

Anal Real Acad. Farm. 2002, 68:

Investigación

Anfotericina Liposomal: Una aproximación fisicoquímica al conocimiento de su mecanismo de acción *

JOSÉ MIÑONES CONDE

Departamento de Química Física. Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela

RESUMEN

El análisis de las isotermas presión superficial (π) - área molecular (A), así como el de las curvas del módulo de compresibilidad (C_s^{-1}) en función de la presión superficial correspondientes a monocapas mixtas de anfotericina B (AmB) y dipalmitoil fosfatidil serina (DPPS) extendidas sobre subfases de diferentes pH, muestra la existencia de importantes interacciones entre ambos componentes, sugiriendo la formación de complejos estables en la interfase aire/agua constituidos por dos moléculas de AmB orientadas horizontalmente y una de DPPS en posición vertical. Las atracciones de tipo iónico y el establecimiento de enlaces de hidrógeno entre los grupos polares de los componentes son los responsables de las interacciones mutuas, las cuales dependen del pH de la subfase como consecuencia del diferente estado de ionización de los grupos implicados en la interacción (grupos carboxílico y amino de la AmB y fosfato, carboxílico y amino del DPPS). La aplicación de la regla de las fases a las transiciones de fase de las monocapas mixtas permite conocer la miscibilidad del complejo con el componente en exceso (AmB o DPPS) cuando la proporción de éste en la mezcla excede a la requerida para la formación del complejo de estequiometría 2:1. La existencia de interacciones AmB/fosfolípido permite formular una interpretación acerca del mecanismo de acción de la AmB sobre la membrana celular de los hongos, así como de su menor toxicidad sobre el huésped cuando se administra en forma de liposomas.

Palabras clave: Monocapas mixtas. Anfotericina B. DPPS. Liposomas. Miscibilidad.

Liposomal Amphotericin: A physical-chemistry approach to the knowledge of its Mechanism of action.

SUMMARY

The analysis of surface pressure (π)-area (A) isotherms and C_s^{-1} - π (compressional modulus- surface pressure) curves corresponding to mixed monolayers of amphotericin B (AmB) and dipalmitoyl phosphatidyl serine (DPPS) spread on subphases of different pH shows the existence of significant interactions between the film-forming components. The formation of a stable complex at the air/water interface, composed of two horizontally oriented AmB molecules and one DPPS molecule in the vertical position, is postulated. Ionic attractive forces and hydrogen bonds between AmB and DPPS polar groups are thought to be responsible for the mutual interactions, which vary with the subphase pH due to the different ionization state of the polar groups implicated in the interaction (carboxylic and amino groups of AmB and phosphate, carboxylic and amino groups of DPPS). By applying the Crisp phase rule to the phase transitions of the mixed monolayers, the miscibility of the film-forming components is discussed. The existence of AmB/phospholipid interactions could explain the action of AmB in the fungi membranes, as well as the low toxicity of AmB when is administered in liposomal form.

Key words: Mixed monolayers. Amphotericin B. DPPS. Liposomes. Miscibility.

INTRODUCCIÓN

La anfotericina B (AmB) es un antibiótico macrocíclico que posee una potente acción antifúngica, de modo que después de más de treinta años de su uso en clínica todavía continúa siendo el medicamento de elección en el tratamiento de la mayoría de las infecciones provocadas por hongos, pese a la introducción en el mercado de otros agentes antimicóticos más modernos, tales como el miconazol y el ketoconazol (1).

Aunque su mecanismo de acción no es totalmente conocido, la hipótesis más aceptada es que forma poros o canales en el interior de la membrana celular de los hongos (2), a través de los que se produce el trasvase de elementos importantes del interior de la célu-

la de los hongos, tales como iones K^+ y Mg^{+2} (3), aminoácidos e incluso, ácidos nucleicos (4), que termina por provocar la lisis y la muerte de la célula. Se ha postulado que la formación de estos poros sólo tiene lugar en membranas que contienen esteroides (5,6), como son las de los hongos o las de los mamíferos. Por el contrario, aquellas que no los contienen, tales como las de virus y bacterias, son insensibles a la anfotericina B (7). A este respecto hay que señalar que estudios "in vitro" han demostrado la existencia de fuertes interacciones entre los esteroides y la anfotericina B (8-10), como consecuencia de la formación de enlaces de hidrógeno entre los grupos polares de ambos componentes, por lo que podría atribuirse a esta causa la necesidad de la presencia de esteroides en la membrana para la formación de poros estables.

No obstante, pese a estos resultados, se ha llegado a sugerir que el modelo basado en la formación de un complejo AmB-esteroide sólo es válido para las membranas que contienen ergosterol, pero no para las que poseen colesterol, en cuyo caso para que el medicamento sea activo tiene que encontrarse en forma de agregados moleculares (11). Por otra parte, Fujii et al (12) han mostrado que la AmB puede interaccionar específicamente con los fosfolípidos, formando poros, sin necesidad de la presencia de esteroides, los cuales desempeñarían únicamente un papel indirecto (13), modificando el empaquetamiento de los fosfolípidos de la membrana y haciéndola de este modo más asequible a la penetración del antibiótico (14). Este papel indirecto de los esteroides en la formación de poros de AmB también fue defendido por Cotero *et al* (15) y por Ruckwardt *et al.* (16) en trabajos más recientes. De acuerdo con esto, uno de los objetivos de este trabajo es comprobar el papel de los fosfolípidos en la formación de estos poros, estudiando mediante la técnica de monocapas la posibilidad de que se establezcan interacciones AmB-fosfolípido.

