ácidos grasos ( $R_1$  y  $R_2$ ) y del grupo fosfato sustituido ( $R_3$ ) unido covalentemente por un grupo glicerol. Las cadenas  $R_1$  y  $R_2$ , en general, se caracterizan por su tamaño (número de unidades

metilénicas) y el grado de insaturación (número, posición e isomería de los dobles enlaces). Cuando ambas cadenas son idénticas, se habla de fosfolípidos simétricos, y cuando son diferentes, asimétricos.

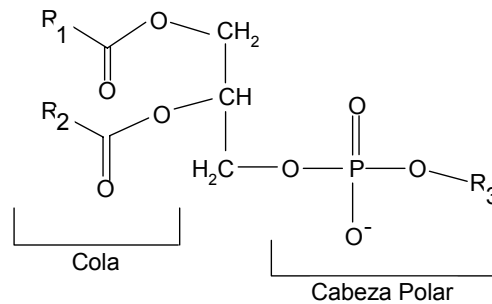


Figura 2. Estructura general de un fosfolípido.

Considerando la densidad de carga negativa del grupo fosfato, será la naturaleza y carga del grupo sustituyente R<sub>3</sub> la que definirá las propiedades de la cabeza polar del fosfolípido. De acuerdo a la carga neta de la molécula, estos surfactantes se clasificarán como catiónicos, aniónicos o zwitteriónicos. En definitiva, las propiedades de la superficie del liposoma y, en consecuencia, el tipo de interacciones que se darán con el medio, quedarán definidas por las características de la cabeza del fosfolípido.

Una de las características más relevantes de los sistemas formados por lípidos es la existencia de dos estados físicos en la membrana (a veces simultáneamente) que pueden favorecer o desfavorecer determinados procesos relativos a la permeabilidad y la difusión a través de la bicapa. Este comportamiento queda definido por un diagrama de fases que describe los cambios en el estado físico de la membrana, en función de la temperatura y la composición. La temperatura de transición de fase (T<sub>m</sub>) es por definición la temperatura a la cual coexisten proporciones equivalentes de dos fases, en este caso el estado gel y el estado líquido-cristalino, y su valor depende tanto del tamaño como del grado de saturación de las cadenas hidrocarbonadas [17], lo que permite controlar la fluidez de la bicapa seleccionando el fosfolípido. Comparando un lípido saturado con su análogo insaturado, la T<sub>m</sub> es significativamente menor para este último pues los dobles enlaces inducen cambios en el ordenamiento de las cadenas,



que dificultan el empaquetamiento necesario en la fase gel. A bajas temperaturas, las colas hidrocarbonadas se encuentran en un estado parcialmente rígido, altamente ordenado y los dobles enlaces adoptan la configuración *trans*, estado que corresponde a la fase gel ( $L_{\beta}$ ). Sobre la temperatura de transición de fase, las cadenas hidrocarbonadas aumentan su movilidad y se organizan en un estado más fluido, el líquido-cristalino ( $L_{\alpha}$ ). Antes de llegar al estado líquido-cristalino, se ha observado en fosfolinas y otros fosfolípidos la existencia de una fase diferente,  $P_{\beta}$ , donde la superficie de la membrana presenta leves ondulaciones, que se conoce como pretransición de fase [18]. En el estado  $P_{\beta}$  existe cierto grado de isomerización *trans/gauche* intermedio entre las fases  $L_{\beta}$  y  $L_{\alpha}$ . El apóstrofe en la simbología indica la existencia de cierto grado de plegamiento de las cadenas en cada fase [18].

Otras propiedades que permiten caracterizar a las vesículas son la lamelaridad (número de bicapas concéntricas) y el tamaño. De acuerdo a estos parámetros, los liposomas pueden clasificarse en vesículas unilamelares pequeñas (SUVs) con diámetros entre 30-50 nm, vesículas unilamelares grandes (LUVs) con diámetros en el rango 50-400 nm y vesículas unilamelares gigantes (GUVs) de diámetros superiores a 30  $\mu\text{m}$ . Existen también vesículas multilamelares o MLVs, a partir de las cuales es posible obtener a través del proceso de extrusión, vesículas unilamelares con una estrecha distribución de tamaños alrededor de un valor definido [19]. Una de las grandes ventajas de los liposomas es que la obtención de diferentes tamaños y lamelaridades depende exclusivamente del método de preparación [20].

Considerando el tipo de aplicaciones de estos sistemas, es importante referirse a su estabilidad y los factores que la controlan. Debe considerarse tanto la estabilidad de la membrana misma como la estabilidad de los microagregados en solución. Como primera aproximación, la estabilidad de la membrana involucra dos procesos principales: el tiempo de residencia del monómero en la bicapa y la velocidad de intercambio de lípidos entre las monocapas, esta última conocida como *flip-flop*. El proceso de salida de una molécula desde la bicapa depende de la cantidad de energía necesaria para solubilizar un alcano en un ambiente hidrofílico. Se han reportado

tiempos de residencia del lípido en la bicapa del orden de  $10^4$  segundos, lo afecta directamente la estabilidad de los liposomas. Por otro lado, el intercambio de lípidos entre las monocapas considera la barrera potencial asociada al transporte de la cabeza hidrofílica a través de una zona hidrofóbica. Para este proceso se han determinado tiempos de residencia del orden de  $10^5$  segundos [21].

La estabilidad de los liposomas en solución se puede definir básicamente considerando la estabilidad física, química, biológica y coloidal [16]. En términos de estabilidad física, las vesículas son termodinámicamente inestables debido al exceso de energía originado por la curvatura de membrana, propia de la forma esférica del agregado. En cuanto a la estabilidad química, los lípidos sufren diferentes procesos de degradación, siendo los más comunes la oxidación y la hidrólisis. La oxidación de fosfolípidos normalmente involucra la participación de especies radicalarias. La degradación por oxidación es mayor en lípidos insaturados y en el caso de dobles enlaces adyacentes, conduce a la formación de peróxidos cíclicos. La hidrólisis de los fosfolípidos es catalizada por ácidos o bases e involucra la formación de ácidos grasos y otros compuestos por ruptura de los enlaces tipo éster. La estabilidad en el medio biológico está directamente relacionada con el control sobre la velocidad de eliminación de los liposomas y la capacidad de retención de las sustancias transportadas por la vesícula. Finalmente, la estabilidad coloidal implica la ausencia de agregación interbicapa y/o fusión. Las interacciones inter-liposomas pueden ser explicadas en gran parte por la teoría DLVO que describe un balance entre las interacciones atractivas de Van der Waals de largo alcance y las fuerzas electrostáticas repulsivas de rango corto. El predominio de la contribución repulsiva tendrá como consecuencia un aumento de la estabilidad coloidal [22].

Las principales clases de fosfolípidos presentes en células animales son las fosfatidilcolinas y fosfatidiletanolaminas, que se diferencian específicamente por sus cabezas polares y por la presencia de dobles enlaces en una o en ambas cadenas hidrocarbonadas. Un componente importante en la organización de la membrana celular es el colesterol, cuya estructura se muestra en la Figura 3. Su presencia afecta principalmente el orden y la estructuración de las cadenas hidrocarbonadas, generando

una fase lipídica ordenada ( $L_o$ , *lipid-ordered*) donde las cadenas se encuentran relativamente rígidas, similar al estado gel, pero permitiendo una importante difusión en el plano de la membrana, como sucede en la fase líquido-cristalina [23]. Se ha observado que el efecto de la presencia del colesterol no es lineal con su concentración, habiéndose detectado discontinuidades en algunas propiedades de la bicapa. Por ejemplo, bajas cantidades de colesterol incrementan la permeabilidad de la membrana y a concentraciones mayores puede llegar a suprimir la transición de fase o disminuir la permeabilidad por sobre  $T_m$  [17,24].

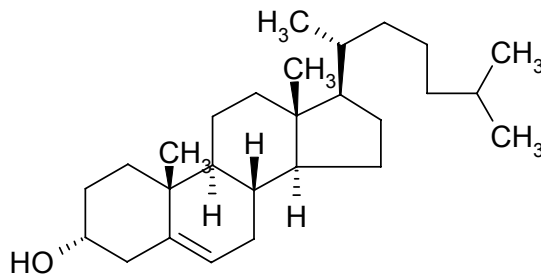


Figura 3. Estructura del colesterol.

La presencia de colesterol afecta las propiedades físicas de la bicapa y su ubicación en la membrana depende principalmente de las posibles interacciones con las distintas zonas de ella. Estudios y simulaciones moleculares postulan que el esqueleto hidrofóbico del colesterol se encuentra inserto en la región hidrocarbonada de la membrana, mientras que el grupo hidroxilo se ubica en la zona límite entre la cadenas y la región polar de la bicapa [25].

El objetivo principal de este trabajo fue conocer el comportamiento y las interacciones entre un éster de sacarosa, surfactante no iónico, y liposomas de distinto tamaño, origen y diferente actividad superficial: 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina, POPC, de origen natural y carácter zwitteriónico y cloruro de dioctadecildimetilamonio, DODAC, molécula anfipática de origen sintético y carga positiva. El éster de sacarosa seleccionado fue el  $\beta$ -D-fructofuranosil-6-O-miristil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (MMS), monoéster de sacarosa derivado del ácido mirístico (ver Figura 1,  $R = -(CH_2)_{13}CH_3$ ).

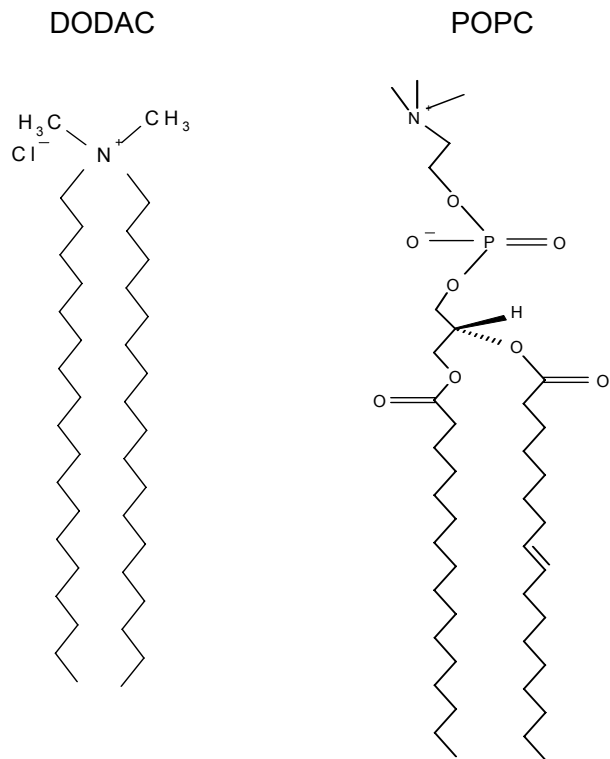


Figura 4. Estructura química de las moléculas estudiadas.

Los sistemas fueron caracterizados en ausencia y presencia de diferentes proporciones de colesterol, y se realizaron estudios cinéticos de la salida de colesterol desde la membrana para conocer el efecto del monoéster en la permeabilidad y estructuración de la bicapa. También se estudió el proceso de solubilización de los distintos sistemas para evaluar el efecto de la presencia de colesterol sobre los fenómenos de saturación y solubilización de la vesícula por surfactantes derivados de la sacarosa. Finalmente, el proceso de solubilización fue estudiado en un modelo real, utilizando para este fin eritrocitos humanos. Los estudios realizados en el desarrollo de este trabajo involucraron el empleo de metodologías de emisión convencional y de microscopía bifotónica.

## 2. MATERIALES

### 2.1 Reactivos

- 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (POPC), y el colesterol (Avantilipids) fueron utilizados tal como se recibieron, sin otros procesos de purificación. El cloruro de dioctadecildimetilamonio (DODAC) (Herga Ind.) fue purificado como se describe en la literatura [26]. El  $\beta$ -D-fructofuranosil-6-O-miristil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (MMS), fue sintetizado previamente en el Laboratorio de Cinética y Fotoquímica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, mediante una modificación del método Osipow-Snell [27].
- $\beta$ -ciclodextrina, ( $\beta$ CD) (Aldrich) y la metil- $\beta$ -ciclodextrina (m $\beta$ CD) ( $M_n = 1310$  y 1,6-2,0 grupos  $\text{CH}_3$  por unidad de glucosa, Aldrich) se utilizaron tal como se recibieron. Las lipoproteínas de alta densidad, HDL, de un diámetro de 97Å fueron sintetizadas en el Laboratorio de Fluorescencia Dinámica de la Universidad de Illinois, EEUU, utilizando el Método de Colato previamente publicado [28].
- Laurdan (6-dodecanoil-2-dimetilaminonaftaleno) (Molecular Probes) fue utilizado tal como se recibió, al igual que el tampón Tris. El agua empleada fue purificada con un sistema Mili-Q Plus, Millipore.
- Los eritrocitos utilizados fueron obtenidos de individuos saludables del Champaign County Blood Bank, Regional Health Center, USA.

### 2.2 Instrumentación

- Sistema de extrusión de 10 mL de capacidad (Northern Lipids, Thermobarrel Extruder).

- Las medidas de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorímetro Fluorolog-Tau 2 (SPEX, Jobin Yvon) controlado a través de un computador con el software DMF 300 que permite la obtención de espectros de fluorescencia corregidos.
- Para las experiencias de microscopía bifotónica se utilizó un sistema ensamblado en el Laboratorio de Fluorescencia Dinámica [29]. La fuente de excitación es un láser pulsado de titanio-zafiro (Mira 900, Coherent, Palo Alto, CA) bombeado con un láser Nd:Vanadato (Verdi, Coherent, Palo Alto, CA). La longitud de onda de excitación usada fue de 780 nm. Se empleó un objetivo LD-Achroplan 20X (Zeiss, Homildale, NJ). Para el barrido y generación de imágenes, se utilizó un scanner galvanométrico (Cambridge Technology Watertown, MA). La potencia del láser se redujo a 40 mW con un filtro neutro (equivalente a aproximadamente 4 mW en la muestra). Las imágenes de polarización generalizada, GP, fueron obtenidas utilizando un sistema de dos canales en la emisión. Cada canal registra una zona del espectro de emisión de Laurdan, como lo muestra la Figura 9 y para ello se usan filtros de interferencia centrados en 446 nm y 499 nm, con un ancho de banda de 46 nm, y ubicados delante de cada detector (Ealing electro-optics, New Englander Industrial Park, Holliston, MA). Para la detección se utilizaron dos fotomultiplicadores, uno en cada canal, (R5600-P, Hamamatsu, Bridge-water, NJ) en modo conteo de fotones.
- Las vesículas pequeñas fueron preparadas en un equipo de sonicación de alta frecuencia (Ultrasonic Homogeneizer, Cole Parmer), con dos pulsos de dos minutos de duración.
- Todas las experiencias se realizaron a temperatura controlada, empleando un baño termorregulador Fisons, HAAKE F3.

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1 Preparación de vesículas (liposomas).**

Como se mencionó en la Introducción, dos propiedades importantes de las vesículas, el tamaño y la lamelaridad, pueden controlarse utilizando diferentes metodologías para su preparación [20]. En este trabajo, para todos los sistemas empleados (POPC y DODAC), se prepararon vesículas pequeñas (SUVs), vesículas gigantes (GUVs) y vesículas extruídas preparadas a partir de vesículas multilamelares (MLVs).

##### **3.1.1 Preparación de Vesículas Unilamelares Pequeñas. Método de Ultrasonificación.**

Entre las numerosas técnicas descritas para la preparación de liposomas unilamelares pequeños (SUVs), la utilización de ultrasonido de alta potencia corresponde a una de las opciones más simples y rápidas. Esta técnica se basa en la dispersión de las moléculas de lípido en agua a través de una sonda que entrega la energía necesaria para formar los microagregados de manera espontánea. El tamaño promedio de estos microagregados es de 30 a 40 nm de diámetro.

Al preparar liposomas formados por más de un lípido o constituyente, es necesario asegurar la homogeneidad de la mezcla inicial. Para este fin se prepara una solución (normalmente en un solvente orgánico volátil) con las cantidades necesarias de cada componente, luego se evapora el solvente con una corriente de nitrógeno y las últimas trazas se eliminan en una línea de vacío. Así se genera una película homogénea adherida a las paredes del recipiente, en donde posteriormente se formarán las vesículas al agregar solvente calentado por sobre la temperatura de transición de fase mezcla de liposomas en cuestión. Este procedimiento fue utilizado indistintamente tanto para lípidos puros como para las diferentes mezclas con colesterol y éster de sacarosa.

Se preparó una solución en cloroformo de cada uno de los componentes, para luego agregar en un vaso precipitado las cantidades requeridas de acuerdo a la composición deseada. Luego se evaporó el solvente con una corriente de N<sub>2</sub> durante 15 minutos. Posteriormente se suspendió la mezcla de lípidos agregando alrededor 5 mL de agua Milli-Q o solución de tampón (pH 7,4), dependiendo del lípido utilizado. Luego la solución se sonicó dos veces por dos minutos. Una vez obtenida una solución opalescente homogénea, ésta se afora en un matraz del volumen adecuado, para alcanzar la concentración de liposomas requerida. Como criterio general, la concentración de las soluciones de liposomas se expresará como molaridad referida a los lípidos totales.

### **3.1.2 Preparación de Vesículas Unilamelares Gigantes. Método de Electroformación.**

Las vesículas unilamelares gigantes (GUVs) son agregados de gran tamaño, por lo que es posible estudiar aspectos físicos y biofísicos de biomembranas a través de técnicas de microscopía. Este hecho permite la observación directa de un escenario único, situación que no es posible con experimentos que involucran SUVs, LUVs o MLVs. Otro aspecto importante es que el tamaño y radio de curvatura de estas vesículas son muy similares al de las células, razón por la cual estos sistemas son considerados ideales para el estudio de interacciones lípido-lípido, lípido-proteína y lípido-ADN, cuando la intención es extrapolar los resultados al medio biológico [30-32].

Entre los diversos protocolos que existen para la preparación de vesículas gigantes, el método de electroformación permite obtener poblaciones relativamente homogéneas en tamaño (entre 30 y 60  $\mu\text{m}$  de diámetro), con un alto porcentaje de vesículas unilamelares (~95%), a diferencia de otras técnicas que solo permiten alcanzar poco más de un 20% de unilamellaridad, además de obtener otro tipo de estructuras cerradas denominados *tubos* [30].

