



UNIVERSIDAD DE SONORA
DIVISIÓN DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE FÍSICA

CARACTERIZACIÓN FÍSICA DE LIPOSOMAS Y LIPOPLEJOS IÓNICOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN FÍSICA

P R E S E N T A:

CARLOS ISIDRO OCHOA SÁNCHEZ

Hermosillo, Sonora, México

Enero 2017

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

SINODALES

Dr. César Rodríguez Beas
Departamento de Física,
Universidad de Sonora.

Dr. Ramón A. Iñiguez Palomares
Departamento de Física,
Universidad de Sonora.

Dr. Ricardo López Esparza
Departamento de Física,
Universidad de Sonora.

Dr. Heriberto Acuña Campa
Departamento de Física,
Universidad de Sonora.

“Siempre, siempre...”

“Sin importar qué...”

“Sólo somos humanos, y los dioses nos hicieron para el amor.

Es nuestra mayor gloria, y nuestra peor tragedia.”

– George R. R. Martin.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres, que siempre (por alguna razón) han confiado y tenido mucha fe en mí, gracias por ser mi ejemplo a seguir y animarme cuando más lo necesito.

A mi hermanita Rosa y a mis sobrinos, que siempre me animan a seguir adelante y me apoyan, gracias por escuchar siempre lo que tengo que decir aunque muchas cosas no son interesantes, por darme consejos y ser mi hermana.

A mi Asesor de tesis el Dr. César Rodríguez Beas, quien me ha brindado siempre todo su apoyo y su paciencia, gracias por ayudarme siempre a organizar mis, tan revueltas, ideas.

Al Dr. Ramón Iñiguez Palomares por aparecer en una época de mi vida en la que yo pensaba que me encontraba en el lugar equivocado, por hablarme de este trabajo de tesis y por hacerme bullying todo este tiempo en que tardé en concluir este trabajo.

A mis amigos de la licenciatura Juan, Rebeca, Abraham, Heichi, Alejandra, Susana, Daniela y Carlos y a mis amigos de la pandilla José Luis, Ramón, Lalo, Gaytán, Isaac y Campa con los que diario platico y que me apoyaban mientras estaba inconforme con mis resultados, o simplemente, me ayudaron a ser feliz mientras pasaba por momentos difíciles.

A Juan Molina por ayudarme tanto en las mediciones de las muestras de liposomas, escuchar conmigo canciones Itonka diario en el cuarto del Zetasizer y apoyarme siempre en lo que necesitaba, ya fuera académico o no.

A ti que siempre me decías “estás haciendo la tesis desde que te conozco pero concéntrate, ya casi la terminas... pero te haces tonto y pierdes mucho el tiempo” gracias por todo, de verdad gracias por todo. Si no fuera por ti, seguiría atorado en la introducción. Te amo.

Carlos Isidro Ochoa Sánchez

Hermosillo, Sonora. Enero 2017.

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1 Terapia génica	2
1.2 Vectores virales	4
2. Antecedentes	6
2.1 Fosfolípidos y liposomas	6
2.1.1 Fosfolípidos	6
2.1.2 Ácido desoxirribonucleico	7
2.1.3 Vesículas o liposomas	10
2.1.4 Lipoplejos	12
2.2 Vectores no vírales	12
2.2.1 Lipoplejos catiónicos	12
2.2.2 Lipoplejos aniónicos	14
3. Justificación	15
4. Hipótesis	16
5. Objetivos	16
6. Metodología	17
6.1 Materiales	17
6.1.1 Fosfolípidos	17
6.1.2 ADN	20
6.1.2.1 Preparación de la solución de ADN	20
6.1.2.2 Preparación de ADN marcado por fluorescencia	21
6.1.3 Búfer	21
6.2 Protocolo de fabricación de liposomas	22
6.3 Protocolo de formación de lipoplejos	27

6.3.1 Apantallamiento de carga de los liposomas aniónicos utilizando cationes de Ca^{2+}	28
6.4 Técnicas de caracterización	29
6.4.1 Dispersión dinámica de luz	29
6.4.2 Electrocinética	31
6.4.2.1 Técnica para medición de tamaños	31
6.4.2.2 Técnicas para medición de potencial Zeta	33
6.4.3 Microscopía confocal	36
7. Resultados y Discusión	38
7.1 Sistema catiónico	39
7.1.1 Determinación de tamaños	39
7.1.2 Propiedades electrocinéticas	40
7.1.2.1 Potencial Z	40
7.1.2.2 Conductividad eléctrica	41
7.2 Sistemas aniónicos	42
7.2.1 Determinación de tamaños	43
7.2.2 Propiedades electrocinéticas	45
7.2.2.1 Potencial Z	45
7.2.2.2 Conductividad eléctrica	48
7.2.3 Imágenes de microscopía confocal	51
7.2.4 Propiedades elásticas de los liposomas	56
7.3 Sistema neutro	62
7.3.1 Determinación de tamaños	62
7.3.2 Propiedades electrocinética	64
7.3.2.1 Potencial Z	64

7.3.2.2 Conductividad eléctrica	65
8. Conclusiones	66
9. Perspectivas	67
A. Apéndice	67
A.1 Polimorfismo lipídico.	67
A.2 Parámetro de empaquetamiento	69
A.3 Área óptima de grupo polar	70
A.4 Consideraciones de empaquetamiento geométrico	73
A.5 Bicapas	75
A.6 Teoría del potencial Z.	76
11. Bibliografía	79

1 INTRODUCCIÓN

A lo largo de su existencia, los seres humanos, como todos los seres vivos, han padecido de numerosas enfermedades, ya sea debido a agentes externos como virus o bacterias, o bien, debido a mutaciones o malformaciones en el material genético de sus células. Debido a estos problemas surgieron métodos para tratar enfermedades que posteriormente darían pie a la medicina: la ciencia dedicada al estudio de la vida, salud, enfermedades y la muerte del ser humano. En la antigüedad el ser humano utilizaba hierbas especiales y minerales para tratar enfermedades. Algunas culturas, como la mesopotámica, datan hasta doscientas cincuenta plantas medicinales, ciento veinte sustancias minerales y ciento ochenta de origen animal [1].

Con el avance de la ciencia y la técnica, los métodos para tratar enfermedades avanzaron, desarrollando ramas de la medicina como la anatomía y la farmacología. Esto permitió la fabricación de antibióticos, analgésicos y vacunas para la mayoría de las enfermedades que padeció y padece el ser humano. Sin embargo en la actualidad existen un gran número de enfermedades que no son curables por métodos tan sencillos como píldoras o vacunas como por ejemplo: el mal de Parkinson, cáncer, la enfermedad de Alzheimer, por mencionar algunas. Para el tratamiento de estas se utilizan terapias como la quimioterapia, en el caso del cáncer y fármacos inhibidores y retardadores para el Alzheimer, pero no existen curas definitivas que cesen los síntomas para éste. Debido a esto, en las últimas décadas surgieron investigaciones acerca de posibles alternativas que puedan servir como tratamiento para este tipo de enfermedades, entre ellas se encuentra la terapia génica.

La *terapia génica* puede ser el tratamiento efectivo de enfermedades, actuando estratégicamente a nivel celular reparando y/o reemplazando material genético dañado por uno sano, utilizando *vectores genéticos* (también conocidos como vehículos portadores de

genes o acarreadores de genes) los cuales servirían de transporte para este material genético. Actualmente, se han estado utilizando virus modificados como transporte efectivo de este material [2].

1.1 Terapia génica

La terapia génica es el conjunto de procedimientos que permiten la liberación o inserción de material genético sano o normal directamente en las células de un paciente con tratamiento de una enfermedad. Los genes son unidades de información de ADN y a su vez estos se encuentran en el núcleo de la célula a un nivel de resolución molecular [3]. Estos controlan tanto el medio interno de la célula como las interacciones con otras y con el medio ambiente en general por medio de proteínas que son transcritas en respuesta a estímulos. Así, si ocurren mínimas alteraciones en su estructura, a veces tan pequeñas como una mutación o cambio en un solo nucleótido que lo constituyen, pueden producir graves daños metabólicos o estructurales. Es por esto que la terapia génica tiene que identificar cuál es el gen afectado causante de la enfermedad para poder corregir a nivel molecular el defecto, no en solo una, sino en millones de células que constituyen el órgano o el tejido de la enfermedad, o bien en el órgano o sistema en el que se expresa este gen. Es por eso que un tipo de terapia a este nivel lucía imposible hasta hace poco [3].

Existen dos tipos de terapia génica: la terapia génica con células somáticas¹ y la terapia génica con células germinales², actualmente, solo se están usando las células somáticas debido a los riesgos que presupone a la descendencia de un individuo el manipular el código genético hereditario al usar células germinales [3].

En la terapia génica, que utiliza células somáticas, se busca introducir los genes a las células y así eliminar las consecuencias clínicas de una enfermedad genética heredada o adquirida. Con este tipo de terapia las generaciones futuras no son afectadas porque el gen no pasa a ellas. Sin embargo, se considerará en un futuro la posibilidad del uso de la terapia génica germinal, a pesar de que existen numerosas barreras tanto tecnológicas como éticas, debido a sus implicaciones. Cualquier gen introducido a las células germinales estaría presente no solo en el individuo, sino en toda su línea de descendencia [3].

Los genes que servirían de remplazo pueden ser llevados a la célula de interés por medio de los llamados “*vectores*”, denominados así por su similitud con los agentes biológicos que transmiten enfermedades. El término vector se utilizaba anteriormente sólo para llamar a los plásmidos y virus modificados que eran utilizados para transportar el gen deseado a la célula de interés debido a los mecanismos que cuentan estos para invadir con efectividad a las células. Sin embargo, con el descubrimiento de otros vehículos efectivos para transportar genes se ha generalizado el termino, llamando así a todo vehículo ya sea biológico, químico o físico [2].

¹Células somáticas. Son aquellas que conforman el crecimiento de los tejidos y órganos de un ser vivo pluricelular, las cuales proceden de células madre originadas durante el desarrollo embrionario y que tienen la capacidad de reproducirse y de apoptosis. ²Células germinales. Esta línea celular es la precursora de los gametos: óvulos y espermatozoides en los organismos que se reproducen sexualmente. Estas son las células que contienen el material genético a heredarse a la siguiente generación.

En concreto hay dos tipos principales de vehículos, los vectores virales y no virales. A continuación se hace una descripción de estos dos vectores.

1.2 Vectores vírales

El éxito de la terapia génica depende enormemente del desarrollo de vectores que puedan, de forma selectiva y efectiva, liberar un gen a las células de interés (células diana) con una mínima toxicidad. La liberación es incluso más difícil *in vivo* donde la seguridad y el tener en la mira al vector así como la rápida eliminación del sistema circulatorio presentan retos adicionales al éxito de la transferencia genética [4].

Los virus, representan la primera opción para la transfección génica (Figura 1.1) ya que su alta eficiencia de transfección ha aumentado debido a su larga historia evolutiva. Los primeros intentos de la terapia génica en mostrar resultados benéficos reales fueron realizados utilizando un vector viral, de los cuales, probablemente, el más importante es el tratamiento empleado a nueve niños con inmunodeficiencia combinada grave ligada al cromosoma X [5]. Sin embargo, la transfección utilizando vectores virales no es la opción ideal debido a sus múltiples desventajas incluyendo citotoxicidad³, respuestas inmunológicas, posibilidad de mutagénesis⁴ de inserción y limitaciones de producción a gran escala [4].

Las desventajas de los vectores virales han enfatizado la necesidad de métodos alternativos con mejoras, como la seguridad, por lo que recientemente se ha optado por los vectores no virales [4].

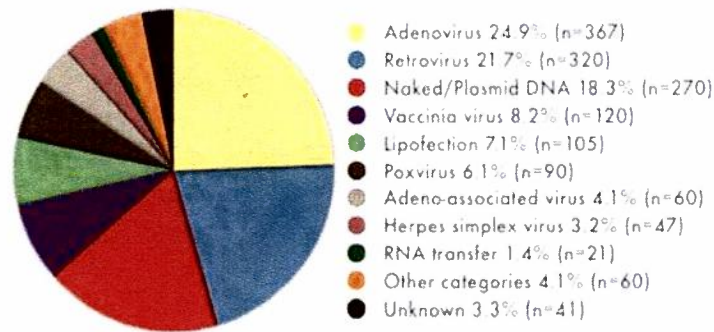


Fig. 1.1 Vectores utilizados en ensayos clínicos de Terapia Génica al año 2016 [6].

Entre los *vectores no virales* destacan por su bajo nivel de toxicidad y alta eficacia, los *liposomas*. Los liposomas han sido utilizados como transportes biocompatibles de fármacos, péptidos, proteínas, ADN plasmídico⁵, oligonucleótidos⁶ o ribosomas, para propósitos farmacéuticos, cosméticos y bioquímicos [2]. La enorme versatilidad en cuanto a tamaños y parámetros físicos de los liposomas ofrece un atractivo potencial para la fabricación de vehículo hechos para una amplia gama de aplicaciones [2].

³Citotoxicidad. Se trata de la cualidad de ser tóxico a las células. ⁴Mutagénesis. Se llama así a la producción de mutaciones sobre el ADN. ⁵ADN plasmídico. Son moléculas de ADN extracromosómico circular o lineal que se replican y transcriben independientes del ADN cromosómico. ⁶oligonucleótidos. Son secuencias cortas de ADN o ARN, con cincuenta pares de bases o menos.

2 ANTECEDENTES

Debido a su importancia en la terapia génica, es necesario el estudio de estas estructuras lipídicas cerradas llamadas vesículas o liposomas. En la siguiente sección se describen los componentes que conforman a los liposomas y lipoplejos iónicos y su uso como potenciales transportadores de material genético.

2.1 Fosfolípidos y liposomas

2.1.1 Fosfolípidos

Los lípidos son moléculas orgánicas constituidas principalmente de carbono e hidrógeno, y en algunos casos nitrógeno. Los lípidos que se constituyen de un grupo fosfato reciben el nombre de fosfolípidos y generalmente contienen nitrógeno en su grupo polar, algunos de estos fosfolípidos son la fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, etc. Dependiendo de la naturaleza química los fosfolípidos poseen una carga eléctrica. En este trabajo, por simplicidad, se referirá a los fosfolípidos simplemente como lípidos.

El lípido es una molécula anfifílica que se constituye a grandes rasgos de dos estructuras moleculares, una región hidrofílica, llamada cabeza o grupo polar y una o dos cadenas llamadas regiones no-polares o hidrofóbicas (Figura 2.1).

Estas características de la molécula permiten que en un medio acuoso las cadenas hidrocarbonadas, mediante su interacción hidrofóbica, se repelan del agua formando estructuras dependientes, principalmente, de la concentración y de la naturaleza de los lípidos. Las características de estas estructuras se detallan en el apéndice.

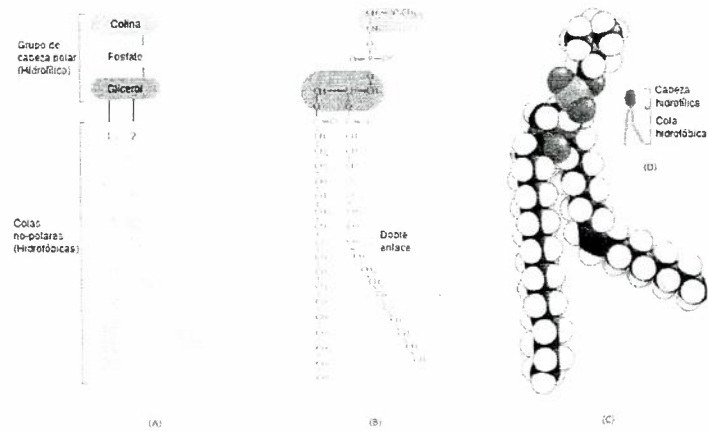


Fig. 2.1: Estructura química de un de fosfolípido, donde se muestran la cabeza hidrofílica y las colas hidrofóbicas [17]. (A) Muestra los nombres de las componentes del lípido, (B) su estructura química y (C) su estructura tridimensional.

2.1.2 Ácido Desoxirribonucleico

La habilidad de las células de almacenar, recuperar y traducir instrucciones genéticas requeridas para crear y mantener un organismo vivo es de gran importancia para la vida. La información hereditaria es transferida de una célula a otra en la división celular y de una generación de organismos a otra a través de las células reproductivas. Estas instrucciones son almacenadas dentro de cada una de las células vivas como sus genes, los elementos que contienen información que determina las características de una especie y del individuo en particular [17]. La información genética consiste principalmente en instrucciones para crear proteínas. Las proteínas son macromoléculas que realizan la mayoría de las funciones de la célula: estas tienen una función estructural celular y forman enzimas que catalizan las reacciones químicas de las células, además ellas regularizan las expresiones genéticas. Las propiedades y las funciones de una célula son determinadas enormemente por las proteínas que es capaz de sintetizar [17].

A finales del siglo XIX se descubrió, gracias a cuidadosos estudios sobre células y embriones, que la información hereditaria se encuentra en los cromosomas, estructuras con

forma de hilos que se encuentran en el núcleo de las células eucariotas y son visibles mediante microscopios ópticos en el proceso de división celular [18]. Más tarde se encontró mediante un análisis químico que los cromosomas están constituidos por proteínas y *Ácido Desoxirribonucleico (ADN)*. En un principio se pensaba que el ADN era un elemento meramente estructural, sin embargo, en la década de 1940 se identificó que el ADN era el portador de la información genética. Más tarde, cuando James Watson y Francis Crick predijeron correctamente la estructura del ADN se pudieron resolver grandes misterios acerca de éste como, la forma en la que el ADN se replica y cómo son especificadas las proteínas mediante instrucciones en el ADN.

Una molécula de ADN consiste de dos cadenas largas polinucleótidas las cuales están compuestas por cuatro tipos de nucleótidos. Cada una de estas cadenas se le conoce como *cadena de ADN* o *hebra de ADN* (Figura 2.2). Las cadenas se mantienen unidas mediante enlaces de hidrógeno. Los nucleótidos están compuestos por azúcares de 5 carbonos y están unidos por uno o más grupos fosfatos y bases nitrogenadas. En el caso del ADN el azúcar es la desoxirribosa ligada a un solo grupo fosfato y la base, la cual puede ser Adenina (A), Citosina (C), Guanina (G) o Timina (T).

Las dos cadenas largas que componen al ADN se mantienen unidas por enlaces de hidrógeno que se forman entre las diferentes bases formando pares de bases, estos pares de bases originan la estructura tridimensional del ADN, la *doble hélice*. Todas las bases se encuentran dentro de la doble hélice y la estructura de soporte de azúcar y fosfato se encuentra en el exterior.

En todas las uniones que se efectúan entre las bases, una base de dos anillos (Purina) se une con una base de un solo anillo (Pirimidina); A siempre se une con T y G con C (Figura 2.3).

Estos cuatro nucleótidos son los únicos que existen en el ADN y éste codifica información mediante diferentes combinaciones y secuencias. Al conjunto completo de información del ADN de un organismo se le llama *genoma*, y este lleva la información a todas las proteínas y las moléculas de ARN que el organismo sintetizará.

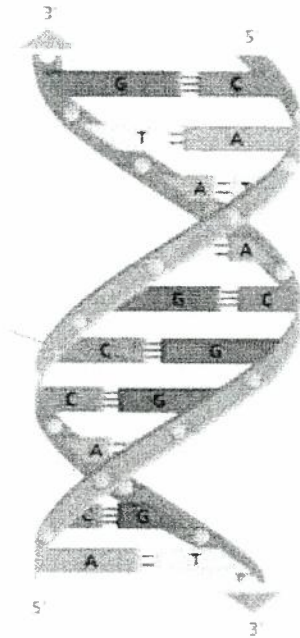


Fig. 2.2. Estructura de doble hélice del ADN [17].

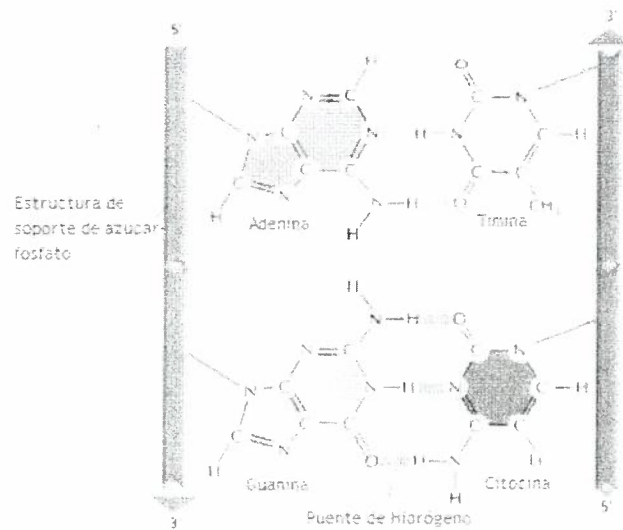


Fig. 2.3 Bases complementarias en el ADN [17].

