

ESTUDIO DE LOS ARQUEOSOMAS OBTENIDOS A PARTIR DE LOS LÍPIDOS DE *Halobacterium halobium* CECT 396.

Cuerda Correa, M.T.¹; Monteoliva Sánchez, M.¹; Ramos Cormenzana, A.¹; Medina Pérez, M.M.²

1. Dpto. de Microbiología (Fac. de Farmacia, Univ. de Granada),

2. Dpto. de Farmacia y Tecnología Farmacéutica (Fac. de Farmacia, Univ. de Granada)

Introducción.

Los liposomas son vesículas constituidas por una o más bicapas lipídicas concéntricas formadas espontáneamente cuando se dispersan en agua fosfolípidos y organizadas de forma análoga a las membranas celulares. Son potenciales vehículos de fármacos de distinta naturaleza ya que los principios activos se incorporan, según su solubilidad, a las bicapas lipídicas o a los compartimentos acuosos.

Son muchos los procedimientos descritos para la elaboración de liposomas, diseñados para mejorar la estabilidad del sistema o adaptarse al principio activo que contendrán los liposomas.

El procedimiento clásico es el más sencillo y consiste en preparar una solución de todos los componentes en un disolvente orgánico que se evapora a vacío en un evaporador rotatorio. Así se obtiene una fina película lipídica en las paredes del matraz a la cual se añade una solución reguladora adecuada y se procede a la hidratación. Esta técnica da lugar a la formación espontánea de liposomas multilaminares [1].

Por otra parte, las arqueobacterias son microorganismos que evolucionaron bajo las condiciones que imperaban en la Tierra primitiva: alta temperatura y salinidad y atmósfera anaerobia. Se diferencian del resto de microorganismos por su RNA ribosomal 16s, sus paredes celulares y sus lípidos de membrana [2]. Se dividen en tres grupos:

- halófilas extremas (haloarqueas),
- metanógenas,
- termoacidófilas (termófilas extremas) [3].

Los lípidos de membrana ensayados en el presente trabajo para la elaboración de arqueosomas proceden de arqueas halófilas extremas. Estos microorganismos requieren concentraciones salinas muy elevadas (20-30g NaCl/100mL) y no es posible sustituir la sal por otros solutos no ionizables como los azúcares. Sólo el KCl puede sustituir parcialmente al NaCl. También necesitan concentraciones anormalmente altas de magnesio, trazas de hierro y otros elementos.

Una característica relevante de estas bacterias son los lípidos polares de su membrana plasmática, que incluye fosfolípidos, glicolípidos, fosfoglicolípidos y sulfoglicolípidos derivados diéter y tetraéter del "arqueol" (sn-2,3-difitanilglicerol), una estructura lipídica saturada sintetizada a través de una ruta muy compleja [3] [4]. La estructura alquíter les confiere a estos lípidos estabilidad a cambios de pH, las cadenas alquílicas los protegen frente a la oxidación y la configuración sn-1 del glicerol proporciona resistencia frente a las lipasas [2]. Estas características resultan de gran interés con vistas a su utilización para la obtención de liposomas de mayor estabilidad.

Hasta el momento un grupo canadiense ha ensayado la obtención de liposomas a partir de los lípidos de membrana de arqueas metanógenas y se les ha denominado **arqueosomas** [5] [6]. Han evaluado la potencial actividad transportadora de antígenos y de vacunas de los arqueosomas, obteniendo resultados muy favorables ya que son capaces de potenciar la respuesta inmune [7] [8]. Además, los arqueosomas, debido a sus

propiedades físico-químicas, también tienen ciertas ventajas para el desarrollo de sistemas de vectorización por vía oral [9].

Los **objetivos** del presente trabajo son los siguientes:

1. Preparar arqueosomas a partir de los lípidos polares totales de una arquea halófila extrema, *Halobacterium halobium* CECT 396.
2. Estudiar la distribución de tamaños de los liposomas obtenidos, su estructura y eficacia del método de elaboración mediante microscopía electrónica de transmisión.

Material y Métodos.

1. Cultivo de la cepa seleccionada.

A partir de un cultivo joven de *Halobacterium halobium* CECT 396 se prepara una suspensión densa, en NaCl 4M, de la cual se toma 1 mL para inocular un matraz con medio MH al 25% de stock de sales de Subov. Los matraces inoculados se llevan a un incubador orbital a 40°C y 110 r.p.m. y se mantiene la incubación durante 7 días.

2. Extracción de los lípidos polares totales.

Se recoge la biomasa mediante centrifugación y se extraen los lípidos según el método de Kates [10] modificado.

3. Preparación de los arqueosomas.

Para la elaboración de los arqueosomas se sigue el método clásico descrito por Bangham y cols. [11], específico para la obtención de liposomas multilaminares. Dicha técnica se ha adaptado a las características de los lípidos objeto de estudio.