La técnica consiste básicamente en hidratar una película de lípidos previamente depositada en un alambre de platino, en presencia de un campo eléctrico, que hace



vibrar el alambre con la película de lípidos, a una frecuencia y amplitud predeterminada, permitiendo así la formación de vesículas sobre el alambre de platino. El procedimiento debe realizarse a una temperatura superior a la de transición de fase del lípido (o mezcla de lípidos). Una desventaja operativa de este método es que la presencia de iones en el solvente puede llegar a reducir en forma notable la formación de vesículas [33].

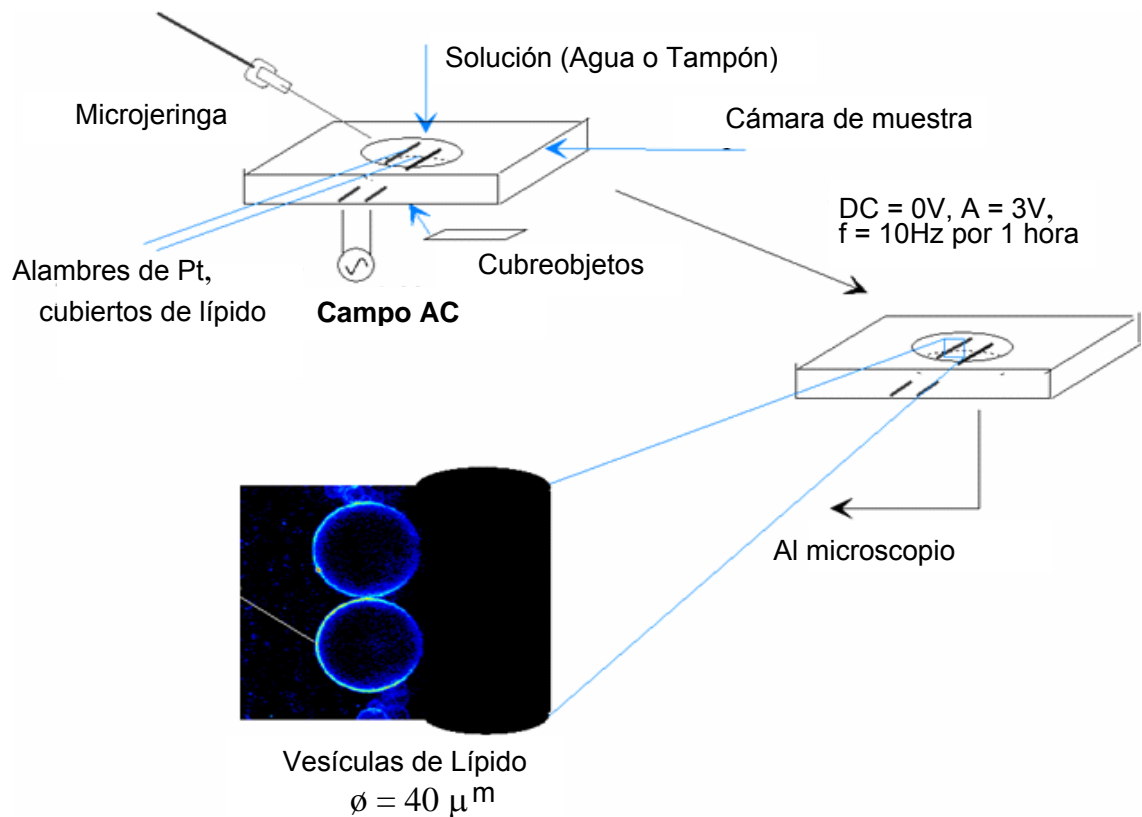


Figura 5. Esquema de la cámara de formación de GUV. La ampliación inferior muestra el alambre de Pt después de la formación de vesículas.

En este trabajo se utilizó una solución de 0,2 mg/mL de lípidos totales, disueltos en  $\text{CHCl}_3$  y se esparcieron  $2 \mu\text{L}$  en cada uno de los dos alambres de la cámara. El solvente se evaporó con una corriente de nitrógeno durante 30 minutos, para luego remover las trazas de solvente al vacío. La cámara se termostató a una temperatura por lo menos  $10^\circ \text{C}$  por sobre la  $T_m$  del lípido o mezcla, y cuando los alambres de platino han alcanzado la temperatura de trabajo ( $\sim 10 \text{ min.}$ ), se introduce el solvente a la cámara (2 mL de agua Millipore o buffer, según el caso), previamente calentada a la

temperatura de trabajo. Posteriormente, se conecta la fuente generadora de pulsos (7 Hz y 2 V) durante el tiempo suficiente para el crecimiento de las vesículas (normalmente una hora). Para verificar la formación de GUVs se utiliza una videocámara CCD. Sólo fue posible generar vesículas gigantes de POPC, las que fueron electroformadas utilizando tampón TRIS pH 8,0 como solvente a una temperatura de 37° C, ya que ésta será a temperatura de trabajo.

### 3.1.3 Preparación de Vesículas Multilamelares.

Las vesículas multilamelares fueron preparadas empleando ciclos de congelamiento y descongelamiento, entre los cuales la solución de lípidos es agitada con un vórtex a una temperatura superior a la de transición de fase. De acuerdo al mecanismo descrito en la literatura [20], la hidratación de la película de lípidos y la posterior agitación con un vórtex permite formar vesículas o liposomas multilamelares, MLVs, con una distribución de tamaños relativamente definida (1-4  $\mu\text{m}$ ).

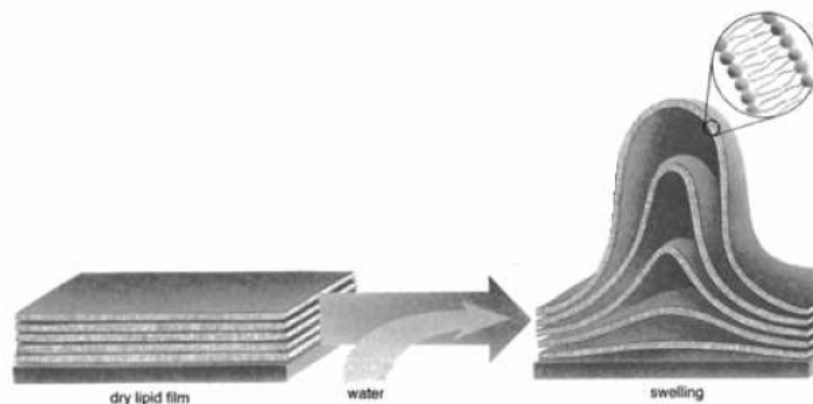


Figura 6. Esquemización de la formación de vesículas multilamelares.

El lípido o mezcla de lípidos se disuelve en una mínima cantidad de  $\text{CHCl}_3$ , que luego es evaporado primero con una corriente de nitrógeno y después, para eliminar toda traza de solvente, en una línea de vacío ( $< 10^{-3}$  torr) durante una hora. A continuación, se agregó un volumen adecuado de agua Milli-Q o tampón, a una temperatura alrededor de 10° C por sobre la  $T_m$ . Posteriormente, los lípidos fueron suspendidos mediante agitación con un vórtex. La suspensión obtenida se congela con

nitrógeno líquido e inmediatamente se descongela en un baño termostático a una temperatura alrededor de  $10^{\circ}\text{C}$  sobre  $T_m$ , para agitarla nuevamente en el vórtex. Este ciclo se repitió por lo menos cinco veces antes de proceder a la extrusión de las vesículas.

#### **3.1.4 Obtención de vesículas por Extrusión.**

La extrusión es el proceso en el cual una solución de vesículas multilamelares es forzada a pasar a través de una membrana de policarbonato con pequeños poros usando gas a alta presión, normalmente nitrógeno. Este método permite obtener una distribución de tamaños más estrecha que las generadas por otros procedimientos, centrada en el tamaño del poro de la membrana utilizada. La distribución de tamaños también muestra dependencia con la presión de extrusión, con la velocidad de flujo de la solución de vesículas y con las características del lípido utilizado [19,34].

La solución de MLVs se hizo pasar a través de membranas de policarbonato de 400, 200 y 100 nm utilizando el equipo de extrusión conectado a un baño termostático a  $60^{\circ}\text{C}$ . Las vesículas fueron extruídas en orden decreciente de tamaño de poro. Se utilizó nitrógeno como gas presurizado y la presión empleada fue controlada para cada tamaño de poro de modo de mantener un flujo razonable de salida de las soluciones de vesículas.

Para generar las curvas de calibración se emplearon soluciones 1mM expresada como lípidos totales. Las experiencias cinéticas y de solubilización fueron llevadas a cabo con diluciones de dichas soluciones madre. Tanto las soluciones madre como las diluciones fueron preparadas inmediatamente antes de realizar las experiencias.

### **3.2 Determinación de propiedades físicas de la membrana.**

La espectroscopía de fluorescencia es una herramienta ampliamente utilizada en biofísica. Esta técnica involucra el uso de moléculas capaces de emitir luz, conocidas como sondas o pruebas fluorescentes. Para el estudio de membranas las sondas fluorescentes han sido diseñadas de manera tal, que su comportamiento se vea fuertemente influenciado por el ambiente en el que se encuentran ubicadas. La interacción de la sonda con su entorno depende fundamentalmente de su estructura, lo que permite que cada molécula se localice en lugares específicos de la membrana. Las medidas espectroscópicas son en general simples y directas, pero la interpretación correcta de la información obtenida requiere un conocimiento detallado de las propiedades fotofísicas de la sonda.

#### **3.2.1. Laurdan y polarización generalizada**

En este trabajo se seleccionó como sonda fluorescente el 6-dodecanoil-2-dimetilaminonaftaleno o Laurdan [35]. Esta molécula fue diseñada por Gregorio Weber en 1979 [35] y su comportamiento en bicapas ha sido ampliamente estudiado [36,37]. La molécula de Laurdan, cuya estructura se muestra en la Figura 7, presenta un alto coeficiente de reparto en agregados formados por lípidos y tiene una solubilidad muy baja en agua [38], lo que asegura que casi la totalidad de su emisión proviene de zonas hidrofóbicas de la membrana. En efecto, diversos estudios han demostrado que el Laurdan se ubica principalmente en la interfase entre las cabezas polares y las colas hidrocarbonadas [39] como consecuencia de la existencia de interacciones de tipo Van der Waals con las cadenas hidrofóbicas, presentando un anclaje lo suficientemente fuerte como para limitar su intercambio con el medio acuoso. (Figura 7):

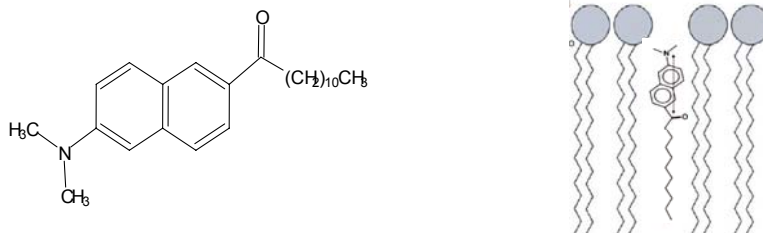


Figura 7. Estructura molecular del Laurdan, y su ubicación en la membrana.

La fotofísica del Laurdan se ve fuertemente influenciada por la polaridad del ambiente en el que se encuentra ubicada, lo que permite hacer una relación directa del perfil de su emisión con la fluidez de la membrana [39,40]. En solventes de alta polaridad, el máximo de emisión del Laurdan presenta un considerable desplazamiento batocrómico, explicado fundamentalmente por la reorientación de los dipolos de las moléculas de solvente alrededor de la sonda durante el tiempo de vida de su estado excitado. En bicapas, el origen de la relajación dipolar ha sido atribuido a las moléculas de agua presentes en la interfase donde se sitúa el Laurdan [39,40] y por lo tanto, el espectro de emisión de la sonda depende fuertemente del grado de empaquetamiento de las cadenas hidrocarbonadas, pues la dinámica molecular y la concentración de moléculas de agua varía en los diferentes estados físicos de la membrana. En el estado líquido cristalino, la bicapa presenta un débil empaquetamiento que permite que ocurra la reorientación de las moléculas de agua con el dipolo de la sonda excitada, teniendo como consecuencia un desplazamiento continuo hacia el rojo. Como resultado, el máximo de emisión de la sonda en el estado gel se encuentra en la región del azul (centrada alrededor de los 440 nm) y en el estado líquido cristalino el máximo se desplaza hacia el verde (490 nm) [30], como puede verse en la Figura 8.

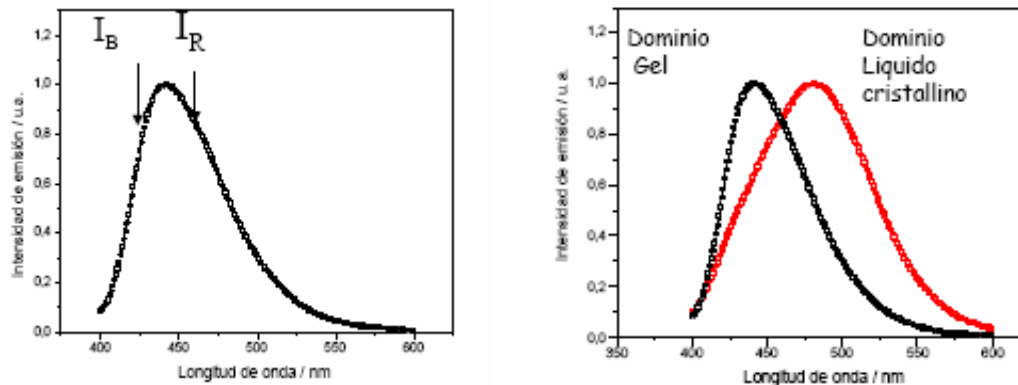


Figura 8. Desplazamiento espectroscópico del Laurdan.

Para cuantificar los cambios espectrales descritos, se ha definido el parámetro de Polarización Generalizada, GP [39,40], el cual relaciona las intensidades relativas de las regiones del azul ( $I_B$ ) y el rojo ( $I_R$ ) a través de la siguiente expresión:

$$GP = \frac{I_B - I_R}{I_B + I_R} \quad (1)$$

Para fosfolípidos saturados se han reportado para la fase gel pura valores típicos alrededor de 0,5-0,6 y para el estado liquido cristalino puro el rango está entre -0,3 y -0,4 [41-43].

### 3.2.2. Espectroscopía de Fluorescencia

En los experimentos realizados en esta sección la concentración de lípidos usada fue del orden de  $10^{-3}$  M y la concentración de Laurdan en cubeta fue  $3 \mu\text{M}$ . Se tomaron espectros de emisión desde 400 a 600 nm usando una longitud de onda de excitación de 364 nm, valor cercano al máximo de absorción de Laurdan. El valor de GP se determinó utilizando la ecuación (1) y los valores de intensidad de emisión a 440 y 490 nm. En todas las experiencias realizadas la temperatura fue controlada con un baño termorregulador.

Es importante señalar que las medidas de fluorescencia estacionaria arrojan un valor de GP promedio de las membranas de todas las vesículas contenidas en la cubeta y por tanto no es posible discriminar si la distribución del Laurdan varía significativamente de una vesícula a otra, o bien, si la distribución de moléculas de agua en el microentorno del Laurdan varía entre una vesícula y otra.

### **3.2.3. Microscopía de Fluorescencia Bifotónica**

La microscopía de fluorescencia multifotónica es una técnica ampliamente utilizada en el campo de la biofísica, pues presenta ventajas importantes respecto a los experimentos de microscopía confocal, como menor posibilidad fotoblanqueo, menor posibilidad de recubrimiento entre bandas de excitación y emisión, mayor penetración de la luz en tejidos entre otras.

La excitación del fluoróforo ocurre por la absorción simultánea de dos fotones, cuya suma de energías sea igual al salto energético desde el estado basal al estado excitado. Los procesos que involucran absorción simultánea de más de un fotón tienen una probabilidad muy baja de ocurrir. Para aumentar esta probabilidad, se requiere que una elevada cantidad de fotones lleguen a la muestra en un tiempo pequeño (densidad de fotones alta). Esto se logra usando un láser pulsado de alta repetición e intensidad, donde cada pulso es de corta duración (100 fs). Si una muestra es excitada con un láser de estas características, la absorción de dos fotones aún es poco probable. La intensidad necesaria para que la probabilidad de absorción sea lo suficientemente alta, se logra enfocando el haz con un objetivo. En su punto focal y únicamente en él ocurrirá el proceso de absorción bifotónico [31]. Esta metodología permite excitar zonas específicas, disminuyendo la posibilidad de fotoblanqueo y fotodaño, resultando de gran utilidad en el estudio de células y tejidos [41].

En las medidas de GP realizadas en el microscopio, cada canal entrega simultáneamente una imagen correspondiente a cada zona del espectro (Figura 9).

Cada imagen esta normalmente formada por 256 X 256 píxeles y cada píxel tiene su valor de intensidad. Mediante el programa SimFCS (desarrollado en el Laboratorio de Fluorescencia Dinámica del Departamento de Física de la Universidad de Illinois, Estados Unidos) las dos imágenes son usadas para generar la imagen de GP (Figura 9), y la intensidad de cada píxel en las correspondientes imágenes, es procesada utilizando la fórmula de GP (Ec. 1). De esta manera, se obtiene una imagen de GP donde cada píxel tiene su propio valor. Finalmente, se genera un histograma de los valores obtenidos, donde el valor de GP promedio corresponde al promedio de la distribución.

El comportamiento espectroscópico anteriormente descrito para el Laurdan, la capacidad de esta sonda de distribuirse de manera homogénea en membranas, el sistema de vesículas gigantes (GUVs) y la resolución espacial que concede la microscopía, permiten discriminar entre vesículas con diferentes valores de GP en la misma cámara o, más interesante aún, distintos valores de GP en la misma vesícula. Esta última ventaja a permitido visualizar directamente la existencia de microdominios lipídicos en imágenes fluorescentes de vesículas gigantes constituidas por mezclas de lípidos [30,31].

Una vez que las condiciones han sido determinadas, el protocolo de trabajo en el microscopio es simple y directo. Generadas las vesículas, se agrega cuidadosamente la sonda (0,1  $\mu$ M en la cámara) para no desprenderlas de los alambres, y se espera alrededor de 30 minutos para que se incorpore la sonda en la membrana, manteniendo el generador de señales conectado. Con la videocámara CCD se ubican las vesículas que serán estudiadas. Durante toda la experiencia se monitorea la temperatura con una termocupla ubicada cerca de los alambres de platino. Para la adquisición y posterior tratamiento de datos se utiliza el programa SimFCS.