Se han realizado diversos estudios de caracterización y transferencia genética utilizando diversos tipos de ADN en liposomas, entre estos se han utilizado plásmidos como ADN plásmido HLA-B7 [19], ADN de timo de ternera [20], etc.

2.1.3 Vesículas o liposomas

Cómo se describe en el apéndice A, los lípidos pueden formar distintas estructuras cuando estos son disueltos en agua, estas configuraciones geométricas dependen de las propiedades de sus grupos polares y sus cadenas hidrocarbonadas. En base a estos parámetros se pueden obtener cantidades que predicen la estructura que formarán, como por ejemplo, el parámetro de empaquetamiento. Bajo ciertas condiciones de solubilidad y temperatura, las estructuras de bicapas esféricas cerradas (figura 2.4) se vuelven más favorables que las bicapas planas infinitas. Esto surge debido a que en las bicapas cerradas los bordes energéticamente desfavorables son eliminados al formar estas estructuras cerradas, lo cual es energéticamente favorable. Así, mientras que los lípidos puedan mantener sus áreas en su valor óptimo en una bicapa curva, las vesículas podrán ser las estructuras preferenciales. Entonces, ¿Cómo se puede estimar el radio de un liposoma? Para formar una bicapa, como se detalla en el apéndice, es necesario que $v/a_0l_c = 1$. Para que una bicapa se curve, los lípidos que se encuentran en una de las monocapas deben de poder empaquetarse, en promedio, en conos truncados. Esto requiere que $v/a_0l_c < 1$. Mediante consideraciones geométricas se puede mostrar que para $1/2 < v/a_0l_c < 1$, el radio de la vesícula más pequeña que se puede formar es

$$R_c \approx l_c \left[\frac{3 + \sqrt{3 \left(\frac{4v}{a_0l_c} - 1 \right)}}{6 \left(1 - \frac{v}{a_0l_c} \right)} \right] \approx \frac{l_c}{(1 - v/a_0l_c)} \quad (1)$$

Donde a_0 es el área del grupo polar de la monocapa interior.

El cuál es el radio crítico en el cual una bicapa no se puede curvar más sin aplicar una fuerza desfavorable en el empaquetamiento de los lípidos [21].

Debido a la complejidad de las biomembranas naturales, se utilizan modelos simplificados de membranas para caracterizar propiedades de lípidos en agregados supramoleculares. Los liposomas han sido el sistema modelo más popular para la investigación en lípidos desde que Bangham y col. describieron que los fosfolípidos formaban vesículas multilamelares en soluciones acuosas [21]. Dispersando fosfolípidos en un medio acuoso se forman poblaciones de liposomas multilamelares (MLV's, por sus siglas en inglés) muy heterogéneos en tamaños y forma. Esto es algo indeseado para muchas de las aplicaciones y generalmente las poblaciones de liposomas más homogéneas se logran exponiendo los agregados lipídicos a ultra sonicación hasta obtener vesículas unilamelares pequeñas (SUV's, por sus siglas en inglés) con diámetros de aproximadamente 30 nm o bien mediante métodos de extrusión a través de filtros de policarbonato de poros pequeños para dar lugar a vesículas grandes unilamelares (LUV's, por sus siglas en inglés) con diámetros de aproximadamente 50 - 200 nm, dependiendo del diámetro del poro del filtro que se esté utilizando [4].

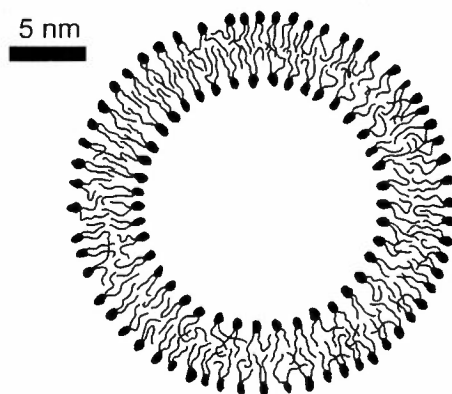


Fig. 2.4. Sección transversal de un liposoma unilamelar [21].

2.1.4 Lipoplejos.

Los lipoplejos son sistemas basados en liposomas, formados cuando el liposoma ha sido acomplejado o funcionalizado con otra molécula además de lípidos en su exterior, comúnmente se utilizan moléculas como proteínas, fármacos, fragmentos o plásmidos de ADN. Éste último es de gran interés en el ámbito de la terapia génica [22]. Para la formación de lipoplejos comúnmente se utilizan liposomas catiónicos ya que, como se mencionó anteriormente, los plásmidos o fragmentos de ADN, tienen una carga total negativa, y existen interacciones electrostáticas entre liposomas y ADN que facilitan la formación de complejos [4]. Por otra parte para incorporar ADN en liposomas zwitteriónicos o aniónicos se hace uso de cationes multivalentes con el fin de apantallar la carga superficial del liposoma, entre los que se destacan los cloruros de: magnesio ($MgCl_2$), calcio ($CaCl_2$), cobalto ($CoCl_2$), cadmio ($CdCl_2$), manganeso ($MnCl_2$), zinc ($ZnCl_2$), etc., lo que hace que se pueda incorporar el ADN en liposomas bastante estables de varios micrómetros de diámetro [23].

2.2 Vectores no vírales

Los llamados métodos de transfección física son métodos que proponen la entrada de los ácidos nucleicos a la célula mediante la interrupción de la membrana plasmática por electroporación⁷, estrés osmótico, o alternativamente inyectando o disparando ADN directamente en una micropartícula a la célula [12]. Sin embargo, los vectores sintéticos basados en el acomplejamiento de ADN con liposomas catiónicos han sido considerados como la mejor ruta alternativa para la transfección viral [12].

2.2.1 Lipoplejos catiónicos

Los complejos formados de liposomas catiónicos (CLs) y ADN, llamados *lipoplejos*, fueron los primeros vectores no virales [7]. Actualmente existen estudios donde se han caracterizado

estos lipoplejos destinados a la transfección en células humanas y cómo afectan a estas [4,8-10]. Estos, prometen una alternativa a las transfecciones virales, ya que al contrario de los virus, estos no son inmunogénicos⁸ y además son relativamente fáciles de fabricar, lo que los hace viables para su fabricación a gran escala. Los liposomas son conocidos por ser vehículos de fármacos seguros *in vivo* y son aprobados para su uso clínico como sistemas de liberación de fármacos [11]. Por otra parte, los lipoplejos son fáciles de preparar comparados con los sistemas virales. Liposomas cargados positivamente y ADN cargado negativamente forman un complejo espontáneamente en una solución acuosa debido principalmente a interacciones electrostáticas, por estas razones el estudio de estos sistemas se ha vuelto de gran importancia para la terapia génica [4].

Los lipoplejos además pueden ser modificados para mejorar sus propiedades como vectores génicos *in vivo* mediante el anclaje o funcionalización de otras moléculas funcionales como receptores o proteínas. Por ejemplo, lipoplejos con moléculas tales como anticuerpos de receptores de transferrina⁹ o folato¹⁰, las cuales se han fabricado para dirigirlas en tejidos cerebrales y células de tumores expresando receptores de folato, respectivamente [7]. A pesar de que estos complejos son una promesa como vectores no virales, la baja eficiencia en transfección *in vivo* ha obligado a realizar más estudios fundamentales acerca de barreras moleculares y celulares en la transfección genética y las interacciones biológicas de los vectores con los huéspedes [12].

⁷Electroporación. Técnica que consiste en aplicar un campo eléctrico externo a una membrana plasmática celular y de esa forma aumentar la conductividad eléctrica y la permeabilidad. ⁸Inmunogénico. Que provoca respuesta inmunológica.

2.2.2 Lipoplejos aniónicos

Aunque los liposomas catiónicos son eficientes en la complejación con el ADN, estos pueden ser inactivados en presencia de suero fisiológico. Además la citotoxicidad de los liposomas catiónicos es algo de gran preocupación, dado que existen reportes donde se prueba que existe esta citotoxicidad independiente de la vía de transfección ya sea *in vivo* como *in vitro* [13]. Debido a la citotoxicidad que presentan estos liposomas catiónicos y algunas otras desventajas, aún no controladas, es evidente que es necesario desarrollar otro sistema de transporte génico para explotar los beneficios de la terapia génica. Así, se han reportado en años recientes estudios en donde se utilizan liposomas aniónicos (ALs) para el transporte de ADN en lugar de liposomas catiónicos [14]. Siddhesh D. Patil y col., en su trabajo, estudiaron la eficiencia de transporte de ADN y transfección *in vitro* de liposomas aniónicos fabricados con una mezcla de lípidos aniónicos y zwitteriónicos. Acomplejaron estos liposomas con ADN utilizando iones de calcio (Ca^{2+}) [13]. Existen estudios donde se fabrican y estudian los ALs como posibles candidatos para transfección genética [15,16].

Lo que ha frenado en los años el desarrollo de lipoplejos con lípidos aniónicos es que no es una tarea sencilla formar los complejos debido a las interacciones repulsivas que se presentan entre los lípidos y el ADN cargados ambos negativamente. Una de las técnicas más populares para fabricar complejos de liposomas aniónicos y ADN es utilizando cationes multivalentes, en su mayoría cationes divalentes de calcio (Ca^{2+}) [16]. De esta manera se apantalla la carga de los liposomas aniónicos, hasta que alcanzan una carga superficial neutra o positiva, permitiendo formar el acomplejamiento de los ALs y el ADN debido a las interacciones electrostáticas.

⁹ La Transferrina es una proteína transportadora específica del hierro en el plasma. ¹⁰ El Folato es un tipo de vitamina B que tiene como función producir ADN y otros tipos de materiales genéticos.

3 JUSTIFICACIÓN

Es de suma importancia el estudio de los liposomas iónicos ya que estos presentan un prometedor futuro de la terapia génica como transportes de material genético o fármacos hacia una célula de interés. Existen numerosos estudios recientes en donde son fabricados y estudiados estos liposomas desde un punto de vista biofísico, proporcionando antecedentes acerca de la tecnología de los liposomas que se ha venido desarrollando en los últimos años. Las diferentes propiedades (tamaño, potencial Zeta, conductividad, comportamiento coloidal, polimorfismo, elasticidad) de algunas estructuras de fosfolípidos tales como los liposomas y sus complejos, son el principal objeto de estudio en este trabajo de tesis.

A pesar de los beneficios que tienen los lipoplejos sobre otros sistemas, estos aún no se encuentran completamente caracterizados y estandarizados dada la gran diversidad de lípidos que existen y sus diferentes mezclas para formar lipoplejos, y que además estos sistemas son algo relativamente nuevos. Los primeros estudios de transfección genética fueron estudiados en 1987 [4].

En este trabajo de tesis se propone fabricar y caracterizar liposomas y lipoplejos para su posible uso en la terapia génica estableciendo un protocolo de fabricación utilizando el método de extrusión. Es importante conocer el comportamiento de potencial Z y conductividad en función de las concentraciones de Ca^{2+} y ADN para predecir los comportamientos de los liposomas en el medio celular.

4 HIPÓTESIS

1.- Los liposomas y lipoplejos catiónicos pueden ser fabricados mediante la técnica de extrusión y la formación de complejos ocurre de manera sencilla mediante interacciones electrostáticas. Utilizando una concentración fija de liposomas y variando únicamente la concentración de ADN se puede encontrar el punto isoeléctrico de los lipoplejos catiónicos.

2.- Los lipoplejos aniónicos se forman mediante el apantallamiento de la carga de los lípidos utilizando cationes divalentes de calcio y, posteriormente, mezclando con ADN, existe una concentración máxima en la que los liposomas aniónicos no forma agregados.

5 OBJETIVOS

Se plantea como objetivo general en este trabajo de tesis fabricar y caracterizar a los liposomas y lipoplejos iónicos. Los objetivos específicos:

- 1.- Fabricar liposomas iónicos (catiónicos y aniónicos).
- 2.- Utilizar un protocolo de fabricación de los liposomas utilizando el método de extrusión.
- 3.- Utilizar un protocolo de fabricación de los lipoplejos.
- 5.- Caracterizar a los liposomas y lipoplejos con diferentes técnicas experimentales, tales como DLS, electrocinética, microscopía DIC y microscopía de fluorescencia.

6 METODOLOGÍA

Existen diversas técnicas para la preparación de liposomas, estas técnicas se dividen en 3 grandes métodos [24]:

1. Método de dispersión mecánica.
2. Método de dispersión en disolvente.
3. Método de eliminación del detergente.

Los siguientes métodos que se muestran son métodos de dispersión mecánica:

1. Sonicación.
2. Celda de presión francesa: extrusión.
3. Liposomas congela y descongela.
4. Hidratación de película de lípidos mediante agitación manual, rotovapor, agitación o secado por congelación.
5. Micro-emulsificación.
6. Extrusión por membrana.

En este trabajo de tesis se utilizará el método de extrusión por membrana.

6.1 Materiales

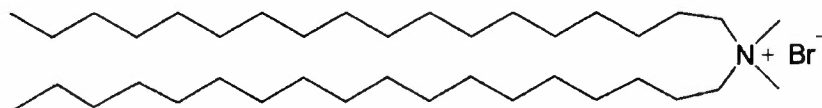
En esta sección se mencionan y describen brevemente los materiales utilizados para la fabricación de los liposomas y lipoplejos iónicos.

6.1.1 Fosfolípidos

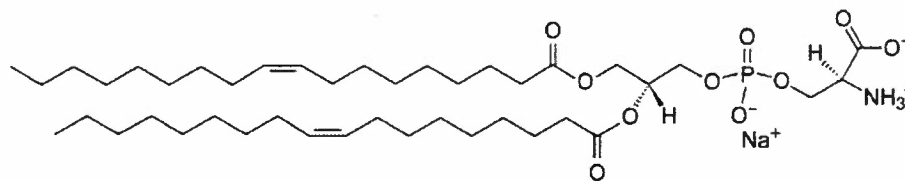
Para la preparación de los liposomas, se utilizaron lípidos en presentación de polvos comprados a Sigma-Aldrich y con éstos se hicieron soluciones necesarias a una concentración determinada utilizando como solvente una mezcla de cloroformo y metanol. En la mayoría

de los casos se utilizó una solución de lípidos a 10^{-2} y 10^{-3} M. Los lípidos utilizados fueron los siguientes:

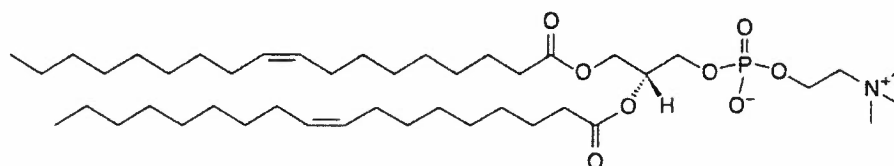
- Bromuro de Dioctadecildimetilamonio (DODAB). Se trata de un surfactante catiónico de dos cadenas hidrocarbonadas con 18 carbonos cada una. Posee con un grupo polar de amonio cuaternario, con carga positiva.



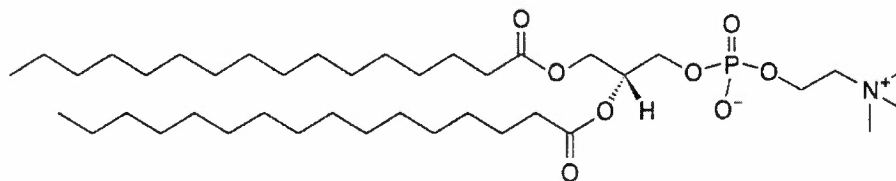
- 1,2-Dioleil-sn-glicero-3-fosfatidilserina (DOPS). Es un lípido aniónico con dos cadenas hidrocarbonadas de 18 carbonos y una insaturación cada una. En su cabeza polar posee un grupo fosfato (PO_4) y un grupo aminoácido que le dan la carga negativa.



- 1,2-Dioleil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DOPC) lípido zwitteriónico con dos cadenas hidrocarbonadas de 18 carbonos y con una insaturación en cada una de ellas. Como es característico del fosfolípido, cuenta con un grupo fosfato en su cabeza polar y un grupo de amino los cuales le otorgan una carga neutra.

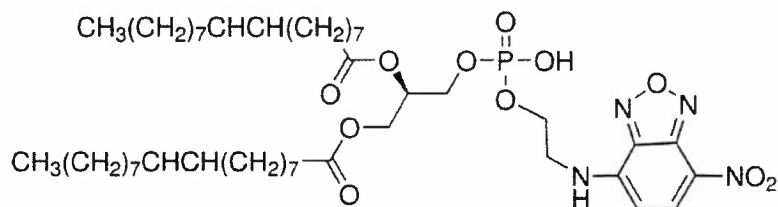


- 1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DPPC) este lípido cuenta con dos cadenas hidrocarbonadas saturadas de 16 carbonos cada una, cuenta además con un grupo fosfato y un grupo amino los cuales le dan carácter zwitteriónico.



Además, se utilizaron lípidos marcados fluorescentemente con el grupo fluorescente 7-Nitrobenzol-2-oxa-1,3-diazol-4-il (NBD) el cual se ha utilizado desde hace décadas para aplicaciones biológicas como estudios en membranas y células [25].

- N-(7-nitrobenzol-2-oxa-1,3-diazol-4-il)-1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (NBD-DOPE)



Los cuales fueron disueltos en 10 ml de solvente orgánico cloroformo/metanol (70:30 v:v). La tabla 6.1 muestra los pesos moleculares (Pm) de los lípidos utilizados en la fabricación de los liposomas/lipoplejos.

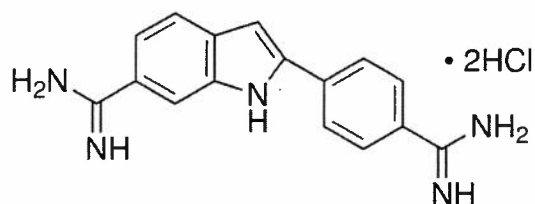
Tabla 6.1. Pesos moleculares de los lípidos utilizados.

Lípido	Pm
DODAB	630.97 g/Mol
DPPC	734.05 g/Mol

DOPS	810.03 g/Mol
DOPC	786.13 g/Mol
NBD-PS	985.195 g/Mol
NBD-PE	924.155 g/Mol

6.1.2 ADN

Para marcar el ADN se utilizó 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) el cual es un marcador fluorescente que se une fuertemente a las regiones donde existen Timina y Adenina las cuales son particularmente abundantes en el ADN [26]. El Pm del DAPI es 457.48 g/Mol.



6.1.2.1 Preparación de la solución de ADN

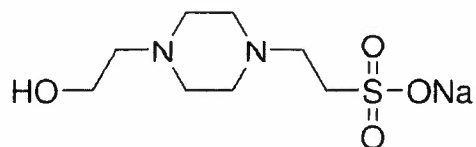
Para preparar la solución de ADN se utilizó un ADN proveniente de timo de ternera de peso molecular que varía de 1×10^7 a 1.5×10^7 D, tomando el promedio esto es 12.5×10^6 D ~ Pm = 1.25×10^7 g/mol. Se peso la cantidad adecuada de ADN y se depositó en un tubo de ensayo, enseguida se depositó el solvente (HEPES). Para incorporar la mezcla, basta solo con dar tres o cuatro giros de 180 grados manuales al tubo (no se recomienda agitarla con el vortex), la solución se almacena durante 24 h a una temperatura cercana a los 4°C. En la formación de los lipoplejos se utilizó una solución de ADN a una concentración de 5×10^{-8} M.

6.1.2.2 Preparación de ADN marcado por fluorescencia

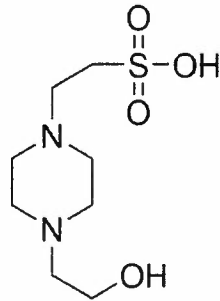
Para marcar el ADN se utilizó el marcador fluorescente DAPI dado que, como se mencionó anteriormente, se une fuertemente a regiones enriquecidas de adenina y timina. Se usó una concentración de DAPI de 1×10^{-6} M, concentración suficiente para observar los lipoplejos por microscopía de fluorescencia. Es importante mencionar que se utilizó esta concentración de DAPI en las soluciones de ADN dado que para una concentración mayor se formaban agregados a simple vista. Es de suma importancia tener cuidado con la iluminación, se recomienda preparar esta solución utilizando luz roja (la iluminación LED es lo más recomendable), de tal manera que no degrade la fluorescencia del DAPI. Una vez preparada la solución, cubrir el recipiente de la luz.

6.1.3 Búfer

Para evitar la disociación del ADN, se utilizó como búfer N-(2-hidroxiethyl)piperazina-N'-2-etano-sulfónico (HEPES base y ácido). Los Pm del HEPES base y HEPES ácido son 238.30 g/Mol y 260.29 g/Mol respectivamente.