Otro aspecto importante a destacar es que la AmB administrada en forma de fungizona (dispersión coloidal del medicamento) provoca numerosos efectos tóxicos sobre el huésped: fiebre, escalofríos

os, náuseas, vómitos y malestar general (17), así como complicaciones más severas (nefrotoxicidad), que terminan por dañar el riñón cuando se administra durante períodos prolongados de tiempo (18). Con el fin de eliminar estos efectos indeseables, se idearon otras formulaciones farmacéuticas tales como emulsiones, micelas, vesículas o liposomas, en las que el medicamento se encuentra asociado con diferentes lípidos (19, 20). Estas nuevas formulaciones mostraron una menor toxicidad del medicamento, sin que por ello existiese una pérdida de su eficacia terapéutica (21-24).

Ahora bien, las razones por las que la AmB en forma de liposomas o de emulsiones lipídicas es menos tóxica que cuando se encuentra libre no son conocidas con suficiente precisión, si bien parece existir una cierta relación entre la composición de la cubierta liposomal y la toxicidad del medicamento, puesto que éste es inocuo si los fosfolípidos constituyentes del liposoma son saturados, en tanto que resulta tan tóxico como la fungizona cuando aquellos son insaturados (25). Por ello, parece importante averiguar la afinidad existente entre el medicamento y el fosfolípido de la formulación farmacéutica, por lo que el estudio de la posible interacción AmB-fosfolípido es fundamental para clarificar el papel de los liposomas y de las formulaciones lipídicas en la disminución de la toxicidad de la AmB.

PARTE EXPERIMENTAL

El fosfolípido estudiado (Dipalmitoil DL- α Fosfatidil-L-Serina) (DPPS), fue suministrado por Sigma con una pureza del 98%. La Anfotericina B fue donada por Squibb Industria Farmacéutica S.A. (Grupo Bristol-Myers Squibb.), presentándose en forma de polvo amarillo. Su pureza variaba de acuerdo con el lote suministrado, aunque en ningún caso fue inferior al 95%.

El fosfolípido se disolvió en una mezcla de cloroformo/etanol en proporción 4:1 (v/v). La AmB se disolvió en una mezcla de dimetilformamida y de ácido clorhídrico 1N en proporción 3:1 (v/v).

Todos los disolventes fueron productos Merck, de carácter “grado reactivo”. Las disoluciones de extensión correspondientes a las mezclas de AmB y fosfolípido se prepararon a partir de dos disoluciones “madre” de cada uno de los componentes, midiendo en cada caso el volumen necesario para obtener la proporción deseada. Tales disoluciones se guardaron en recipientes de vidrio, herméticamente cerrados, y se mantuvieron en nevera durante tres días como máximo. En todo momento estuvieron protegidas de la luz. Estas disoluciones se esparcieron sobre agua desionizada, de resistividad 18 M Ω cm, obtenida por el sistema Milli RO- Milli Q de ósmosis inversa, fabricado por la firma Millipore.

Para medir la presión superficial se utilizó una balanza de superficies, tipo Wilhelmy, modelo KSV 5000 (KSV Chemical Corporation, Helsinki), con una resolución de 4 μ N/m. La velocidad de compresión fue de 30 mm/min. (36 cm²/min.) que, de acuerdo con el número de moléculas depositado en la subfase (4.25×10^{16}), corresponde a un valor de 8,5 Å²/molec. min. Esta balanza permite obtener simultáneamente dos isothermas π -A, debido a que posee dos cubetas independientes en las que se introduce la subfase y sobre cuya superficie se depositan las monocapas del material a estudiar, comprimiéndose cada una de ellas mediante una barrera móvil de poliacetal. Todas las operaciones de la balanza KSV están controladas mediante un ordenador que permite programar las condiciones de la experiencia (velocidad de compresión, presión superficial máxima a alcanzar, sentido del movimiento de las barreras, etc.), registrándose en la pantalla del mismo.