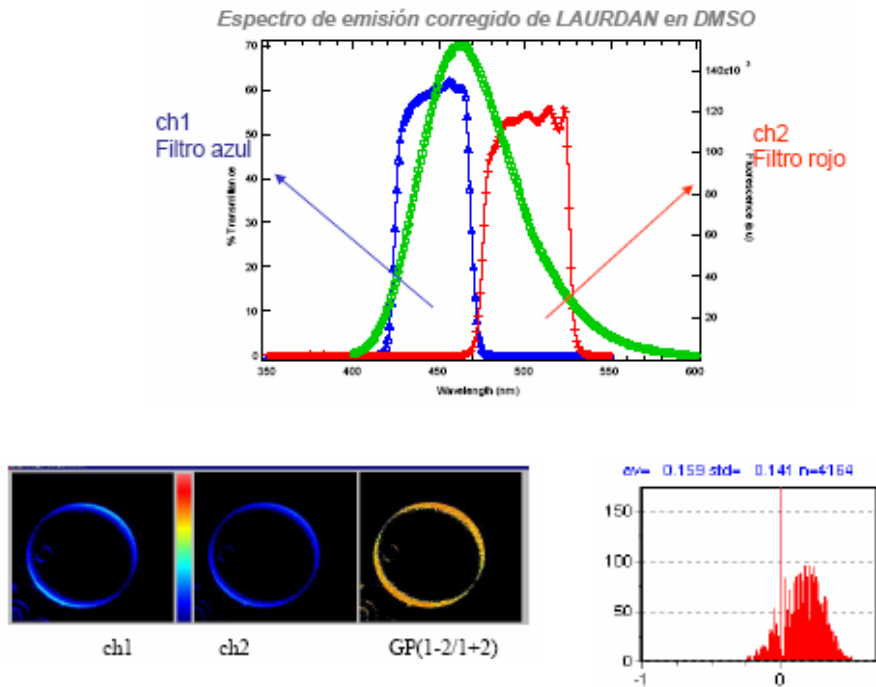


Figura 9. Medición de GP en un microscopio de dos canales. La parte superior de la figura muestra como los canales filtran las regiones del azul y el rojo en el espectro del Laurdan. En la parte inferior izquierda se observan las imágenes entregadas por ambos canales y la imagen de GP que entrega el software Sim-FCS. Entre las imágenes de ambos canales puede apreciarse el rango de colores que representa la escala de GP desde el azul (fase líquido cristalina) hasta el rojo (fase gel). La parte inferior derecha muestra el histograma de GP entregado por el software, con la escala de GP en el eje X.

### 3.3 Determinación de constantes de velocidad para la extracción de colesterol desde bicapas.

Las interacciones lípido-colesterol y la influencia que tiene la presencia de este último sobre las propiedades de bicapas de fosfolípidos son temas ampliamente estudiados, principalmente por la relevancia estructural del colesterol en la dinámica molecular de la mayoría de las células de los organismos eucarióticos. La extracción de colesterol desde membranas permite determinar la afinidad de esta molécula por diferentes tipos de lípidos, así como también monitorear posibles cambios en las propiedades físicas de la membrana, originados por la presencia o ausencia de colesterol.

Las ciclodextrinas son oligómeros cíclicos constituidos por seis, siete u ocho moléculas de glucosa, que en su cavidad central pueden solubilizar moléculas hidrofóbicas (como es el caso del colesterol). Estos compuestos son ampliamente utilizados en los procesos de extracción de colesterol desde biomembranas. Las  $\beta$ -ciclodextrinas (Figura 10), formadas por siete moléculas de glucosa, son las que presentan mayor afinidad por la formación del complejo con colesterol. Las constantes de asociación ciclodextrina-colesterol dependen en forma importante de la presencia y características de cadenas laterales en el oligómero [44].

En las membranas de los organismos eucarióticos, la cantidad de colesterol debe ser cuidadosamente controlada para evitar problemas como la formación de placas arterioscleróticas. Normalmente los niveles de colesterol son mantenidos por aceptores biológicos como las lipoproteínas de alta densidad (HDL). Estas partículas están formadas por fosfolípidos y proteínas como la apolipoproteína AI (apo-AI). Las HDL pueden ser obtenidas en el laboratorio utilizando lípidos y proteínas apo-AI purificadas y dependiendo de las proporciones con que se preparen, las HDL resultantes tendrán diferentes tamaños y propiedades [28].

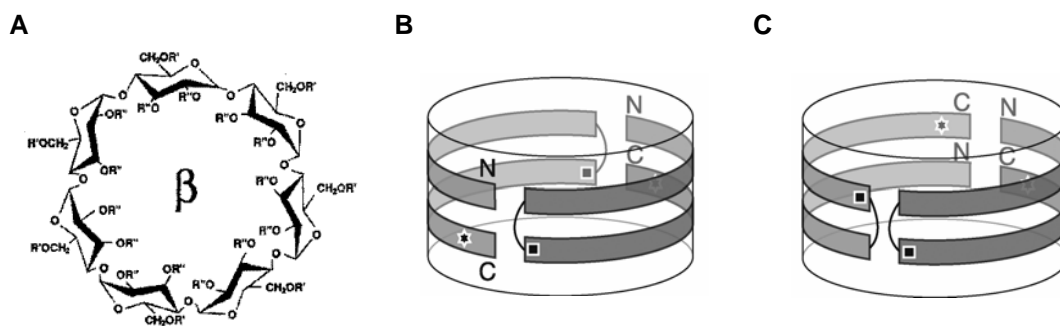


Figura 10. Estructura de la  $\beta$ -ciclodextrina (A) y posibles estructuras de la HDL utilizada (B y C).

En esta sección del trabajo se determinó qué efecto tiene la presencia del éster de sacarosa sobre las propiedades difusionales y de transporte de la bicapa, estudiando las cinéticas de extracción de colesterol desde vesículas pequeñas y gigantes. Como aceptores de colesterol se utilizaron  $\beta$ -ciclodextrina, metil- $\beta$ -ciclodextrina y HDL. Los estudios cinéticos fueron realizados empleando metodologías

de fluorescencia y de microscopía bifotónica, a 37° C, durante 10 horas en el caso de las vesículas pequeñas, SUVs, y 2 horas en el caso de las gigantes, GUVs.

### **3.4 Solubilización de liposomas. Determinación de constantes de reparto K y razón efectiva Re.**

Para estudiar las propiedades fisicoquímicas que describen la interacción surfactante-lípido se han utilizado desde modelos simples de membranas, como es el caso de liposomas y vesículas [45,46], hasta sistemas mucho más complejos como el *stratum corneum* [47-49]. Los modelos propuestos plantean que la capacidad del surfactante para saturar y solubilizar una bicapa está directamente relacionada con su concentración micelar crítica, cmc, y con su coeficiente de distribución, K [50].

La interacción de surfactantes con liposomas ocasiona como resultado final la ruptura de las bicapas, con la consiguiente solubilización de sus componentes. El mecanismo de solubilización de liposomas ha sido descrito a través de un modelo de tres etapas, proceso que se inicia con la penetración de moléculas de surfactante en las bicapas hasta alcanzar la saturación. En este punto comienza la segunda etapa con la formación de micelas mixtas compuestas por moléculas de surfactante y del fosfolípido (constituyente de la membrana) coexistiendo con las vesículas saturadas de surfactante. En la tercera y última etapa, luego de completada la transformación de estructuras lamelares en micelas, todas las moléculas de fosfolípido están presentes como micelas mixtas [49].

El modelo de partición en el equilibrio [50] predice la existencia de un coeficiente de reparto, K, para la distribución de surfactante entre la bicapa lipídica y el medio acuoso. En una solución de liposomas este parámetro queda definido por la siguiente expresión:

$$K = \frac{C_B}{(L + C_B)C_W} \quad (2)$$

donde  $C_B$  y  $C_W$  corresponden a la concentración de surfactante en la bicapa y en la fase acuosa respectivamente, y  $L$  corresponde a la concentración de lípido. Cuando la concentración de surfactante es del orden de la concentración de lípido, la ecuación anterior puede ser reordenada a:

$$K = \frac{R_e}{(1 + R_e)C_W} \quad (3)$$

donde  $R_e$  es la razón molar efectiva surfactante a lípido en la bicapa ( $C_B/[L]$ ).

En general, el proceso de solubilización queda caracterizado por dos parámetros:  $C^{\text{sat}}$ , que corresponde a la concentración de surfactante necesaria para saturar la bicapa, y  $C^{\text{sol}}$  que es la concentración de surfactante requerida para completar el proceso de solubilización. En trabajos previos [51], se ha reportado para la solubilización de vesículas de DODAC con ésteres de sacarosa, la existencia de un tercer parámetro,  $C^{\text{ss}}$ , que estaría asociado a cambios estructurales en la superficie de la bicapa, ocurridos antes de la saturación. Todos los parámetros críticos mencionados presentan dependencia lineal con la concentración de lípido, de acuerdo a la siguiente ecuación general:

$$[C^c]_t = [C^c]_w + R_e^c L \quad (4)$$

donde  $C_t^c$  corresponde a la concentración total de surfactante y los superíndices indican los diferentes puntos críticos. A partir de este tratamiento es posible determinar las razones molares efectivas surfactante a lípido, para liposomas saturados con éster de sacarosa, en cada uno de los puntos críticos: saturación superficial ( $R_e^{\text{ss}}$ ), saturación de la interfase ( $R_e^{\text{sat}}$ ) y solubilización ( $R_e^{\text{sol}}$ ).

El proceso de solubilización fue estudiado observando la variación del GP del Laurdan incorporado a bicapas en presencia de concentraciones crecientes de miristil sacarosa. Se emplearon metodologías de fluorescencia convencional y microscopía bifotónica para vesículas pequeñas y gigantes de POPC y DODAC, en ausencia y presencia de diferentes proporciones de colesterol. Se determinaron los parámetros

críticos de saturación, solubilización y saturación superficial, en el caso que corresponda. Los experimentos realizados sobre SUV involucraron la incubación de las vesículas con diferentes concentraciones de surfactante, por un mínimo de 24 horas, a temperatura ambiente. El Laurdan fue agregado en el momento de preparar las soluciones, para permitir la incorporación de la sonda durante todo el tiempo de incubación. Los valores promedio de GP fueron obtenidos midiendo a 440 y 490 nm durante 5 minutos, a 25° C. En el caso de las vesículas gigantes, la concentración de surfactante agregada fue lo suficientemente grande como para asegurar el seguimiento del proceso de solubilización completo en un promedio de 15 minutos, a 25° C.

### **3.5 Aplicación a un modelo real. Solubilización de eritrocitos con Monomiristil Sacarosa seguida por Microscopía de Fluorescencia Bifotónica.**

La interacción entre compuestos anfífilos y eritrocitos humanos es un fenómeno que da lugar a transformaciones morfológicas importantes, las cuales se diferencian dependiendo de si el agente externo actúa sobre la monocapa externa o interna de la membrana del eritrocito [52]. Una posible transformación involucra la formación de equinocitos, los cuales son eritrocitos con espículas regularmente espaciadas entre sí, sobre toda la superficie. Otro cambio morfológico es la formación de estomatocitos, o eritrocitos con forma de taza, que presentan plegamientos internos de la membrana. Ambas transformaciones involucran un número determinado de etapas reversibles, con diferentes alteraciones morfológicas para finalmente sufrir hemólisis. Se cree que los anfífilos que actúan como agentes equinocitogénicos afectan principalmente la monocapa externa, mientras que los compuestos anfífilos que actúan como agentes estomatocitogénicos afectan principalmente las propiedades de la monocapa interna [52,53].

Para conocer las propiedades solubilizantes de la miristil sacarosa *in vivo*, se realizaron experimentos con eritrocitos humanos obtenidos en el Champaign County Blood Bank, Regional Health Center, a partir de muestras de individuos saludables. Las muestras fueron almacenadas a 4° C y utilizadas el mismo día o al día siguiente después de colectadas. Los eritrocitos se aislaron por centrifugación, y posteriormente

fueron resuspendidos en tampón PBS (10 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH = 7.5 conteniendo 147 mM NaCl y 3 mM KCl). La incubación con MMS fue realizada suspendiendo los eritrocitos en el tampón con diferentes concentraciones de detergente (hematocrito final de 5% vol/vol) durante 2 horas a 37° C. Luego de la incubación, las muestras fueron lavadas tres veces con tampón y se preparó una dilución en PBS con un hematocrito final al 0.2% y concentración 1 uM de Laurdan para las medidas de GP. El proceso fue seguido por microscopía bifotónica a 37° C.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSION.

### 4.1 Caracterización de los sistemas lipídicos. Efecto del radio de curvatura

El efecto de la presencia de colesterol y MMS en la bicapa fue monitoreado siguiendo las variaciones de GP, usando vesículas de diferentes tamaños y concentraciones de éster y colesterol crecientes. El rango de trabajo para el colesterol fue desde 0% hasta por lo menos un 30% en moles, siendo esta última la concentración promedio en la mayoría de las membranas biológicas. En el caso del éster de sacarosa, el rango de trabajo se estimó considerando valores reportados en la literatura [29], por sobre y bajo la razón de saturación superficial. Todas las experiencias se realizaron a temperatura ambiente (25° C) y temperatura biológica (37° C). En la Tabla 1 se muestran los datos obtenidos para liposomas de POPC de diferente tamaño, en presencia de una cantidad definida de miristil sacarosa (10%) y cantidades variables de colesterol:

**Tabla 1.** Parámetro de Polarización Generalizada para liposomas de POPC de diferente tamaño y composición, con un porcentaje fijo de éster de sacarosa (10% mol MMS). Los valores informados para SUVs y EUVs corresponden al GP corregido. (Medidas referidas a GP del Laurdan en DMSO).

~% mol colesterol	SUV		EUV (400nm)		GUV	
	25°C	37°C	25°C	37°C	25°C	37°C
0	0,0132	-0,1030	0,0610	-0,0549	0,0995	0,0316
10	0,1596	0,0147	0,1999	-0,0364	0,1107	-0,0242
20	0,2779	0,1371	0,2719	0,1548	0,2104	0,1180
30	0,4352	0,3359	0,4493	0,3279	0,3573	0,2755
45	0,5086	0,4159	-	-	0,357	0,2961

La tabla anterior permite observar el efecto de la presencia de colesterol y el tamaño de los liposomas, sobre el ambiente que sensa el Laurdan. Cambios en el primer decimal en los valores de GP fueron considerados como cambios significativos, de lo contrario, se consideró que el microentorno de la sonda era equivalente.

En principio, podría esperarse que la curvatura de la membrana afecte propiedades tales como la permeabilidad y el orden molecular, tanto lateral como a través de la bicapa, pudiendo inducir la formación de microdominios. En consecuencia, es importante establecer que los cambios en la fluidez de la membrana se deben sólo a cambios en la composición, sin participación o efecto del radio de curvatura. En la Tabla 1 es posible apreciar que a bajas concentraciones de colesterol los valores de GP son independientes del tamaño del liposoma, como consecuencia, podría establecerse que las diferencias en el radio de curvatura no afectan de manera importante la estructuración de la membrana y probablemente tampoco su fluidez.

A mayores concentraciones de colesterol (>30%), se observan diferencias importantes en los valores de GP, que podrían asociarse a cambios en la distribución del colesterol a través de la membrana, en este punto dependientes del radio de curvatura [54,55]. Se ha reportado que a bajas concentraciones de colesterol (<5%) también existe una relación directa entre la curvatura de la bicapa y la distribución del colesterol [56]. En el desarrollo de este trabajo se utilizaron composiciones por sobre dicho límite y por debajo de las altas composiciones a las que empiezan a verse diferencias importantes. Los datos de la Tabla 1 han sido graficados en la Figura 11, en donde puede apreciarse claramente el rango de composiciones intermedias de colesterol donde el efecto del tamaño del liposoma (curvatura) no es significativo, mientras que a bajas y altas composiciones es observable el efecto reportado en la literatura. En presencia de éster de sacarosa el comportamiento es cualitativamente equivalente al descrito para sistemas binarios colesterol-fosfolípido. En resumen, los resultados obtenidos permiten señalar que en el rango de concentraciones estudiado, las diferencias de tamaño no provocan efectos detectables por la sonda empleada. Por esta razón, las experiencias realizadas en liposomas pequeños y liposomas gigantes se consideraron comparables y equivalentes. La coincidencia en los valores obtenidos para liposomas gigantes y liposomas sonicados de POPC, confirma la hipótesis antes planteada.



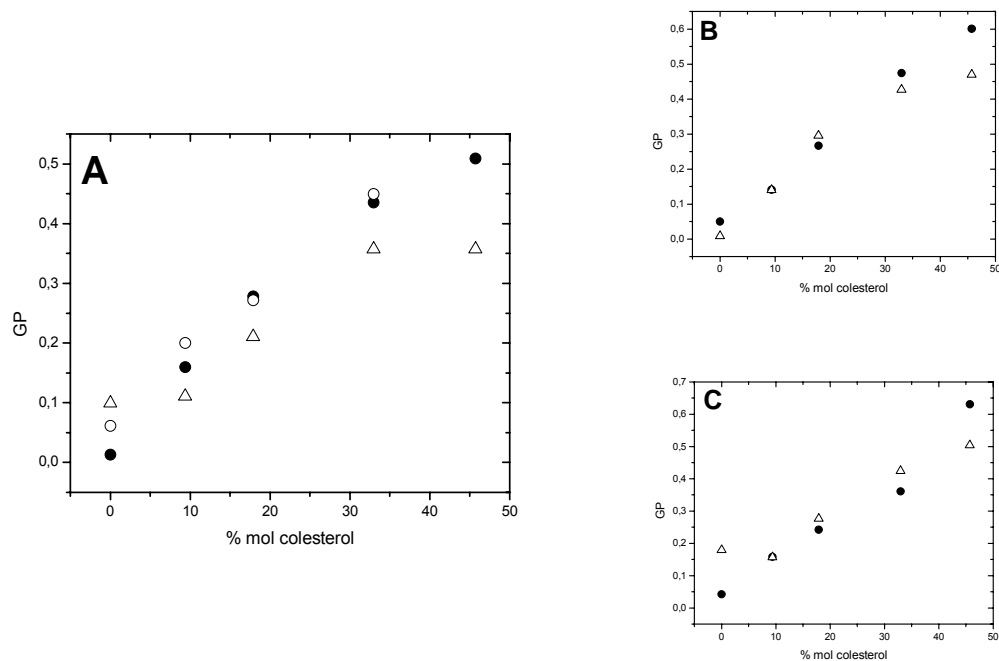


Figura 11. (A) Comparación del comportamiento de liposomas de POPC pequeños (●), extruídos (○) y gigantes (△) con un 10% mol MMS, a 25°C. (B y C) Comparación entre liposomas de POPC pequeños y gigantes con un 20% mol MMS (B) y un 30% mol MMS (C) a 25°C.  $[lip]_{TOT} = 1 \text{ mM}$ .