HEPES (SAL)

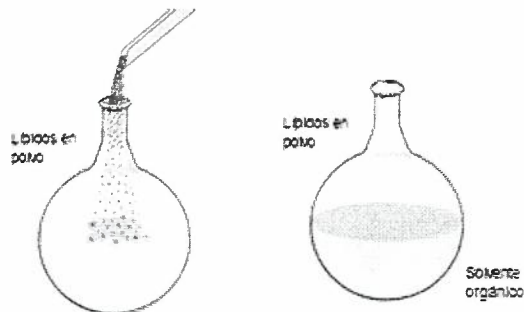


HEPES (ÁCIDO)

6.2 Protocolo de fabricación de liposomas

Los liposomas utilizados en este trabajo de tesis se fabricaron mediante el método de extrusión, originalmente reportado por Bangham y col. [27], y es un método para obtener liposomas de un tamaño. Consiste en los siguientes pasos:

1.- Se pesan los fosfolípidos depositándolos en un matraz aforado y se disuelven en un solvente orgánico, comúnmente cloroformo y/o metanol, en este caso se utilizó una mezcla Cloroformo–metanol.



2.- Una vez asegurada la disolución de los lípidos en cloroformo/metanol lo siguiente es llevar a cabo el proceso de evaporación de éstos y obtener la película delgada de lípidos deseada utilizando un rotavapor (figura 6.1), para esto se vierte la solución de forma manual a un matraz de bola y se realizan los siguientes pasos:

- a) Se fija el giro del matraz a una velocidad constante de 75 revoluciones por minuto (RPM).
- b) Se sumerge el matraz en un baño térmico, el cual esta a una temperatura ligeramente superior a la temperatura de transición (T_m) del lípido (tabla 6.2), i.e., temperatura en la que las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos, pasan de un estado líquido a un estado gel-sólido. Previo a este paso, se enciende el baño térmico para que alcance la temperatura deseada.
- c) Se utiliza un baño recirculador para el control de temperatura, utilizando una temperatura baja, necesaria para la condensación del solvente orgánico dentro del matraz de depósito del rotavapor.
- d) Se utiliza una bomba para generar un vacío en la solución y acelerar el proceso de evaporación.
- e) Se mantiene la solución dentro del baño térmico alrededor de dos horas.

Tabla 6.2 Tabla de temperatura de transición de los lípidos.

Lípido	T_m (°C)
DOPC	-20
DPPC	41
DOPS	-11
DODAB	45
NBD- DOPE	12

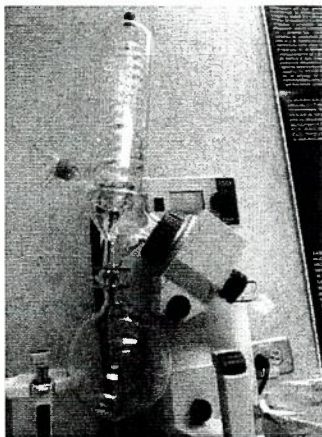
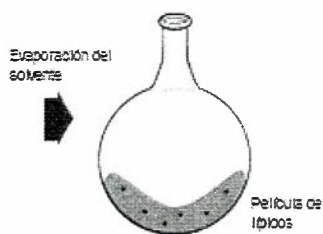


Fig. 6.1 Fotografía de rotavapor utilizado.

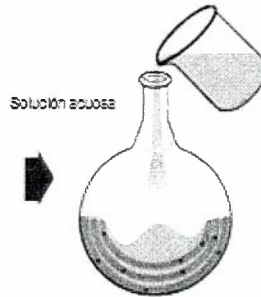
3.- Cuando el solvente se evapora por completo y la suspensión termina seca, se tiene como resultado una película de fosfolípidos sobre la pared interior del matraz utilizado la cual se ve blanquizca a simple vista.



4.- Una vez finalizado el proceso de evaporación del cloroformo/metanol se obtiene la película delgada de lípidos, esta película es una superposición de varias bicapas lipídicas (figura 6.2), de la cual se obtendrán los liposomas (vesículas) mediante un proceso de hidratación. Para hidratar la película se utilizó un búfer N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etano-sulfónico (HEPES, base y ácido) con pH neutro (7.4) a una concentración de 40 mM, filtrado con membranas con tamaños de poros de 200 nm para filtrarlo de agentes externos como el polvo.

a) Se retira del rotavapor el matraz con la película lipídica.

b) Se hidrata con búfer HEPES utilizando una micropipeta, de forma normal a la superficie con la punta de la micropipeta alejada aproximadamente un par de centímetros de la base, liberando el HEPES de forma cuidadosa. Una vez hecho esto, se coloca de nuevo al rotavapor.



c) Se fija nuevamente la velocidad giro utilizada en el paso anterior.

d) Se sumerge en el baño térmico a la misma T_m que en el proceso de evaporación del cloroformo/metanol.

5.- Se deja a la frecuencia giro que se utilizó en el proceso de evaporación y a la T_m del liposoma nuevamente permitiendo que la película de fosfolípidos se hidrate.

6.- Durante el proceso se forman agregados, por lo que se detiene el rotavapor y se deshacen los agregados con ondas de ultrasonido, utilizando un sonicador intercaladamente durante un tiempo máximo de un minuto o hasta que a simple vista la solución se vea lo más homogénea posible.

7.- Nuevamente se pone la solución a girar en el rotavapor durante una hora.

8.- Si los agregados no se han disuelto a simple vista, se repiten los pasos 6 y 7.

9.- Al final se obtienen liposomas multilamelares MLV's y estos son dispersados un par de segundos con ondas de ultrasonido. Al realizar estos pasos obtenemos SUV's y LUV's (figura 6.2).



Fig. 6.2 Micrografía obtenida mediante la técnica de DIC de liposomas obtenidos mediante el procedimiento.

10.- Una vez finalizado el proceso de hidratación se tiene una diversidad de liposomas, tanto LUV's, SUV's y SMV's. Por lo cual en este siguiente paso se tiene como objetivo tener una población de tamaños de liposomas más uniforme, logrando esto mediante un filtrado de la solución inicial de liposomas.

Para homogeneizar los tamaños de los liposomas obtenidos se hace pasar la solución por un extrusor como el que se muestra en la Figura 6.3, el cual tiene la capacidad de filtrar un máximo de 10 ml y además la presión que se ejerce sobre la solución es controlada mediante el flujo de nitrógeno. Primero se hace pasar cinco veces por un filtro de policarbonato del tamaño mayor al requerido, y luego cinco veces por otro filtro de tamaño de poros menor, según el tamaño de liposoma requerido. Con este método se obtuvo un índice de polidispersidad menor, como lo mencionan L.D Mayer y col. [28].

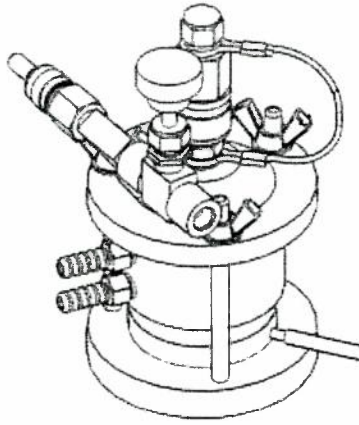


Figura 6.3 Extrusor Thermobarrel [29].

En el extrusor se colocan un filtro de policarbonato con un tamaño de poro determinado, según el tamaño de liposoma deseado (se utilizaron para las muestras los filtros de 1 μm y 200 nm de diámetro) y un filtro de desagüe de poliéster. Una vez colocados, se deposita dentro del extrusor la solución de liposomas y se comienza el proceso de extrusión abriendo de forma muy lenta la válvula del tanque de nitrógeno procurando que el flujo del líquido sea lento, gota por gota.

6.3 Protocolo de formación de lipoplejos

El siguiente paso consiste en acomplejar los liposomas que se fabricaron anteriormente con la solución de ADN preparada, para formar los lipoplejos. Para esto se realizaron diferentes concentraciones de liposomas/ADN hasta encontrar la concentración máxima de ADN en donde no se formen agregados muy grandes. El método para realizar estas concentraciones fue siguiendo los siguientes tres pasos:

- a) Primeramente se agrega un agitador magnético a un vial en donde se deposita el volumen deseado de la solución de liposomas.

- b) Se ajusta el volumen con búfer de HEPES, de tal manera que en el volumen final las concentraciones de liposomas y ADN sean las deseadas.
- c) En este paso se debe encender la placa para hacer girar el agitador magnético a 20 RPM y de esta forma incorporar el volumen de la solución de ADN deseada gota por gota ($\sim 20 \mu\text{l}/\text{min}$) de forma lenta para que el ADN se incorpore a toda la solución de liposomas, con ayuda del agitador magnético se logra una mejor homogenización del ADN en la solución de liposomas.

Se prepararon 13 muestras de lipoplejos utilizando una solución de ADN a diferentes concentraciones de $90.75 \times 10^{-10} \text{ M}$ a $2.5 \times 10^{-8} \text{ M}$ y 0.5 ml de liposomas a una concentración de $5 \times 10^{-4} \text{ M}$.

Para el caso de los AL's se utilizó una solución de Ca^{2+} para apantallar la carga de los liposomas y lograr la formación de los lipoplejos, para cada mezcla de lípidos se buscó la concentración adecuada, por lo que primero se acomplejan los liposomas con el Ca^{2+} (liposomas/ Ca^{2+}), donde estos últimos apantallan las cargas negativas de los liposomas, luego se forman los lipoplejos añadiendo el ADN al complejo liposomas/ Ca^{2+} resultando el lipoplejo liposomas/ Ca^{2+} /ADN.

6.3.1 Apantallamiento de carga de los liposomas aniónicos utilizando cationes de Ca^{2+}

En el caso de los liposomas aniónicos es necesario apantallar la carga de estos cuando se pretende acomplejar la superficie exterior con ADN, puesto que la carga neta de esta estructura lipídica es negativa. Para esto se utilizaron cationes de cloruro de calcio (CaCl_2) en distintas concentraciones hasta dar con la concentración óptima, en la cual no se formen agregados y apantalle lo suficiente la carga de los liposomas. Por simplicidad se utilizara Ca^{2+} para referirse a los cationes de CaCl_2 . Se prepararon 10 muestras de 1.5 ml con Ca^{2+} utilizando concentraciones de 10^{-6} a $5 \times 10^{-2} \text{ M}$.

6.4 Técnicas de caracterización

Las técnicas de caracterización que se utilizaron fueron aquellas con las que se pueden conocer propiedades eléctricas y mecánicas y observar las morfologías de los liposomas y lipoplejos estudiados. A continuación se describen de manera breve tres de ellas.

6.4.1 Dispersión dinámica de luz

La Dispersión Dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés), también llamada Espectroscopia de correlación de fotones es una de las técnicas experimentales más populares empleadas para la determinación de la distribución de tamaños de partículas o macromoléculas en suspensión.

En el experimento de DLS, la luz emitida por un láser de luz polarizada verticalmente e incide sobre el medio de dispersión. La luz dispersada llega al detector APD (Fotodetector de avalancha). La posición del detector es la que define el ángulo de dispersión θ . El volumen V de dispersión se define como la intersección del rayo incidente y el rayo interceptado por el detector [31].

En un experimento de DLS, se irradia una muestra de partículas en solución con un haz de luz láser de longitud de onda λ_0 . El movimiento Browniano de las partículas en suspensión origina fluctuaciones temporales en la intensidad de luz dispersada $I_{\theta_r}(t)$, a un ángulo de medición θ_r [31].

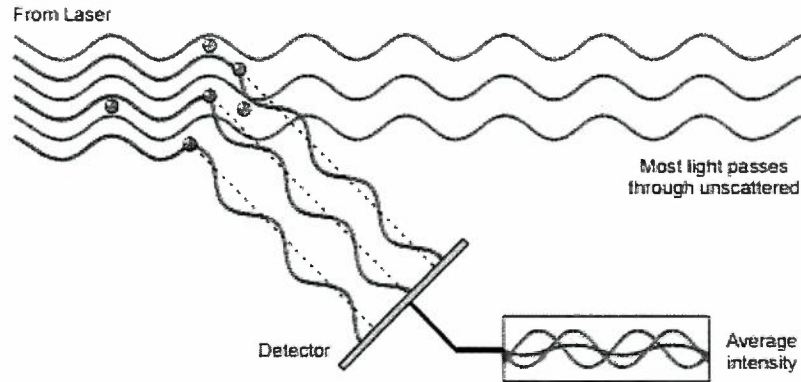


Fig. 6.6 Diagrama de cómo la luz dispersada incide en el detector y se crea una intensidad refracción promedio mediante la superposición de las distintas intensidades [31].

Debido a que las partículas están en constante movimiento Browniano, el campo eléctrico dispersado cambia constantemente, causando que la intensidad de la luz fluctúe en el tiempo. El comportamiento de esta fluctuación puede modelarse a través de la denominada función de autocorrelación, y en un experimento de DLS se mide la función de autocorrelación $g^2(q, t)$ de la luz dispersada por una muestra a un cierto ángulo:

$$g^{(2)}(q, t) = \frac{\langle I(q, 0) I(q, t) \rangle}{\langle I^2(q, 0) \rangle} \quad (2)$$

$I(q, 0)$ representa la intensidad de la luz medida en $t=0$ e $I(q, t)$ en un tiempo t y los corchetes representan el promedio temporal de los valores de la intensidad de la luz medida a diferentes valores del tiempo t . Donde $q \equiv \frac{4\pi n}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2}$ es el número de onda, n es el índice de refracción del medio, λ es la longitud de onda del láser y θ es el ángulo de dispersión.

La Función de correlación correspondiente del campo eléctrico dispersado $g^{(1)}(q, t)$ se obtiene por medio de la relación de Siegert $g^2(q, t) = 1 + b|g^{(1)}(q, t)|^2$, donde b es una constante experimental. La función de correlación decae con el tiempo de acuerdo a la dinámica de la muestra, para el caso de los sistemas coloidales más diluidos el decaimiento

de $g^{(1)}(q, t)$ se describe con una función exponencial simple, para nuestro caso de interés se utilizaron vesículas grandes unilamelares (LUV's). En el caso de estas vesículas el decaimiento de las funciones de correlación difiere de una exponencial simple y de hecho se pueden describir mediante otras aproximaciones como acumulantes, Countin o la función exponencial estrecha.

$$g^{(1)} \sim \exp -\Gamma t^\beta \quad (3)$$

En esta ecuación $\Gamma = 1/\tau$ es la frecuencia de relajación, τ es el tiempo de relajación y β el exponente de estrechamiento.

6.4.2 ELECTROKINÉTICA

El Zetasizer Nano es un instrumento con la capacidad de medir tres características fundamentales de partículas y moléculas en un medio líquido utilizando distintas celdas en la que se deposita la solución. Estos tres parámetros fundamentales son tamaño de partícula, potencial zeta y el peso molecular. En este trabajo nos interesaremos en los tamaños, potencial zeta y en la conductividad [32].

Para realizar estas mediciones, el instrumento Zetasizer Nano cuenta con un arreglo óptico pre-alineado y con posición de medición programable para mediciones de tamaños y potencial zeta dentro de un amplio rango de concentraciones [32].

6.4.2.1 Técnica para medición de tamaños

La medición de tamaños en este equipo se lleva a cabo por DLS utilizando un ángulo de dispersión fijo de 90° . El sistema determina el tamaño de las partículas de la muestra utilizando DLS calcula los tamaños utilizando teorías establecidas. Recordando que el movimiento Browniano se define como: “El movimiento aleatorio o también llamado errático que se observa en partículas microscópicas disueltas en un medio fluido.”

Una partícula de menor tamaño se moverá rápido y una partícula de mayor tamaño tendrá un movimiento browniano lento. La relación entre el tamaño de la partícula y su movimiento Browniano está definido por la ecuación de Stokes-Einstein.

$$D = \frac{K_b T}{6\pi\eta r} \quad (4)$$

Donde D es el coeficiente de difusión, K_b es la constante de Boltzmann, T es la temperatura, es la η viscosidad del medio y r el radio de la partícula. El Zetasizer mide las fluctuaciones en la intensidad de luz dispersada y la usa para calcular el tamaño de las partículas en la muestra.

La función de correlación tiene información acerca del movimiento y por lo tanto del tamaño de la partícula. En un experimento de DLS normalmente el intervalo de tiempo que toma llegar a cero la correlación es del orden de 1 a 10 milisegundos. Dado esto, se toman (δt) en el orden de nanosegundos o microsegundos. Si se comparan una señal consigo misma en un tiempo t , esta tendrá una correlación y entonces las señales serán idénticas como se muestra en la figura (6.7) por lo que la correlación reportada será 1. Típicamente las señales se comparan en distintos (δt) por lo que si medimos la correlación en $(t + \delta t)$, $(t + 2\delta t)$, $(t + 3\delta t)$, ... , $(t + n\delta t)$ eventualmente la correlación alcanzará el cero [32].

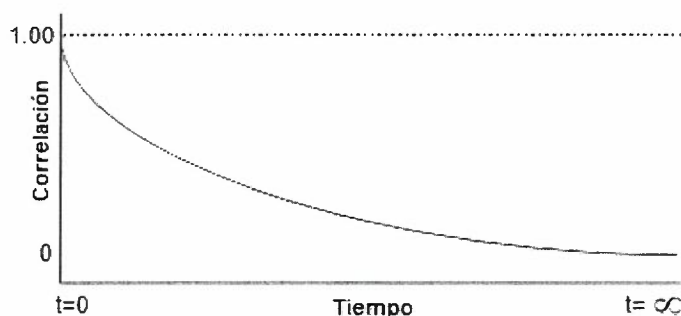


Figura 6.7. Curva típica de correlación en el tiempo.

Para partículas de mayor tamaño, el tiempo de decaimiento en la curva es mayor que el de la función de correlación para partículas pequeñas como se muestra en la figura 6.8.

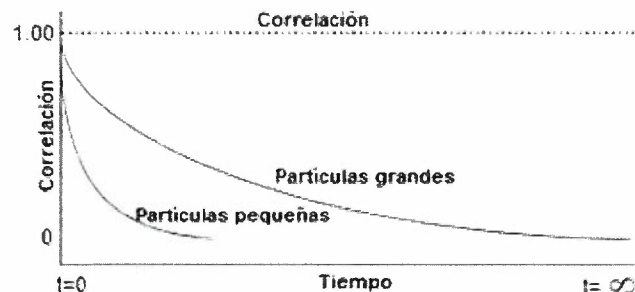


Figura 6.8. Comparación de dos curvas para partículas grandes y pequeñas.

Una vez medida la función de correlación se puede utilizar para calcular los tamaños promedio. El software del Zetasizer utiliza la relación de Stokes-Einstein para extraer la razón de decaimiento y, posteriormente, utiliza ajuste por acumulantes para calcular el coeficiente de difusión y mediante la ecuación (4) se calculan los tamaños promedio formando una distribución de tamaños.

6.4.2.2 Técnicas para medición de potencial zeta

Para realizar la medición del potencial zeta, el equipo ZetaSizer Nano determina la movilidad electroforética y después aplica la ecuación de Henry (como se detalla más adelante). Para obtener esta movilidad electroforética se realiza un experimento de electroforesis¹¹ en la muestra y se mide la velocidad de las partículas utilizando velocimetría láser doppler [32].

¹¹La *electroforesis* es el movimiento relativo de una partícula cargada en un líquido en el que está suspendida y bajo la influencia de un campo eléctrico.

Cuando se aplica un campo eléctrico a un electrolito, las partículas suspendidas son atraídas hacia el electrodo de carga opuesta. Las fuerzas viscosas actúan en las partículas oponiéndose al movimiento. Cuando se logra alcanzar el equilibrio entre estas dos fuerzas, las partículas se mueven con una velocidad constante. Esta velocidad depende del campo eléctrico (E), la constante dieléctrica del medio (ϵ), la viscosidad del medio (η) y del potencial zeta (ζ). La velocidad de una partícula en un campo eléctrico es comúnmente nombrada como *movilidad electroforética* (μ_e), esta se mide y con ella se determina ζ .

Con esto se puede obtener el potencial zeta de la partícula aplicando la ecuación de Henry.

$$\mu_e = \frac{2\epsilon\zeta f(K_\alpha)}{3\eta}$$

Donde $f(K_\alpha)$ es la función de Henry, comúnmente se utilizan dos valores para aproximar esta función, 1 y 1.5.

Para medir la μ_e se utiliza una celda como se muestra en la figura 6.9, y en donde se vierte el líquido dentro del capilar.

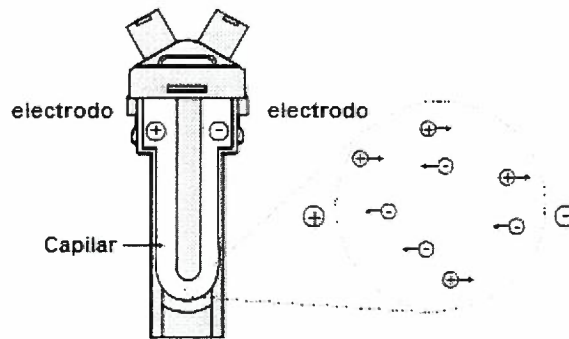


Fig. 6.9. Celda para mediciones de potencial zeta del Zetasizer Nano [29].