RESULTADOS

Componentes puros

La isoterma π - A correspondiente a la monocapa de AmB extendida sobre agua a 20 °C se muestra en la **Figura 1**. Esta isoterma presenta cuatro regiones claramente diferenciadas: una primera (E), que se extiende desde el comienzo de la curva hasta, aproximada-

mente, $170 \text{ \AA}^2/\text{molec.}$, en la que la presión superficial (π) aumenta ligeramente a medida que se comprime la monocapa, denotando que ésta se encuentra en un estado expandido, similar al “gaseoso”. La segunda región se caracteriza por un aumento continuo de la presión cuando se comprime la monocapa y corresponde a un estado de “líquido expandido” (LE), en el que el módulo de compresibilidad del filme ($C_s^{-1} = -A \delta\pi/\delta A$) es del orden de 20.5 mN/m , valor característico de este estado superficial. La tercera región (LE-LC) de la isoterma está caracterizada por la existencia de una meseta en la que la presión se mantiene prácticamente constante en un valor del orden de 10 mN/m . Se trata de una región de transición de la monocapa desde un estado de “líquido expandido” (LE) a otro de “líquido condensado” (LC). Por último, la isoterma presenta una región LC de elevada pendiente, que puede atribuirse a que en estas condiciones la monocapa se encuentra en un estado de “líquido condensado” ($C_s^{-1} = 75 \text{ mN/m}$), en el que las moléculas están cada vez más empaquetadas a medida que se comprime el filme, hasta que se produce su colapso, si bien en las condiciones bajo las cuales se obtuvo la isoterma de la **Figura 1** (moléculas depositadas: 4.25×10^{16} ; superficie inicial disponible: 850 cm^2 ; área inicial de la que dispone cada molécula: 200 \AA^2) no se llegó a alcanzar el mismo, debido a problemas de solubilidad de la monocapa cuando se somete a elevadas compresiones.

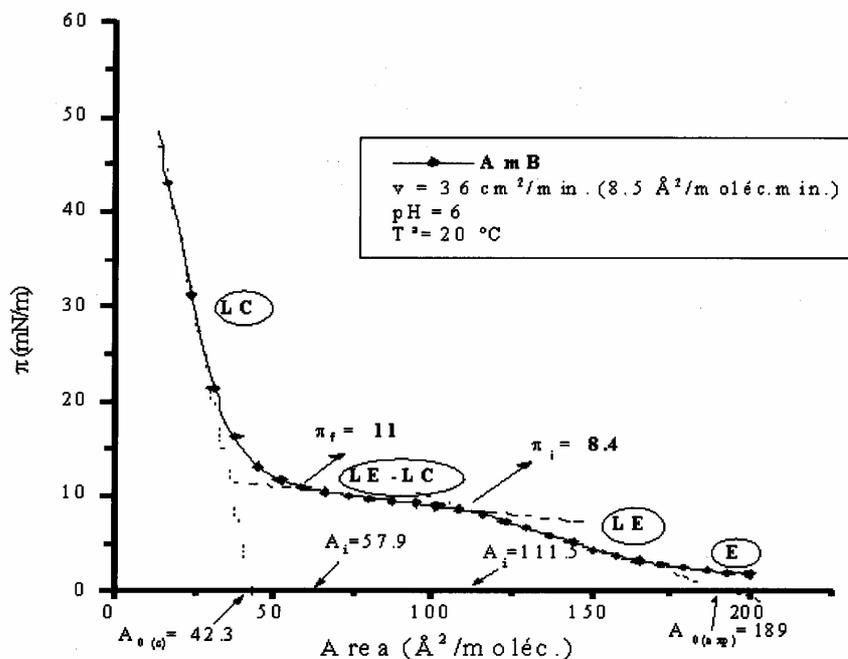


Figura 1.- Isotherma π -A de una monocapa de anfotericina B a 20°C.

El DPPS forma una monocapa condensada cuando se encuentra extendido sobre agua (pH = 6) (**Figura 2**), siendo su área extrapolada del orden de $56 \text{ \AA}^2/\text{moléc.}$, en tanto que la ocupada en su estado de máximo empaquetamiento, justo antes del colapso, es de $38.6 \text{ \AA}^2/\text{moléc.}$, valor similar al de $39 \text{ \AA}^2/\text{moléc.}$ obtenido por Van Deenen et al (26) para la DL-diestearoil fosfatidil serina extendida sobre tampón de fosfatos a pH = 7.4. El módulo de compresibilidad del filme es de 180 mN/m y su presión de colapso está próxima a 60 mN/m. A pH = 3, la isoterma obtenida es similar a la registrada a pH=6. Sin embargo, a pH = 10 la monocapa presenta mayores áreas específicas que a los demás valores de pH, siendo su área límite del orden de $80 \text{ \AA}^2/\text{moléc.}$ y su presión de colapso de 57 mN/m, valor

inferior al obtenido en los otros los sustratos.

