

Estudio sobre las interacciones de interfase entre vesículas biológicas y superficies inorgánicas de biomateriales por medio de microscopía de fuerza atómica.

Solera, F^{1.}, Vega, J^{1,2.}, Madrigal, S^{2.}, y Loria, A³

¹Laboratorio Nacional de Nanotecnología. Centro Nacional de Alta Tecnología. Consejo Nacional de Rectores. Costa Rica. 2011.

²Laboratorio de Polímeros. Escuela de Química. Universidad Nacional. Costa Rica. 2011.

³Instituto de Investigaciones Farmacéuticas. Facultad de Farmacia. Universidad de Costa Rica. 2011

Resumen

Incompatibilidades de interfase en la interacción entre las micropartículas biológicas que normalmente circulan en la sangre y la superficie de los implantes de biomateriales están normalmente asociadas con posteriores reacciones de rechazo por parte del sistema inmune. Ello requiere un modelo explicativo de la conducta observada en la interfase de los liposomas y las plaquetas en contacto con biomateriales y superficies inorgánicas. Por lo tanto, el análisis de la relación entre el equilibrio iónico de las fuerzas de superficie de atracción entre liposoma -superficie /grado de deformación y el cambio en las propiedades de la superficie de las nanopartículas liposomales absorbidas por la modificación de superficie de los liposomas con biopolímeros como el quitosano. Se ha hecho progreso en la comprensión de la dinámica de las interfaces para la consistencia de diferentes vesículas de lípidos como modelo, y se ha encontrado que el recubrimiento de biopolímero de vesículas de lípidos con quitosano proporciona mejor estabilidad física y un aumento en la interfaz entre los biomateriales y nanopartículas inorgánicas biomiméticas.

Palabras clave: Interfase, vesículas biológicas, biomateriales, microscopía de fuerza atómica, liposomas.

Interface interactions between biological vesicles and inorganic surfaces of biomaterials using atomic force microscopy.

Abstract

Interface incompatibilities in the interaction between biological microparticles that normally circulate in the blood and the surface of biomaterials implants are normally associated with subsequent rejection reactions by the immune system. This requires an explanatory model for the behavior observed at the interface of liposomes and platelets in contact with biomaterials and inorganic surfaces. Thus, allowing the analysis of the relationship between the ionic balance of surface forces of attraction between liposome-surface/degree of deformation and change in the surface properties of liposomal nanoparticles absorbed by the surface modification of liposomes with biopolymers such as chitosan. Progress has been made in understanding the dynamics of interfaces for consistency of different lipids vesicles as a model and found that the biopolymer coating of lipid vesicles with chitosan provides better physical stability and an increase in the interface between biomaterials and biomimetic inorganic nanoparticles.

Key words: Interface, biological vesicles, biomaterials, atomic force microscopy, liposome.

Introducción

Los fenómenos iónicos de enlace e intercambio sobre superficies inorgánicas determinan la fuerza de las interacciones entre liposoma y superficie (liposoma – superficie). Debido a esto, el equilibrio en el intercambio iónico de los iones Ca^{2+} en la superficie, juega un papel importante en las fuerzas de atracción liposoma – superficie. La capacidad de una determinada superficie de enlazar diferentes iones dependerá de la presencia de grupos funcionales (sílice o titanio) o sitios de interacción específicos (mica). Estos factores se encuentran estrechamente relacionados con los cambios que se puedan presentar en la densidad de carga del material.

La fuerza de las atracciones liposoma – superficie determina la naturaleza de las interacciones entre la superficie y los liposomas adsorbidos sobre esta, mediante un efecto asociado a las propiedades de la doble capa lipídica.

Un análisis similar de las interacciones entre sistemas biológicos “nativos” (micropartículas y plaquetas) y superficies inorgánicas serviría como herramienta para el entendimiento de los fenómenos de biocompatibilidad en biomateriales.