Como se observa en la figura 6.10, la luz dispersada a un ángulo de 17° se combina con el haz de referencia. Esto produce una fluctuación en la intensidad de la señal, donde esta fluctuación es proporcional a la velocidad de las partículas. Se utiliza un procesador de señales digitales para extraer las frecuencias características de la luz dispersada y con esto se estima la velocidad promedio de las partículas [32].

La forma que tiene el capilar de la celda beneficia la medición de la velocidad electroforética puesto que, en un punto de la celda, llamada capa estacionaria, el flujo electroosmótico¹² es cero, donde ambos flujos se cancelan. Si realizamos la medición de la velocidad electroforética en este punto, obtendremos el valor real de la velocidad.

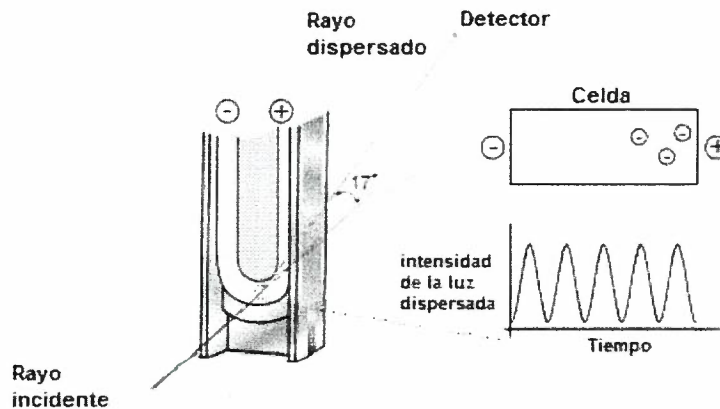


Fig. 6.10. Esquema de medición del potencial zeta [32].

Volviendo a la ecuación de Henry, utilizamos el valor medido para la movilidad electroforética para calcular el potencial zeta, teniendo un conocimiento previo de los parámetros restantes del medio [29].

¹²Se le llama *flujo electroosmótico* al flujo o movimiento de un fluido en un capilar muy pequeño cuando es aplicado un campo eléctrico.

6.4.3 Microscopía confocal de fluorescencia

El microscopio confocal ofrece muchas ventajas sobre el microscopio convencional óptico de campo amplio, incluyendo la habilidad de controlar la profundidad del campo, reducir o eliminar la información de fondo fuera del plano focal y la capacidad de coleccionar varias secciones ópticas de muestras gruesas, como se puede apreciar en la figura 6.11, el enfoque de en un solo plano permite que recolectar la fluorescencia de un plano de interés obteniendo imágenes con mejor detalle ((d),(e) y (f)), mientras que utilizando un microscopio convencional no se obtienen estos detalles para las mismas muestras ((a),(b) y (c)). La clave para el enfoque confocal es el uso de técnicas de filtrado espacial que permitan eliminar la luz desenfocada de muestras cuyo espesor se encuentra inmediata al plano del foco [33].

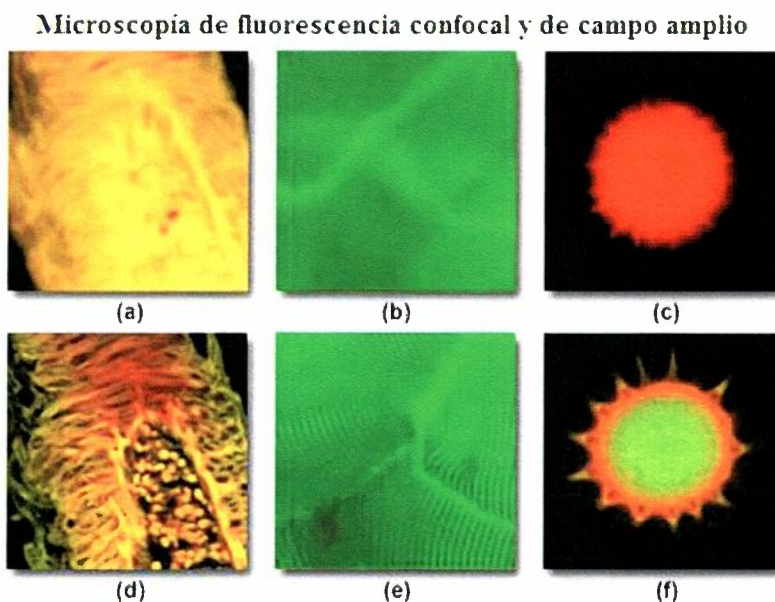


Fig. 6.11. (a), (b) y (c) corresponden a micrografías capturadas con un microscopio de fluorescencia de campo amplio, mientras que (d), (e) y (f) corresponden a micrografías capturadas con un microscopio de fluorescencia confocal [33].

En la figura 6.12 se representa el diagrama del principio físico de la técnica microscopía confocal de barrido láser (CLSM, por sus siglas en inglés) en epifluorescencia.

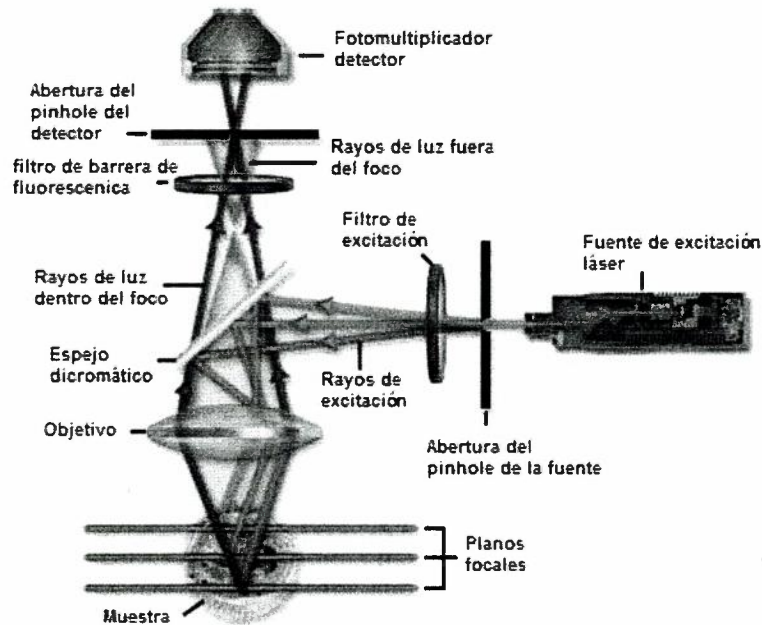


Fig. 6.12. Diagrama de la configuración de un CLSM [33].

La luz emitida de la fuente de excitación pasa a través de la abertura del *pinhole* que está situado en el plano focal con un punto de escaneo en la muestra y la segunda apertura de *pinhole* se encuentra posicionada enfrente del detector (o tubo fotomultiplicador). El espejo refleja la luz de la fuente hacia la muestra en el plano focal definido después una segunda fluorescencia es emitida de los puntos de la muestra (en el mismo plano focal) pasando de nuevo por el espejo dicromático y enfocado al punto focal de la abertura en el *pinhole* del detector. La apertura del segundo *pinhole* se encarga de eliminar la emisión fuera del plano focal dejando pasar únicamente la radiación emitida por el plano de interés de la muestra como se aprecia en el diagrama de la figura 6.12, de esta forma, la pequeña fracción de la radiación de fluorescencia que se encuentra fuera del plano focal no es detectada por el fotomultiplicador y esta no contribuye al resultado final de la imagen. El filtro de excitación,

espejo dicromático y el filtro de barrera se encargan de realizar tareas similares, logrando obtener, en conjunto con el reenfoque de la muestra al plano focal deseado, un mejor resultado y deseable.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sección se presentan, analizan y discuten los resultados obtenidos de las diferentes medidas obtenida con las técnicas experimentales utilizadas (electrocinética, DLS y microscopia confocal). Primero se hace un análisis de los resultados de la movilidad electroforética del sistema catiónico (liposomas de DODAB y DODAB/ADN), discutiendo los efectos de los componentes que forman a los lipoplejos, se incluyen estadísticas de tamaños correspondientes e imágenes obtenidas mediante microscopia confocal. Después se hace le mismo análisis de los sistemas aniónicos, (DOPS–DOPC, DOPS–DOPC/Ca²⁺ y DOPS–DOPC/Ca²⁺/ADN, DOPS–NBD-DOPE/Ca²⁺/ADN) y finalmente se discute el comportamiento del sistema neutro (DPPC/ADN). En adelante se utilizarán los corchetes cuadrados [] para indicar la concentraciones utilizadas, i.e., todo lo que este encerrado en corchetes se referirá a que son concentraciones.

Como se mencionó en capítulo de metodologías, las medidas de movilidad electrocinética se llevaron a cabo con dispositivo Zetasizer Nano ZS. Se efectuaron mediciones con tres repeticiones a todos los sistemas de liposomas: tamaños, potencial zeta y conductividad (σ). A continuación se presentan los resultados de estas tres cantidades físicas en forma de tablas y gráficas para los diferentes sistemas estudiados.

7.1 Sistema catiónico

Como sistema catiónico se utilizaron liposomas de DODAB posteriormente fueron acomplejados formando el complejo DODAB/ADN.

7.1.1 Determinación de tamaños

El comportamiento de los tamaños de los liposomas de DODAB en función de la concentración de ADN [ADN] es, como se muestra la figura 7.1. El diámetro hidrodinámico promedio de los liposomas obtenidos fue de 195 ± 8 nm. En la formación de los lipoplejos la [liposomas] se mantuvo fija con un valor de 5×10^{-4} M variando la [ADN] en un rango de 1.81×10^{-10} M a 2.5×10^{-8} M. La figura muestra el comportamiento de los tamaños obtenidos al ir aumentando la [ADN]. Se puede ver claramente que el tamaño de los liposomas aumenta al ir aumentando la [ADN], esto da señal de que el ADN se va uniendo a los liposomas catiónicos debido a las interacciones electrostáticas como se mencionó en la sección 2.2.4.

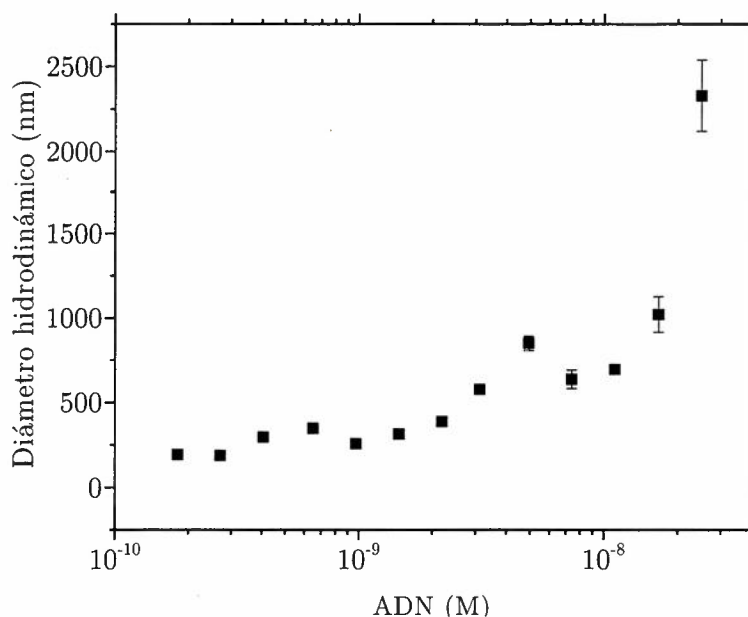


Fig. 7.1. Diámetro hidrodinámico de los lipoplejos formados por liposomas de DODAB vs. [ADN].

Al aumentar la [ADN] se observa que los diámetros de los lipoplejos aumentan hasta el orden de 800 nm después de la concentración 10^8 M, después los tamaños se disparan hasta de alrededor de 2 μm para la [ADN] más grande utilizada (2.5×10^{-8} M), esto se debe a que se forman agregados.

7.1.2 Propiedades electrocinéticas

Los liposomas utilizados para los estudios de electrocinética fueron tomados de la misma solución que se preparó para las medidas de los tamaños. Y de igual manera, se mantuvo fija la [liposomas] a 5×10^{-4} M y la [ADN] se fue variando hasta alcanzar la concentración máxima de 1.67×10^{-8} M.

7.1.2.1 Potencial Z

La figura 7.2 muestra el comportamiento del potencial zeta (ζ) de los liposomas mezclados con ADN. Como se puede observar, se trata de dos regiones distintas, i.e., una región con ζ positivo, que corresponde a las [ADN] de 1.81×10^{-10} M a 6.5×10^{-10} M, y otra región de ζ negativo, que corresponde a las [ADN] de 9.75×10^{-10} M a 1.67×10^{-8} M. La primera región con ζ positivo, se debe prácticamente a las cargas de los liposomas, ya que hay más cargas positivas de los liposomas que cargas negativas del ADN. Es decir, la [ADN] es muy baja, por lo que los liposomas no quedan totalmente cubiertos por el ADN, predominando así su carga positiva.

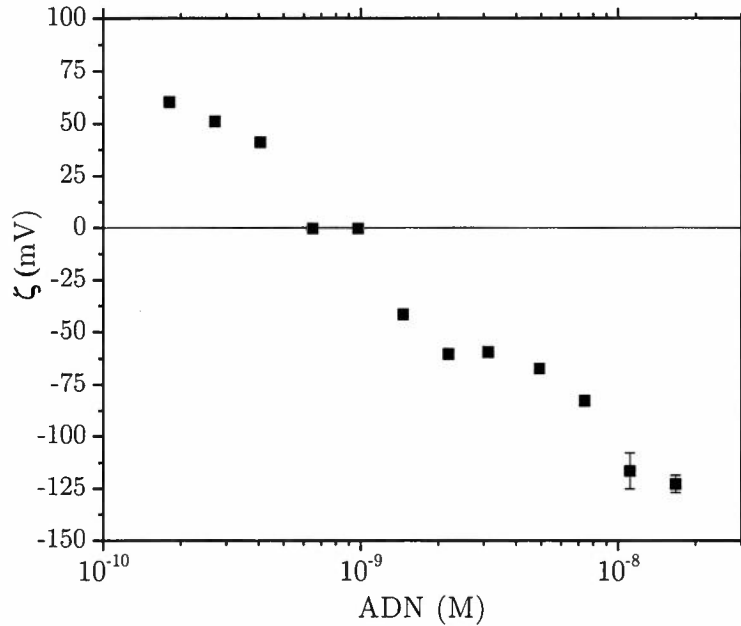


Fig. 7.2. Potencial z de los liposomas vs. [ADN].

Al ir aumentando la [ADN], éste se va distribuyendo en todos los liposomas hasta cubrir por completo las superficies de todos los liposomas, apantallando así su carga obteniendo valores de $\zeta = 0$. Este valor del potencial se alcanza para la [ADN] de 8.125×10^{-10} M. Aquí las cargas de los liposomas y la del ADN se igualan llegando al punto llamado isoelectrico (o isoneutralidad), donde el complejo formado por los liposomas y el ADN obtiene carga neutra. La segunda región con ζ negativo, se debe prácticamente a que al ir incrementando la [ADN], las cargas negativas de éste superan a las cargas positivas de los liposomas apantallando todas sus cargas e invirtiendo el signo de la carga superficial de los liposomas debido a que hay un exceso de cargas de ADN, alcanzando valores del ζ de alrededor de más de 100 mV. Los cambios de los signos del ζ nos indican que efectivamente el ADN se va “pegando” a los liposomas formando así los lipoplejos catiónicos.

7.1.2.2 Conductividad eléctrica

Las medidas de conductividad eléctrica (σ) se obtuvieron de las mismas corridas experimentales del ζ , i.e., al obtener el ζ se obtiene también las mediciones de la σ . Debido a que los cambios del ζ dependen de la [ADN], de la misma manera evolucionan los valores de la σ . En la gráfica 7.3 se observan los valores de la conductividad de los liposomas al ir incrementando la [ADN].

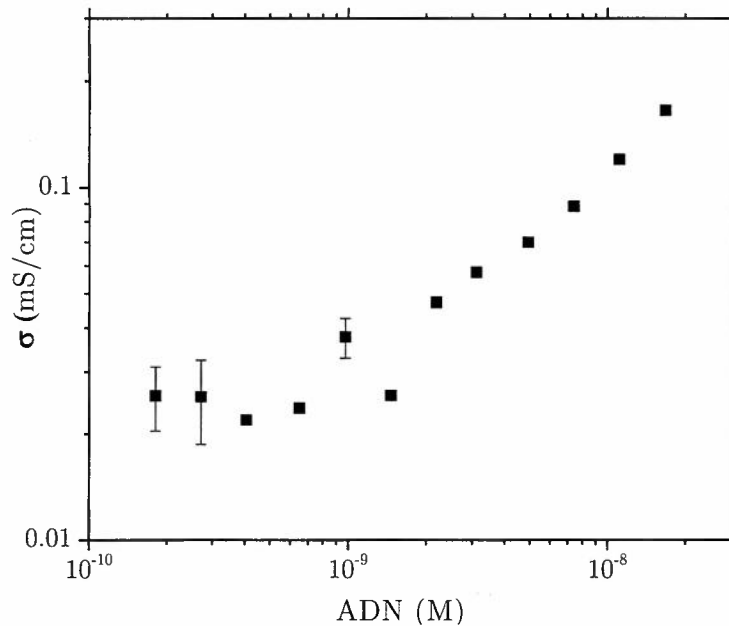


Fig. 7.3. Conductividad eléctrica de los liposomas vs. [ADN].

Se observa que la σ de los lipoplejos se incrementa al ir incrementando la [ADN], esto debe a que al irse acomplejando el ADN con los liposomas, el ADN libera iones de sodio (Na^+), mientras que los liposomas liberan iones de bromo (Br^-), aumentando así la conductividad del medio. Esto aporta una prueba más de la complejación de los liposomas con el ADN formando así a los lipoplejos.

7.2 Sistemas aniónicos

Como sistemas aniónicos se utilizaron liposomas de una mezcla de DOPS–DOPC y DOPS–NBD–DOPE, posteriormente se utilizaron los sistemas DOPS–DOPC/ Ca^{2+} /ADN y DOPS–NBD–DOPE/ Ca^{2+} /ADN.

7.2.1 Determinación de tamaños

Aquí se describe el comportamiento de los tamaños de los liposomas aniónicos de DOPS–DOPC y DOPS–NBD–DOPE, en función de la $[\text{Ca}^{2+}]$ y de la $[\text{ADN}]$.

Para el caso de los liposomas de DOPS–DOPC el tamaño promedio obtenido fue de 139 ± 6 nm. Para obtener estos valores se realizaron tres repeticiones de muestras de liposomas variando las concentraciones en un rango de 5×10^{-6} M a 1×10^{-4} M. La figura 7.4 muestra el comportamiento de los tamaños obtenidos al ir aumentando la $[\text{liposomas}]$ de DOPS–DOPC. No se observa una variación importante con respecto a los tamaños en función de la concentración de liposomas en solución, como es de esperarse.

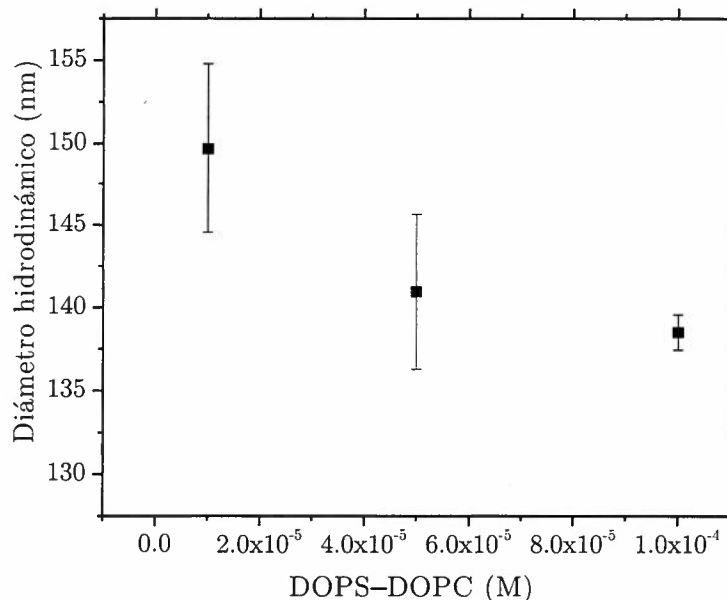


Fig. 7.4. Diámetro hidrodinámico de liposomas formados de DOPS-DOPC vs concentración.