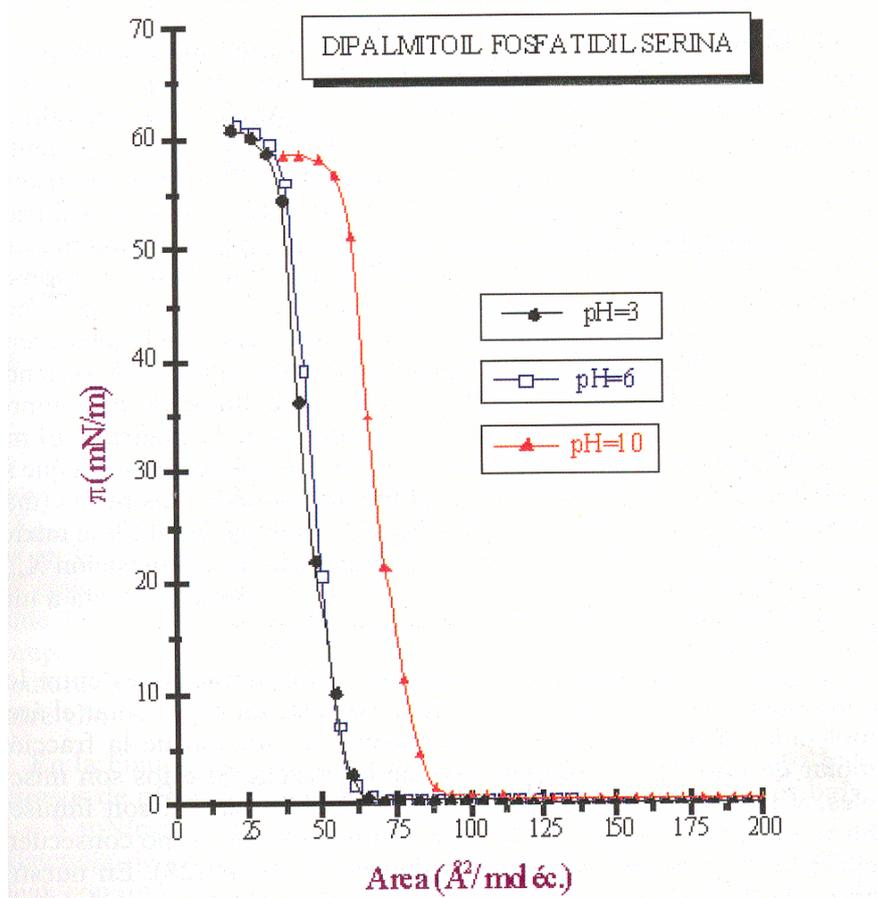


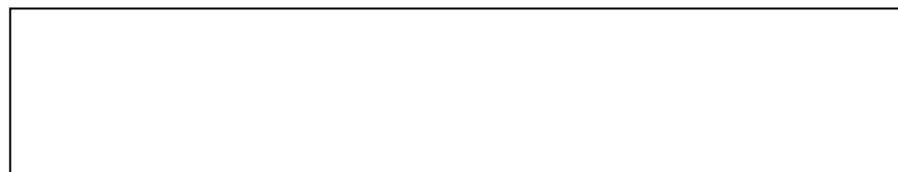
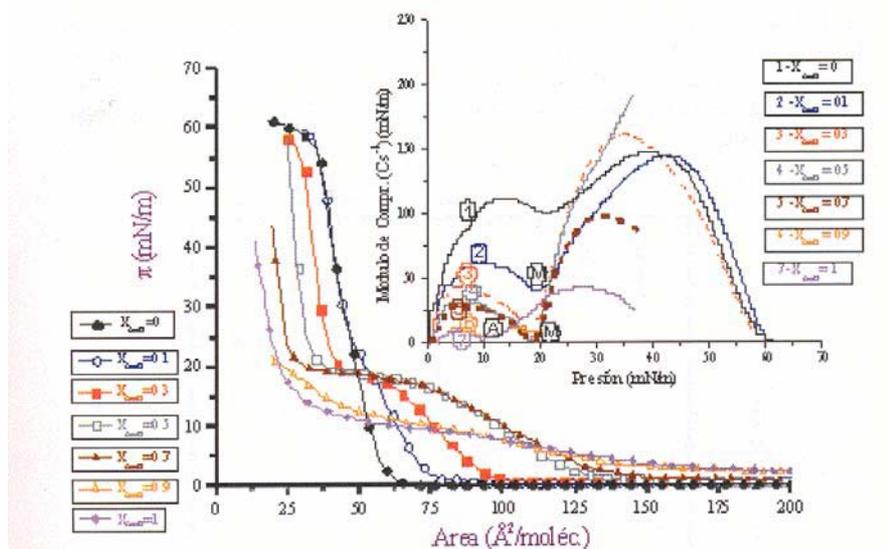
Figura 2.- Curvas π -A de monocapas de DPPS, extendidas sobre subfases de diferente pH.

Subfase acuosa de pH=3.

La adición de DPPS a la monocapa de AmB provoca, a bajas presiones superficiales, la condensación de su fase expandida y a

elevadas presiones, la expansión de su fase condensada (**Figura 3**). Los esteroides provocan un efecto similar sobre la AmB (9). Cadenhead y Phillips (27) también describen este mismo comportamiento.