Las vesículas lipídicas o liposomas (Figura 1), han sido ampliamente utilizadas en estudios biofísicos como modelos de membrana celular desde su descubrimiento en la década de los años 60 (Yeagle, 1987; Bangham, 1993). Actualmente se dispone de métodos confiables para la preparación de suspensiones de vesículas con propiedades bien definidas y tamaños que van desde pocos nanómetros hasta decenas de micras. La propiedad que tienen los liposomas de encapsular y proteger sustancias tanto hidrofílicas, como hidrofóbicas (en el interior acuoso del liposoma o en el núcleo hidrofóbico de la bicapa lipídica, respectivamente), ha adquirido especial interés en el campo de la liberación de sustancias activas, especialmente para aplicaciones cosméticas, para el cuidado de la piel y en terapias anticáncer (Abraham, 2005; Lasic, Martin, Gabizon, Huang & Papahadjopoulos, 1991).

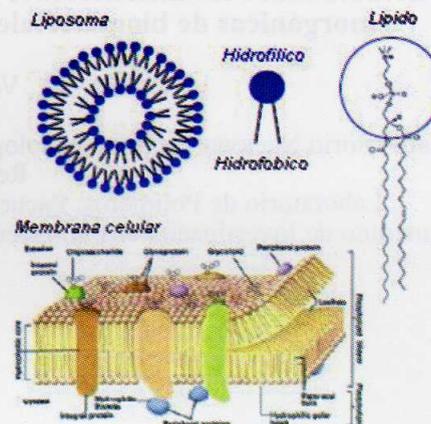


Fig 1. Liposomas, lípidos y la membrana celular. La imagen es un recopilado desarrollado por uno de los autores

Los recientes avances en el campo de la química de polímeros han permitido el desarrollo de una amplia variedad de estructuras micelares conformadas por vesículas fundamentadas en matrices poliméricas, que han demostrado poseer mayor estabilidad y propiedades de encapsulación (Meir, 2000; Fischer, Ortiz, Srinivas, Klein, Kim, David *et al*, 2007). Nuestro grupo de investigación se ha dedicado al desarrollo de vesículas liposomales formadas a partir de dispersiones concentradas de lecitina de soja que han sido recubiertas con biopolímeros (Álvarez, Seyler, Madrigal Vila & Molina, 2007; Mura, Manconi, Madrigal, Sinico, Fadda Vila *et al* 2008) obtenidos a partir de biomasa de desecho de origen marino (quitosano y colágeno), con el objetivo de disponer de un sistema liposomal que además de estable, biocompatible y con excelentes propiedades de carga de principios activos, reúna los requisitos planteados por el programa de Química Verde de la EPA, dado que incorpora dentro de sus materias primas únicamente sustancias de desecho, generando un valor agregado a los mismos, a la vez que beneficia el medio ambiente.

A pesar de que sus aplicaciones se han multiplicado a través de los años y que las técnicas de preparación se han facilitado gracias a los avances tecnológicos; las estructuras vesiculares continúan manteniendo cierto enigma y generando cuestionamientos en cuanto a sus mecanismos de formación (estados metaestables y equilibrio), propiedades (asociadas a su distribución de tamaños) y comportamiento (Claessens, Leemakers, Hoekstra, & Stuart, 2007; Lasic, 1988). Muchas de estas preguntas están asociadas a procesos competitivos a nivel molecular entre efectos hidrofóbicos y estéricos/electroestáticos

que determinan el estado de equilibrio de la doble capa lipídica en el caso de los liposomas (y de la membrana celular), así como las propiedades mesoscópicas que definen la formación (cierre) de la vesícula (Groves & Dustin, 2003).

El objetivo de este estudio fue entender el comportamiento de los liposomas en superficies inorgánicas, desarrollando un modelo que permita comprender mejor las interacciones liposoma – superficie, mismo que sería aplicado al desarrollo de plataformas basadas en dobles capas para aplicaciones en estudios biofísicos de membranas celulares (Wu, Holowka, Craighead, & Baird, 2004; Simson, Sackmann, Baszkin, & Norde, 2000), biosensores (Benkoski, Kasemo, & Hook, 2005; Olofsson, Rindzevicius, Pfeiffer & Hook, 2003), sistemas de liberación de principios activos (Discher, Eisenberg, 2002; Vermette, Meagher, Gagnon, Griesser & Doillon, 2000) y sistemas basados en interfases bio/no-bio, como implantes, biosensores

y biofilms antibacteriales.