Para el caso de los liposomas de DOPS–NBD-DOPE se realizaron tres mediciones de tamaños y se obtuvieron tamaños promedio de 188 ± 9 nm. Se fijó la [liposomas] a 5×10^{-6} M, en promedio, estos liposomas obtenidos fueron de un tamaño superior a los de DOPS–DOPC. Se prepararon muestras de liposomas DOPS–NBD-DOPE variando la $[Ca^{2+}]$ en un rango de 10^{-6} M a 0.05 M. Esto se hizo con el fin de encontrar la concentración óptima, i.e., la máxima concentración en donde los tamaños fueran estables. En la figura 7.5 se muestra el comportamiento de los tamaños de los liposomas DOPS–NBD-DOPE al ir aumentando la concentración de $[Ca^{2+}]$.

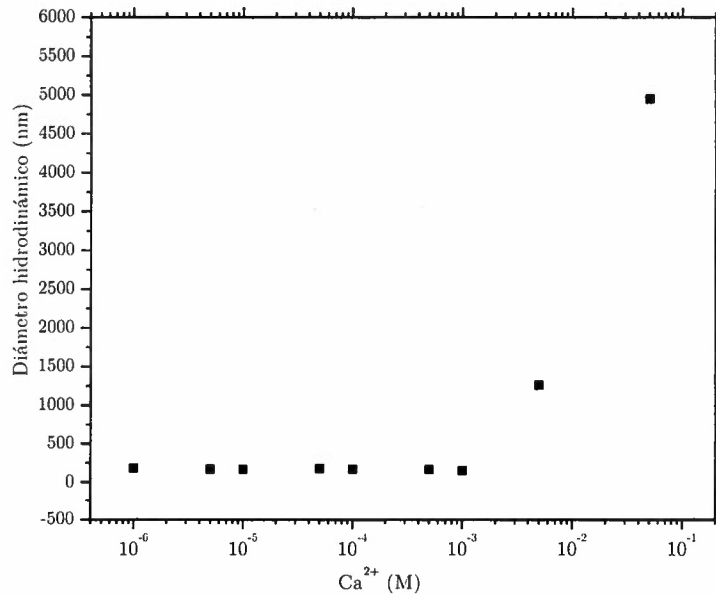


Figura 7.5 Diámetro hidrodinámico de liposomas de DOPS–NBD-DOPE vs. $[Ca^{2+}]$.

Se observa que el diámetro de los liposomas se mantiene estable hasta las dos $[Ca^{2+}]$ más altas en donde se dispara de forma exponencial, este comportamiento muestra que al aumentar excesivamente la $[Ca^{2+}]$, éstos van apantallando las cargas superficiales de los liposomas, neutralizándolos, lo que da lugar a la formación de agregados. Este

comportamiento se verá reflejado en el comportamiento de la gráfica del ζ correspondiente al mismo sistema.

7.2.2 Propiedades electrocinéticas

Los liposomas de DOPS–DOPC y DOPS–NBD-PE utilizados para los estudios de electrocinética fueron cogidos nuevamente de la misma solución que se preparó para las medidas de los tamaños. Y de igual manera, se varió la [liposomas] de 5×10^{-6} a 1×10^{-4} M.

7.2.2.1 Potencial Z

La figura 7.6 muestra el comportamiento del ζ de los liposomas de DOPS–DOPC en función de su concentración. Se obtuvo, en promedio, un $\zeta = -70.65 \pm 0.122$ mV para las cinco mediciones de ζ de los liposomas a diferentes concentraciones. Se observa que el ζ es menor a -30 mV lo cual implica que las interacciones electrostáticas de repulsión entre estos liposomas es lo suficientemente grande como para evitar que estos se “adhieran” entre ellos mismos, provocando agregaciones o que la solución se sedimente.

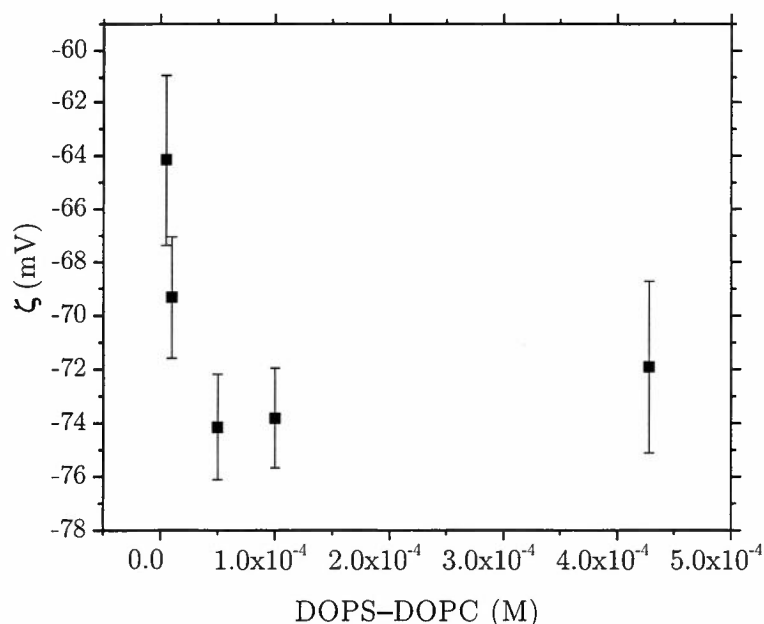


Fig. 7.6. Comportamiento del ζ de liposomas de DOPS–DOPC al aumentar su concentración.

A estos liposomas aniónicos de DOPS-DOPC se agregaron cationes de Ca^{2+} con el fin de apantallar la carga de estos y poder formar, posteriormente, lipoplejos fácilmente mediante interacciones electrostáticas. Para esto se caracterizó primeramente el ζ de los liposomas DOPS–DOPC/ Ca^{2+} . Utilizando una $[Ca^{2+}]$ de 5×10^{-3} M se realizaron tres mediciones del ζ obteniendo un valor promedio de -28 ± 1.232 mV. Se utilizó esta $[Ca^{2+}]$ debido a que se encontró para el sistema DOPS–DOPE que esta era la concentración máxima en la cual las plaquetas metálicas de las celdas empleadas no se quemaban. Utilizando esta $[Ca^{2+}]$ se observó que se apantalló la carga negativa de los liposomas, en promedio de -70.65 mV hasta -28 mV, de acuerdo con los resultados obtenidos anteriormente para los liposomas DOPS–DOPC, aunque en teoría se pudieron haber alcanzado valores del ζ positivos agregando mayores $[Ca^{2+}]$ en las mediciones que se realizaron, sin embargo las plaquetas metálicas, de las celdas de medición empleadas, se quemaban a altas concentraciones de cationes.

Al tener el complejo DOPS–DOPC/ Ca^{2+} formado, se añadió ADN para formar a los lipoplejos. Para esto se prepararon muestras utilizando distintas $[ADN]$ en un rango de 1.81×10^{-10} a 2.5×10^{-8} M, manteniendo fijas las $[liposomas]$ de 1.66×10^{-4} M y $[Ca^{2+}]$ de 5×10^{-3} M en todos los casos. La gráfica de la figura 7.6 muestra el comportamiento del ζ del complejo cuando se va incrementando la $[ADN]$.

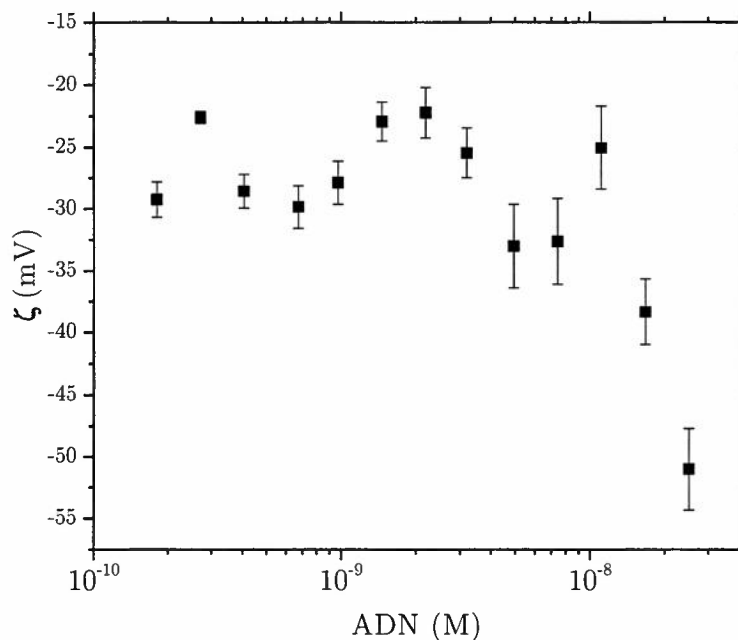


Fig. 7.7. Comportamiento del ζ de los complejos DOPS–DOPC/ Ca^{2+} vs. [ADN].

Se observa que para bajas [ADN] el ζ tiene un valor aproximado de -25 mV . Este valor oscilatorio del ζ se conserva hasta alcanzar valores de [ADN] de 10^{-8} M , donde aumenta significativamente con valores negativos. En este rango de [ADN], éste se va “pegando” a los complejos liposomas/ Ca^{2+} , necesitando concentraciones de 10^{-8} M para apantallar todas las cargas del complejo e iniciar la agregación de estos, incrementado negativamente los valores del ζ .

Los mismos estudios realizados para los liposomas de DOPS–DOPC, se hicieron para los liposomas de DOPS–NBD-PE. Primero se realizaron mediciones del ζ de los liposomas en función de la $[\text{Ca}^{2+}]$. Para ellos se utilizaron las mismas muestras con las que se hicieron las mediciones de tamaños de los liposomas, la figura 7.7 muestra el comportamiento del ζ .

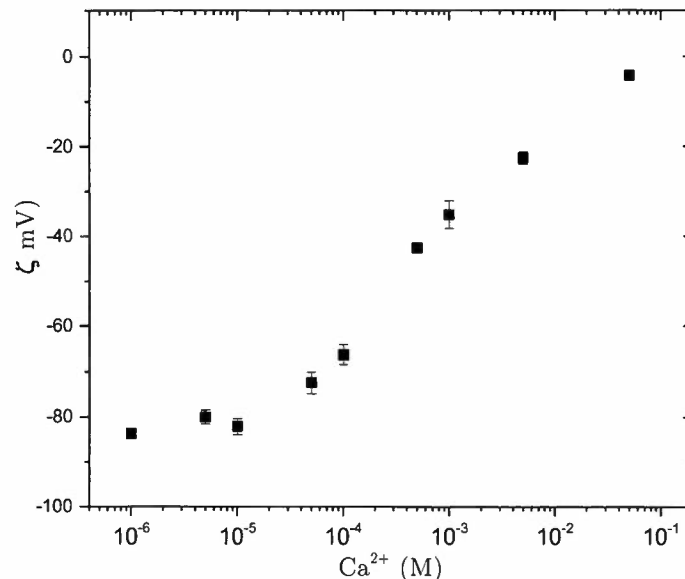


Figura 7.8 Comportamiento del ζ de los liposomas de DOPS–NBD–DOPE al incrementar la $[Ca^{2+}]$.

Cómo se puede apreciar en la gráfica, el ζ de los liposomas disminuye de un valor negativo hacia un valor de cero. La disminución se inicia a partir de la $[Ca^{2+}]$ de 10^{-5} M, alcanzando valores del ζ cercanos a cero para las $[Ca^{2+}]$ más altas, aproximadamente de 0.1 M. Estos valores del ζ indican que se logró apantallar la carga de los liposomas con los cationes de Ca^{2+} . Comparando con la gráfica de la figura 7.5 tiene sentido que los tamaños aumenten, puesto que como en módulo el ζ disminuye, las fuerzas repulsivas entre los liposomas son menores de igual forma y la solución coloidal se vuelve inestable permitiendo la agregación de liposomas. Se sabe que las soluciones coloidales estables tienen valores de ζ entre -30 mV y 30 mV [32].

7.2.2.2 Conductividad eléctrica

Al igual que para el caso de los sistemas catiónicos, las medidas de conductividad eléctrica (σ) se obtuvieron de las mismas corridas experimentales del. Debido a que los cambios del ζ dependen de la concentración de $CaCl_2$ y/o ADN, de la misma manera evolucionan los

valores de la σ . En la gráfica 7.9 se observan los valores de la conductividad de los liposomas DOPS/DOPC al ir incrementando la concentración.

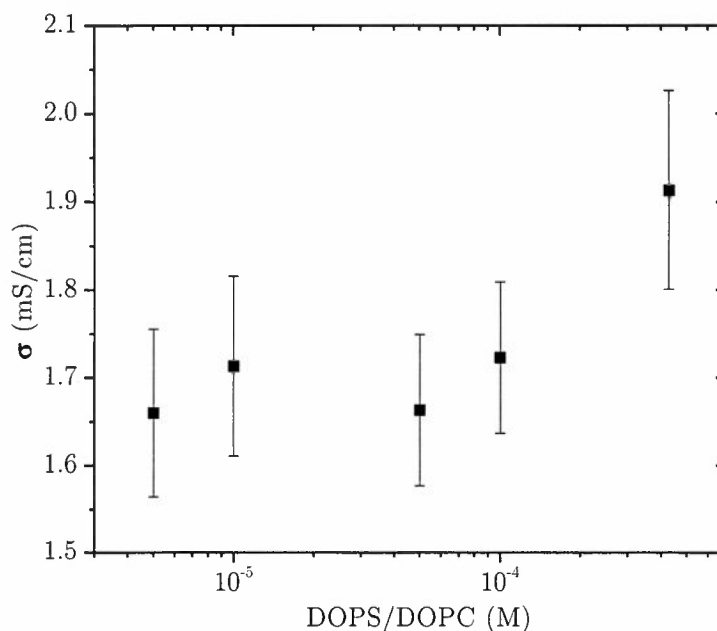


Fig. 7.9. Conductividad eléctrica de los liposomas a distinta concentración.

Se observa que la σ se mantiene constante a distintas concentraciones de DOPS–DOPC, presentando variaciones importantes hasta la concentración más alta. Esto se debe a que aumenta la concentración de iones de Na^+ presentes en el medio, proporcionados por el DOPS, debido a su disociación en el medio acuoso. Se obtuvo un valor promedio de σ de 1.734 ± 0.126 mS/cm.

También se obtuvieron los valores de la σ del sistema DOPS–DOPC/ Ca^{2+} al hacer las medidas del ζ . Se obtuvo un valor promedio de la σ de 2.363 ± 0.134 mS/cm utilizando una $[\text{Ca}^{2+}]$ de 5×10^{-3} M. De igual manera, al aumentar la $[\text{Ca}^{2+}]$ aumenta considerablemente la conductividad de la solución, como se esperaba.

Se realizó además un estudio de la σ para los lipoplejos DOPS–DOPC/ Ca^{2+} /ADN en función de la [ADN]. Los valores fueron tomados de las mismas mediciones que se realizaron

para el ζ , del mismo sistema. La gráfica de la figura 7.10 presenta el comportamiento de la σ al incrementar la [ADN].

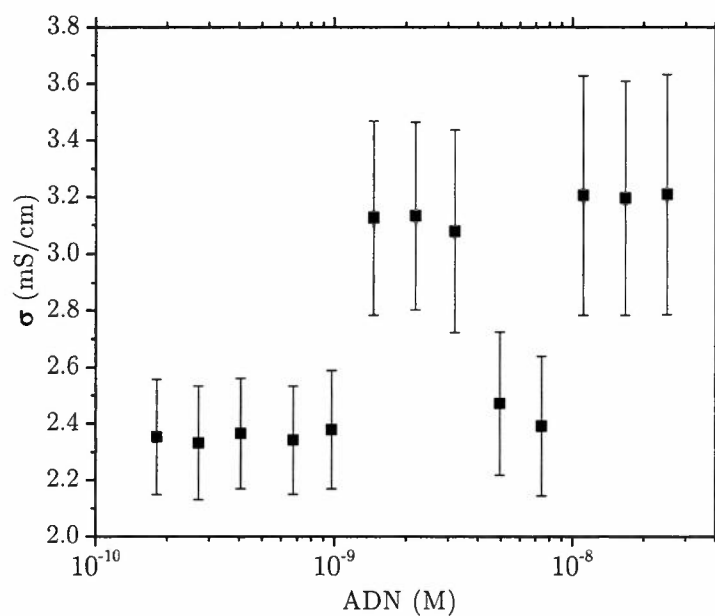


Fig. 7.10. Comportamiento de la σ de los lipoplejos formados por DOPS-DOPC/ Ca^{2+} vs. [ADN]

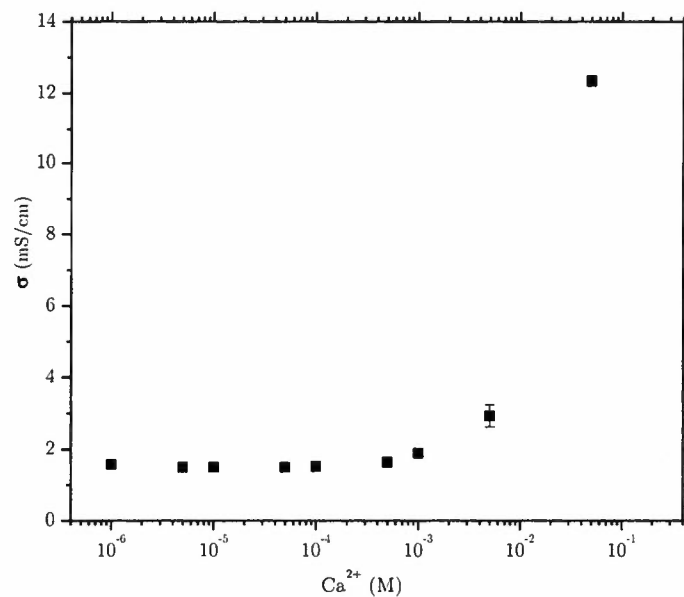


Fig. 7.11. Comportamiento de la σ del complejo DOPS-NBD-DOPE vs. [Ca^{2+}].

7.2.3 Imágenes de microscopia confocal

Además de los resultados de los tamaños obtenidos por la técnica de DLS, utilizando el Zetasizer, se obtuvo una distribución de tamaños por medio de imágenes obtenidos por CLSM de dos de los sistemas anteriormente analizados: DOPS–DOPC y DOPS–NBD–DOPE. Cabe señalar que las muestras analizadas con esta técnica no fueron filtradas, i.e., no fueron pasadas por el extrusor, como se describió en la parte del protocolo de fabricación de liposomas. El objetivo fue tener una distribución de tamaños de los liposomas cuando no son filtrados, utilizando el microscopio, ya que haciéndolo por medio del Zetasizer, al tener tamaños del orden de micras, el índice de polidispersidad obtenido era muy grande (uno) para todos los tamaños mayores a 1 μm , por lo tanto no se podía obtener una distribución real de la gran mayoría de tamaños de liposomas contenidos en la muestra sin filtrar.

La figura 7.12 muestra dos imágenes, A y B, de los liposomas de DOPS–DOPC, en donde se observan estructuras cuasiesféricas bien definidas.

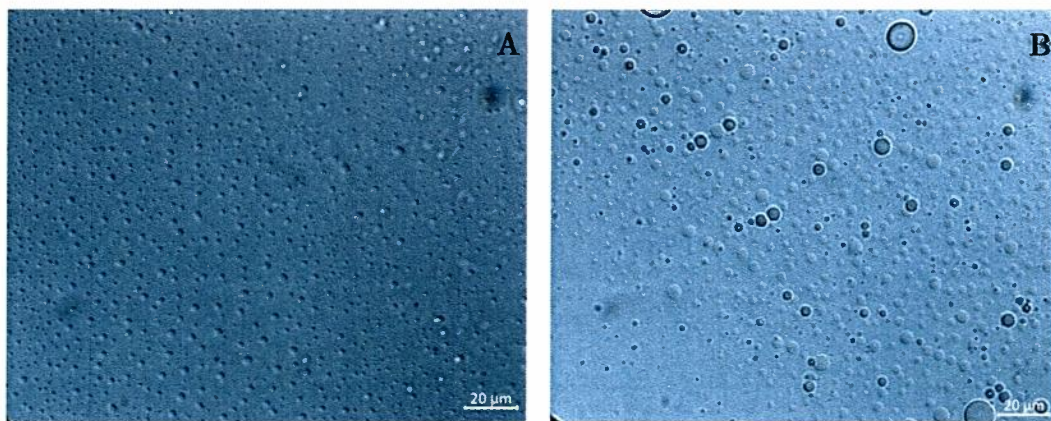


Fig. 7.12. Imágenes microscopia confocal de los liposomas de DOPS–DOPC.

En A se observa una distribución de tamaños de liposomas de entre 0.59 y 3.75 μm , mientras que en B se observan tamaños de entre 0.62 y 11.52 μm . De la imagen A se realizó una estadística de los tamaños para encontrar los rangos en los cuales estos liposomas son

más frecuentes (Fig. 7.13). Se observa un rango de tamaños que vas desde aproximadamente de 100 nm hasta los 4 μm , obteniendo un máximo de liposomas con tamaños de alrededor de 1.4 μm .