#### 4.1.1 Comportamiento de la bicapas de POPC y DODAC frente a la presencia colesterol.

La influencia del colesterol sobre las propiedades físicas de bicapas de fosfolípidos ha sido ampliamente estudiada [41,54,57-60]. Los esteroides juegan un papel crucial a nivel regulatorio y estructural en la organización lateral de las membranas celulares [61]. Los cambios inducidos por esta molécula se manifiestan afectando propiedades de la bicapa tales como la rigidez, la fluidez, el espesor y las temperaturas de transición de fase, además de suprimir la pretransición y disminuir el grado de plegamiento de las cadenas en el estado gel [62,63]. Los efectos mencionados se explican en su mayoría por la influencia del colesterol sobre el orden y

la conformación de las moléculas de fosfolípido, observándose como consecuencia variaciones importantes en los equilibrios de fase del sistema [64].

El colesterol es una molécula con un grupo polar (-OH) pequeño comparado con la gran porción hidrofóbica, rígida y plana, compuesta por anillos y una pequeña cola que termina en dos grupos metilenos (Figura 2). Puesto que el grupo hidroxilo no es lo suficientemente grande como para aislar por sí mismo al cuerpo hidrofóbico del agua presente, la molécula de colesterol se ubicará bajo las cabezas polares de los fosfolípidos de la bicapa, de modo de minimizar las interacciones entre la porción hidrofóbica y el medio acuoso, modelo conocido como “Modelo Sombrilla” [65]. Este modelo involucra la existencia de interacciones atractivas entre el colesterol y las moléculas de lípido, y de interacciones repulsivas entre moléculas de colesterol. Por otro lado, la presencia y posición de las moléculas de colesterol limitará el movimiento de las cadenas hidrocarbonadas, ocasionando una disminución en la entropía del sistema. De acuerdo a este modelo, el balance entre la disminución de entropía y la existencia de interacciones atractivas, será determinante en el comportamiento de la mezcla colesterol-fosfolípido. Finalmente, si la concentración de colesterol aumenta, la capacidad de recubrimiento de las moléculas de lípido podría llegar a ser insuficiente, saturándose la membrana y produciéndose la salida de colesterol. Este punto correspondería a la máxima solubilidad del colesterol en la bicapa [65].

El estudio de las interacciones entre fosfatidilcolinas y colesterol en bicapas ha permitido obtener, a partir de datos experimentales e investigaciones teóricas [62,66], diagramas de fase detallados en donde destaca la existencia de una región bifásica que limita por ambos lados con regiones monofásicas (véase Figura 12). Una de estas regiones, existente a bajas concentraciones de colesterol, se denomina líquido-desordenada ( $l_d$ ), mientras que la otra, presente a altos contenidos de colesterol, se conoce como líquido-ordenada ( $l_o$ ). Ambas fases exhiben un rápido movimiento rotacional y traslacional característico del estado líquido-cristalino, pero en la fase  $l_o$  las cadenas hidrocarbonadas presentan un grado de orden similar al estado gel (conformación *trans*). La similitud entre los diagramas obtenidos en base a datos experimentales y en base a modelos teóricos, para mezclas con colesterol y otros

fosfolípidos (en base a fosfatidilcolinas), que difieren entre sí tanto en el grupo polar como en la cadenas hidrocarbonadas, permite generalizar el comportamiento de los sistemas fosfatidilcolina-colesterol [67] utilizando un diagrama de fases obtenido para el sistema DPPC-colesterol [62].

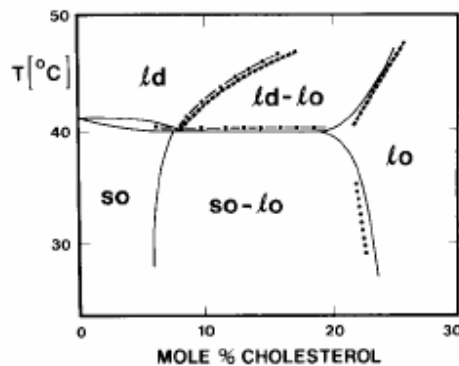


Figura 12. Diagrama de fases experimental para el sistema DPPC-colesterol [68].

A bajas concentraciones, el colesterol presenta prácticamente el mismo grado de solubilidad tanto en la fase sólida (so) como en la fase líquido-desordenada (ld). En cambio, a altas concentraciones de colesterol, la existencia del estado líquido se ve favorecida incluso a temperaturas mas bajas que  $T_m$ , dando origen a la fase denominada  $l_o$ . Sin duda, una de las características que más llama la atención es la existencia de una zona de inmiscibilidad de fases líquidas por sobre la temperatura de transición de fase, que puede entenderse como la coexistencia de una fase rica en lípido (con un alto desorden en sus cadenas hidrocarbonadas) correspondiente a la fase  $l_d$ , y una fase rica en colesterol que incrementa el orden de las cadenas ( $l_o$ ). Este último comportamiento es el que se asocia a la existencia de dominios ricos en colesterol, lípidos saturados y proteínas, distribuidos en la membrana celular [61].

En la Figura 13 se puede observar el efecto del aumento de colesterol en los sistemas estudiados. A las temperaturas de trabajo y en ausencia de colesterol el sistema se encuentra en estado fluido, pues la temperatura de transición,  $T_m$ , del POPC es  $-2^\circ \text{C}$ . La Figura 13A muestra la variación del GP de liposomas de POPC frente al aumento de la concentración de colesterol a dos temperaturas,  $25^\circ \text{C}$  y  $37^\circ \text{C}$ .

Se observa un aumento del valor de GP con el aumento de colesterol, pero no discontinuidades que permitan inferir sobre la existencia de cambios significativos en el comportamiento del sistema, por lo tanto es posible asumir que el aumento en la concentración de colesterol en el rango de trabajo estudiado no altera el estado físico de la membrana de POPC. A ambas temperaturas, especialmente a 25°C, se observa que la fluidez (valores de GP) no depende linealmente con la concentración de colesterol, observándose muy poca dependencia alrededor de un 45% del esterol. Este punto podría interpretarse como un valor crítico en la solubilidad del colesterol en este tipo de membrana a esta temperatura. El valor anterior es similar al reportado para la saturación con colesterol de membranas de dioleoilfosfatidilcolina [65].

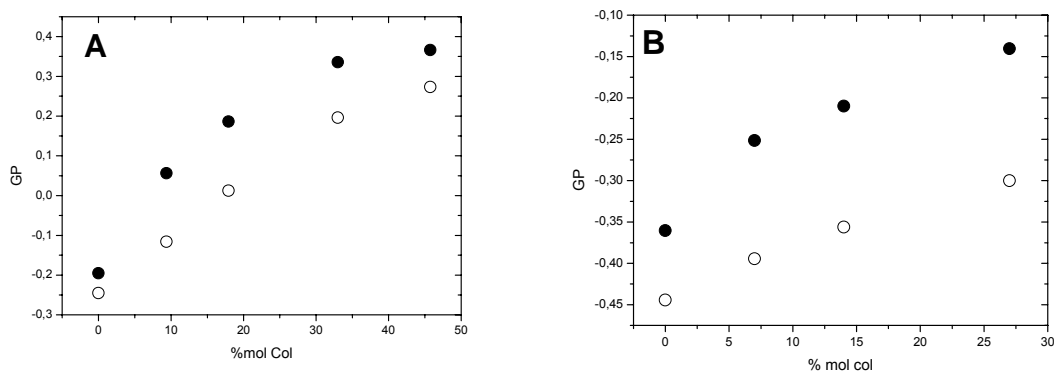


Figura 13. (A) Curva de calibración para SUV de POPC a 25° C (●) y 37° C (○). (B) Curva de calibración para SUV de DODAC a 25° C (●) y 40° C (○).  $[\text{líp}]_{\text{TOT}} = 1\text{mM}$ .

En el caso de las vesículas de DODAC (Figura 13B), el aumento de colesterol presente también es acompañado de un aumento del valor de GP. La presencia creciente de colesterol no genera la aparición de discontinuidades en el comportamiento de GP, descartándose la existencia de cambios importantes en el estado físico de las membranas, por lo menos en el rango de trabajo.

A diferencia del sistema POPC, la  $T_m$  del DODAC es de 38° C, por lo tanto la curva a 25° C corresponde al sistema en estado gel, mientras los datos a 40°C muestran el comportamiento en el estado líquido cristalino. A las dos temperaturas se observa un comportamiento similar con el aumento de colesterol.

La gran cantidad de estudios existentes para la mezcla de colesterol con fosfatidilcolinas y fosfolípidos en general, permite apoyar bibliográficamente muchas de las observaciones realizadas, pero en el caso de surfactantes catiónicos como el DODAC, la escasez de información hace difícil contrastar los resultados de este trabajo, requiriéndose un estudio mucho más detallado para conocer este sistema.

Las curvas de GP en función de concentraciones de colesterol muestran que la presencia de este compuesto afecta más a los liposomas de POPC (Figura 13) que a las vesículas de DODAC (en el caso del POPC se observa un  $\Delta GP$  de 0,6, mientras que para el DODAC éste es sólo de 0,15). El comportamiento observado en el caso del POPC puede ser racionalizado de acuerdo a lo propuesto en la literatura. Cuando el fosfolípido se encuentra en estado líquido-cristalino, la velocidad de relajación dipolar del Laurdan no es despreciable y el efecto del colesterol se acentúa, disminuyéndola y provocando un desplazamiento espectral hipsocrómico que se refleja en un mayor valor de GP. En este estado, la incorporación de colesterol limita la capacidad de movimiento de las moléculas de agua presentes a nivel de la porción fluorescente de la sonda, sin que haya una disminución en la concentración de éstas. Por otra parte, en la fase gel la velocidad de relajación dipolar es baja (es posible aislar las variaciones originadas por cambios en la polaridad del ambiente) y el desplazamiento hipsocrómico producido por la adición de colesterol se asocia a una disminución en la polaridad, es decir, disminuye el número de moléculas de agua presentes en los alrededores de la sonda. Este último comportamiento es concordante con estudios que revelan una disminución en la hidratación de la bicapa en presencia de colesterol [64]. A partir de las variaciones espectrales anteriormente descritas, es posible hablar de una disminución en la fluidez o rigidización de la membrana como consecuencia de la adición de colesterol, válida tanto para POPC como para DODAC.

#### **4.1.2 Comportamiento de las bicapas DODAC-Colesterol y POPC-Colesterol frente a la presencia de éster de sacarosa.**

El estudio de las interacciones entre surfactantes y membranas a menudo se centra en el proceso de solubilización, el cual consiste en la transformación de vesículas en micelas mixtas, constituyendo una importante herramienta en la desintegración y/o reconstitución de biomembranas. Dicho proceso requiere que en el medio acuoso se alcancen concentraciones de detergente por sobre la concentración micelar crítica, una vez que se ha alcanzado el equilibrio de reparto entre la bicapa y el medio acuoso. Sin embargo, el estudio de estas interacciones a concentraciones subcríticas (antes de que se inicie el proceso de solubilización como tal) es también de especial importancia, pues existen numerosos agentes fisiológicamente activos que únicamente debido a su carácter anfipático presentan bioactividad. Se postula que la perturbación de la membrana celular ocasionada por la presencia de moléculas externas afecta ciertas funciones biológicas, por lo que el estudio del efecto de surfactantes principalmente sobre propiedades como la permeabilidad y la transición de fase, puede resultar muy útil en la comprensión de muchos mecanismos biológicos.

Al analizar la interacción de una molécula anfipática con la bicapa lipídica, es razonable asumir que la cabeza polar se sitúa en la superficie y la cadena hidrofóbica queda anclada intercalándose con las cadenas hidrocarbonadas de las moléculas de lípido. Esto ocasiona un aumento de la densidad de empaquetamiento en la zona hidrofóbica, teniendo como consecuencia final una disminución en la fluidez. En general, la presencia de carga eléctrica en el surfactante tiende a disminuir el efecto del incremento en la densidad de empaquetamiento debido a la interacción repulsiva con la cabeza zwitteriónica del fosfolípido. Se ha observado que surfactantes iónicos no tienen mayor incidencia en la fluidez de la membrana, lo que indicaría que las interacciones repulsivas en la superficie compensan el aumento en la densidad de empaquetamiento. Si el largo de la cadena de la molécula de surfactante aumenta, la magnitud de las interacciones repulsivas no será suficiente para compensar el aumento en la densidad, observándose finalmente una disminución en la fluidez de la bicapa.

Por otro lado, si se trata de membranas cargadas, el comportamiento variará dependiendo de la carga del surfactante [69].

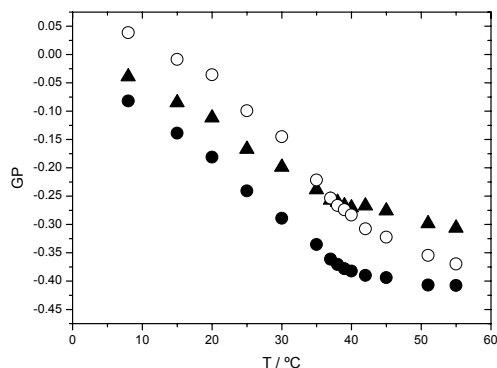


Figura 14. Efecto de la adición de colesterol y MMS sobre  $T_m$  de SUV de DODAC a (●) 14% mol col, (▲) 40% mol col y (○) 14% mol col-20% mol MMS.  $[\text{líp}]_{\text{TOT}} = 1\text{mM}$ .

El efecto de la presencia de surfactantes sobre la transición de fase muestra una respuesta diferente dependiendo de si los fosfolípidos son zwitteriónicos o presentan carga neta. Para el caso del DPPC, al graficar la relación entre la concentración de surfactante iónico y la temperatura de transición de fase, se observa que ésta disminuye linealmente con la concentración de surfactante y a su vez la pendiente aumenta con el incremento en el tamaño de la cadena alquílica del tensoactivo. Lo anterior también ha sido reportado para surfactantes no iónicos y sales catiónicas de trimetilamonio [70]. Junto con esto, el rango de transición entre una fase y otra también se ve afectado, dependiendo principalmente del grupo polar del surfactante [70]. Por otro lado, los fosfolípidos que presentan carga responderán dependiendo del balance entre las interacciones repulsivas frente a surfactantes iónicos. Para los surfactantes no iónicos de cadena corta, se ha reportado que  $T_m$  disminuye linealmente con el aumento en su concentración y la carga del fosfolípido no tiene mayor incidencia en la interacción. En términos termodinámicos, el descenso de  $T_m$  se produce por la disminución del potencial químico debido a la adición del surfactante a una fase pura. Si el reparto del surfactante en la fase liquido-cristalina es mayor que en la fase gel, la primera se estabilizará, con la consiguiente disminución de  $T_m$ . Ahora, si el reparto del surfactante en la fase gel es mayor, la  $T_m$  aumentará con la

concentración de tensoactivo, efecto que se ha reportado para surfactantes de cadena larga. En general, los surfactantes tienden a aumentar su afinidad por la fase gel a medida que el tamaño de su cadena se asemeja al largo de las cadenas de las moléculas de lípido, principalmente porque la diferencia entre las interacciones surfactante-lípido y lípido-lípido disminuye, facilitando la estabilidad de la mezcla [70].

En la Figura 14 se observa la dependencia de GP con la temperatura para vesículas pequeñas (SUV) de DODAC en presencia de diferentes proporciones de colesterol y MMS. La  $T_m$  reportada en la literatura para DODAC puro es 38° C [16] y la adición de colesterol no modifica notoriamente este valor, pero si se hace más difícil detectar un cambio en la pendiente a concentraciones mayores de colesterol (40%), probablemente por un efecto similar al observado en fosfatidilcolinas donde a altas concentraciones de colesterol ocurre la estabilización de la fase  $l_o$  y la supresión de  $T_m$  (Figura 13). También se puede apreciar en el gráfico que la presencia de MMS y colesterol produce efectos opuestos en cada fase, rigidizando la fase gel y fluidizando la líquida cristalina.

Dado el carácter no iónico del MMS, las interacciones repulsivas con la cabeza catiónica del DODAC no son consideradas. La escasa variación de  $T_m$  podría atribuirse a la presencia de colesterol en el sistema. Sin embargo, existen estudios de las interacciones entre MPS, éster de sacarosa derivado del ácido palmítico, y vesículas de DODAC que también muestran una variación despreciable en la temperatura de transición de fase, aunque sí se reporta una disminución en el rango de transición a medida que aumenta la concentración de surfactante [71]. Estos estudios sugieren lo que constituye la base de una de las hipótesis de este trabajo, que la voluminosa cabeza de los ésteres de sacarosa se sitúa en la interfase de las vesículas de DODAC, bloqueando la entrada de moléculas de agua y forzando una estructuración de las moléculas ya presentes en ella. Los datos mostrados a continuación comprueban dicha hipótesis:



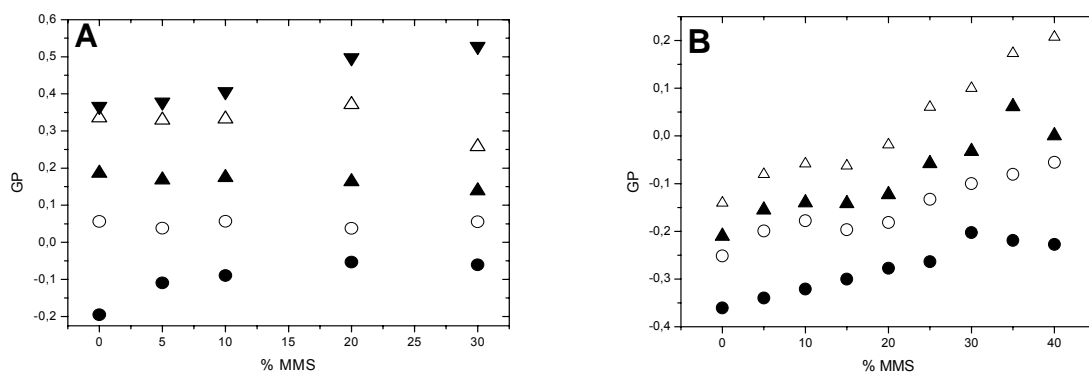


Figura 15. (A) Comportamiento de SUV de POPC en función de concentración de MMS a (●) 0%, (○) ~10%, (▲) ~20%, (Δ) ~30% y (▼) ~45% mol col. (B) Comportamiento de SUV de DODAC en función de la concentración de MMS a (●) 0%, (○) ~5%, (▲) ~15% y (Δ) ~30% mol col. Ambos gráficos a 25° C, [líp]<sub>TOT</sub> = 1mM.