En términos generales, las interacciones de los liposomas con las superficies inorgánicas dependerán de la naturaleza de la superficie, las condiciones del medio (buffer) y de los lípidos que constituyan la bicapa del liposoma.

Los liposomas pueden adsorberse y romperse en la superficie inorgánica, formando discos compuestos por una monocapa (Figura 3). A medida que se van adsorbiendo más liposomas en la superficie, las monocapas tienden a coalescer (juntarse unas con otras) para formar una bicapa confluyente. Otro posible mecanismo de interacción sugiere que las vesículas pueden permanecer intactas a la hora que son adsorbidas en la superficie, permaneciendo estables por largos periodos de tiempo. Finalmente, las vesículas adsorbidas en las superficies pueden experimentar una transición a bicapas continuas por encima de alguna concentración crítica.

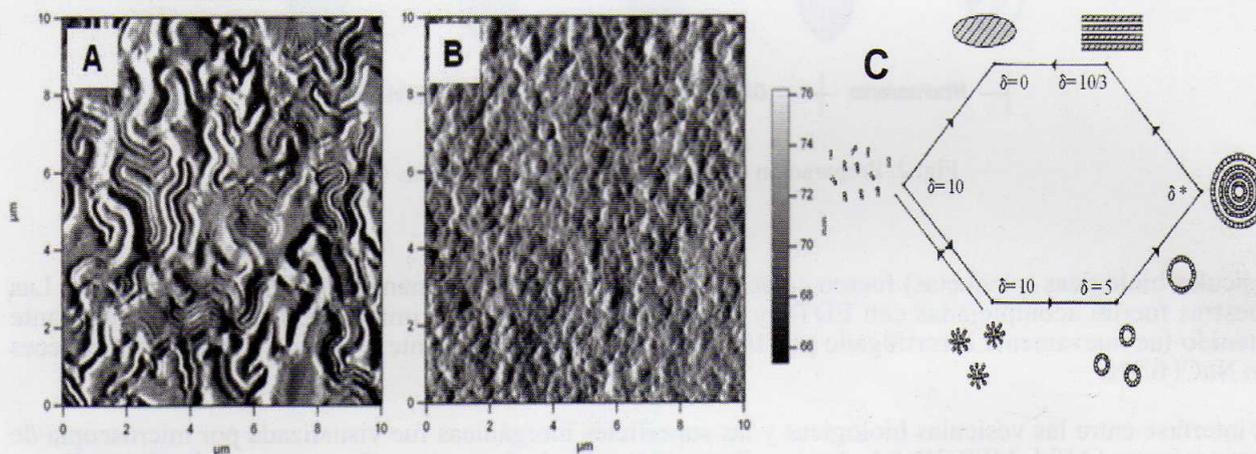


Figura. 3. Visualización por AFM de la fenomenología involucrada en la formación sintética de vesículas. A) Bicapas de fosfolípidos obtenidos por la técnica de la inflamación lenta. B) Formación de estructuras cerradas (vesículas) por el método de hinchazón rápida con agitación mecánica. C) Fenomenología implicada en la formación de vesículas por hinchazón con técnica de corte.

También se examinaron las siguientes relaciones: equilibrios iónicos de superficie; fuerza de atracción liposoma-superficie/grado de deformación; alteraciones en las propiedades de la bicapa lipídica; interacciones entre los liposomas adsorbidos. Se avanzó en el entendimiento de las dinámicas de las interfases de distinta consistencia (duro-blando), usando las vesículas lipídicas como modelo. Y el

estudio de los efectos que tiene la interacción de una superficie inorgánica con micropartículas que circulan habitualmente en la sangre, tales como los activadores inespecíficos de los procesos de coagulación que actúan en los lugares de lesión y en superficies de implantes o biomateriales.