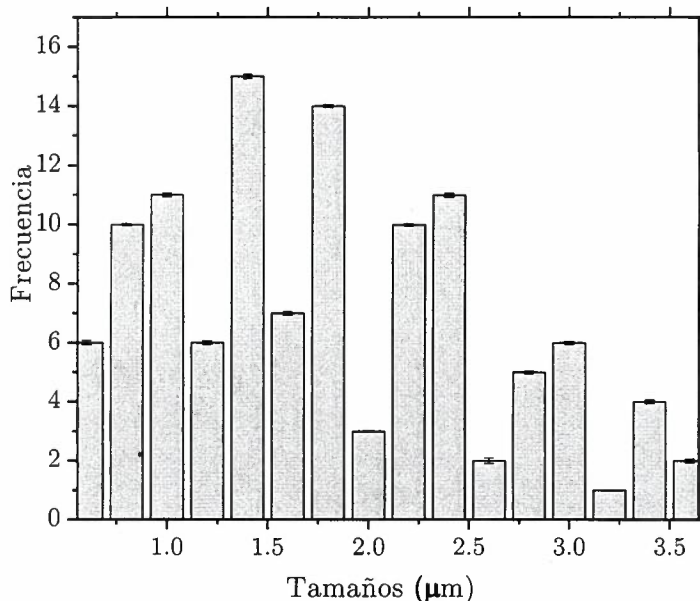


Fig. 7.13. Distribución de tamaños de liposomas de DOPS-DOPC.

Es importante señalar que en la preparación de la muestra se utilizó redispersión por ondas de ultrasonido con tiempos no controlados, i.e., durante la hidratación de las bicapas de lípidos se observaron agregados los cuales fueron desagregados mediante ondas de ultrasonido (sonicación) en diferentes intervalos. Durante la hidratación, de la muestra con el rotavapor, se observaron agregados a simple vista, por lo que la muestra se sometió a sonicación por 1 min, después se devolvió la muestra al rotavapor para que continuará hidratándose. Aproximadamente después de 2 h si en la muestra se continuaban observando agregados, se volvía a sónica durante otro min, sino era el caso, se dejaba terminar el tiempo de hidratación en el rotavapor.

En el caso sistema de los liposomas marcados fluorescentemente, el sistema fue DOPS-NBD-DOPE, del cual se tomaron imágenes utilizando microscopía de fluorescencia (con el mismo CLSM). Para ello se tomó en cuenta que el grupo NBD, anclado en la cabeza

polar del lípido neutro DOPE, se excita en la longitud de onda de 460 nm y emite en 529 nm. A pesar de que los liposomas forman una bicapa, solamente la monocapa externa de éste es la que se observa en el color verde.

Al igual que el sistema DOPS–DOPC, para observar la distribución de tamaños de estos liposomas, tampoco fueron sometidos a la técnica de filtrado. La figura 7.14 muestra una imagen de los liposomas obtenidos, donde los liposomas se observan como puntos verdes. Desafortunadamente, en el fondo se observa una mancha verde, la cual pertenece a todos los lípidos que se quedaron en la solución acuosa, i.e., todos aquellos lípidos que no formaban parte de la estructura liposómica.

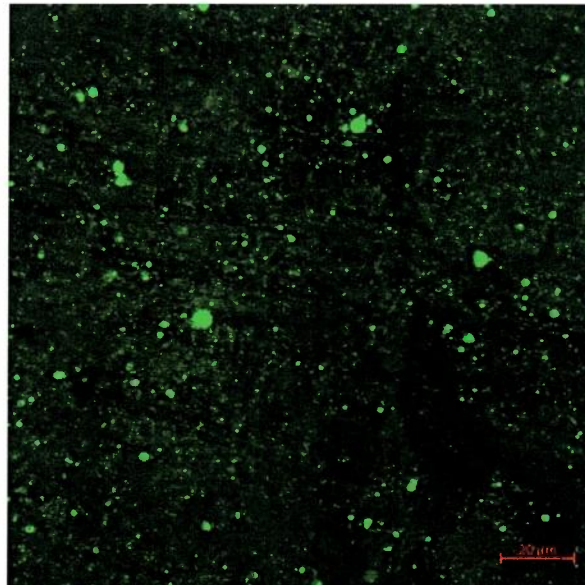


Fig. 7.14. Imágenes de liposomas de DOPS–NBD–DOPE obtenidas por microscopia de fluorescencia.

La distribución de tamaños de estos liposomas fue menor a la del sistema DOPS–DOPC. Ya que en su mayoría se observan en un rango de entre los 100 nm hasta los 2.26 μm (Fig. 7.15). Sin embargo, se observan liposomas o agregados con tamaños del orden de 4 μm . La población más grande de liposomas fue de entre 0.8 y 1.2 μm .

En la figura 8.16 se muestran dos imágenes, A y B, obtenidas por microscopía de fluorescencia, donde se observan liposomas de tamaño de alrededor 1.2 μm y 5.5 μm respectivamente. En la figura 7.16-B se observa con mejor resolución la figura del liposoma, con un contorno mejor marcado que aquel de la figura 7.16-A. Cabe señalar que para obtener imágenes deseadas, i.e., donde se aprecien liposomas con contornos bien marcados, hay que tratar a éstos con protocolos de lavados, para evitar que todos aquellos lípidos que no estén formando una estructura liposómica permanezcan en la solución, y así evitar todo ese fondo del mismo color en donde fluoresce el marcador, que en este caso fue el NBD ligado lípido DOPE. Desafortunadamente, en este caso se carecía de experiencia en el proceso de lavado, por lo que se obtuvieron imágenes como la que se observa en la figura 7.14.

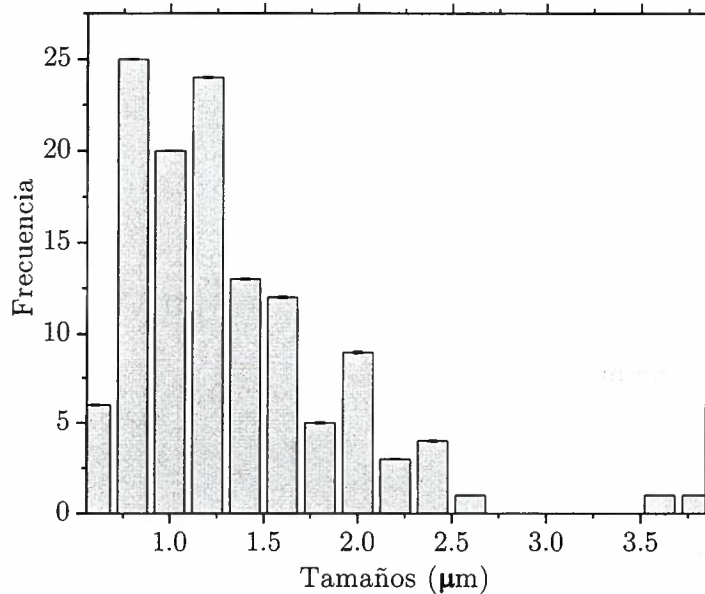


Fig. 8.15. Distribución de tamaños de liposomas DOPS-NBD-DOPE.

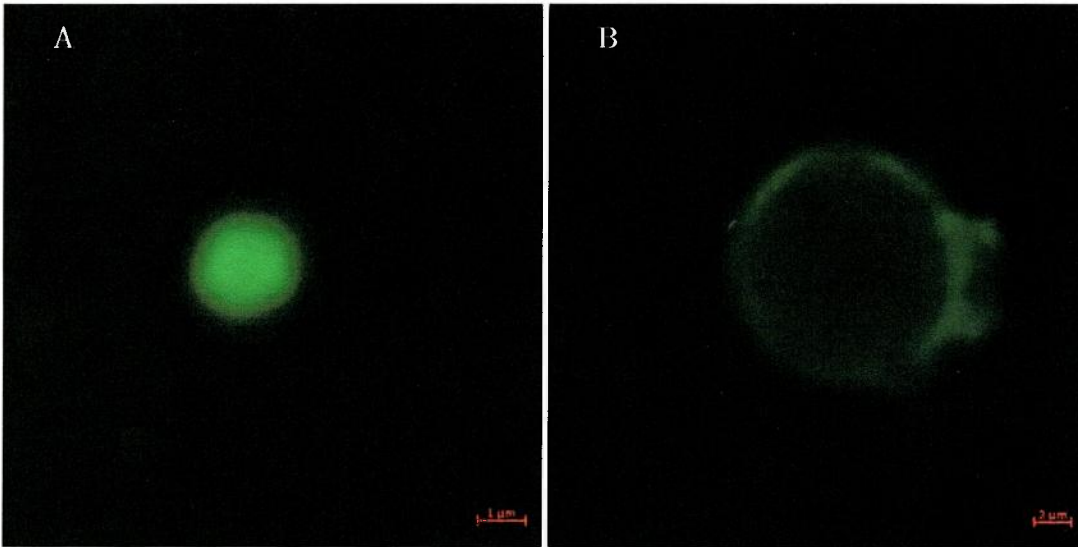


Fig. 7.16. Imágenes de fluorescencia de liposomas de DOPS-NBD-DOPE.

Después de obtener estas imágenes, se procedió a añadir ADN al sistema para obtener los lipoplejos. Para ello previamente se neutralizó la carga superficial negativa de los liposomas con cationes de Ca^{2+} a una concentración fija de 5×10^{-3} M. Una vez neutralizados los liposomas se añadió el ADN a una concentración de 2.5×10^{-8} M. Y con el fin de obtener imágenes de microscopía confocal (como se muestra en la figura 7.17), de la complejación del ADN con los liposomas, se añadió el marcador fluorescente DAPI (descrito previamente en el apartado de materiales), el cual se acompleja con el ADN. Se usó una concentración fija de DAPI de 10^{-4} M.

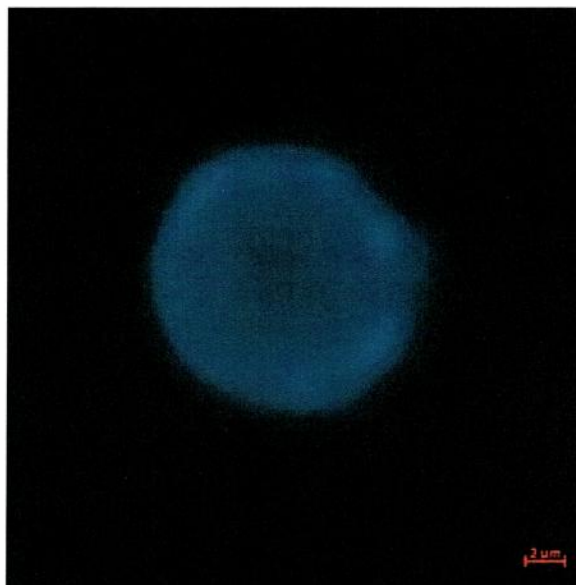


Fig. 7.17. Imagen del lipoplejo DOPS–NBD-DOPE/Ca²⁺/ADN usando la técnica de fluorescencia de CLSM.

El DAPI se enlaza fuertemente al ADN en las regiones ricas en Adenina y Timina, por lo que una vez excitado a una longitud de onda $\lambda = 340$ nm emitirá en color azul a una $\lambda = 488$ nm, y dicha fluorescencia es 20 veces mayor a la que fluoresce el DAPI por sí solo. Es concluyente de la imagen que la superficie externa del liposoma efectivamente se acompañó con ADN, dado que se pueden observar emisiones en el color azul provenientes del marcador DAPI en las mismas regiones donde se emite el color verde propio del grupo fluorescente NBD.

7.2.4 Propiedades elásticas de los liposomas

Hasta ahora se han mencionado los análisis de los tamaños y propiedades eléctricas (ζ y σ) de los liposomas iónicos y no-iónicos, y de igual manera para los lipoplejos. En esta sección también se presenta un análisis de las propiedades mecánicas de la membrana o

bicapa de los liposomas de DOPS–DOPC, i.e., de la elasticidad de la membrana que forma al liposoma.

Las propiedades elásticas de una membrana se pueden estudiar mediante los módulos elásticos de curvatura (k_1) y Gaussiano (k_2) [34,35]. Estos módulos elásticos están asociados a la energía (E) libre de Helfrich por unidad de área, la cual se expresa de la siguiente manera.

$$E = \frac{1}{2}k_1 \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} - \frac{2}{R_0} \right)^2 + k_2 \frac{1}{R_1 R_2}$$

En la ecuación R_1 y R_2 son los radios de curvatura principal en diferentes puntos de la membrana, R_0 es el radio de curvatura espontáneo. Como se mencionó anteriormente, k_1 es una constante de curvatura elástica, y está asociada a las fluctuaciones térmicas de la membrana, por lo que da información acerca de la flexibilidad de ésta. Dependiendo de los valores que puede tomar esta constante, es la rigidez de la membrana, i.e., para un valor grande de k_1 la membrana es muy rígida y poco deformable y por el contrario, si tiene un valor pequeño la membrana es muy flexible (con valores del orden de $k_B T$; donde k_B es la constante de Boltzmann y T es la temperatura absoluta). También se mencionó que k_2 es la constante de curvatura Gaussiana, la cual está asociada a las formas de la membrana.

En presente caso, se utilizó una solución de liposomas con una concentración de 5×10^{-6} M y se hizo uso de la técnica de DLS para evaluar las propiedades elásticas de la membrana (k_1) de los liposomas. Con DLS se midió la función de autocorrelación de intensidades ($g^{(2)}$) de la luz dispersada por los liposomas a un ángulo determinado de acuerdo con

$$g^{(2)}(q, t) = \frac{\langle I(q, 0) I(q, t) \rangle}{\langle I^2(q, 0) \rangle} \quad (5)$$

donde $I(q,t)$ es la intensidad de la luz dispersada que llega al detector. En los experimentos se hicieron tres corridas distintas para cada ángulo utilizado y se obtuvo un promedio para cada ángulo. Del promedio de $g^{(2)}$ se obtiene la función de correlación de campos ($g^{(1)}$), correspondiente al campo eléctrico dispersado, mediante la relación de Siegert (como se detalla en la sección 6.4.1 de DLS)

$$g^{(2)}(q, t) = 1 + b|g^{(1)}(q, t)|^2 \quad (6)$$

donde b es una constante experimental, que en general es del orden de una unidad, los paréntesis angulares significan un promedio de ensemble que se obtiene como un promedio del tiempo de los datos experimentales. q es el número de onda cuyo valor es igual a $q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin(\theta/2)$, con n como el índice de refracción del solvente, λ la longitud de onda de la luz y θ el ángulo de dispersión.

La función de correlación $g^{(1)}$ decae con el tiempo de acuerdo a la dinámica de la muestra, y esta se puede describir mediante distintas funciones según sea el caso, en ocasiones, se puede describir de forma muy aproximada mediante funciones exponenciales. En una solución $g^{(1)}$ se puede describir con la exponencial estrecha de la ecuación (3) descrita anteriormente.

donde Γ es la frecuencia de relajación cuyo valor es $\Gamma = 1/\tau$. Con τ como el tiempo de relajación y β el exponente de estiramiento. Hay teorías que describen los análisis de los experimentos llevados a cabo con DLS de membranas en soluciones diluidas [36,37], las cuales consideran a la dispersión de la luz por segmentos de la membrana de tamaño ξ . Al someter a la membrana a fluctuaciones térmicas la amplitud de esta está relacionada con k_1 . Se utilizó un valor de $\beta = 2/3$ de acuerdo a varias aproximaciones teóricas predichas por

[36,37]. Escalando a Γ con la tercera potencia de q como $\Gamma = m q^3$. Aquí, la pendiente de esta expresión contiene a k_1 de la membrana de los liposomas de acuerdo a,

$$m = 0.025 \gamma_k \left(\frac{K_B T}{\kappa} \right)^{\frac{1}{2}} \frac{K_B T}{\eta} \quad (7)$$

Donde γ_k es una constante cercana a la unidad (≈ 1) y η es la viscosidad del solvente, que en nuestro caso fue agua.

En experimentos típicos, se mide la $g^{(1)}$ en varios ángulos de dispersión y se ajusta a la exponencial estrecha (ecuación (3)). k_1 se obtiene de la pendiente de ecuación (7) como resultado del ajuste lineal de las curvas de Γ vs. q^3 .

Para el caso de los liposomas de DOPS–DOPC se midió la $g^{(2)}$ haciendo un barrido de ángulos de 40° a 140° y posteriormente se obtuvo $g^{(1)}$ mostrando los resultados en la gráfica de la figura 7.18. Se observa que los valores del tiempo de relajación de la $g^{(1)}$ van disminuyendo conforme el ángulo de dispersión se incrementa.

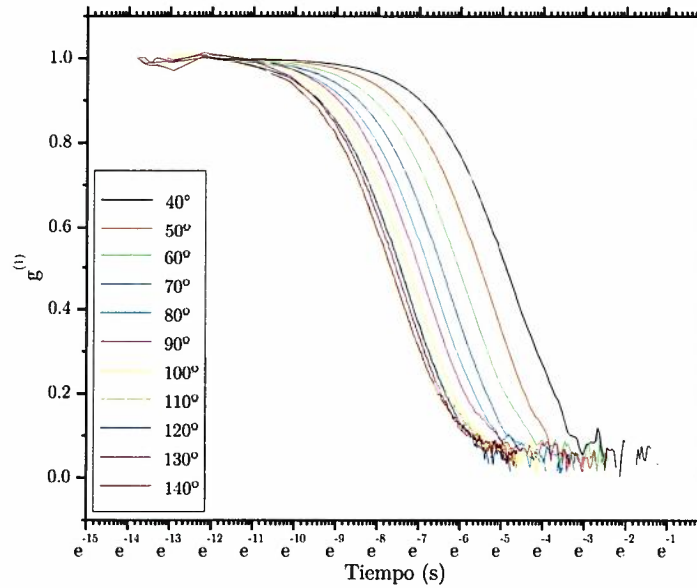


Fig. 7.18. Función de correlación $g^{(1)}$ normalizada de los liposomas de DOPS–DOPC a diferentes ángulos.

De los resultados de las corridas experimentales, también se obtuvieron la distribución de tamaños de los liposomas por intensidad y por número, como se muestra en la figura 7.19. Se observa una distribución que contempla diferentes poblaciones de tamaños tanto para la distribución por intensidad (7.19-A) como para la distribución por número (7.19-B). En la distribución por intensidad se observa una población principal de tamaños de liposomas del orden de 147 nm, y otras pequeñas poblaciones distribuidas en un rango de 750 a 3100 nm. En caso de la distribución por número se observan dos grandes poblaciones, una alrededor de 44 nm y otra alrededor de 112 nm, y otras dos pequeñas poblaciones alrededor de 142 y 185 nm.

Estas distribuciones de tamaños se deben a que no se filtró la solución de liposomas antes de hacer los experimentos. Por otro lado, la longitud de onda del láser utilizado en estos experimentos de DLS es de $\lambda = 637.8 \text{ nm}$. El hecho de que λ del láser sea más grande que los tamaños de los liposomas (tomando en cuenta la distribución más grande en número), los resultados arrojados por los experimentos no corresponden a las fluctuaciones de las membranas de los liposomas, sino más bien corresponden a la difusión de los liposomas en la solución. Es decir, para poder medir la fluctuación de la membrana de los liposomas, éstos deben de ser más grandes que λ del láser, ya que en este caso se mide la fluctuación de un área de la membrana, pudiendo obtener la elasticidad de la misma. Por consiguiente, en este caso no se graficará Γ vs. q^3 , sino más bien Γ vs. q^2 , lo que da información de la difusión de los liposomas.

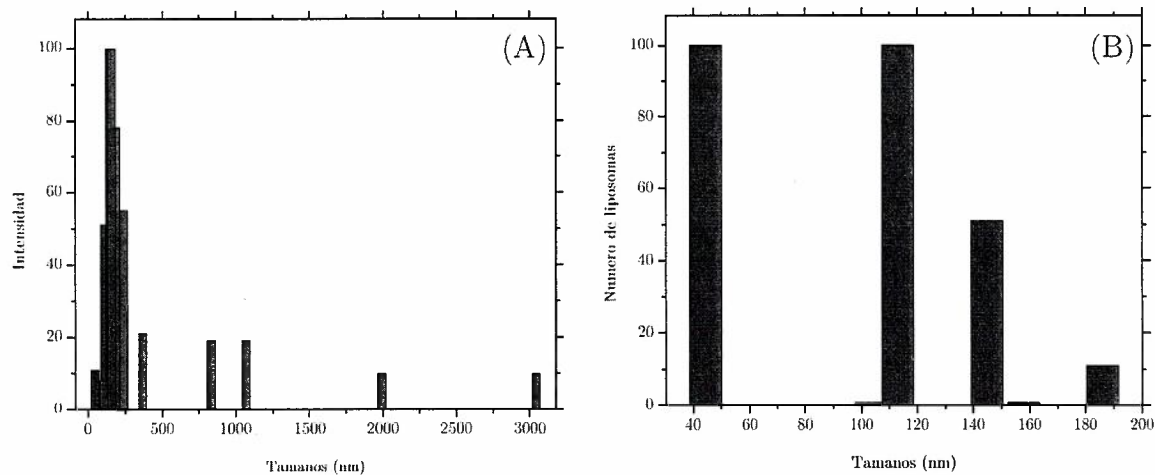


Fig.7.19. Distribución de tamaños de los liposomas por intensidad (A) y por número (B).