La Figura 15 muestra los valores de GP para vesículas de POPC y DODAC en función de la concentración de éster, manteniendo fija la proporción de colesterol. La presencia simultánea de colesterol y MMS en las bicapas tiene efectos distintos para las vesículas de DODAC y POPC. En el gráfico A se observa que en el caso de liposomas de POPC, la presencia de éster de sacarosa, MMS, tiene relativamente poca influencia sobre los valores de GP. La curva que corresponde al comportamiento en ausencia de colesterol muestra un leve aumento en los valores de GP, es decir, existe una leve disminución de la fluidez o disminución de la concentración de moléculas de agua en los alrededores del Laurdan, probablemente por el aumento en la densidad de empaquetamiento debido a la adición de moléculas de MMS, lo que correspondería al comportamiento observado generalmente al trabajar a concentraciones sublícticas. Al agregar colesterol, este efecto se anula y los valores de GP se mantienen independientes de la cantidad de MMS presente. A altos contenidos de colesterol y MMS se observa una discontinuidad en el valor de GP a 30% mol de colesterol y un aumento a 45% mol. Este comportamiento podría tener su origen en el efecto rigidizante del colesterol (ya discutido), o en cambios estructurales de la bicapa. Considerando que el colesterol se sitúa entre las cadenas hidrocarbonadas del fosfolípido, su presencia impediría que el surfactante pueda anclarse en ese lugar.

Ambos argumentos han sido utilizados en estudios cinéticos de liberación de compuestos por acción de surfactantes desde vesículas de POPC, donde la adición de colesterol afecta marcadamente el comportamiento observado [72].

En el caso de las vesículas de DODAC (Figura 15B) el comportamiento es diferente. Se observa una clara disminución en la fluidez de la membrana, tanto con el aumento en la concentración de colesterol, como con el aumento en la concentración de MMS, observándose además discontinuidades en el comportamiento. La diferencia en la respuesta de la bicapa de DODAC frente al aumento de MMS, puede deberse a la disminución en las interacciones repulsivas entre los grupos amonio del DODAC originada por la presencia de la voluminosa cabeza del éster de sacarosa. Esta estabilización favorecería la integración de MMS en la membrana, superando los impedimentos estructurales ocasionados por la presencia de colesterol, incrementando así la densidad de empaquetamiento de la zona hidrofóbica donde se ubica la sonda fluorescente, lo que se traduce finalmente en el aumento en los valores de GP observado.

#### **4.2 Cinéticas de extracción de colesterol desde bicapas.**

Como se mencionó anteriormente, la presencia de colesterol en las membranas celulares cumple un número importante de funciones biológicas, por ello existen variados mecanismos para regular su contenido. El exceso de colesterol en determinadas células del organismo puede ser liberado a través de moléculasceptoras de colesterol como las HDL o apolipoproteínas como la A-1 [44]. Las ciclodextrinas son habitualmente utilizadas como agentes transportadores de colesterol en estudios de laboratorio, dado que interactúan (a bajas concentraciones) con la membrana sin provocar alteraciones, a diferencia de otros compuestos como los surfactantes, que pueden llegar a solubilizarlas [44]. Se han propuesto dos mecanismos a través de los cuales las ciclodextrinas pueden extraer el colesterol desde membranas lipídicas: uno de ellos involucra la extracción de colesterol desde la membrana y su posterior retención en el medio extracelular, actuando como depósitos

de colesterol. La otra posibilidad es que, a concentraciones lo suficientemente bajas como para no alterar el equilibrio neto entre las células y el medio, las ciclodextrinas remuevan el colesterol desde la membrana y posteriormente las liberen a otro aceptor, actuando simplemente como transportadores. Este último es el mecanismo que se ha propuesto para las HDL [44]. En ambos casos, la difusión del colesterol desde la membrana hasta la superficie y la colisión entre la membrana y la partícula aceptor (que permite finalmente la captura de colesterol), son factores determinantes de la velocidad de transferencia del colesterol.

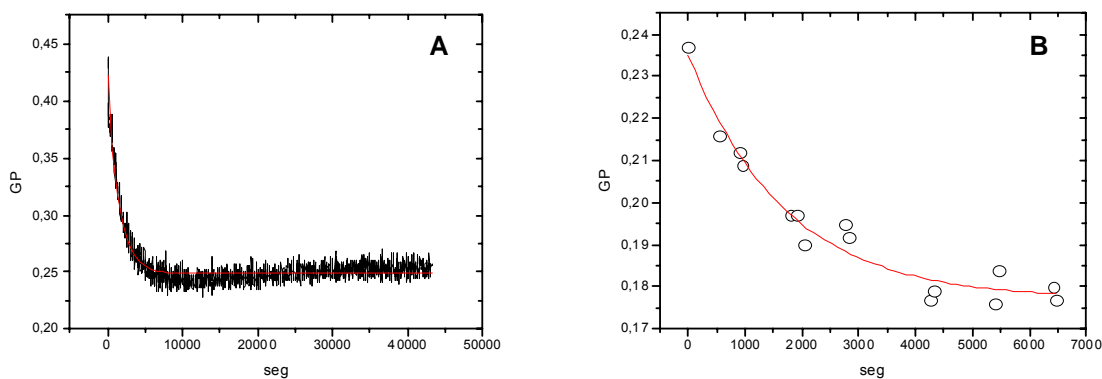


Figura 16. (A). Cinética de salida de colesterol para SUV de POPC, a 37° C seguida a través de espectrofluorescencia.  $[lip]_{TOT} = 0.2 \text{ mM}$ ,  $[βCd] = 1 \text{ mM}$ . (B). Cinética de salida de colesterol desde GUV de POPC a 37° C seguida mediante microscopía bifotónica.  $[lip]_{TOT} = 5,0 \text{ μM}$ ,  $[βCd] = 0,27 \text{ mM}$ . Ambos con un ~30% mol de colesterol.

En la Figura 16 se presentan cinéticas de extracción de colesterol realizadas en SUVs (Figura 16A) y GUVs (Figura 16B) de POPC con un ~30% mol de colesterol, a 37° C, utilizando  $β$ -ciclodextrina como aceptor y siguiendo la variación del GP del sistema en el tiempo. En ambos casos se observa un decaimiento monoexponencial, con constantes de velocidad de primer orden prácticamente iguales ( $6,3 \times 10^{-4}$  y  $5,9 \times 10^{-4} \text{ seg}^{-1}$  para SUV and GUV respectivamente). En todas las experiencias realizadas y en forma consistente, los valores de GP inicial resultaron mayores para las SUVs que para las GUVs, esta diferencia no afecta la calidad de los ajustes y el valor de las diferencias de GP ( $\Delta GP$ , ver Tabla 2) se mantiene constante, por ello es probable que el origen de esta diferencia sea de orden instrumental o de calibración.

Los cambios de GP que observamos fueron interpretados como la disminución de colesterol en la bicapa, producida por la extracción de éste por parte de las BCD. De acuerdo a la literatura, el colesterol abandona las membranas sintéticas siguiendo cinéticas de primer orden [73], lo que significa que existe un único *pool* con características similares, de donde éste se extrae. Este comportamiento es precisamente el que se observa, donde ambos sistemas se ajustan a una curva de decaimiento exponencial de primer orden. Reportes bibliográficos postulan la existencia de una dependencia entre la velocidad de transferencia de colesterol y la curvatura de la superficie de la bicapa [74]. Sin embargo, en este trabajo, los parámetros cinéticos obtenidos al ajustar las curvas tanto de vesículas pequeñas (alto radio de curvatura) como de vesículas gigantes (menor radio de curvatura) son del mismo orden, lo que permite descartar su influencia. Por lo tanto, para los sistemas sometidos a estudio en este trabajo, es posible proponer que no existe dependencia entre la velocidad de salida del colesterol y el tamaño del liposoma (radio de curvatura), cuando se emplean ciclodextrinas como molécula aceptora.

La Figura 17 muestra que la velocidad de salida de colesterol y la fracción de colesterol extraído, es función de la concentración de aceptor presente en el medio en el rango de 0,1 a 2,6  $\mu\text{M}$ . A concentraciones más altas, por ejemplo 6,5 mM (Figura 17A) tras el decaimiento inicial de primer orden, ocurre una nueva disminución de los valores de GP. La primera fluidización del sistema, asociada a la salida de colesterol de acuerdo a una cinética de primer orden, arrojó en todos los experimentos, parámetros cinéticos de la misma magnitud. Sin embargo, no resultó posible ajustar la segunda disminución en los valores de GP, observada cuando se trabaja a concentraciones de  $\beta\text{-Cd}$  más elevadas. Este comportamiento, podría racionalizarse en términos de un re-equilibrio de flip-flop, desde la bicapa interna más rica en colesterol hacia la externa desde donde ya se ha extraído el esterol. Existen estudios que demuestran que el flip-flop de colesterol es relativamente rápido por lo que la segunda disminución podría corresponder a la salida de colesterol presente en la bicapa interna [73], más aún considerando que el GP al final del proceso es levemente mayor que el de liposomas de POPC sin colesterol, a esa temperatura.

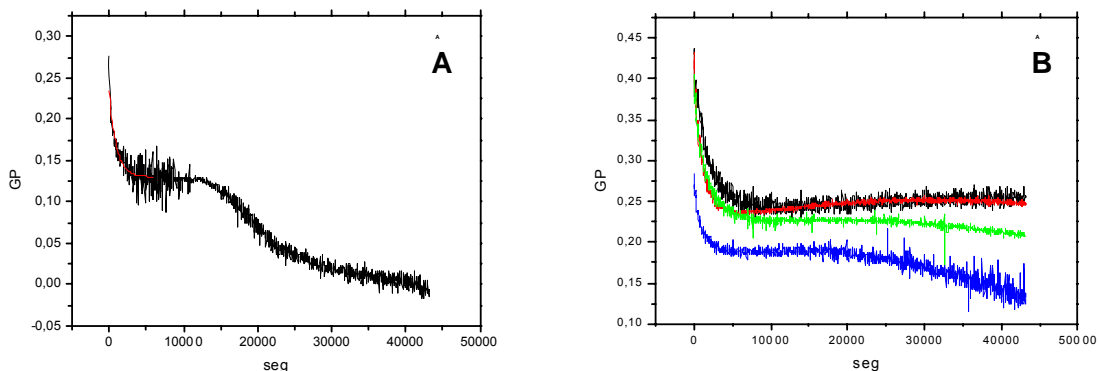


Figura 17. (A). Cinética de extracción de colesterol desde SUV de POPC.  $[lip]_{TOT} = 0,5 \text{ mM}$ ,  $[\beta\text{-Cd}] = 6,5 \text{ mM}$ ,  $\sim 30\%$  mol colesterol. (B). Efecto del aumento en la concentración de  $\beta\text{-Cd}$  sobre una solución  $0.2 \text{ mM}$  de POPC con  $\sim 30\%$  mol colesterol: (—)  $1 \text{ mM } \beta\text{-Cd}$ , (—)  $1,5 \text{ mM } \beta\text{-Cd}$ , (—)  $2,0 \text{ mM } \beta\text{-Cd}$  y (—)  $2,6 \text{ mM } \beta\text{-Cd}$ . Ambos experimentos seguidos por espectrofluorescencia a  $37^\circ \text{ C}$ .

Como ya se discutió en la Metodología, la presencia de sustituyentes en los grupos hidroxilo de las ciclodextrinas altera tanto su solubilidad como su capacidad de solubilizar moléculas hidrofóbicas. En este estudio de la velocidad de salida de colesterol desde vesículas gigantes, además de emplear  $\beta\text{-Cd}$  como aceptor, se utilizó la ciclodextrina metil sustituida ( $m\text{-}\beta\text{-Cd}$ ) y partículas de HDL.

Las experiencias para al sistema POPC:Colesterol muestran que las partículas de HDL y las  $\beta\text{-Cds}$  se comportan como aceptores de características cualitativamente similares, llegando a valores de GP parecidos, a pesar de las diferencias obvias entre las ciclodextrinas y las partículas de HDL. La  $m\text{-}\beta\text{-Cd}$  extrae el colesterol mucho más rápido, observándose casi un orden de magnitud de diferencia entre las constantes de velocidad en ausencia de MMS (Tabla 2). Como ya se ha dicho, las propiedades de las diferentes ciclodextrinas dependen fuertemente de la presencia de grupos sustituyentes: la presencia de grupos metilénicos, en particular, significa un aumento notable en la hidrofobicidad de la cavidad, aumentando la solubilidad de colesterol en su interior. Con respecto a la eficiencia en la extracción de colesterol, la diferencia anómala en los GP iniciales de las cinéticas para SUV de la misma composición, obligó a realizar comparaciones con respecto a la variación de fluidez del sistema (antes y

después de la interacción con el aceptor), en lugar de hablar en términos de porcentaje de colesterol liberado.

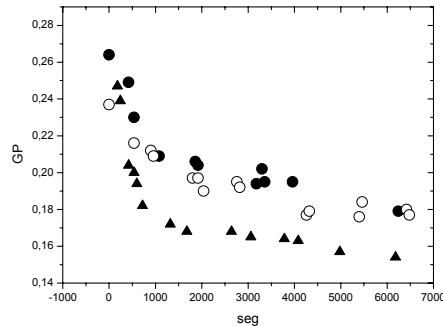


Figura 18. Cinéticas de salida de colesterol desde GUV de POPC con ~30% mol colesterol, a 37°C, seguidas por microscopía bifotónica. (●) HDL (0,35  $\mu$ M), (○)  $\beta$ -Cd (0,25 mM) y (▲) *m*- $\beta$ -Cd (0,25 mM). [GUV] = 5  $\mu$ M.

Las curvas que representan las cinéticas de extracción en ausencia de éster de sacarosa, no permiten establecer diferencias importantes entre los tres aceptores estudiados, a excepción de la velocidad de extracción observada en la *m*- $\beta$ -Cd. Los  $\Delta$ GP obtenidos indican que todos los aceptores extraen una cantidad similar de colesterol, pero debe considerarse que las partículas de HDL se encuentran a una concentración mil veces menor, indicando, como es natural, que cada partícula es capaz de extraer un número importante de moléculas de colesterol.

Las cinéticas de extracción de colesterol por los tres aceptores (HDL,  $\beta$ CD y mCD) fueron seguidas en presencia de MMS. Los estudios de transporte postulan que la extracción de colesterol desde la bicapa es un proceso difusional [73,75,76] donde la molécula en cuestión (colesterol) difunde a través de la membrana acercándose a la interfase, donde tiene lugar la colisión con el aceptor y la transferencia.[73] Al agregar MMS al sistema, se esperaba que la velocidad de salida de colesterol disminuyera proporcionalmente a la cantidad de surfactante presente en la bicapa, pues la presencia de éster de sacarosa en la superficie impediría la eventual extracción de las moléculas de colesterol que se aproximen a la superficie del liposoma.

En presencia de éster de sacarosa, los resultados obtenidos son diferentes para los tres tipos de aceptores. Para las partículas de HDL, se observa que la

velocidad disminuye en un orden de magnitud, pero no existe una dependencia lineal entre la constante de velocidad,  $k$  y la cantidad de éster presente. En el caso de la  $\beta$ -Cd, la constante de velocidad disminuye a la mitad con el primer agregado de MMS, pero no se observan más cambios al aumentar la concentración de éster, la constante de velocidad se mantiene prácticamente constante, indicando una posible saturación. Finalmente, cuando el aceptor es la  $m$ - $\beta$ Cd, la constante de velocidad disminuye significativamente al agregar el surfactante a los liposomas y continúa haciéndolo, en forma más moderada, a medida que aumenta la proporción de MMS. Estos resultados sugieren la existencia de interacciones específicas entre la superficie del liposoma y cada partícula o molécula aceptora, principalmente por el comportamiento similar entre HDL y  $\beta$ -Cd en ausencia de MMS, y la casi nula influencia observada posteriormente en  $\beta$ -Cd al agregar éster de sacarosa. Los resultados obtenidos son compatibles con la existencia de interacciones específicas de las cabezas de sacarosa del MMS con las especies aceptoras, lo que estaría indicando que en este caso es necesario el encuentro y colisión entre el liposoma y el aceptor, como ya ha sido propuesto en algunos estudios [73].

La diferencia entre el valor de GP cuando la cinética ha terminado y el valor inicial, ( $\Delta$ GP), es un índice de la cantidad de colesterol que se ha transferido al aceptor. Utilizando la Figura 17 como curva de calibración, se observa que en ausencia de MMS, la capacidad de remoción de colesterol sigue el orden  $m$ - $\beta$ -Cd > HDL >  $\beta$ -Cd. La presencia de MMS dificulta la remoción por HDL, mientras que en el caso de las ciclodextrinas se observa a algunas concentraciones un efecto facilitador, especialmente cuando el agente aceptor es  $m$ - $\beta$ -Cd. A esa misma concentración de MMS, en el caso de las partículas de HDL, parece haber incluso una leve reducción de la capacidad de remoción de colesterol, situación que estaría indicando claramente una diferencia importante en los mecanismos de extracción de partículas y ciclodextrinas. Probablemente la presencia de las cabezas de sacarosa dificulta el anclaje de las partículas de HDL sobre la superficie del liposoma limitando así su capacidad. La formación de puentes de hidrógeno entre la ciclodextrina y la sacarosa podría explicar las diferencias observadas entre la ciclodextrina y el derivado metil sustituido. Suponiendo que el comportamiento de los liposomas pequeños es extrapolable a los

gigantes, en la Figura 15A, puede observarse que cuando las mezclas POPC:Col:MMS tienen un 30% de colesterol hay un quiebre en los valores de GP, es posible que dicha discontinuidad comience alrededor de un 10% de MMS, y podría ser responsable del aumento de la capacidad de remoción por las ciclodextrinas y de la leve disminución de las partículas de HDL.

**Tabla 2.** Parámetros cinéticos obtenidos para los diferentes sistemas estudiados. GUVs de POPC con ~30% mol colesterol inicial. Datos evaluados a 37° C.