Metodología

Las vesículas fueron preparadas por medio de dispersión de lecitina de soya (120, 150, 180, 210 y 240 g L⁻¹) en solución acuosa de NaCl 10⁻⁵ M. Se hidrataron (hincharon) las muestras de lecitina durante 24 horas y luego se sonicaron (60 ciclos de 5 s en sonicación y 5 s en pausa). Posteriormente las muestras fueron congeladas lentamente hasta llegar a -40°C y poco a poco calentada hasta 40°C. En

todos los casos, las muestras fueron preparadas por triplicado. Posteriormente, las muestras descongeladas fueron sometidos a diferentes números de ciclos de tratamiento con ultrasonidos, 5 s "on" / 5 s "off" (0, 25, 50, 75, 100 ciclos para la evaluación del área de la curva de histéresis y 0, 25, 40 50, 60, 75, 100 ciclos de viscosidad aparente y las mediciones de movilidad electroforética). Figura 2.

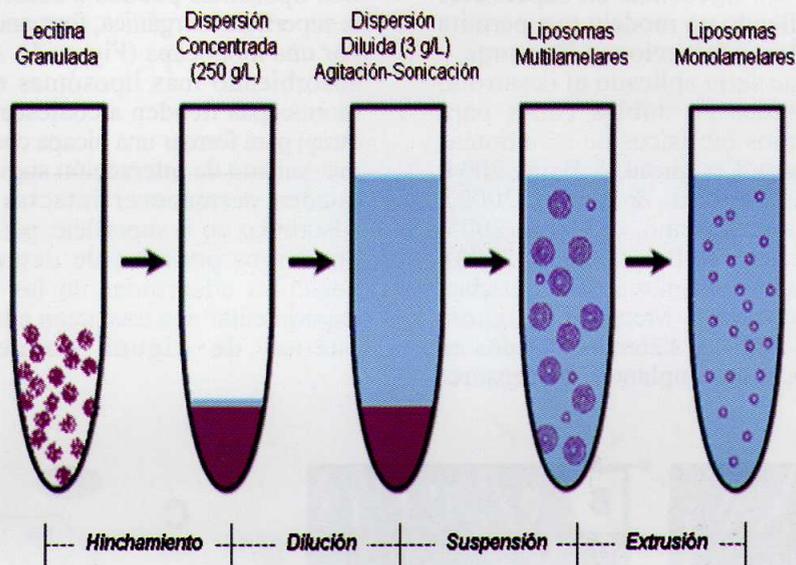


Fig. 2. Preparación de vesículas biológicas sintéticas (liposomas).

Vesículas biológicas (plaquetas) fueron colectadas a partir de sangre humana bajo el siguiente método: Las muestras fueron acomplejadas con EDTA y luego centrifugadas por 5 min a 2000 rpm. El sobrenadante obtenido fue nuevamente centrifugado por 10 min a 6000 rpm. Finalmente, el sólido fue lavado tres veces con NaCl 0.9%.

La interfase entre las vesículas biológicas y las superficies inorgánicas fue visualizada por microscopía de fuerza atómica (AFM, MFP-3D-SA, Asylum Research) en modo de contacto. Las muestras disueltas en agua fueron colocadas sobre mica y secada al aire a temperatura ambiente. Las imágenes AFM se realizaron con una *spring contact* de $k = 0.03 \text{ N/m}$ usando un cantiléver de nitruro de silicio (Si_3N_4).

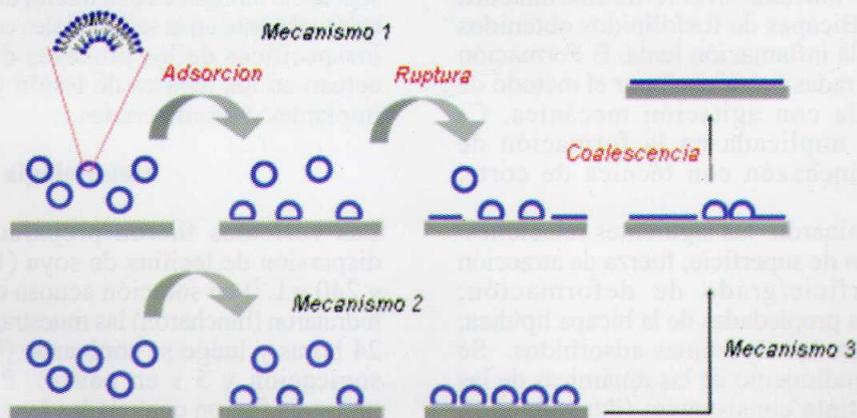


Figura. 4. Mecanismo explicatorio par a las interacciones entre vesículas biológicas superficies inorgánicas de biomateriales.