El filme mixto de composición $X_{AmB} = 0.1$ presenta un comportamiento superficial similar al del fosfolípido puro, mientras que el de composición $X_{AmB} = 0.9$ se comporta como la AmB. Los demás filmes poseen un comportamiento intermedio entre el de los componentes puros. En todos ellos (excepto en el de $X_{AmB} = 0.9$), existe una transición de fases LE-LC a una presión en torno a 18-19 mN/m. Tal transición se manifiesta en las curvas π -A por la presencia de una meseta, cuya longitud va aumentando a medida que lo hace la proporción de AmB en la mezcla. Por otra parte, la pendiente de tal meseta es mayor en las curvas correspondientes a las monocapas de bajo contenido en AmB, tal como se evidencia al observar las curvas π -A, o viendo la “profundidad” del mínimo M en las curvas del módulo de compresibilidad (C_s^{-1}) que se presentan en el recuadro de la **Figura 3**. El mínimo **M** de cada curva corresponde a la transición de fases a la que se está aludiendo, observándose que el mismo es tanto más nítido (más “profundo”) cuanto mayor es el contenido de AmB en el filme mixto. En el caso de la AmB pura y en el de la mezcla de composición $X_{AmB} = 0.9$, el mínimo de C_s^{-1} (designado con la letra **A**) se presenta a una presión inferior (10 mN/m, aproximadamente).



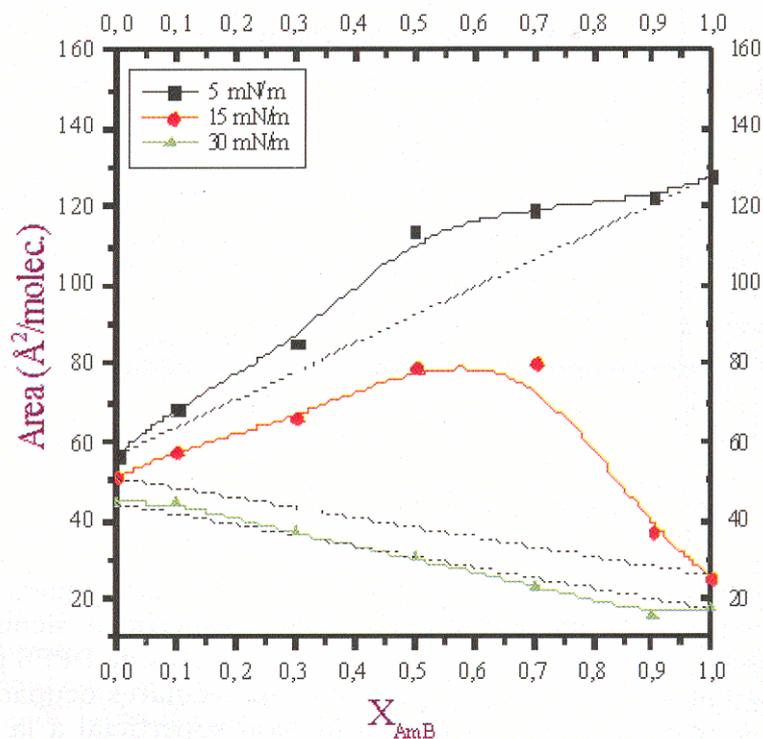
Una forma de demostrar la existencia de interacciones entre los componentes de una monocapa mixta consiste en representar el área molecular media ocupada por la misma en función de la fracción molar de uno de los componentes de la mezcla. Si estos son miscibles, y presentan un comportamiento ideal (o bien si son inmiscibles), tal representación da lugar a una línea recta, como consecuencia del cumplimiento de la aditividad de las áreas (28). En nuestro caso, de darse esta situación, se debería cumplir la ecuación:

$$A_m = X_{AmB} A_{AmB} + X_{DPPS} A_{DPPS}$$

en la que A_m representa el área molecular media ocupada por la monocapa mixta a una determinada presión superficial, siendo X_{AmB} y X_{DPPS} las respectivas fracciones molares de AmB y de DPPS presentes en la mezcla, y A_{AmB} y A_{DPPS} las áreas moleculares

ocupadas por los componentes puros a la misma presión superficial a la que se mide A_m . La existencia de desviaciones de la linealidad evidencia un comportamiento no ideal de los componentes, con atracciones moleculares entre los mismos (desviaciones negativas) o repulsiones entre ellos (desviaciones positivas).