4. Caracterización de los arqueosomas por microscopía electrónica de transmisión.

Posteriormente las muestras obtenidas se caracterizan al microscopio electrónico de transmisión mediante tinción negativa con acetato de uranilo al 2%. La técnica seguida permite comprobar no solo la formación de liposomas, sino analizar su estructura, dimensiones y grado de agregación.

Resultados y Discusión

En primer lugar, hay que señalar que los estudios realizados en este campo son escasos,

por tanto, los resultados de este trabajo son novedosos y abren nuevas vías de investigación ya que hemos demostrado que los lípidos polares totales de la arquea halófila extrema *Halobacterium halobium* CECT 396 (con todas las concentraciones ensayadas) forman liposomas espontáneamente en dispersión acuosa. La Figura 1 constituye un ejemplo representativo de los mismos. Se trata de una microfotografía tomada a 12.000 aumentos, que muestra la forma y estructura multilaminar de arqueosomas elaborados con 30 mg/mL de lípidos totales ya que el procedimiento de elaboración es específico para la obtención de este tipo de vesículas, aspecto que se ha comprobado mediante la caracterización microscópica. En esta figura se visualizan las bicapas fosfolipídicas alternando con compartimentos acuosos, así como una zona central polar. La difusión del colorante utilizado revela la existencia de regiones transparentes al bombardeo electrónico (zonas a las que el colorante no ha podido acceder) y zonas electrodensas que denotan la presencia del metal pesado. Por ello las capas hidrófobas se comportan como transparentes, mientras que las partes polares, concéntricas a las anteriores, corresponden a las zonas electrodensas, oscuras a nuestra percepción.

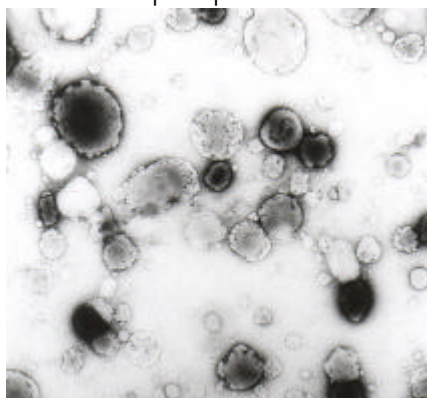


Figura 1. Arqueosomas obtenidos con 30 mg/mL de lípidos totales de *H. halobium* CECT396.

En la Tabla 1 se recogen los resultados medios de la medida de los diámetros de los liposomas obtenidos y la desviación estándar de estos según la concentración de lípidos con que se prepararon las muestras. La última columna indica el diámetro medio de todos los liposomas

medidos y la desviación estándar para todos los resultados, independientemente de la concentración de lípidos empleados en la preparación de los arqueosomas. Los datos resultantes de la medida del diámetro de los liposomas formados con los lípidos polares totales de esta haloarquea reflejan que el diámetro medio es mayor en los liposomas obtenidos con 15 mg/mL, pero debido a que es el grupo del cual tenemos menos datos también es el que presenta mayor desviación estándar: es el grupo con menos uniformidad en el tamaño de los arqueosomas.

En los liposomas obtenidos con 30 mg/mL se da el caso contrario, son los de menor diámetro medio, pero a la vez presentan una mayor uniformidad en éste (menor desviación estándar).

Los arqueosomas obtenidos con 22,5 mg/mL tienen un diámetro medio más próximo al diámetro medio de todos los liposomas formados, independientemente de la cantidad de lípidos con que hayan sido preparados.

Tabla 1. Diámetros medios y sd de los arqueosomas de *H. halobium* CECT 396.

Φ_{medio} 15 mg/mL	Φ_{medio} 22,5 mg/mL	Φ_{medio} 30 mg/mL	Φ_{medio}
0,748	0,707	0,645	0,692
sd 15 mg/mL	sd 22,5mg/mL	sd 30 mg/mL	sd media
0,309	0,251	0,188	0,243

La Tabla 2 agrupa los valores extremos de diámetro para los liposomas preparados con cada concentración lipídica y los valores totales.

Tabla 2. Diámetros máximos y mínimos de los arqueosomas de *H. halobium* CECT 396.

	15mg/ mL	22,5mg/ mL	30mg/ mL	Independiente concentración
$\Phi_{\text{máximo}}$ (μm)	1,273	1,350	1,200	1,350
$\Phi_{\text{mínimo}}$ (μm)	0,380	0,280	0,335	0,280

En la Figura 2 se representa la distribución de frecuencias para cada una de las tres concentraciones de lípidos totales empleadas (15; 22,5 y 30 mg/mL). En el eje de abscisas se muestran los intervalos de diámetro (establecidos mediante el análisis estadístico

realizado con el paquete estadístico Statistica 6.0) y en el de ordenadas el número de liposomas que pertenecen a dichos intervalos.

Los histogramas de la Figura 2 muestran, en general, una distribución univariante en la que la mayor frecuencia se registra para aquellos liposomas de tamaño medio. No obstante, en los tres histogramas se aprecia un sesgo en torno al valor central de la distribución. Éste se acentúa tanto en el histograma correspondiente a 15 mg/mL que origina una división en dos grupos de tamaños. Este hecho, como se ha comentado anteriormente, puede ser debido a la escasez de datos obtenidos para esta concentración de lípidos.