Resultados

En la figura 5 se observa a nivel micrométrico por medio microscopía de fuerza atómica, el tamaño de los liposomas sintetizados que va desde 1 a 3 micras aproximadamente.

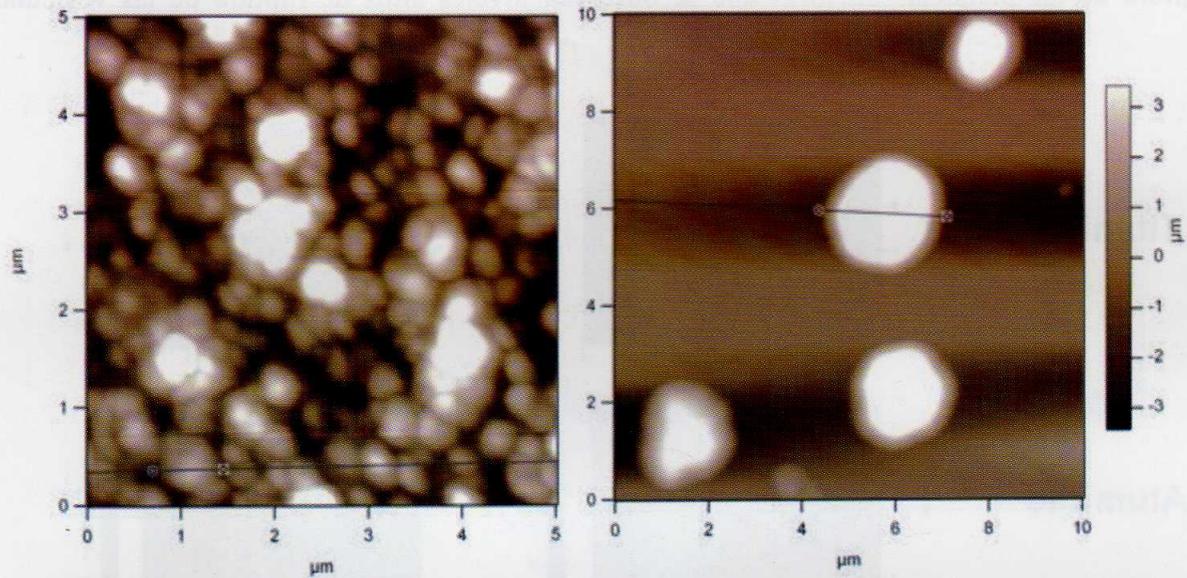


Figura. 5. Visualización por AFM de vesículas biológicas sintetizadas (Liposomas).

En la figura 6 se observa una comparación de la interacción entre plaquetas y vesículas biológicas con diferentes superficies inorgánicas de biomateriales.

En el caso del aluminio y el titanio se observa una ruptura tanto de las plaquetas como de las vesículas, mientras que en cerámica se observa una ruptura más moderada de las plaquetas y una ausencia aparente de ruptura en las vesículas. En el caso de las interacciones con sílice se puede observar un nivel mucho menor de ruptura de las plaquetas mientras que se observan niveles altos de ruptura de las vesículas.