Entonces, utilizando la $g(1)$ de los distintos ángulos se realizó un ajuste de acumulantes a 2^{do} orden, para obtener los valores de Γ y q^2 , los cuales se muestran en la tabla 7.1.

Tabla 7.1.- Valores de Γ , R^2 y q^2 obtenidos de $g^{(1)}$ de los liposomas de DOPS–DOPC para (B).

Angulo de dispersión	Γ (s ⁻¹)	R^2	q^2 (m ⁻³)
40	82.13744	0.98907	8.03262x10 ¹³
50	155.38473	0.99174	1.22643x10 ¹⁴
60	250.86649	0.9879	1.7167x10 ¹⁴
70	388.33318	0.99201	2.25911x10 ¹⁴
80	518.13775	0.98927	2.83717x10 ¹⁴
90	648.92571	0.98318	3.43339x10 ¹⁴
100	831.68178	0.98593	4.0296x10 ¹⁴
110	998.78522	0.98606	4.60769x10 ¹⁴

En la figura 7.19 se muestra los datos graficados de Γ con q^2 esta se obtuvo utilizando la Γ obtenida en la tabla 7.2 y se observa que esta curva presenta un comportamiento lineal, realizó un ajuste de curva sobre esos puntos y se obtuvo una pendiente $m = 98.1727 \times 10^{-22}$ y esta línea interseca al eje vertical en $\Gamma(0) = -144.68836$.

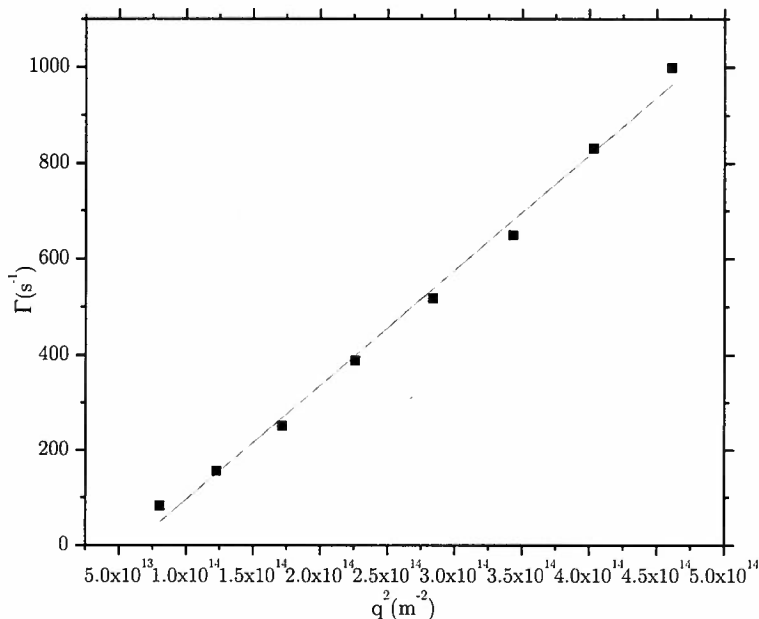


Fig. 7.19 relación de Γ en función q^2 de los liposomas.

7.3 Sistema neutro

Al igual que para los sistemas de liposomas y lipoplejos iónicos (catiónicos y aniónicos) se hicieron los mismos análisis para el sistema no-iónico (neutro). Se midieron los tamaños, el ζ y la σ utilizando como sistema liposomas de DOPC.

7.3.1 Determinación de tamaños

Se utilizó el lípido de DOPC para fabricar los liposomas, nuevamente utilizando el método de extrusión, descrito en la sección de protocolos de fabricación de los liposomas, capítulo

6.2 de metodologías. Estos tuvieron un tamaño promedio de 250.164 ± 4.29 nm con una polidispersidad de 0.351. Se fijó una [liposomas] de 5×10^{-4} M y la cual posteriormente se le añadió diferentes [ADN] para formar los lipoplejos DOPC/ADN. Se realizaron tres mediciones de tamaños para cada [ADN], obtenido un promedio para cada una, como se muestra en la gráfica de la figura 7.21. La [ADN] varió en el rango 1.176×10^{-16} a 2.941×10^{-16} M.

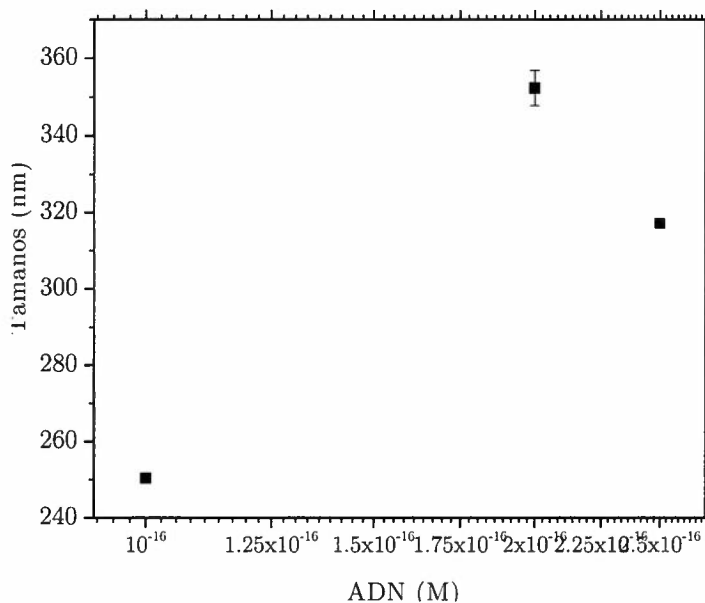


Fig. 7.21. Tamaños de lipoplejos de DOPC/ADN en función de la [ADN].

En la figura se puede observar cómo los tamaños de los complejos son del orden de los liposomas solos, i.e., sin ADN. Al incrementar la [ADN] el tamaño se dispara, aumentando más de 100 nm de su tamaño, comparado con la concentración anterior. Esto podría indicar que se pudieran estar “pegando” dos o más lipoplejos. Sin embargo, los tamaños no son lo suficientemente grandes como para pensar que se forman agregados. Para la última [ADN] de 2.6×10^{-16} M el tamaño los lipoplejos disminuye, lo que nos lleva a pensar que los lipoplejos

que se estaban pegando se “despegan” nuevamente, pero dejando complejos individuales más grandes que aquellos lipoplejos con [ADN] bajas.

7.3.2 Propiedades electrocinéticas

En esta sección se presentan los análisis de las mediadas del ζ y la σ de los lipoplejos formados por DOPC/ADN. Las mediciones fueron realizadas de la misma manera que para los sistemas iónicos, y se utilizaron las mismas [ADN] que para los tamaños (de 1.176×10^{-16} a 2.941×10^{-16} M).

7.3.2.1 Potencial Z

La figura 7.22 muestra el comportamiento del ζ de los liposomas en función de la [ADN]. De igual forma se realizaron tres mediciones de éste parámetro con tres repeticiones cada una. Se observa un valor del ζ del orden de -43.5 mV para la [ADN] más baja.

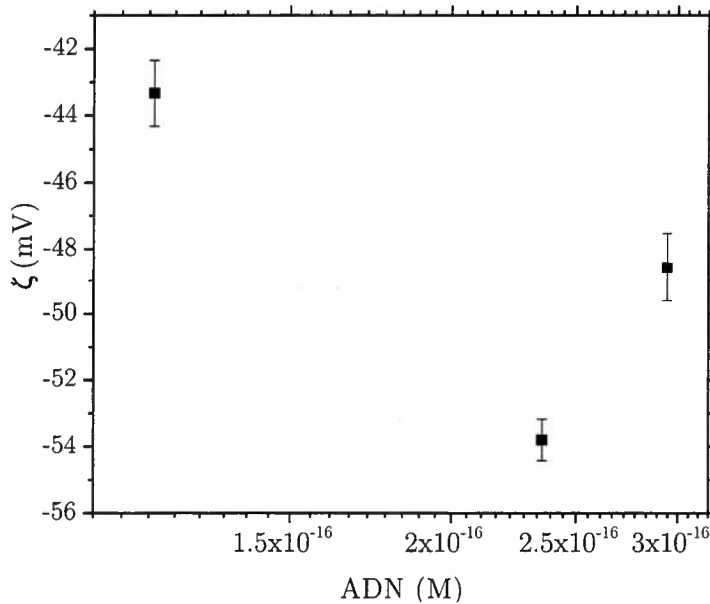


Fig. 7.22. ζ de lipoplejos formados por DOPC/ADN vs. [ADN].

Al incrementar la [ADN] el valor del ζ aumenta, más cantidad de ADN se está pegando a los liposomas o podría ser que se estuvieran uniendo dos o más lipoplejos, pero sin llegar a formar agregados. Este fenómeno concuerda con las medias de tamaños de los lipoplejos analizados anteriormente, y de hecho también se refleja para la [ADN] más grande 2.941×10^{-16} M, en donde el potencial disminuye, de su valor absoluto, lo cual probablemente se deba a que las cargas, que provocan una repulsión entre los lipoplejos y tienden a los valores de ζ más bajos.

7.3.2.2 Conductividad eléctrica

En la figura 7.23 se muestran los valores de la conductividad σ del mismo sistema de lipoplejos que, a pesar de que son pocos los valores reportados, su trayectoria está bien definida. El comportamiento de la σ de los lipoplejos es como se esperaba, i.e., se incrementa con el aumento de la [ADN].

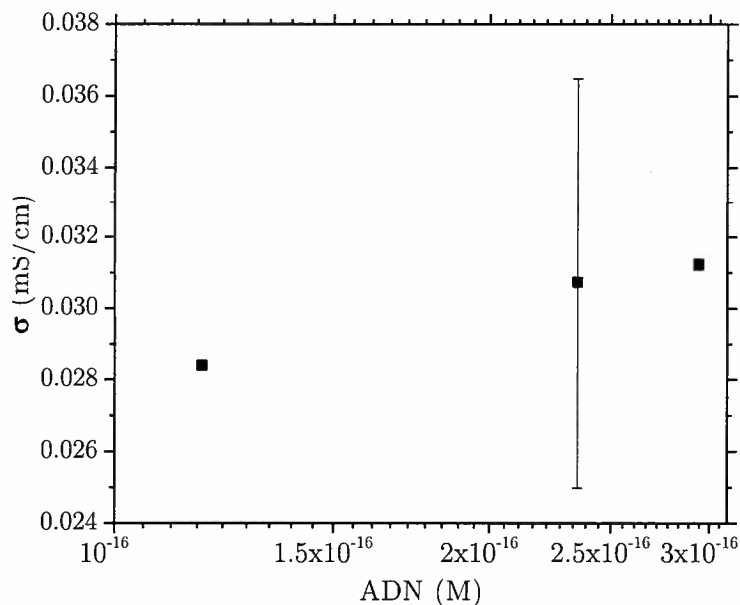


Fig. 7.23. σ de lipoplejos formados por DOPC/ADN vs. [ADN].

Este aumento se debe precisamente al aumento [ADN], pues cuanto más ADN hay en el medio más iones de Na^+ se liberan de él, quedando en el medio y aumentando la σ de este.

Todos los resultados nos indican que efectivamente el ADN se acompleja con los liposomas de DOPC, obteniendo lipoplejos de DOPC/ADN, a pesar de que la carga de los liposomas es neutra. Recordando que la cabeza polar del lípido DOPC posee un grupo fosfato (F), que le da una carga negativa y un grupo metilo (CH_3), que le da una carga positiva (ver figura del DOPC en la sección 6.1.1: Fosfolípidos, del capítulo 6.1: Materiales). Tomando en cuenta que el grupo metilo es que queda en la parte extrema del lípido, su carga positiva atrae la carga negativa del ADN, formando así el complejo.

8 CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, se puede concluir que se lograron fabricar liposomas tanto catiónicos como aniónicos utilizando el protocolo de fabricación para el método de extrusión.

Para ambos casos, se observó que los diámetros de los liposomas aumentan en función de la [ADN] utilizada hasta llegar un punto en el que se forman agregados de liposomas. Además se observó que el potencial z disminuye a medida que aumenta la [ADN] mientras que la conductividad aumenta y para el caso de las mediciones de los liposomas catiónicos se encontró el punto isoeléctrico, i.e. el punto en donde $\zeta=0$. Con estos resultados se observó que se lograron formar lipoplejos catiónicos.

Por otra parte, para el caso de los liposomas aniónicos se observó que al aumentar la $[\text{CaCl}_2]$ no aumentan los tamaños de forma significativa, sino hasta alcanzar una concentración máxima en la que los liposomas se vuelven inestables formando agregados. Por microscopía confocal de fluorescencia se corroboró que existe ADN adherido a la superficie exterior de los liposomas aniónicos, formando lipoplejos aniónicos.

De los resultados experimentales de dispersión de luz no se logró encontrar las propiedades elásticas de las membranas de los liposomas aniónicos de DOPS-DOPC sin embargo, mediante el análisis de las funciones de autocorrelación se logró encontrar el coeficiente de difusión de los liposomas.

9 PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos abren como perspectiva el estudio del sistema catiónico mediante técnicas de microscopía electrónica, espectroscopia UV-Vis para estimar la cantidad de ADN que se adhiere a los liposomas y además, realizar un mejor estudio con lo aprendido en este trabajo para estudiar las propiedades elásticas de liposomas utilizando DLS, y para el sistema aniónico, estudiar cómo afectan las distintas concentraciones de Ca^{2+} a las propiedades elásticas de los liposomas.

Además, una posible extensión de este trabajo es realizar transfección de los lipoplejos catiónicos con células bacterianas y con células humanas, tanto sanas como enfermas, y además realizar un estudio citotóxico.

APÉNDICE

A.1 Polimorfismo lipídico

Las Membranas biológicas son mezclas complejas de una gran variedad de especies de lípidos. Su composición es muy diferenciada, no solo entre distintos organismos y sus tejidos, sino también entre las membranas de las células y los orgánulos de un tejido dado y entre las mono-capas de una membrana. La composición de los lípidos es muy importante para los requerimientos funcionales de las membranas. Las preferencias de fase de un lípido en particular influyen en las propiedades de la membrana que éste constituye [38].

Existen distintos tipos de auto-ensamblaje lipídico, debido a la estructura anfifílica de la molécula, mientras que sus cabezas polares favorecen el contacto con el agua, las colas hidrocarbonadas interactúan unas con otras preferentemente antes que con el agua. La forma más simple es formando micelas, una estructura globular en la que el grupo polar se encuentra en contacto directo con el medio acuoso mientras que las colas hidrocarbonadas son encerradas en el interior, interactuando unas con otras (figura A.1 (a)). Los ácidos grasos ionizados forman fácilmente estas estructuras, pero la mayoría de los fosfolípidos no lo hacen, debido a que estos tienen dos colas hidrocarbonadas y debido a esto es imposible para ellos formar de forma natural una estructura tan compacta [39].

Por otro lado existe otra organización que satisface las preferencias que presentan los fosfolípidos, la llamada bicapa lipídica, compuesta de dos monocapas de lípidos encontradas en sus extremos hidrofóbicos (figura A.1 (b)). A esta bicapa lipídica se le conoce también como hoja biomolecular. El interior hidrofóbico que se forma en esta bicapa actúa como una barrera de permeabilidad.

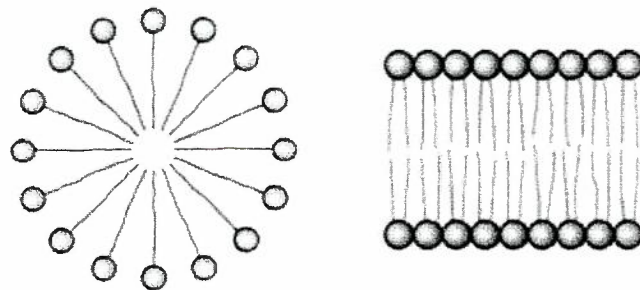


Fig. A.1 Micela formada por ácidos grasos ionizados (a) y sección de una bicapa lipídica formada por lípidos con dos colas hidrofóbicas (b) [40].

Esta estructura de bicapa es más favorable para la mayoría de los fosfolípidos en medios acuosos, que la de micela, debido a que las dos cadenas de ácido graso de los fosfolípidos y glicolípidos ocupan demasiado volumen para caber en el interior de una micela. Esto no

sucede en sales de ácidos grasos (como el palmitato de sodio, ingrediente de jabones) que tienen una sola cadena, formando fácilmente micelas [39]. La formación de bicapas en lugar de micelas por fosfolípidos es de gran importancia biológica ya que debido su naturaleza anfifílica y a su geometría molecular pueden formar estructuras de bicapa esféricamente cerradas, llamadas vesículas o liposomas (figura A.2) [41].

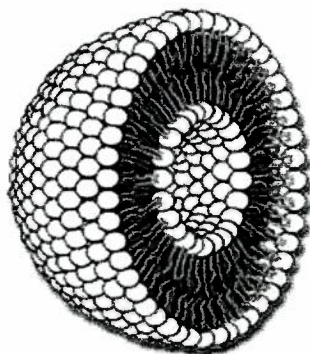


Fig. A.2 Liposoma unilamelar [42].

A.2 Parámetro de empaquetamiento

A continuación se dará detalle de lo mencionado anteriormente, resaltando las características que poseen los lípidos para formar las estructuras determinadas.

El llamado parámetro de empaquetamiento lipídico, es el parámetro que asocia las propiedades del lípido con la estructura que forman en solución acuosa. Las moléculas anfifílicas pueden asociarse en una gran variedad de estructuras que pueden cambiar de una a otra forma según sean las condiciones del medio acuoso que las contiene; pH, fuerza iónica, tipos de iones, temperatura, etc. Para comprender esto, hay que tener en cuenta que actúan diversas fuerzas entre las moléculas anfifílicas y los agregados. Estos factores determinan la

estructura de equilibrio que se forma [21]. A continuación se hablará de las fuerzas que actúan entre las moléculas, tanto de las cabezas polares como de las cadenas hidrocarbonadas.

A.3 Área optima de grupo polar

Las fuerzas más importantes que gobiernan el auto-ensamblaje de moléculas anfifílicas, dentro de estructuras bien definidas como micelas y bicapas, se derivan de la repulsión hidrofóbica originada en la interfaz agua-hidrocarburo (figura A.3), estas fuerzas inducen a las moléculas a asociarse unas con otras, por otro lado, la atracción hidrofílica y iónica de los de las cabezas polares, realizan la acción opuesta manteniéndolas en contacto con el agua [21].

Estas dos interacciones compiten actuando principalmente en la región de interfaz: una tendiendo a decrecer y la otra tendiendo a incrementar el área de interfaz a por molécula expuesta (figura A.4). La interacción atractiva surge principalmente de las fuerzas hidrofóbicas o de tensión interfacial, las cuales actúan en la interfaz agua-hidrocarburo. Esta interacción puede ser expresada como una energía libre interfacial por unidad de área (γ) característica de la interfaz hidrocarburo-agua cuyo valor es de $\gamma = 50 \text{ mJm}^{-2}$ y en la presencia de un grupo polar hidrofílico este valor se reduce hasta un valor cerca de $\gamma = 20 \text{ mJm}^{-2}$ [21].

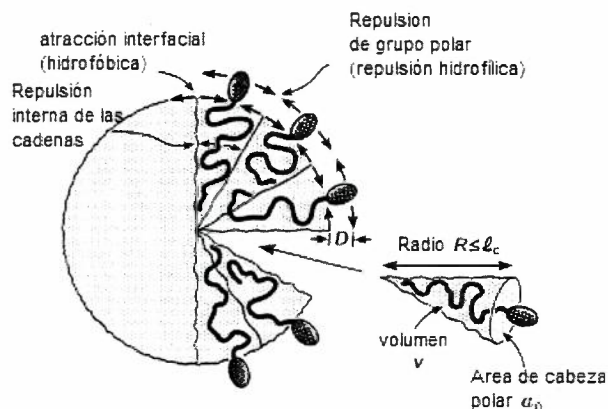


Fig. A.3 Esquema de empaquetamiento micelar de moléculas anfifílicas [21].