Ante la relativa heterogeneidad de tamaños y el bajo número de medidas realizadas de los arqueosomas formados con 15 mg/mL evidencia la necesidad de realizar más ensayos para evaluar si realmente con una concentración menor de lípidos se obtiene liposomas de tamaño poco homogéneo y si existe tendencia a la bivarianza.

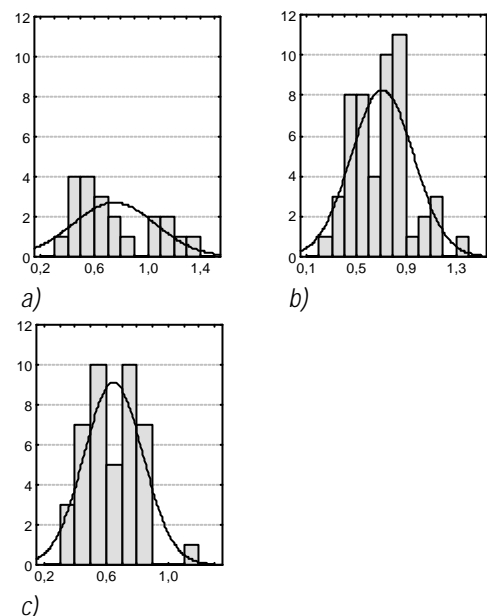


Figura 2. Distribución de frecuencias de los diámetros medidos en función de la concentración de lípidos utilizada: a) 15 mg/mL; b) 22,5 mg/mL; c) 30 mg/mL.

Es interesante estudiar el tamaño de los liposomas debido a que puede condicionar las características del fármaco que se encapsule en próximas experiencias y la posible aplicación de

160 VI Congreso SEFIG y 3^{as} Jornadas TF

estos arqueosomas. En este aspecto también habría que estudiar cómo puede influir en el diámetro de los liposomas la esterilización por calor o el almacenaje de las preparaciones durante largos períodos de tiempo, a distintos pH y a diferentes temperaturas [5] [12].

Como **conclusiones** del presente trabajo cabe destacar que es posible que la concentración de lípidos empleada para preparar los liposomas influya en el tamaño de la vesícula formada y también en la homogeneidad de dicho tamaño dado que, al analizar los diámetros de los liposomas preparados con distintas concentraciones de los lípidos polares totales de *Halobacterium halobium* CECT 396, se puede observar que:

1. los liposomas presentan un diámetro mayor cuanto menor es la concentración de lípidos,
2. la homogeneidad en el tamaño de estos arqueosomas aumenta al incrementar la cantidad de lípidos empleados en la preparación,
3. los liposomas preparados con 22,5 mg de lípidos polares totales/mL de tampón fosfato son los que se aproximan más al diámetro medio de todos los arqueosomas observados y los más homogéneos en cuanto a su tamaño, si los comparamos con los obtenidos con 15 y 30 mg de lípidos/mL de tampón,
4. es necesario valorar la influencia del tamaño del liposoma en las futuras aplicaciones tecnológicas.

Bibliografía.

1. Vila Jato JL. Tecnología farmacéutica (vol II). Editorial Síntesis, Madrid, 1997.
2. Kates M. Biological Membranes: Aberrations in Membrane Structure and Function. Alan R. Liss, Inc., 1988.
3. Ross HNM, Collins MD, Tindall BJ, Grant WD. Journal of General Microbiology, 123. 75 (1981).
4. Kates M, Moldeveanu N. General and Applied Aspect of Halophilic Microorganisms 191(1991).
5. Choquet CG, Patel GB, Sprott GD. Canadian Journal of Microbiology, 42, 183 (1996).
6. Sprott GD, Tolson DL, Patel GB. FEMS Microbiology Letters, 154, 17 (1997).
7. Krishnan L, Dicaire CJ, Patel GB, Sprott GD. Infection and Immunity, 68, 54 (2000).
8. Krishnan L, Sad S, Patel GB, Sprott GD. The Journal of Immunology, 165, 5177 (2000).
9. Patel GB, Agnew BJ, Deschatelets L, Fleming LP, Sprott GD. International Journal of Pharmaceutics 194, 39 (2000).
10. Kates M. Techniques of lipidology. Isolation, analysis and identification of lipids (2^a edición revisada), Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 1988.
11. Bangham AD, Hill MW, Miller NGA. Methods in membrane biology, Plenum Press, New York., 1974.
12. Choquet CG, Patel GB, Beveridge TJ, Sprott GD. Applied and Environmental Microbiology, 42, 375 (1994).

Autor de contacto:

M. del Mar Medina Pérez

M. Teresa Cuerda Correa

mdelmar@ugr.es

Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada

Dpto. de Farmacia y Tecnología Farmacéutica

Campus de Cartuja s/n

18170 Granada

Granada

Tel: 958 243 901 / 958 249 975

Fax: 958 248 958 / 958 246 235