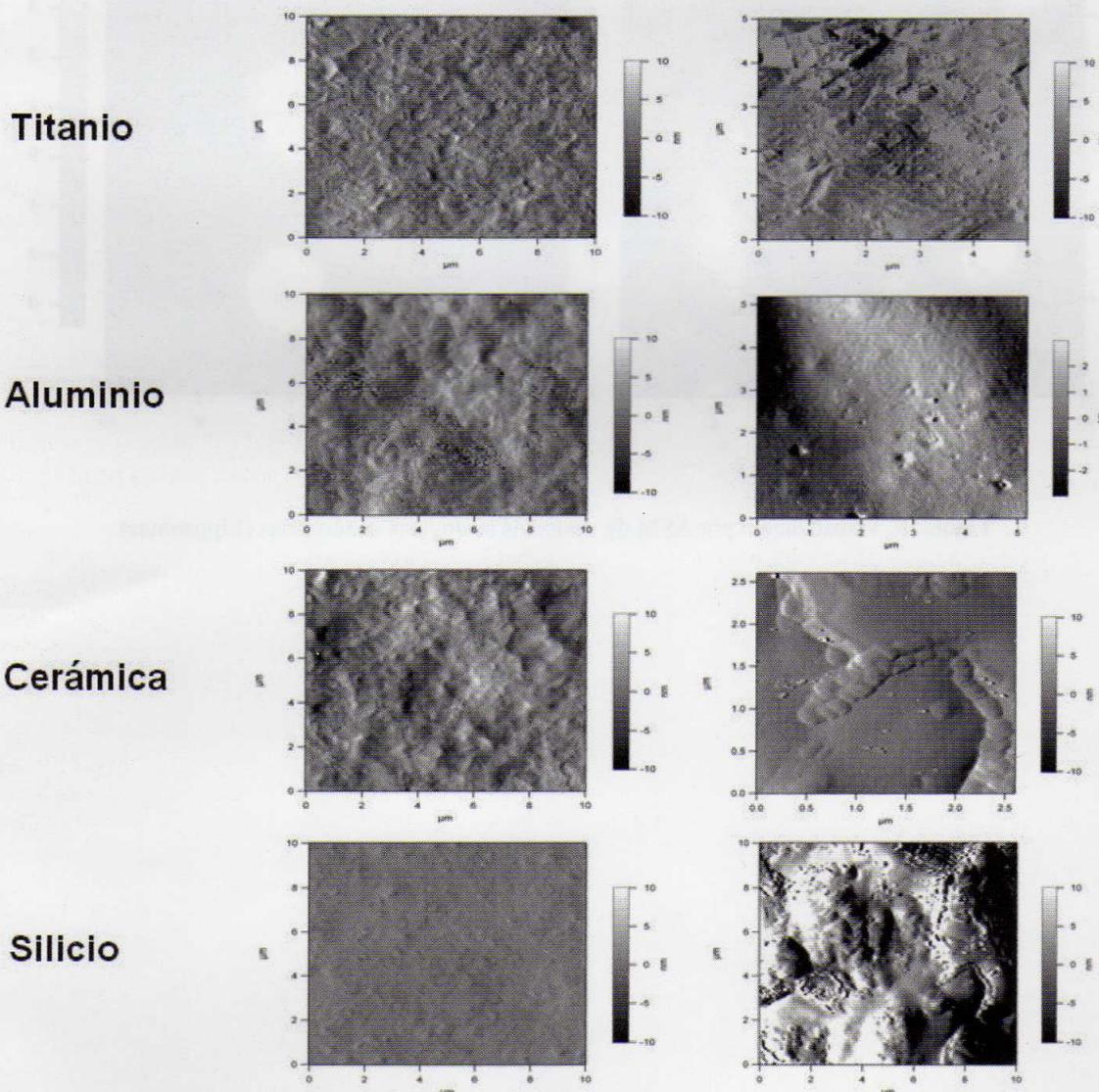


Figura. 6. Visualización por AFM de la interacción entre plaquetas (izquierda) vesículas biológicas (derecha) y superficies inorgánicas de biomateriales (titanio, aluminio, cerámica y sílice).

Discusión

Al interactuar con superficies inorgánicas, las vesículas biológicas (liposomas y plaquetas) exhiben una amplia gama de comportamientos que van desde la simple absorción y deformación causada por la interacción, a la descomposición y la formación de bicapas de superficie.