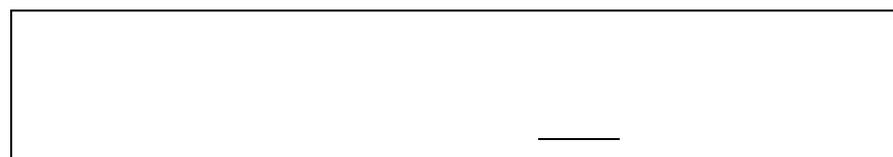
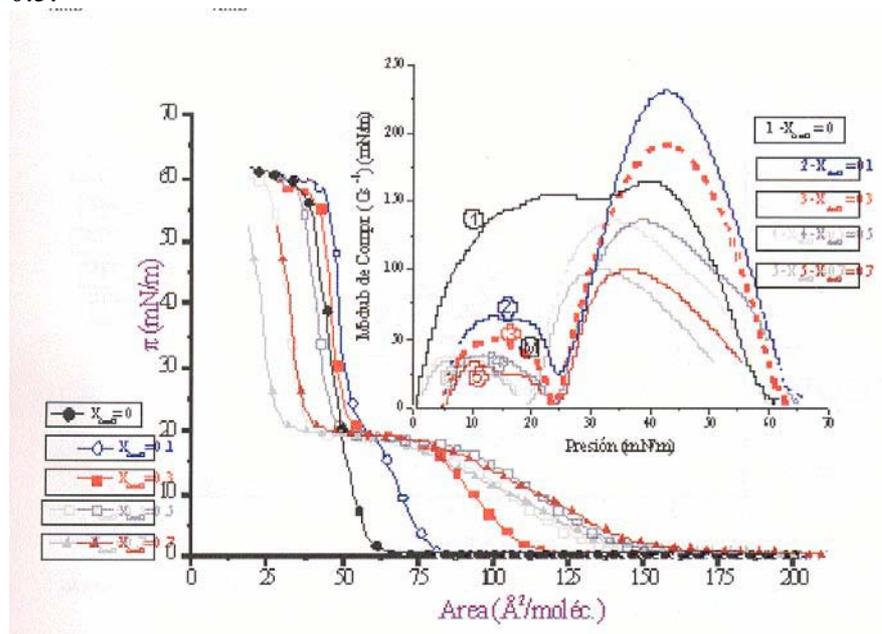
En la **Figura 4** se muestran estos resultados referidos a sustratos acuosos de $\text{pH} = 3$. En el caso de que A_m se mida a presiones bajas ($\pi = 5 \text{ mN/m}$), inferiores a la de transición de fases, se observa la existencia de pequeñas desviaciones positivas del comportamiento ideal, con un máximo cuando $X_{AmB} = 0.5$. Estas desviaciones son más acusadas cuando el área molecular se mide a la presión de 15 mN/m , valor al que la monocapa de AmB pura ha sobrepasado la región de transición de fases. En este caso, la máxima desviación se alcanza en las mezclas de X_{AMB} comprendida entre 0,5 y 0,7. Por último, a presiones elevadas (30 mN/m), cuando todos los filmes se encuentran en estado condensado, el comportamiento de los mismos es prácticamente ideal.



Subfase acuosa de pH=6.

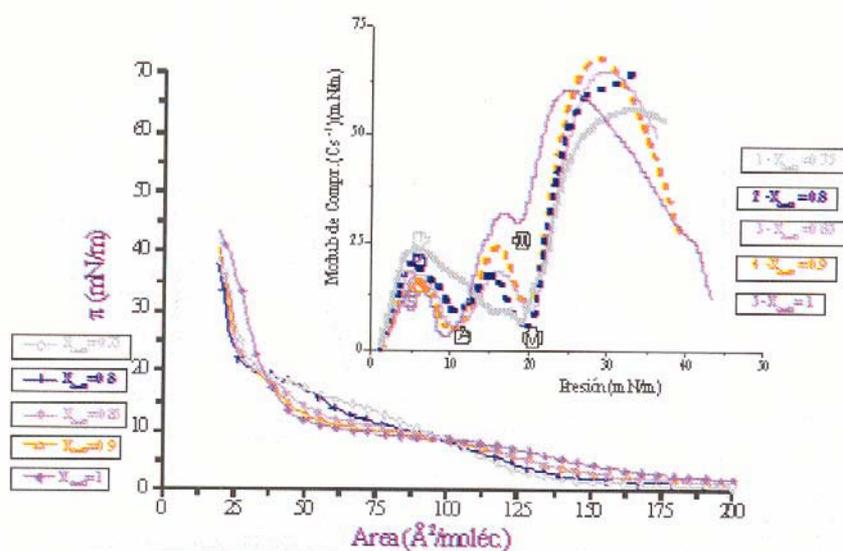
Las isothermas π -A obtenidas cuando se extienden las diferentes mezclas de AmB y DPPS sobre subfases acuosas de pH=6 se muestran en la **Figuras 5 y 6**. En la primera de ellas se observa, una vez más, que la adición de DPPS al filme de AmB provoca su condensación cuando se encuentra en el estado de “líquido expandido” y su expansión cuando se halla en la fase de “líquido condensado”. Por otra parte, todos los filmes mixtos presentan una transición de fases a $\pi \approx 19$ -20 mN/m, evidenciada por la presencia de una mese-

ta en las isothermas π -A y por la existencia de un mínimo M en las curvas $C_S^{-1} - \pi$ (recuadro de la **Figura 5**). Las isothermas π -A evidencian también que todas las monocapas colapsan a la misma presión que la del fosfolípido. Este hecho se observa de forma nítida en el intervalo de $X_{AmB} = 0.1$ a $X_{AmB} = 0.5$.



En los sistemas en los que X_{AmB} está comprendida entre 0.75 y 1 existen dos transiciones de fase (**Figura 6**): la primera, a valores decrecientes de presión a medida que aumenta la proporción de AmB en la mezcla, que se manifiesta por la presencia de una meseta en las curvas π -A a una presión de 10-11 mN/m, así como por la existencia de un mínimo, A, en la representación de C_S^{-1} frente a π (recuadro de la **Figura 6**), y la segunda, a mayores valores de π (del

orden de 20 mN/m), que también da origen a una meseta en las curvas π -A, de extensión muy pequeña, y a un mínimo, **M**, en las del módulo de compresibilidad. La longitud de la primera meseta, así como su horizontalidad (“profundidad” del mínimo **A**), aumenta con la proporción de AmB en la mezcla, mientras que estos mismos parámetros, relativos a la segunda meseta (o al mínimo **M**), se modifican muy poco con la composición de la mezcla.