	% mol MMS	HDL	$\beta$ -Cd	<i>m</i> - $\beta$ -Cd
<b>k (seg<sup>-1</sup>)</b>	0	$8,979 \times 10^{-4}$	$5,872 \times 10^{-4}$	$2,475 \times 10^{-3}$
	5	$2,297 \times 10^{-4}$	$2,356 \times 10^{-4}$	$6,354 \times 10^{-4}$
	10	$8,605 \times 10^{-4}$	$2,147 \times 10^{-4}$	$4,156 \times 10^{-4}$
	20	$8,647 \times 10^{-5}$	$2,369 \times 10^{-4}$	-
<b><math>\Delta</math>GP (%col final)</b>	0	0,074 (20,0%)	0,058 (22,6%)	0,087 (18,0%)
	5	0,102 (25,0%)	0,091(25,0%)	0,174(20,0%)
	10	0,042 (27,0%)	0,137(20,0%)	0,300(11,0%)
	20	0,107 (25,0%)	0,076(25,0%)	-

Como se comentó en el inicio de esta sección, la fotofísica del Laurdan es muy dependiente de la presencia o ausencia de colesterol. La disminución en el valor de GP de las vesículas de POPC observada en las cinéticas de extracción, es acompañada por un aumento importante en las intensidades a 440 y 490 nm, como puede observarse en la Figura 19, probablemente debido a los cambios en el entorno que afectan directamente el rendimiento cuántico de la sonda.



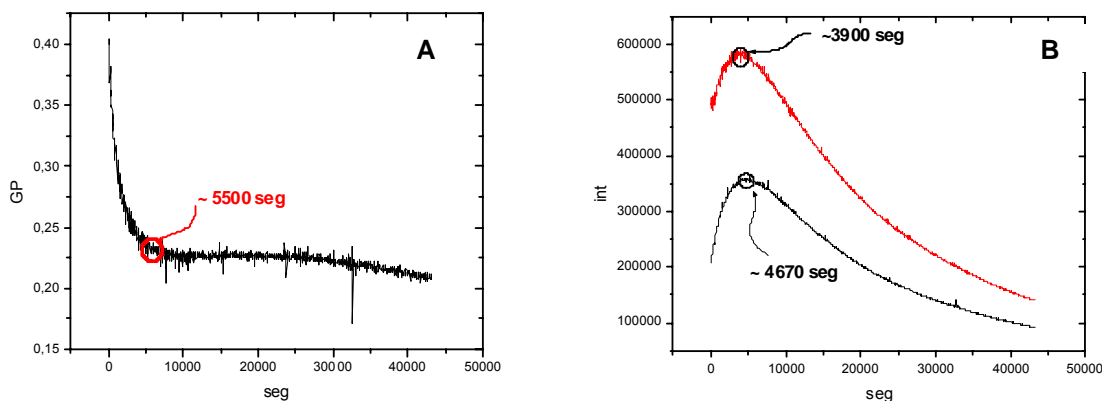


Figura 19. (A). Cinéticas de salida de colesterol desde SUV de POPC con ~30% mol de colesterol, a 37°C, seguidas por espectrofluorescencia. (B). Intensidades a 440 nm (—) y a 490 nm (—) en la misma experiencia.

Las experiencias cinéticas con vesículas de DODAC, buscaban detectar diferencias en la capacidad extractiva de los agentes aceptores al agregar cantidades de MMS por debajo y por encima de la concentración de saturación superficial de la bicapa. Sin embargo, no fue posible observar decaimientos exponenciales en los valores de GP. Al agregar el agente aceptor al sistema, el valor de GP experimenta un aumento importante, independiente de las condiciones iniciales (Figura 20). Además del aumento de los valores de GP, (que indican menor presencia de agua en las inmediaciones de la sonda) se detectó un incremento en la opalescencia de las soluciones, (la dispersión de luz crece significativamente en el tiempo al agregar  $\beta$ -Cd al sistema, Figura 20D). A través de experiencias de fluorescencia, se verificó la ausencia de interacciones entre las vesículas de DODAC y ciclodextrina, en ausencia de colesterol y se descartó la migración de la sonda desde la bicapa al aceptor. El comportamiento señalado no permitió estudiar la cinética de extracción de colesterol en estos sistemas.

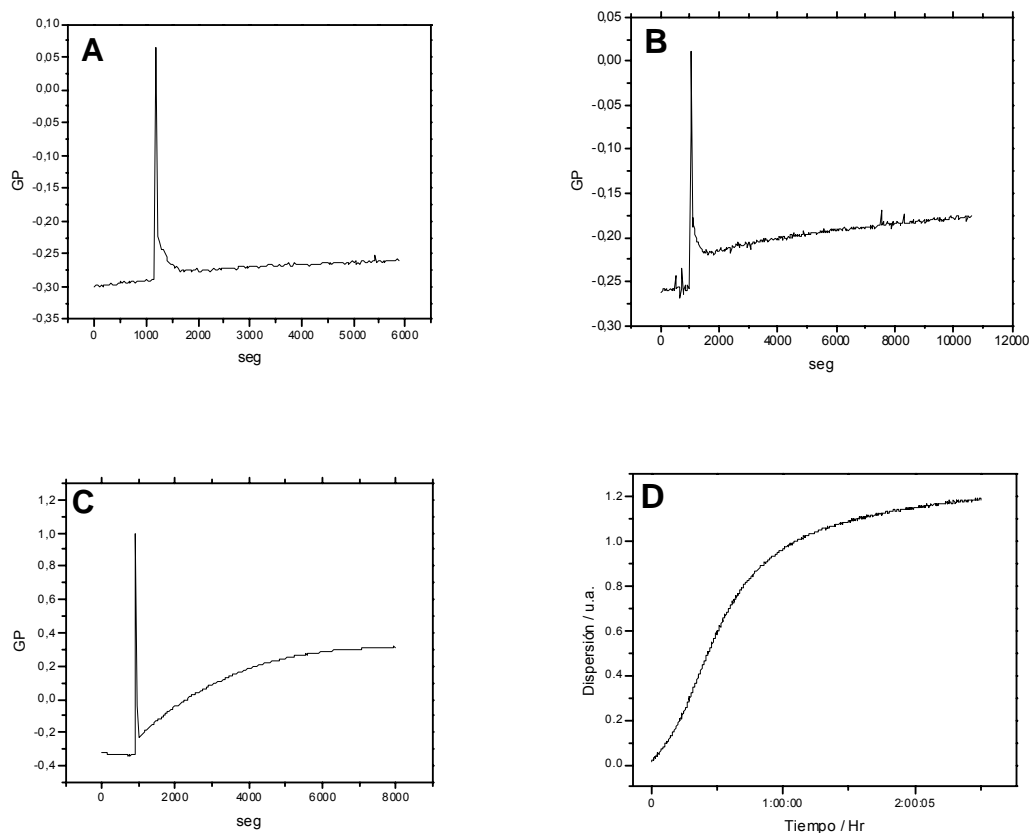


Figura 20. Cinéticas para SUV de DODAC seguidas por espectrofluorescencia, a 40°C. (A) [DODAC] = 0,25 mM, ~ 30% mol colesterol, [βCd] = 1 mM; (B) [DODAC] = 0,2 mM, ~ 30% mol colesterol, [βCd] = 4.4 mM; (C) [DODAC] = 0.2 mM, ~ 15% mol colesterol, [βCd] = 13,2 mM; (D) dispersión seguida por UV a 40°C, [DODAC] = 0,2 mM, ~ 5% mol colesterol, [βCd] = 13 mM.

### 4.3 Solubilización de liposomas.

La transformación de estructuras lamelares en micelas mixtas originada por la presencia de compuestos anfífilicos, se ha descrito a través de un mecanismo de tres etapas [50]. En la etapa inicial, a concentraciones de surfactante menores que su cmc, la integración de las moléculas de detergente en la bicapa produce alteraciones de sus características, acompañada habitualmente por un incremento en el tamaño de los agregados que se traduce en un aumento en la turbidez de la solución. Cuando la bicapa se satura, comienzan a formarse estructuras mixtas (micelas compuestas por

lípidos y detergente), coexistiendo con las estructuras lamelares (liposomas o bicapas abiertas). La posterior adición de surfactante produce una disminución importante en la turbidez de la solución, hasta llegar a la completa disolución de los liposomas y teniendo únicamente micelas mixtas presentes en el sistema. En este trabajo, el proceso de solubilización fue estudiado siguiendo los cambios de GP del Laurdan a medida que la concentración de miristil sacarosa se incrementa.

La Figura 21 muestra el efecto de MMS sobre los valores de GP en los sistemas estudiados, POPC y DODAC. En términos generales se observa una disminución inicial de la fluidez o acceso del agua (aumento en los valores de GP). Este comportamiento alcanza un valor máximo, para posteriormente aumentar la fluidez (las micelas mixtas permiten el acceso más fácil del agua al entorno de la sonda, con la consiguiente disminución de los valores de GP), hasta alcanzar un valor constante de GP, tendiente al de micelas de surfactante puro. La etapa inicial del proceso de solubilización muestra que el comportamiento de las vesículas de DODAC es diferente al de los liposomas de POPC, como se observa en la Figura 21A:

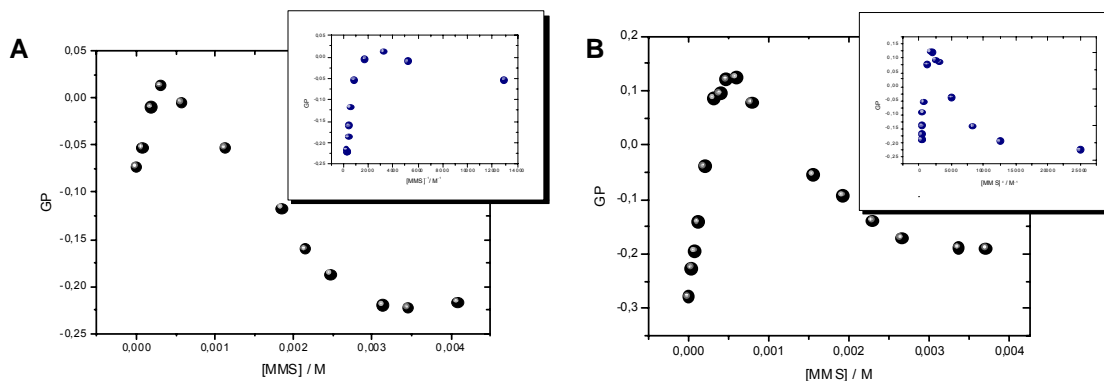


Figura 21. (A). Variación de GP en función de la concentración de MMS en SUV de POPC en ausencia de colesterol, seguida por espectrofluorescencia. [POPC] = 0.4 mM, 25°C. (B). Variación de GP en función de la concentración de MMS en SUV de DODAC con ~5% mol colesterol, seguida por espectrofluorescencia. [DODAC] = 0.4 mM, 25° C. Los gráficos insertos en la esquina superior corresponden a la variación de GP en función del inverso de la concentración de MMS, en ambos casos.

El aumento inicial en los valores de GP se debe a la incorporación del surfactante, que provoca el aumento de la densidad de empaquetamiento. La presencia de los grupos sacarosa en la superficie de la bicapa bloquea el acceso de

moléculas de agua, con la consiguiente disminución de la fluidez en los alrededores de la sonda.

El efecto del MMS sobre los liposomas de POPC es mucho menos importante que en el caso de vesículas de DODAC; la saturación de la bicapa es mucho más lenta en este último caso, y los cambios en la fluidez (asociados al cambio de GP) son sustancialmente mayores, en el mismo rango de concentraciones de MMS. La menor variación de GP observada para los liposomas de POPC, podría deberse a que los grupos de sacarosa en este caso se encuentran parcialmente inmersas entre las cabezas zwitteriónicas, con menor posibilidad de interactuar y formar puentes de hidrógeno.

En el caso particular del DODAC, el cambio inicial del valor de GP podría implicar más que un aumento en la densidad de empaquetamiento, reorganizaciones estructurales en la superficie de las vesículas. Estos cambios quedan en evidencia al graficar el parámetro GP contra el inverso de la concentración de surfactante (inserto en Figura 21A). El quiebre observado a bajas concentraciones de surfactante, da cuenta de la existencia de un parámetro adicional a los parámetros de solubilización normalmente evaluados, y corresponde a la razón de saturación superficial o  $R_e^{ss}$ , reportado previamente para la interacción entre vesículas de DODAC y el monoéster de sacarosa derivado del ácido palmítico [71].

Además de evaluar los parámetros de solubilización, se estudió la influencia de la presencia de concentraciones crecientes de colesterol en el proceso de solubilización de ambos sistemas. De acuerdo a la literatura el colesterol aumenta la estabilidad de los liposomas frente a surfactantes debido al aumento en la rigidez de la bicapa [46], hecho que también se pudo verificar al evaluar las cinéticas de solubilización por medidas de dispersión de luz (Figura 22). A medida que aumenta la concentración de colesterol disminuye la velocidad de solubilización. Además, se observa un aumento de la absorbancia inicial para luego disminuir en forma importante y sostenida.

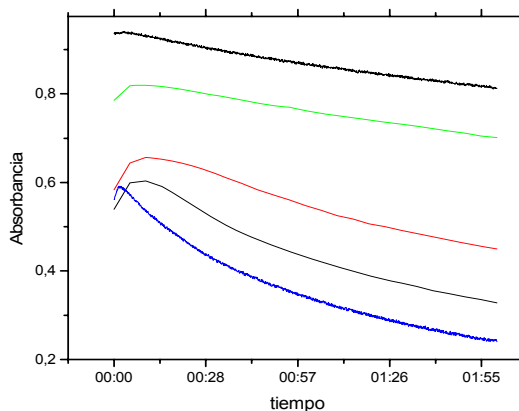


Figura 22. Solubilización de SUV de POPC seguida por absorción UV a 400 nm, a 25°C.  $[\text{líp}]_T = 0.2 \text{ mM}$ ,  $[\text{MMS}] = 1.4 \text{ mM}$ . (—) 0 %, (—) ~10%, (—) ~20%, (—) ~30% y (—) ~45% mol colesterol.

El aumento inicial en la dispersión concuerda con las observaciones hechas en otros estudios, que indican un aumento de tamaño al inicio del proceso de solubilización, observado principalmente en SUV. Este fenómeno se hace más significativo a concentraciones intermedias de colesterol para luego volverse menos importante a concentraciones más altas. La incorporación de moléculas de surfactante, por lo tanto, ocasiona importantes cambios morfológicos que han sido interpretados principalmente a través de un mecanismo de fusión de vesículas [70].

Otra observación importante es la diferencia que existe en la variación de GP antes de la saturación, a medida que se aumenta la cantidad de colesterol en el sistema. Con un ~30% mol de colesterol (Figura 23), en el caso de POPC, la curva de solubilización cambia sustancialmente con respecto a la curva en ausencia de colesterol (Figura 21), siendo cada vez menor la concentración de saturación, a medida que aumenta el contenido de colesterol. En cambio, en el caso de las vesículas de DODAC, el comportamiento frente al proceso de solubilización es poco dependiente de la cantidad de colesterol presente, es decir, los cambios estructurales observados en ausencia de colesterol no son alterados por la presencia del mismo.

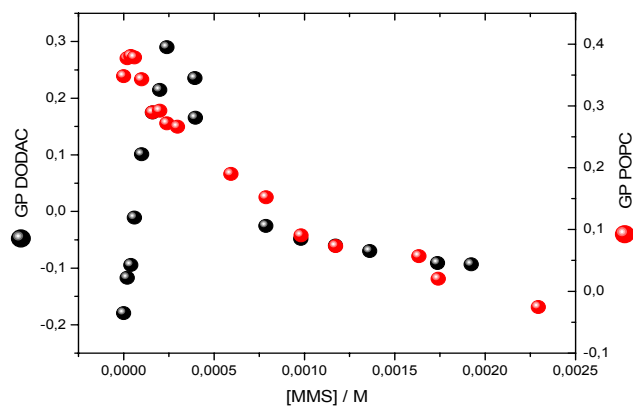


Figura 23. Solubilización de SUV de POPC y DODAC seguida por espectrofluorescencia.  $[\text{líp}]_T = 0.2 \text{ mM}$ ,  $\sim 30\%$  mol colesterol,  $25^\circ \text{ C}$ .

En general, todos los sistemas sometidos a estudio se ajustaron adecuadamente al modelo de tres etapas planteado por Lichtenberg [50] descrito al inicio de esta Sección. Los parámetros del proceso de solubilización se obtuvieron a partir de la relación lineal entre la concentración de lípidos y los valores de parámetros críticos de saturación y solubilización (Ec. 4 y Figura 24). Los interceptos resultaron ser del orden de la cmc del surfactante, como lo plantea el modelo. Sin embargo, en el caso del POPC a altas concentraciones de colesterol, los cambios observados en la zona de saturación dificultaron la estimación de dichos parámetros, imposibilitando su determinación. En el caso de la solubilización de vesículas de DODAC, los parámetros críticos de solubilización a altas proporciones de colesterol, no fueron determinados pues no se alcanzaron las concentraciones de MMS requeridas para solubilizar completamente la bicapa.

Los parámetros de solubilización obtenidos para vesículas pequeñas, SUVs, utilizando medidas de fluorescencia, se presentan en las tablas 3 y 4. Los datos presentados para DODAC en ausencia de colesterol fueron obtenidos de trabajos previos [51].

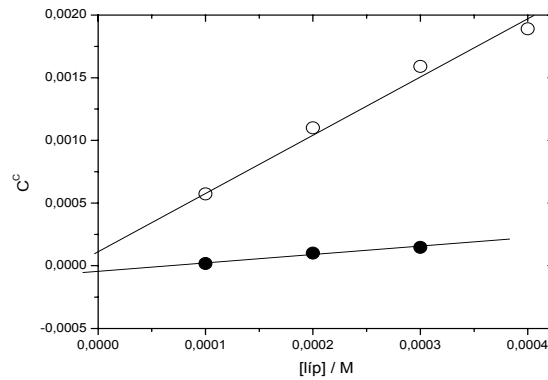


Figura 24. Determinación de  $R_e^{sat}$  y  $R_e^{sol}$  para SUV de POPC con ~20% mol colesterol a 25° C, de acuerdo a la Ec. (4). (•)  $C_{sat}^C$  y (○)  $C_{sol}^C$ .

**Tabla 3.** Parámetros obtenidos para la solubilización de SUV de DODAC a 25° C. (n.d. no determinado)

<b>DODAC</b>						
<b>~% mol colesterol</b>	<b>Saturación Superficial</b>		<b>Saturación</b>		<b>Solubilización</b>	
	Re	K	Re	K	Re	K
0	0,22	4508	1,12	13208	6,68	21745
5	0,29	5620	0,92	11979	6,93	21847
15	0,45	7759	1,36	14407	4,74	20645
30	0,31	5916	0,98	12374	n.d.	n.d.