Imágenes de microscopia de fuerza atómica permitieron probar la permanencia de estructuras cerradas de vesículas biológicas en los sistemas de vesícula-superficie inorgánicos. Parte de este comportamiento es característico de los sistemas coloidales, por ejemplo, los liposomas son repelidos por las superficies de carga igual y atraídos por la carga opuesta. Sin embargo, sus grados de libertad internos, y la interfase acuosa de la superficie inorgánica, están involucrados en otros aspectos de su comportamiento en las superficies. En particular, la relación entre factores de la superficie y la fuerza de atracción entre las superficies y liposomas es un reto. A pesar del buen desempeño de los materiales modernos compatibles con la sangre utilizada en *stents* (endoprótesis vascular) y válvulas cardíacas artificiales, todavía se requiere un mayor desarrollo en este campo con el fin de mejorar el rendimiento y la investigación orientada al estudio de los mecanismos de la biocompatibilidad.

Referencias

- Abraham, S. A., Waterhouse, D. N., Mayer, L. D., Cullis, P. R., Madden, T. D., & Bally, M. (2005) The liposomal formulation of doxorubicin. In *Liposomes, Pt E*. Vol. 391, 71-97.
- Álvarez, M.A., Seyler, D., Madrigal-Carballo S., Vila, A. O., & Molina, F. (2007). Influence of the electrical interface properties on the rheological behaviour of sonicated soy lecithin dispersions. *Journal of Colloid and Interface Science*. (309), 279-282.
- Bangham, A. D. (1993). *Chemistry and Physics of Lipids*. LIPOSOMES – THE BABRAHAM CONNECTION 64, (1-3), 275-285.
- Benkoski, J. J., Jesorka, A., Kasemo, B., & Hook, F. (2005). Light-activated desorption of photoactive polyelectrolytes from supported lipid bilayers. *Macromolecules*. 38(9), 3852-3860.
- Claessens, M., Leermakers, F. A. M., Hoekstra, F. A., & Stuart, M. A. C. (2007). Entropic stabilization and equilibrium size of lipid vesicles. *Langmuir*, 23(11), 6315-6320.
- Discher, D. E., Ortiz, V., Srinivas, G., Klein, M. L., Kim, Y., David, C. A., ... & Ahmed, F. (2007). Emerging applications of polymersomes in delivery: From molecular dynamics to shrinkage of tumors. *Progress in Polymer Science*. 32(8-9), 838-857.
- Discher, D. E., & Eisenberg, A. (2002) Polymer vesicles. *Science*. 297(5583), 967-973.
- Graff, A., Winterhalter, M., & Meier, W. (2001) Nanoreactors from polymer-stabilized liposomes. *Langmuir*. 17(3), 919-923.
- Graneli, A., Rydstrom, J., Kasemo, B., & Hook, F. (2004). Utilizing adsorbed proteoliposomes trapped in a non-ruptured state on SiO₂ for amplified detection of membrane proteins. *Biosensors & Bioelectronics*. 20(3), 498-504.
- Groves, J. T., & Dustin, M. L. (2003). Supported planar bilayers in studies on immune cell adhesion and communication. *Journal of Immunological Methods*. 278(1-2), 19-32.
- Hovis, J. S., & Boxer, S. G. (2001). Patterning and composition arrays of supported lipid bilayers by microcontact printing. *Langmuir*, 17(11), 3400-3405.
- Ishida, T., Takanashi, Y., & Kiwada, H. (2006) Safe and efficient drug delivery system with liposomes for intrathecal application of an antivasospastic drug, fasudil. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 29 (3), 397-402.
- Kam, L., & Boxer, S. G. (2003). Spatially selective manipulation of supported lipid bilayers by laminar flow: Steps toward biomembrane microfluidics. *Langmuir*. 19(5), 1624-1631.
- Lasic, D. D. (1988). The mechanism of vesicle formation. *Biochem. Journal*. 256(1), 1-11.
- Lasic, D. D., Martin, F. J., Gabizon, A., Huang, S. K., & Papahadjopoulos, D. (1991). Sterically stabilized liposomes: a hypothesis on the molecular origin of the extended circulation times. *Biochim. Biophys. Acta*. 1070(1), 187-192.
- Leng, J., Egelhaaf, S. U., & Cates, M. E. (2003) Kinetics of the micelle-to-vesicle transition: aqueous lecithin-bile salt mixtures. *Biophys Journal*. 85(3), 1624-46.
- Madrigal-Carballo S., Seyler D., Manconi, M., Mura, S., Vila, A. O. & Molina, F. (2008). An approach to rheological and electrokinetic behaviour of lipid