Subfase acuosa de pH=10.

Las isothermas π -A correspondientes a las mezclas de AmB-DPPS de composición comprendida entre $X_{AmB} = 0.1$ y $X_{AmB} = 0.7$, extendidas sobre agua de pH=10, se muestran en la **Figura 7**. Los hechos más destacados son los mismos que se han descrito a los demás valores de pH: condensación del filme de AmB por adición de DPPS cuando aquél se encuentra en su estado de “líquido expan-

didó”, y expansión del mismo cuando se halla en su estado de “líquido condensado”; existencia de una meseta de presión constante a $\pi = 17-18$ mN/m, cuya longitud y horizontalidad aumentan al hacerlo la proporción de AmB en la mezcla, y colapso de todas las películas mixtas a la misma presión a la que lo hace el DPPS. Las curvas $C_s^{-1}-\pi$, mostradas en el recuadro de la **Figura 7**, confirman estos resultados y permiten definir con claridad la presión a la que tiene lugar la transición de fases, **M**, de las monocapas mixtas.

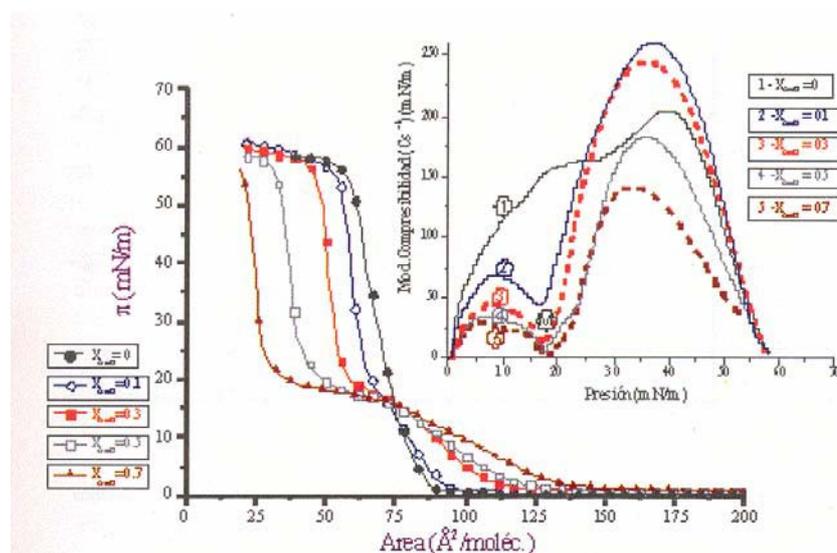
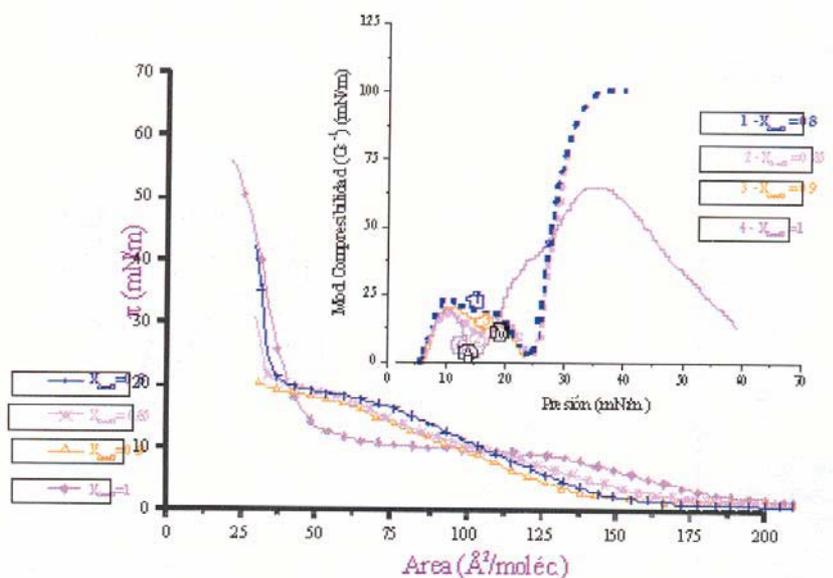


Figura 7.- Curvas π -A y C_s^{-1} - π de monocapas mixtas de AmB y DPPS, con bajo contenido en AmB ($X_{AmB} < 0.7$), depositadas sobre agua a pH=10.

La posterior adición de AmB al DPPS, para originar las mezclas de composición comprendida entre $X_{AmB} = 0.8$ y $X_{AmB} = 0.9$, da lugar a las curvas π -A que se representan en la **Figura 8**, en las que se evidencia que la longitud de la meseta antes aludida disminuye al hacerlo la fracción molar de AmB en la mezcla, sin que cambie de forma significativa la horizontalidad de la misma. Aparte de la transición de fases responsable de la existencia de esta meseta

en las curvas π -A, existe otra menos evidente cuando X_{AmB} es 0.9, la cual se presenta a una presión próxima a 12 mN/m. En el recuadro de la figura 8, esta transición se manifiesta por la presencia de un mínimo A en las curvas C_S^{-1} - π .