**Tabla 4.** Parámetros obtenidos para la solubilización de SUV de POPC a 25°C. (n.d. no determinado)

<b>POPC</b>				
<b>~% mol colesterol</b>	<b>Saturación</b>		<b>Solubilización</b>	
	Re	K	Re	K
0	0,46	7880	6,48	21660
10	0,54	8770	8,14	22260
20	0,65	9850	4,44	20400
30	n.d.	n.d.	6,04	21450

La razón efectiva surfactante a lípido,  $R_e$ , corresponde a la mínima cantidad molar de surfactante requerida para saturar o solubilizar un mol de lípido,[70] permitiendo establecer diferencias en la capacidad del surfactante para incorporarse en la membrana. Así, valores bajos de  $R_e^{sol}$  implican la formación de micelas mixtas pobres en surfactante y con altos contenidos de fosfolípido, lo cual es indicativo de un

agente solubilizante de alta eficacia. A su vez, altas razones efectivas de solubilización son observadas en agregados con una alta concentración de moléculas de surfactante y baja cantidad de fosfolípido, correspondiendo a agentes solubilizantes menos eficientes.

Por otro lado, la constante de reparto  $K$  tiene relación con la afinidad del surfactante por la fase acuosa y la lipídica. Esta constante puede ser evaluada indirectamente a partir de la razón efectiva  $R_e$ , como se hizo en este trabajo. El coeficiente de reparto está asociado directamente con la energía libre estándar asociada a la transferencia de una molécula de surfactante desde el seno de la solución a la membrana, a través de la relación  $\Delta G_{tr}^{\circ} = -RT \ln K$ , así como la cmc del surfactante esta relacionada de la misma manera con la energía libre de micelización. Lo anterior permite establecer una relación lineal entre  $\log K$  y  $\log cmc$ , concluyéndose de esta manera que el efecto hidrofóbico, que es la fuerza impulsora del proceso de micelización, es un factor determinante en el reparto de las moléculas de surfactante entre la membrana y la fase acuosa [70].

Los parámetros anteriormente descritos permiten establecer comparaciones entre diferentes surfactantes y su capacidad solubilizante, y en este caso específico, diferencias en la efectividad del surfactante debido a la presencia de colesterol. Al observar los valores de la Tabla 3, no es posible establecer o detectar la existencia de una relación de proporcionalidad entre el aumento en la cantidad de colesterol presente y los cambios observados en los parámetros del proceso de solubilización (Figura 25). En términos generales, las vesículas de DODAC necesitan una mayor cantidad de surfactante que los liposomas de POPC para alcanzar la saturación de la bicapa. En el caso de las vesículas de DODAC la presencia de colesterol, provoca un aumento sostenido del parámetro de saturación superficial,  $R_e^{ss}$ , hasta el punto de 30% en el que se observa un a reducción de dicho valor. Para la saturación de la bicapa,  $R_e^{sat}$ , se observa un valor relativamente constante alrededor de 1, con una discontinuidad en 15% en moles de colesterol. Por último, para la solubilización de estas vesículas,  $R_e^{sol}$ , se observa un valor constante, alrededor de 7,0, para luego caer bruscamente en un 15% en moles; no fue posible determinar este parámetro a



contenidos mayores de colesterol. El comportamiento descrito, con existencia de discontinuidades en los parámetros evaluados puede indicar la existencia de fases diferentes en función del contenido de colesterol.

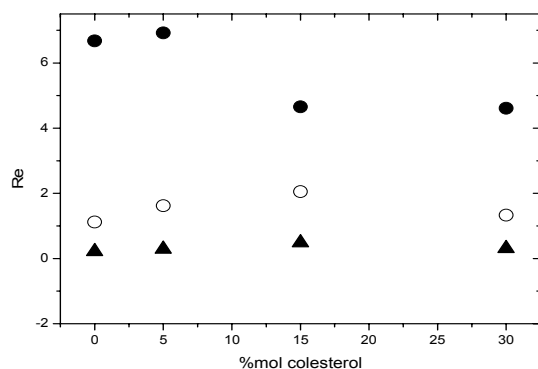


Figura 25. Razones efectivas surfactante a lípido para saturación superficial  $Re^{ss}$  (▲), saturación  $Re^{sat}$  (○) y solubilización  $Re^{sol}$  (●) de vesículas de DODAC en presencia de MMS, en función de la concentración de colesterol, 25° C.

En el caso de los liposomas de fosfatidilcolina (Tabla 4 y Figura 25), el efecto observado es similar en el caso de la saturación de la bicapa,  $Re^{sat}$  aumenta sostenidamente con el aumento de colesterol, indicando la disminución en la capacidad del surfactante para saturar la superficie a medida que aumenta el contenido del esterol. Para la solubilización se observa una discontinuidad entre 10 y 20% en moles de colesterol, que podría corresponder a un cambio de fase análogo al descrito para el sistema DPPC-Colesterol [62], indicando que la nueva fase es más fácilmente solubilizable, tras lo cual nuevamente la razón aumenta con el contenido de colesterol. De acuerdo a la literatura, si el POPC y el colesterol se consideran en conjunto como la matriz para el reparto del detergente (en este caso octil- $\beta$ -tioglucopiranosido), las constantes de reparto disminuyen con el aumento en la concentración de colesterol. En cambio, si sólo se considera POPC, las constantes de reparto permanecen independientes del contenido de colesterol, y se mantienen constantes hasta aproximadamente un 50% mol de colesterol [77]. Esto evidenciaría la asociación preferencial del detergente con el POPC, evitando la interacción con las moléculas de colesterol.

El estudio del proceso de solubilización empleando vesículas gigantes, GUVs, de POPC y utilizando fluorescencia de microscopía bifotónica como técnica de seguimiento permitió observar que el proceso de solubilización ocurre sin cambios importantes en el valor de GP, es decir el contenido o acceso de agua a la bicapa, no se ve afectado por la presencia de cantidades crecientes de éster de sacarosa (MMS=1 $\mu$ M, valor menor a la cmc del detergente). Se puede observar claramente en la Figura 26, que mientras el GP permanece prácticamente constante, el tamaño del liposoma se reduce sostenidamente.

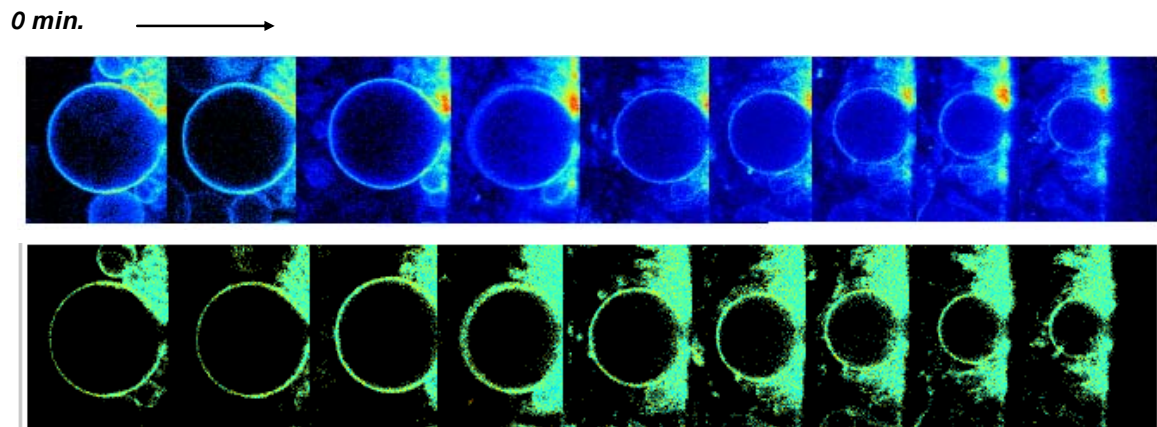


Figura 26. Imágenes de intensidad (sup.) y GP (inf.) para el proceso de solubilización de GUV de POPC con 1 $\mu$ M de MMS. 25° C.

El proceso anteriormente descrito difiere radicalmente con antecedentes que reportan importantes cambios en la morfología de vesícula gigantes de POPC, frente a la adición de octaetilenglicol dodeciléter (C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>), surfactante de carácter no iónico [78]. Estos cambios refieren, a bajas concentraciones de surfactante (1,8 mM), la formación inicial de protuberancias delgadas de forma tubular para llegar, luego de diversas variaciones, a la formación de vesículas esféricas con invaginaciones en su interior, proceso que va acompañado de una continua disminución en la curvatura media de la membrana. En cambio, concentraciones diez veces mayores inducen el proceso inverso, con un aumento inicial en la curvatura media de la membrana, y posteriormente una disminución abrupta de la misma. Los cambios anteriores se atribuyen a la intercalación, en distinto grado, de moléculas de surfactante tanto en la membrana externa como en la membrana interna, ocasionando cambios en el área de

ambas bicapas. El cambio discontinuo en la curvatura media de la membrana observado a altas concentraciones de C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> evidencia un proceso de agregación interrumpido del surfactante en la bicapa. De acuerdo a los antecedentes anteriormente expuestos, es posible decir que el MMS interacciona con la membrana de vesículas de POPC sin cambiar la curvatura media, irrumpiendo de manera continua en ella, hasta su completa solubilización. Además, el proceso ocurre a concentraciones mil veces menores ( $\mu$ M) dejando en evidencia la mayor eficiencia de los ésteres de sacarosa como agentes solubilizantes.

#### **4.4 Solubilización de eritrocitos.**

En el campo de las investigaciones relacionadas con las propiedades de biomembranas y su interacción con drogas y otros agentes externos, los eritrocitos son frecuentemente utilizados como modelo experimental, entregando información sobre importantes procesos fisiológicos tales como endo y exocitosis. La interacción de este tipo de células con diferentes tipos de surfactantes ocasiona cambios morfológicos significativos que han sido explicados a través de la hipótesis de acoplamiento de bicapas [79], en donde la formación de espículas en la superficie de eritrocitos humanos o *equinocitosis*, y la formación de invaginaciones o *estomatocitosis* son relacionadas principalmente con la distribución del detergente en la bicapa.

De acuerdo al modelo de mosaico fluido, la membrana celular es una matriz compuesta por proteínas y lípidos distribuidos asimétricamente en ambas mitades de la bicapa. En el caso articular de los eritrocitos, esta asimetría es notable. La capa externa está compuesta principalmente fosfatidilcolina y esfingomiolina, mientras que en la capa interna se encuentran fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina. Los tres primeros fosfolípidos mencionados son compuestos zwitteriónicos, mientras que la fosfatidilserina, a pH neutro presenta carga negativa. Este hecho determina que la distribución del detergente en la membrana dependa fundamentalmente de la carga que éste presente a pH neutro y de su velocidad de difusión, lo que determinará que se ubique preferentemente en la capa externa o interna de la bicapa. Como consecuencia, la presencia del surfactante provocará que ambas capas se expandan en forma

diferente, induciendo cambios en la morfología para mantener el volumen de la célula constante. Así, los compuestos aniónicos se ubican principalmente en la capa externa, perteneciendo a esta clasificación la mayoría de los agentes equinocitogénicos, mientras que los compuestos catiónicos, que generalmente provocan efectos estomatocitogénicos, se ubican en la capa interna [52]

El modelo anteriormente descrito explica la mayoría de los cambios morfológicos observados por la acción de surfactantes en eritrocitos, sin embargo, no es fácil explicar el efecto estomatocitogénico observado en algunos surfactantes no iónicos como  $C_{12}E_8$  y Triton X-100, pues no es posible asociar una distribución asimétrica a interacciones de tipo electrostático [52]. No obstante, existen estudios que indican que este tipo de surfactantes con unidades polioxietilénicas o similares, son capaces de quelar cationes formando complejos con un débil carácter positivo, y de acuerdo con el modelo anteriormente expuesto, se explicaría el efecto estomatocitogénico observado [80].

El efecto del MMS sobre eritrocitos humanos fue observado empleando fluorescencia de microscopía bifotónica, que permite apreciar en forma simultánea los cambios morfológicos de la célula y la variación en el contenido de agua de la bicapa (a través de la determinación de GP). Como puede observarse en la Figura 27, este éster de sacarosa es un agente estomatocitogénico, que provoca la transición tanto desde equinocitos como discos bicóncavos a estomatocitos, al igual que la mayoría de los detergentes no iónicos.

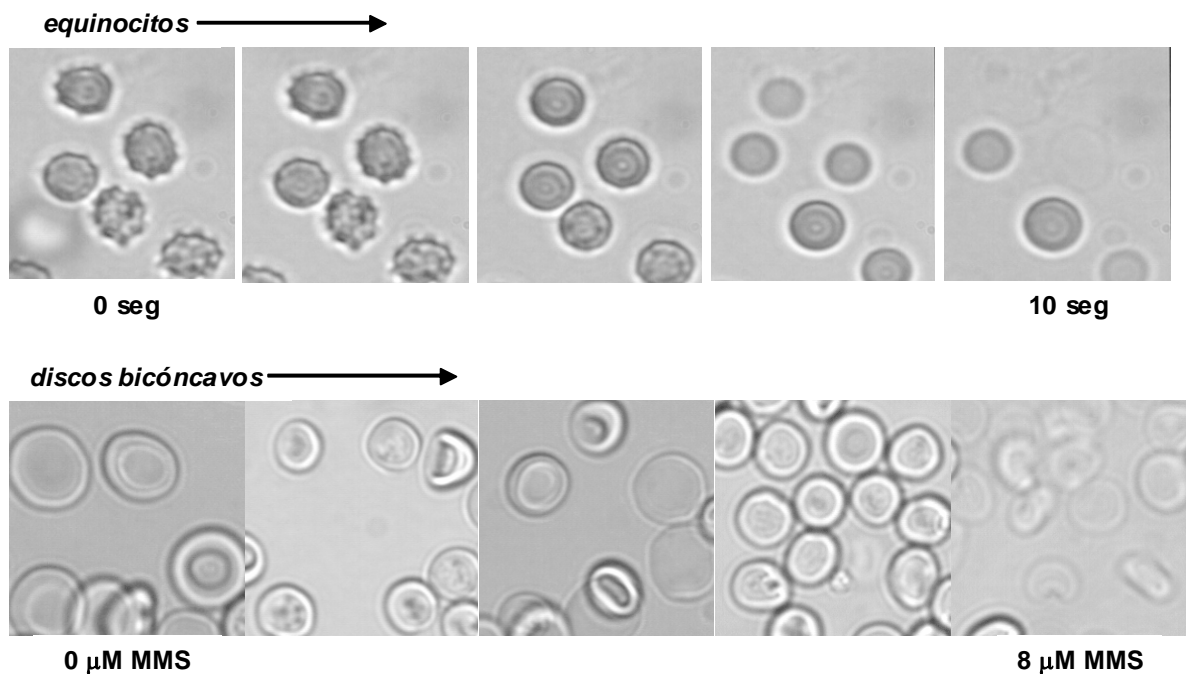


Figura 27. Efecto estomatocitogénico del MMS sobre eritrocitos humanos, partiendo desde equinocitos y desde discos bicóncavos. Hematocrito final al 0,2%, 37° C.

Los cambios en la morfología de eritrocitos producidos por compuestos aniónicos, catiónicos, zwitteriónicos y no iónicos han sido estudiados en profundidad [52]. Se ha detectado la existencia de surfactantes que son poderosos agentes estomatocitogénicos entre los que destacan los éteres alquílicos de octaetilenglicol, y también de agentes equinocitogénicos como el dodecil maltósido y el decil- $\beta$ -D-glucopiranosido. De acuerdo a la estructura de la miristil sacarosa, un disacárido al igual que la maltosa, podría esperarse un comportamiento similar (agente equinocitogénico), pero ocurre lo contrario.

El efecto de surfactantes sobre las propiedades de eritrocitos varía dependiendo del rango de concentraciones empleado, observándose alteraciones de la permeabilidad del eritrocito a concentraciones sublétricas [81]. La adición de MMS en altas concentraciones produce finalmente la hemólisis, que se puede observar en la Figura anterior, al igual que lo reportado en estudios con otros surfactantes, incluyendo no iónicos como la serie de los Tritones [82].

Paralelamente, los valores evaluados para el GP de los eritrocitos antes de la ruptura de la célula (concentraciones sublépticas), permiten establecer que existe una leve disminución en el contenido de agua de la membrana y posteriormente cuando la hemoglobina es liberada al medio, se observa una disminución importante en los valores de GP, acompañada de un incremento en el volumen debido al ingreso de agua al eritrocito. Este cambio drástico de fluidez podría deberse a la salida de componentes proteicos de la membrana, más estudios son necesarios para demostrar esta proposición. El fenómeno presenta características similares cuando se parte de equinocitos o discos bicóncavos.

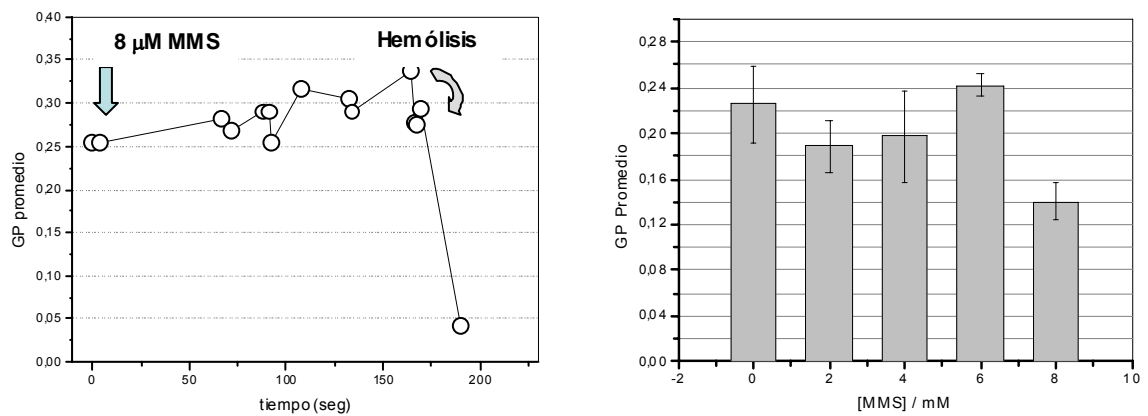


Figura 28. Valores de GP durante la interacción de eritrocitos (con morfología de equinocito) con MMS. Hematocrito al 0.2%, 1 μM Lau, 37°C.