vesicles covered with chitosan biopolymer. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects (accepted - article in press)*, doi:10.1016/j.colsurfa.2007.11.039.

Meier, W. (2000). Polymer nanocapsules. *Chemical Society Reviews*. 29(5), 295-303.

Meier, W., Nardin, C., & Winterhalter, M. (2000). Reconstitution of channel proteins in (polymerized) ABA triblock copolymer membranes. *Angewandte Chemie-International*. 39(24), 4599.

Mura, S., Manconi, M., Madrigal-Carballo, S., Sinico, C., Fadda, A. M., Vila, A. O. & Molina F. (2008). Composite soy lecithin-decylpolyglucoside vesicles: A theoretical and experimental study. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects (accepted - article in press)*, doi:10.1016/j.colsurfa.2007.09.036.

Nardin, C., Hirt, T., Leukel, J., & Meier, W. (2000). Polymerized ABA triblock copolymer vesicles. *Langmuir*. 16(3), 1035-1041.

Nardin, C., Thoeni, S., Widmer, J., Winterhalter, M., & Meier, W. (2000.) Nanoreactors based on (polymerized) ABA-triblock copolymer vesicles. *Chemical Communications*. (15), 1433-1434.

Nohynek, G. J., Lademann, J., Ribaud, C., & Roberts, M. S. (2007) Grey goo on the skin? Nanotechnology, cosmetic and sunscreen safety. *Critical Reviews in Toxicology*. 37(3), 251-277.

Olofsson, L., Rindzevicius, T., Pfeiffer, I., Kall, M., & Hook, F. (2003). Surface-based gold-nanoparticle sensor for specific and quantitative DNA hybridization detection. *Langmuir*. 19(24), 10414-10419.

Orth, R. N., Wu, M., Holowka, D. A., Craighead, H. G., & Baird, B. A. (2003) Mast cell activation on patterned lipid bilayers of subcellular dimensions. *Langmuir*. 19(5), 1599-1605.

Papahadjopoulos, D., Allen, T. M., Gabizon, A., Mayhew, E., Matthay, K., Huang, S. K....& Redemann, C. (1991). Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. *Proceeding of the National Academy of Sciences. U.S.A.* 88(24), 11460-11464.

Simson, R., Sackmann, E., Baszkin, A., & Norde, W. (2000). Mimicking physics of cell adhesion. In *Physical Chemistry of Biological Interfaces*, Marcel Dekker: New York.

Sofou, S. (2007). Surface-active liposomes for targeted cancer therapy. *Nanomedicine.*, 2(5), 711-724.

Stadler, B., Falconnet, D., Pfeiffer, I., Hook, F., & Voros, J. (2004) Micropatterning of DNA-tagged vesicles. *Langmuir*. 20(26), 11348-11354.

Taylor, T. M., Davidson, P. M., Bruce, B. D., & Weiss, J. (2005). Liposomal nanocapsules in food science and agriculture. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 45, (7-8), 587-605.

Vermette, P., Meagher, L., Gagnon, E., Griesser, H. J., & Doillon, C. J. (2002). Immobilized liposome layers for drug delivery applications: inhibition of angiogenesis. *Journal of Controlled Release*. 80(1-3), 179-195.

Wu, M., Holowka, D., Craighead, H. G., & Baird, B. (2004). Visualization of plasma membrane compartmentalization with patterned lipid bilayers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101(38), 13798-13803.

Yeagle, P. L. (1987). [*The Membranes of Cells*] Academic Press, Inc.: San Francisco, CA, USA.