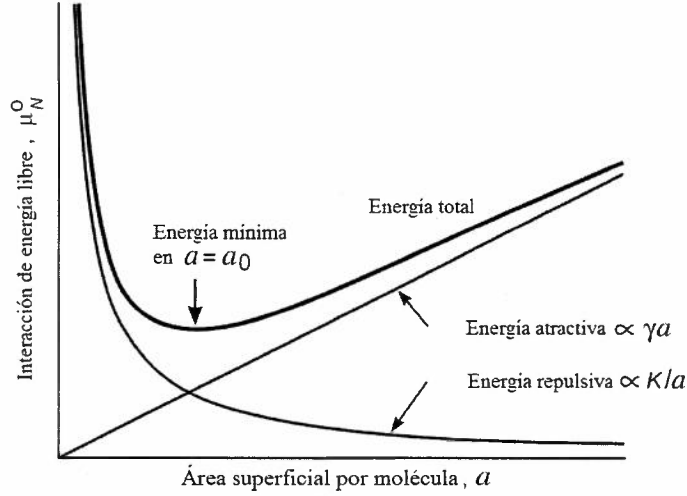


Fig. A.4 Área óptima de grupo polar a_0 en el cual las fuerzas opuestas del grupo polar de repulsión y de interfaz (hidrofóbica) atractiva son balanceadas [21].

La energía libre interfacial total por molécula en un agregado puede ser descrita a primer orden como:

$$\mu_N^0 = \gamma a + K/a \quad (8)$$

Donde K es una constante. Así la contribución de la energía libre interfacial atractiva para μ_N^0 puede ser escrita simplemente como γa donde, a primera aproximación y γ puede tomar valores de entre 20 y 50 mJm^{-2} .

Hablar de las contribuciones repulsivas resulta un poco más complicado de describir puesto que son muy complejas y difíciles de formular explícitamente. Entre los grupos polares hidrofílicos existe una contribución estérica, una contribución de una fuerza de

hidratación y una contribución electrostática de la doble capa si es que los grupos polares están cargados. Estas contribuciones individualmente no tienen que ser conocidas explícitamente. Esto porque en la ecuación de estado bidimensional de Van Der Waals se espera que el primer término en cualquier expansión de la energía sea inversamente proporcional al área de superficie ocupada por grupo polar a [21].

De forma inicial podemos suponer que ambas fuerzas actúan en el mismo plano que la interface hidrofóbica-hidrofílica. La energía mínima es entonces cuando $d\mu_N^0/da = 0$, esto lleva a

$$\mu_N^0 \text{ min} = 2\gamma a_0, \quad a_0 = \sqrt{\frac{K}{\gamma}}$$

a_0 es el área de superficie óptima por molécula, definida como la interfaz grupo polar-agua. La energía interfacial por molécula puede ser expresada ahora de forma más conveniente de la forma

$$\mu_N^0 = 2\gamma a_0 + \frac{\gamma}{a} (a - a_0)^2 \quad (9)$$

En la expresión no depende de la constante K , quedando en términos de a y a_0 , así que μ_N^0 está expresada ahora en términos de parámetros conocidos o medibles γ y a_0 . Como se puede observar en la figura A.4, del concepto de fuerzas opuestas sugiere la existencia de un área óptima por grupo polar, en la que la interacción de la energía por lípido es mínima.

La energía varía de forma parabólica respecto a a_0 para pequeñas desviaciones. Como se describe en (5). Esto implica la existencia de un comportamiento elástico cuando la capa es estirada. Las ecuaciones anteriores contienen la información de las interacciones inter-filicas en micelas, bicapas y estructuras más complicadas. Estas implican que, a primera

aproximación, la energía de interacción entre lípidos tiene un mínimo en una cierta área de grupo polar a_0 , sobre la cual la energía varía de forma parabólica (i.e., elásticamente) [21].

A.4 Consideraciones de empaquetamiento geométrico

Habiendo establecido las ecuaciones que describen de forma adecuada las interacciones entre moléculas anfifílicas simples dentro de un agregado, se tiene que establecer las estructuras más favorables. Ahora entra en juego la geometría o “propiedades de empaquetamiento” de las moléculas. Estas dependen del área óptima a_0 , el volumen v de la o las cadenas hidrocarbonadas, las cuales se asumen que son fluidos (deformables) pero incompresibles y que existe una longitud máxima l_{max} que pueden tener las cadenas. Llamemos a esto la longitud crítica de la cadena l_c . Esta longitud establece el límite en qué tanto se pueden extender las cadenas; son permitidas aquellas longitudes menores mas no mayores, esto sería energética o entrópicamente costoso. La longitud crítica l_c es un parámetro semi-empírico, ya que representa de forma vaga una distancia de corte más allá en que las cadenas hidrocarbonadas no pueden ser consideradas como un fluido. Sin embargo, como es de esperarse, es del mismo orden que, aunque un poco menor que, la longitud de las cadenas completamente extendidas l_{max} . De acuerdo con Tanford [21]. Para una cadena de hidrocarbano saturada con n átomos de carbono:

$$l_c \leq l_{max} \approx (0.154 + 0.1265n)nm \quad (10)$$

Y

$$v \approx 27.4 + 26.9n \times 10^{-3} nm^3 \quad (11)$$

Nótese que para un valor de n grande, $\frac{v}{l_c} \approx 0.21 \text{ nm}^2 \approx \text{constante}$, el cual es un valor que está cercano al área de sección transversal mínima que puede tener una cadena de hidrocarbonos.

Una vez que han sido especificados a_0 , v y l_c para una molécula dada, todos esos siendo medibles o estimables, se pueden cerciorar en cuales estructuras se pueden empaquetar las moléculas con esas constricciones geométricas. Un parámetro conveniente para analizar estas estructuras es el numero adimensional, $v/a_0 l_c$ conocido como el “parámetro de empaquetamiento” crítico o “factor de empaquetamiento”. En la figura A.5 se muestra como ocurren las diferentes interacciones en el grupo polar y en las regiones de la cabeza determinan $v/a_0 l_c$, y a la vez la forma de empaquetamiento crítica o límite que pueden adoptar las estructuras en las que se ensamblan [21].

Como se puede apreciar en la figura A.5 el parámetro de empaquetamiento dicta la geometría de las moléculas y la forma límite que pueden tener estas; por ejemplo, para $v/a_0 l_c = \frac{1}{2}$ la forma de la molécula puede ser de un cono truncado pero no pueden tomar formas más rectas o más cónicas (como las figuras adyacentes a esta).

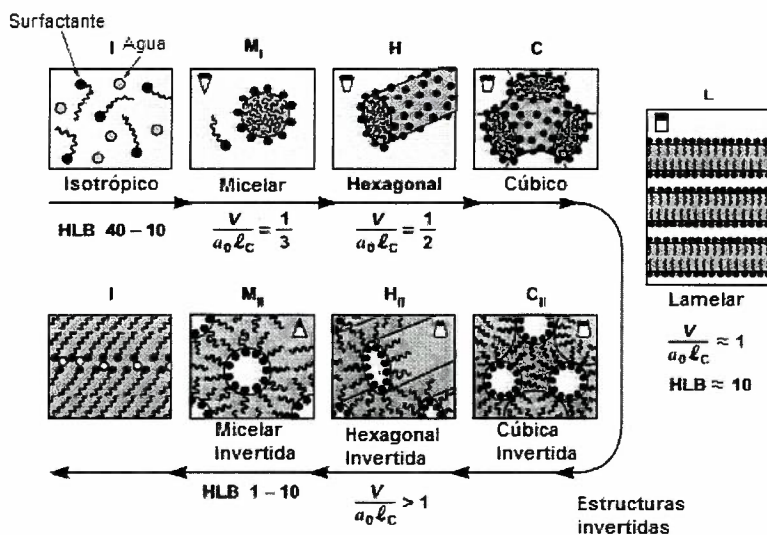


Fig. A.5 Parámetros que rigen el empaquetamiento de moléculas anfifílicas y sus respectivas estructuras [21].

En consecuencia de esto, los lípidos pueden agregarse como ya se mencionó, formando estructuras 3-D bien definidas. Las micelas esféricas son formadas cuando las moléculas adoptan preferencialmente la forma de un cono, i.e., $v/a_0l_c < 1/3$, y las micelas no esféricas (ej. forma de barra o discoidal) se forman cuando la geometría de la molécula se asemeja a la de un cono truncado con $1/3 < v/a_0l_c < 1/2$. Sin embargo, biológicamente el empaquetamiento más importante del lípido es la bicapa lipídica, la cual requiere una forma cercana a la cilíndrica, i.e., $1/2 < v/a_0l_c < 1$. Si $v/a_0l_c > 1$ entonces se forman las estructuras con curvatura espontánea negativa o estructuras invertidas (ej. micelas invertidas o fases hexagonales invertidas) [7].

A.5 Bicapas

Las bicapas se forman cuando las moléculas anfifílicas que las conforman no se pueden empaquetar en estructuras micelares, debido a que tienen un área de grupo polar a_0 es lo suficientemente pequeña o sus cadenas hidrocarbonadas son muy voluminosas para caber dentro de tan pequeño agregado y aun así mantener su área de superficie en un valor óptimo. Para que los lípidos formen bicapas el valor de su parámetro de empaquetamiento debe encontrarse cercano a 1, y esto requiere que para a_0 y l_c , el volumen de su cadena hidrocarbonada sea alrededor del doble del que sería para su conformación en micelas. Por lo tanto, aquellos lípidos que están conformados por dos cadenas son muy probables a formar bicapas, y de hecho la mayoría de ellos lo hacen. Por ejemplo, las lysofosfatidilcolinas (lyso-PCs) de una sola cadena forman micelas pequeñas pero no esféricas, mientras que las lecitinas (fosfatidilcolinas, PCs) con dos cadenas alquilas, como $di - C_{14} PC$ y $di - C_{16} PC$, forman bicapas [4].

A.6 Potencial Z

Para hablar del potencial Z primeramente se mencionará el comportamiento electrocinético de los coloides¹³ en suspensión.

En solución cada coloide tiene una carga eléctrica que suele ser de naturaleza negativa, aunque también puede ser positiva o no cargados. Estas cargas producen fuerzas de repulsión electrostática entre los coloides vecinos. Si esta fuerza logra ser lo suficientemente grande, los coloides permanecen en una suspensión estable y dispersa, si por otro lado, estas cargas se reducen se obtiene el efecto opuesto y los coloides se aglomeran o sedimentan [43].

Para imaginar la atmosfera iónica de los coloides se utiliza el modelo de la *doble capa* (figura A.6) para explicar cómo actúan las fuerzas eléctricas de repulsión. Como se muestra en la figura, supóngase un coloide con una carga definida, por efecto de esta, en la superficie del coloide se unirán iones de carga contraria (contra-ion) debido a interacciones electrostáticas formando una capa rígida alrededor, a esta capa rígida de contra-iones se le conoce como *capa de Stern* [32].

Al formarse esta capa de Stern los contra-iones siguen siendo atraídos al coloide, sin embargo, son rechazados por esta capa dando lugar a otra región en donde se encuentran contra-iones pero de una forma más dispersada. A esta nueva región se le conoce como *capa difusa*.

¹³Los *coloides* son sistemas formados por dos o más fases, principalmente una fluida y otra dispersa en forma de partículas generalmente sólidas muy finas.

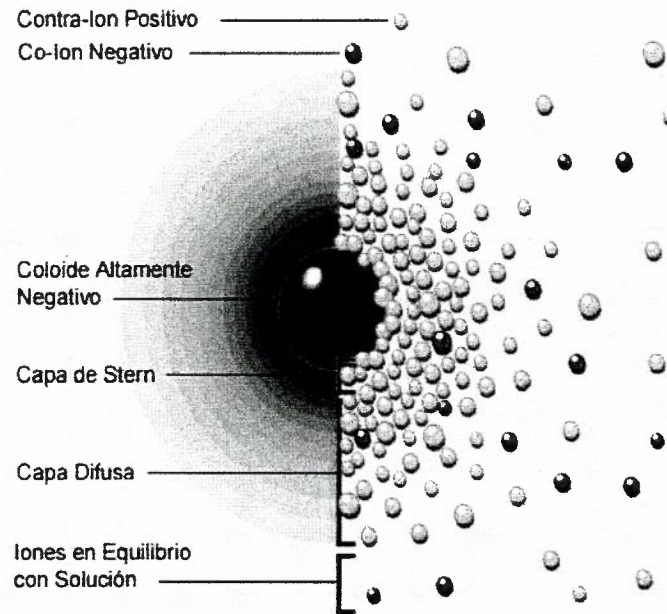


Figura A.6: Diagrama de la doble capa formada por el coloide y sus contra-iones [43].

La concentración de contra-iones cerca de la superficie es alta y ésta va disminuyendo conforme aumenta la distancia, hasta que se logra un equilibrio con la concentración de contra-iones de la solución [32]. Además de contra-iones, en la capa difusa hay un déficit de iones de la misma carga que el coloide llamados co-iones y su concentración incrementa a medida que se alejan de la superficie. Los contra-iones de la capa de Stern y de la capa difusa son los que en conjunto se reciben el nombre de la doble capa. El espesor de esta doble capa depende del tipo y concentración de los iones en la solución. Así, el coloide y su atmósfera iónica producen un potencial eléctrico en función de la solución. Este potencial tiene un valor máximo en la superficie y disminuye conforme se aleja, aproximándose a cero fuera de la capa difusa.

Un punto de interés es el potencial donde se unen la capa difusa y la de Stern. A este potencial, se le conoce como *potencial z* (ζ), el cual es importante ya que puede ser medido de una forma indirecta utilizando electrocinética, mientras que la carga de la superficie y su

potencial no pueden medirse [29]. La magnitud del ζ es un indicador de la estabilidad de un sistema coloidal. Si todas las partículas en suspensión tienen una magnitud suficientemente alta de ζ entonces se repelerán unas de otras y no habrá tendencia a que se aglomeren. Mientras tanto si las partículas tienen un potencial zeta bajo ocurrirá lo contrario. Por lo general cuando las partículas tienen un ζ de igual o superior a $+30 \text{ mV}$ o -30 mV son consideradas estables [32].

10 BIBLIOGRAFÍA

- [1] P. Laín Entralgo. Historia de la medicina 1er ed. Salvat Editores, S. A. Barcelona España 1978. Pág. 16.
- [2] Paulina Wyrozumska et al. Synthetic Vectors for genetic drug delivery. M.R. Mozafari (ed.), Nanocarrier Technologies: Frontiers of Nanotherapy, 139–174. Springer.
- [3] Enrique Daniel Austin-Ward. Gene Therapy and its applications, Rev. méd. Chile v.126 n.7 Santiago jul. 1998.
- [4] Samppa Ryhänen. Biophysical studies on cationic liposomes - Implications for self-assembly and mechanism of lipofection (Helsinki university biomedical dissertations No.71 2006)
- [5] Cavazzana-Calvo et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency-X1 disease, 288:669-672, 2000.
- [6] The Journal of Gene Medicine - <http://www.abedia.com/wiley/vectors.php>
- [7] Felgner, P.L. et al. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA transfection procedure, proc. Natl. Acad. Sic. USA 84:7413-7417, 1987.
- [8] Huong Thi Bui et al. Liposome Membrane Itself Can Affect Gene Expression in the Escherichia coli Cell-Free Translation System. The ACS Journal of Langmuir Surfaces and Colloids, October 7, 2008 volume 24, number 19.
- [9] Barbara Wetzer, Gerardo Byk et al. Reductible cationic lipids for gene transfer. Biochemistry Journal Great Britain (2001) 356, 747-756.
- [10] Sara Napoli, Giuseppina M. Carbone et al. Neomycin improves cationic lipid-mediated transfection of DNA in human cells. Bioorganic & Medicinal Chemistry letters 15 (2005) 3467-3469.
- [11] Theresa M. Allen. Liposomes Opportunities in drug delivery. Drugs 54 Suppl 4(4, supplement):8-14 January 1997.

- [12] S Li and L. Huang. Nonviral gene Therapy: promises and challenges, Macmillan Publishers 0969-7128/00, 2000.
- [13] Siddhesh D. Patil, et al. Anionic Liposomal Delivery System for DNA Transfection, The AAPS journal 2004; 6 (4) Article 29.
- [14] Fillion P, Desjardins A, Sayasith K, Lagace J. Encapsulation of DNA in negatively charged liposomes and inhibition of bacterial gene expression with fluid liposome-encapsulated antisense oligonucleotides. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1515:44-54. 19.
- [15] Jiesheng Ye et al. Anionic solid lipid nanoparticles supported on protamine/DNA complexes. Republic of China. *Nanotechnology* 19 (2008) 285708.
- [16] Charudharshini Srinivasan and Diane J. Burgess. Optimization and characterization of anionic lipoplexes for gene delivery. USA. *Journal of Controlled Release* 136 (2009) 62-70.
- [17] Bruce Alberts, Alexander Johnson et al. *Molecular Biology of the cell* 5th ed. Garland Science, NY, USA (2008). Pag. 197-201
- [18] J.D. Watson and F. H. C. Crick. Molecular Structure of Nucleic Acids. *Nature* Vol. 171 No. 4356 April 25(1953) 737-738.
- [19] Gary J. Nabel et al. Direct gene transfer with DNA-liposome complexes in melanoma: Expression, biologic activity, and lack of toxicity in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 90 11307-11311, December 1993.
- [20] Sandra Gromeslki and Gerald Brezesinski. DNA Condensation and Interacton with Zwitterionic Phospholipids Mediated by Divalent Cations. *Langmuir* 22, 6293-6301 (2006).
- [21] Jaboc N. Israelachvili. *Intermolecular and Surface Forces* 3rd ed. Elsevier, Burlington, MA, USA. 2011 Pag.536-550.
- [22] Philip L. Felgner et al. Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 84, pp. 7413-7417, 1987

- [23] Hongjun Liang, Daniel Harries and Gerard C. L. Wong. Polymorphism of DNA-anionic liposome complexes reveals hierarchy of ion-mediated interactions, PNAS, Vol. 102, No. 32, August 2005, CA, USA.
- [24] Abolfazl Akbarzadeh et al. Liposome: Classification, Preparation, and applications. Springer. Nanoscale Research Letters (2013), 8:102.
- [25] Sourav Haldar and Amitabha Chattopadhyay. Application of NBD-Labeled Lipids in Membrane and Cell Biology. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg (2012) August 2012.
- [26] Jan Kapuscinski. DAPI: a DNA-Specific Fluorescent Probe. Biotechnic & Histochemistry vol. 70 no. 5. 220-233 (1995)
- [27] Coe, Royden, M. et al. Procedimiento de extrusión de liposomas. The liposome Company, inc. Oficina española de patentes y marcas. España (1996). No. ES 2 087 315.
- [28] L.D. Mayer, M.J Hope and P.R Cullis. Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. Elsevier, Biochimica et Biophysica Acta 858 (1986) 161-168.
- [29] Lipex TM. 10/1.5 mL Thermobarrel and regular barrel extruder. Assembly and operation Manual. 2016.
- [30] Avanti Polar lipids, inc. Liposome Preparation. <https://avantilipids.com/tech-support/liposome-preparation>.
- [31] Bruce J. Berne and Robert Pecora. Dynamic Light Scattering with applications to Chemistry, biology and physics. Dover Publications, Inc. Mineona, New York (2000).
- [32] Olympus. Zetasizer Nano User Manual. MANO485 Issue 1.1. Abril 2013. Malvern Instruments Ltd.
- [33] Theory of Confocal Microscopy. <http://fluoview.magnet.fsu.edu/theory/confocalintro.html>
- [34] R. Iñiguez-Palomares et al. Effect of polymer on the elasticity of surfactant membranes: A light scattering study, Phys. Rev. E 84, 011604 (2011).

- [35] A. Arteaga-Jiménez et al. Polimorfismo de Liposomas, Epistemus, UniSon, 2015.
- [36] A.G. Zilman and R. Granek, Undulations and Dynamic Structure Factor of Membranes 77 (23), 1996, 4788-4791.
- [37] A.G. Zilman and R. Granek, Membrane dynamics and structure factor, PRL 284, 2002, 195–204.
- [38] Austin L. Bailey and Pieter R. Cullis. Current Topics in Membranes, Volume 44 Liposome Fusion Chapter 09. Academic press. Vancouver, British Columbia, Canada 1997.
- [39] Jeremy M Berg, John L Tymoczko, and Lubert Stryer. Biochemistry 5th edition Chapter 12. Pag. 326-328 New York, W.H Freeman, 2002.
- [40] Reginald H. Garrett and Charles M. Grisham. Biochemistry 5th edition Brooks/Cole. Belmont, CA, USA (2013).
- [41] Frank Caruso. Colloids and colloid assemblies, 152. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim (2004).
- [42] Phospholipids aqueous solution structures
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Phospholipids_aqueous_solution_structures_E_S.svg
- [43] Potencial Zeta: Un Curso Completo en 5 minutos.
http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/2009-2-Potencialzeta-AlexCervantes_7040.pdf