## 5. CONCLUSIONES

- A las temperaturas de estudio, la presencia de colesterol en liposomas de POPC reduce su fluidez sin provocar cambios significativos en su estado físico. En el caso de las vesículas de DODAC se observa el mismo efecto en ambos estados, fluido y gel cristalino. De acuerdo a los valores de GP la presencia de colesterol afecta más a los liposomas de POPC que a las vesículas de DODAC.
- La presencia de MMS a concentraciones sublépticas tiene poca influencia sobre los liposomas de POPC observándose un leve aumento en la rigidez. En presencia de colesterol y MMS se observan discontinuidades que podrían corresponder a cambios estructurales.
- La presencia de MMS a concentraciones sublépticas en vesículas de DODAC, aumenta la rigidez en forma importante, por la presencia de los grupos sacarosa en la superficie de la vesícula. La presencia de MMS y colesterol modifica en forma distinta cada fase (la fase gel se rigidiza mientras que la líquida cristalina se hace más fluida).
- Los resultados obtenidos para el estudio de la salida de colesterol desde liposomas de POPC, sugieren la existencia de interacciones específicas entre la superficie del liposoma y la partícula aceptora pues la presencia de MMS dificulta la remoción del colesterol.
- Los resultados para el estudio de la solubilización de vesículas por MMS, muestran que los sistemas estudiados se ajustan al modelo de 3 etapas. En el caso del DODAC la saturación de la membrana es más lenta que para el POPC. Para ambos sistemas la presencia de colesterol se traduce en una disminución de la velocidad de solubilización.

- No es posible establecer una relación de proporcionalidad entre la cantidad de colesterol presente en la membrana y los cambios observados en los parámetros de solubilización.
- Las discontinuidades a 10 y 20% mol de colesterol en los parámetros de solubilización podrían indicar la existencia de un cambio de fase como el descrito para mezclas DPPC:Colesterol.
- La solubilización de GUV de POPC, ocurre sin cambios en la fluidez del sistema, sólo se observa disminución de tamaño del liposoma por la salida del lípido.
- El MMS es un agente estomatocitogénico para eritrocitos humanos.
- En el rango de composiciones estudiado no existe un efecto importante del radio de curvatura, detectable por la sonda utilizada, por lo que es posible asegurar que las variaciones observadas en los sistemas corresponden a efectos de composición y no de tamaño o fabricación de los distintos sistemas.



## 6. BIBLIOGRAFIA

1. Holmberg, K., *Natural surfactants*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2001. **6**(2): p. 148-159.
2. Hill, K. and O. Rhode, *Sugar-based surfactants for consumer products and technical applications*. Fett-Lipid, 1999. **101**(1): p. 25-33.
3. Glatter, O., et al., *Sugar-ester nonionic microemulsion: Structural characterization*. Journal of Colloid and Interface Science, 2001. **241**(1): p. 215-225.
4. Youan, B.B.C., A. Hussain, and N.T. Nguyen, *Evaluation of sucrose esters as alternative surfactants in microencapsulation of proteins by the solvent evaporation method*. AAPS PharmSci, 2003. **5**(2), Article 22.
5. Michaud, J.P. and C.L. McKenzie, *Safety of a novel insecticide, sucrose octanoate, to beneficial insects in Florida citrus*. Florida Entomologist, 2004. **87**(1): p. 6-9.
6. Zi-juan, S., et al., *Synthesis of insecticidal sucrose esters*. For. Stud. China, 2006. **8**(3): p. 26-29.
7. de la Serna, J.B., et al., *Cholesterol rules - Direct observation of the coexistence of two fluid phases in native pulmonary surfactant membranes at physiological temperatures*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(39): p. 40715-40722.
8. Uchegbu, I.F. and S.P. Vyas, *Non-ionic surfactant based vesicles (niosomes) in drug delivery*. International Journal of Pharmaceutics, 1998. **172**: p. 33-70.
9. Israelachvili, J., *Intermolecular and Surface Forces*. second ed. 2006, New York: Academic Press.
10. Jaafari, M.R., et al., *Immune response and protection assay of recombinant major surface glycoprotein of Leishmania (rgp63) reconstituted with liposomes in BALB/c mice*. Vaccine, 2006. **24**(29-30): p. 5708-5717.
11. Mishra, V., et al., *Development of novel fusogenic vesosomes for transcutaneous immunization*. Vaccine, 2006. **24**(27-28): p. 5559-5570.
12. White, K., et al., *Immunogenicity of liposomes containing lipid core peptides and the adjuvant Quil A*. Pharmaceutical Research, 2006. **23**(7): p. 1473-1481.
13. Cortesi, R., et al., *Cationic liposomes as potential carriers for ocular administration of peptides with anti-herpetic activity*. International Journal of Pharmaceutics, 2006. **317**(1): p. 90-100.
14. Chua, Z.T., et al., *Saposin C: Neuronal effect and CNS delivery by liposomes*, in *Neuroprotective Agents*. 2005. p. 237-246.
15. Vyas, S.P., et al., *Non-ionic surfactant based vesicles (niosomes) for non-invasive topical genetic immunization against hepatitis B*. International Journal of Pharmaceutics, 2005. **296**(1-2): p. 80-86.
16. Carmona-Ribeiro, A.M., *Bilayer-forming synthetic lipids: Drugs or carriers?* Current Medicinal Chemistry, 2003. **10**(22): p. 2425-2446.
17. Lian, T. and R.J.Y. Ho, *Trends and development in liposome drug delivery systems*. J. Pharm. Sci., 2000. **90**(6): p. 667-680.
18. Alakoskela, J.-M., *Interactions in Lipid-Water Interface Assessed by Fluorescence Spectroscopy*, in *Institute of Biomedicine*. 2005, University of Helsinki: Helsinki.

19. Frisken, B.J., C. Asman, and P.J. Patty, *Studies of vesicle extrusion*. Langmuir, 2000. **16**(3): p. 928-933.
20. Lasic, D.D., *The mechanism of vesicle formation*. Biochemical Journal, 1988. **256**: p. 1-11.
21. Haluska, C.K., *Interactions of Functionalized Vesicles in the Presence of Europium (III) Chloride*, in *Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät*. 2004, Max Planck Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung, Universität Potsdam: Postdam.
22. Churaev, N.V., *The DLVO theory in Russian colloid science*. Advances in Colloid and Interface Science, 1999. **83**(1-3): p. 19-32.
23. Ulrich, A.S., *Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles*. Bioscience Reports, 2002. **22**(2): p. 129-150.
24. Veatch, S.L. and S.L. Keller, *Organization in lipid membranes containing cholesterol*. Physical Review Letters, 2002. **89**(26): Art. No. 268101.
25. Kessel, A., N. Ben-Tal, and S. May, *Interactions of cholesterol with lipid bilayers: The preferred configuration and fluctuations*. Biophysical Journal, 2001. **81**(2): p. 643-658.
26. Encinas, M.V., E. Lemp, and E.A. Lissi, *Vesicular Effect on the Reactivity of Anthracene-Derivatives Towards Singlet Molecular-Oxygen*. Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology, 1989. **3**(1): p. 113-122.
27. Osipow, L., et al., *Ind. Eng. Chem.*, 1956. **48**: p. 1459.
28. Tricerri, M.A., et al., *Interaction of apolipoprotein A-I in three different conformations with palmitoyl oleoyl phosphatidylcholine vesicles*. Journal of Lipid Research, 2002. **43**(2): p. 187-197.
29. So, P.T.C., et al., *Time resolved fluorescence microscopy using two photon excitation*. Bioimaging, 1995. **3**: p. 49-63.
30. Bagatolli, L.A. and E. Gratton, *Direct observation of lipid domains in free-standing bilayers using two-photon excitation fluorescence microscopy*. Journal of Fluorescence, 2001. **11**(3): p. 141-160.
31. Sanchez, S.A. and E. Gratton, *Lipid-protein interactions revealed by two-photon microscopy and fluorescence correlation spectroscopy*. Accounts of Chemical Research, 2005. **38**(6): p. 469-477.
32. Sanchez, S.A., et al., *A two-photon view of an enzyme at work: Crotalus atrox venom PLA(2) interaction with single-lipid and mixed-lipid giant unilamellar vesicles*. Biophysical Journal, 2002. **82**(4): p. 2232-2243.
33. Angelova, M.I. and D.S. Dimitrov, *Liposome Electroformation*. Faraday Discussion. Chem. Soc., 1986. **81**: p. 303-311.
34. Patty, P.J. and B.J. Frisken, *The pressure-dependence of the size of extruded vesicles*. Biophysical Journal, 2003. **85**(2): p. 996-1004.
35. Weber, G. and F.J. Farris, *Synthesis and Spectral Properties of a Hydrophobic Fluorescent Probe: 6-Propionyl-2-(dimethylamino)naphthalene*. Biochemistry, 1979. **18**(14): p. 3075-3078.
36. Bagatolli, L.A., et al., *A model for the interaction of 6-Lauroyl-2-(N,N-dimethylamino)naphthalene with lipid environments: Implications for spectral properties*. Photochemistry and Photobiology, 1999. **70**(4): p. 557-564.
37. Parassasi, T., et al., *Laurdan and Prodan as polarity-sensitive fluorescent membrane probes*. J. Fluoresc., 1998. **8**(4): p. 365-373.

38. Bagatolli, L.A., E. Gratton, and G.D. Fidelio, *Water dynamics in glycosphingolipid aggregates studied by LAURDAN fluorescence*. Biophysical Journal, 1998. **75**(1): p. 331-341.
39. Parasassi, T., et al., *Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of LAURDAN fluorescence*. Biophys. J., 1991. **60**(1): p. 179-189.
40. Parasassi, T., et al., *Phase fluctuation in phospholipid membranes revealed by Laurdan fluorescence*. Biophysical Journal, 1990. **57**: p. 1179-1186.
41. Bagatolli, L.A. and E. Gratton, *Two-photon fluorescence microscopy observation of shape changes at the phase transition in phospholipid giant unilamellar vesicles*. Biophysical Journal, 1999. **77**(4): p. 2090-2101.
42. Bagatolli, L.A. and E. Gratton, *Two photon fluorescence microscopy of coexisting lipid domains in giant unilamellar vesicles of binary phospholipid mixtures*. Biophysical Journal, 2000. **78**(1): p. 290-305.
43. Bagatolli, L.A., T. Parasassi, and E. Gratton, *Giant phospholipid vesicles: comparison among the whole lipid sample characteristics using different preparation methods - A two photon fluorescence microscopy study*. Chemistry and Physics of Lipids, 2000. **105**(2): p. 135-147.
44. Liu, S.M., et al., *Cyclodextrins differentially mobilize free and esterified cholesterol from primary human foam cell macrophages*. Journal of Lipid Research, 2003. **44**(6): p. 1156-1166.
45. Deo, N. and P. Somasundaran, *Mechanism of mixed liposome solubilization in the presence of sodium dodecyl sulfate*. Coll. & Surf. A, 2001. **186**: p. 33-41.
46. Deo, N. and P. Somasundaran, *Disintegration of liposomes by surfactants: Mechanism of protein and cholesterol effects*. Langmuir, 2003. **19**(6): p. 2007-2012.
47. Lopez, O., et al., *Structural modifications in the stratum corneum by effect of different solubilizing agents: A study based on high-resolution low-temperature scanning electron microscopy*. Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology, 2000. **13**(5): p. 265-272.
48. Cocera, M., et al., *Sublytic alterations caused by alkyl glucosides in stratum corneum lipid liposomes*. Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects, 2001. **176**(2-3): p. 167-176.
49. Deo, N. and P. Somasundaran, *Effects of sodium dodecyl sulfate on mixed liposome solubilization*. Langmuir, 2003. **19**(18): p. 7271-7275.
50. Lichtenberg, D., *Characterization of the solubilization of lipid bilayers by surfactants*. Biochim. Biophys. Acta, 1985. **821**: p. 470-478.
51. Becerra, N., et al., *Solubilization of dodac small unilamellar vesicles by sucrose esters - A fluorescence study*. Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects, 2006. **272**(1-2): p. 2-7.
52. Isomaa, B., H. Hagerstrand, and G. Paatero, *Shape transformations induced by amphiphiles in erythrocytes*. Biochimica Et Biophysica Acta, 1987. **899**: p. 93-103.
53. Wong, P., *A basis of echinocytosis and stomatocytosis in the disc-sphere transformations of the erythrocyte*. Journal of Theoretical Biology, 1999. **196**(3): p. 343-361.
54. Williams, E.E., et al., *The curvature and cholesterol content of phospholipid bilayers alter the transbilayer distribution of specific molecular species of*

- phosphatidylethanolamine*. *Molecular Membrane Biology*, 2000. **17**(3): p. 157-164.
55. Nemezt, G. and W.A. F. Schroeder, *Time-Resolved Fluorescence Investigation of Membrane Cholesterol Heterogeneity and Exchange*. *Biochemistry*, 1988. **27**(20): p. 7740-7749.
  56. Rukmini, R., et al., *Cholesterol organization in membranes at low concentrations: Effects of curvature stress and membrane thickness*. *Biophysical Journal*, 2001. **81**(4): p. 2122-2134.
  57. Alecio, M.R., et al., *Use of a fluorescent cholesterol derivative to measure lateral mobility of cholesterol in membranes (4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole-labeled cholesterol/fluorescence recovery after photobleaching)*. *Proc. NatL Acad. Sci. USA*, 1982. **79**: p. 5171-5174.
  58. Harris, J.S., et al., *Evidence for Transbilayer, Tail-to-Tail Cholesterol Dimers in Dipalmitoylglycerophosphocholine Liposomes*. *Biochemistry*, 1995. **34**(11): p. 3851-3857.
  59. Halstenberg, S., et al., *Cholesterol-induced variations in the volume and enthalpy fluctuations of lipid bilayers*. *Biophysical Journal*, 1998. **75**(1): p. 264-271.
  60. Sideratou, Z., et al., *Molecular recognition of complementary liposomes: The enhancing role of cholesterol*. *Langmuir*, 2000. **16**(24): p. 9186-9191.
  61. Crane, J.M. and L.K. Tamm, *Role of cholesterol in the formation and nature of lipid rafts in planar and spherical model membranes*. *Biophysical Journal*, 2004. **86**(5): p. 2965-2979.
  62. Vist, M.R. and J.H. Davis, *Phase-Equilibria of Cholesterol Dipalmitoylphosphatidylcholine Mixtures - H-2 Nuclear Magnetic-Resonance and Differential Scanning Calorimetry*. *Biochemistry*, 1990. **29**(2): p. 451-464.
  63. Filippov, A., G. Oradd, and G. Lindblom, *Influence of cholesterol and water content on phospholipid lateral diffusion in bilayers*. *Langmuir*, 2003. **19**(16): p. 6397-6400.
  64. Parasassi, T., et al., *Influence of Cholesterol on Phospholipid Bilayers Phase Domains as Detected by Laurdan Fluorescence*. *Biophysical Journal*, 1994. **66**: p. 120-132.
  65. Parker, A., et al., *Lateral distribution of cholesterol in dioleoylphosphatidylcholine lipid bilayers: Cholesterol-phospholipid interactions at high cholesterol limit*. *Biophysical Journal*, 2004. **86**(3): p. 1532-1544.
  66. Ipsen, J.H., et al., *Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1987. **905**: p. 162-172.
  67. Sankaram, M.B. and T.E. Thompson, *Cholesterol-Induced Fluid-Phase Immiscibility in Membranes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991. **88**(19): p. 8686-8690.
  68. Thewalt, J.L. and M. Bloom, *Phosphatidylcholine - Cholesterol Phase-Diagrams*. *Biophysical Journal*, 1992. **63**(4): p. 1176-1181.
  69. Inoue, T., et al., *Interaction of Surfactants with Vesicle Membrane of Dipalmitoylphosphatidylcholine - Fluorescence Depolarization Study*. *Chemistry and Physics of Lipids*, 1988. **46**(2): p. 107-115.
  70. Inoue, T., *Vesicles*. *Surfactant Science Series*, ed. M. Rossof. Vol. 62. 1996, New York: Marcel Dekker. 151-195.

71. Lemp, E., A.L. Zanocco, and G. Gunther, *Structural changes in DODAC unilamellar liposomes by addition of sucrose esters monitored by using fluorescent techniques*. Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects, 2003. **229**(1-3): p. 63-73.
72. Nagawa, Y. and S.L. Regen, *Surfactant-Induced Release from Phosphatidylcholine Vesicles - Regulation of Rupture and Leakage Pathways by Membrane Packing*. Journal of the American Chemical Society, 1992. **114**(5): p. 1668-1672.
73. Steck, T.L., J. Ye, and Y. Lange, *Probing red cell membrane cholesterol movement with cyclodextrin*. Biophysical Journal, 2002. **83**(4): p. 2118-2125.
74. Thomas, P.D. and M.J. Poznansky, *Effect of Surface Curvature on the Rate of Cholesterol Transfer between Lipid Vesicles*. Biochemical Journal, 1988. **254**(1): p. 155-160.
75. Hao, M.M., et al., *Vesicular and non-vesicular sterol transport in living cells - The endocytic recycling compartment is a major sterol storage organelle*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(1): p. 609-617.
76. Leventis, R. and J.R. Silvius, *Use of cyclodextrins to monitor transbilayer movement and differential lipid affinities of cholesterol*. Biophysical Journal, 2001. **81**(4): p. 2257-2267.
77. Wenk, M.R. and J. Seelig, *Interaction of octyl-beta-thioglucopyranoside with lipid membranes*. Biophysical Journal, 1997. **73**(5): p. 2565-2574.
78. Mavcic, B., et al., *Shape transformation of giant phospholipid vesicles at high concentrations of C12E8*. Bioelectrochemistry, 2004. **63**(1-2): p. 183-187.
79. Sheetz, M.P. and S.J. Singer, *Biological Membranes as Bilayer Couples. A Molecular Mechanism of Drug-Erythrocyte Interactions*. Proceedings of the Indian Academy of Sciences-Chemical Sciences, 1974. **71**(11): p. 4457-4461.
80. Hagerstrand, H., et al., *Oxyethylene chain-cation complexation; Nonionic polyoxyethylene detergents attain a positive charge and demonstrate electrostatic head group interactions*. Cellular & Molecular Biology Letters, 2001. **6**(2): p. 161-165.
81. Miseta, A., et al., *Effect of non-lytic concentrations of Brij series detergents on the metabolism-independent ion permeability properties of human erythrocytes*. Biophysical Journal, 1995. **69**(6): p. 2563-2568.
82. Tragner, D. and A. Csordas, *Biphasic interaction of Triton detergents with the erythrocyte membrane*. Biochem. J., 1987. **244**: p. 605-609.