Las isothermas π -A correspondientes a las mezclas de AmB-DPPS presentan dos características comunes: la primera, es la existencia de una meseta de presión casi constante a 20 mN/m, aproximadamente, la cual debe atribuirse a la AmB existente en las mezclas, ya que este componente presenta una transición de fases de la misma naturaleza que la que da origen a la meseta en las curvas de compresión de las monocapas mixtas, si bien aquella se produce a una presión notablemente inferior (10 mN/m). Tal transición fue atribuida por Saint-Pierre-Chazalet *et al* (10) al cambio de orientación que experimentan las moléculas de AmB, desde una posición

horizontal cuando se hallan en el estado de “líquido expandido”, a otra vertical, cuando se encuentran en el de “líquido condensado”. A este mismo cambio de orientación debe atribuirse también la transición de fases observada en las monocapas mixtas, con la particularidad de que en estos casos la reorientación de las moléculas de AmB está dificultada por la presencia del fosfolípido, como consecuencia del establecimiento de interacciones entre ambos componentes, las cuales impiden que el polieno se reoriente a la presión de 10 mN/m, haciéndolo a una presión más elevada (≈ 20 mN/m).

La segunda característica de las monocapas mixtas de AmB y DPPS es que la longitud de la meseta de presión constante que aparece en las correspondientes isothermas π -A aumenta a medida que lo hace la proporción de AmB en la mezcla, pasando por un valor máximo cuando X_{AmB} es 0.7, para después disminuir. Puesto que una mayor longitud de la meseta implica una mayor dificultad para el cambio de orientación de las moléculas de AmB (como consecuencia de su interacción con el fosfolípido), se deduce que la máxima interacción entre los componentes del filme mixto tiene lugar cuando X_{AmB} es 0.7, es decir, cuando aquellos se hallan en la proporción de 2,33 a 1 (AmB/DPPS) o, redondeando, 2:1, en cuyo caso X_{AmB} es 0.66. Este valor es intermedio entre el de $X_{AmB} = 0.5$ y $X_{AmB} = 0.7$, para los cuales se presentan las mayores desviaciones del comportamiento ideal cuando se representan las áreas moleculares medias ocupadas por las monocapas mixtas en función de la composición de las mismas (**Figura 4**).

Así pues, la existencia de una máxima interacción en las mezclas de composición $X_{AmB} = 0.66$ permite postular que en estas condiciones los componentes se encuentran formando complejos estables, $C_{(h-v)}$, constituidos por dos moléculas de AmB, dispuestas horizontalmente, y una de fosfolípido, en posición vertical. En las mezclas de otras composiciones, estos complejos coexisten con el exceso de fosfolípido ($X_{AmB} < 0.66$) o con el de AmB ($X_{AmB} > 0.66$). En la bibliografía se han descrito complejos con la misma estequiometría para sistemas similares (9,10).

En las mezclas en las que los componentes se encuentran en proporción diferente a la requerida para que se cumpla la estequiometría del complejo, existirá un exceso de fosfolípido (cuando $X_{AmB} < 0.66$) o de AmB (si $X_{AmB} > 0.66$), de modo que en estos casos el componente en exceso puede formar un sistema homogéneo (miscible) con el complejo o, por el contrario, constituir un sistema heterogéneo o inmiscible. Con ayuda del diagrama de fases, y utilizando la regla de las fases de Crisp, $L = C - F + 1$ (29), se puede averiguar el número de fases superficiales de la monocapa mixta a medida que varía su composición. En efecto, la **Tabla I** muestra que cuando la proporción de AmB en el filme mixto excede a la del complejo ($X_{AmB} > 0.66$), las presiones correspondientes a la transición señalada con la letra **A** aumentan a medida que lo hace la proporción de fosfolípido en la mezcla. Puesto que estas presiones son próximas a la de transición de la AmB pura (10 mN/m), resulta lógico atribuir la transición de fases señalada con la letra **A** a la misma causa a la que se atribuye la de la AmB; es decir, al cambio de orientación de estas moléculas libres, en exceso, desde una posición horizontal a otra vertical. La aplicación de la regla de las fases a este sistema permite completar esta interpretación. Para nuestro caso, se tiene que: $C = 2$ (AmB y DPPS) y $L = 1$, ya que la presión de transición varía con la composición del sistema mixto. Por lo tanto, el número de fases en equilibrio, F , es 2, de modo que a presiones inferiores a las de la transición **A** ($\pi < \pi_A$), la monocapa mixta está formada por complejos $C_{(h-v)}$ mezclados con moléculas de AmB en exceso, las cuales están dispuestas horizontalmente en la interfase ($AmB_{(h)}$). En esta mezcla es posible que se establezca algún tipo de interacción entre la $AmB_{(h)}$ libre y el complejo $C_{(h-v)}$, que dificulta la reorientación de las moléculas del polieno, provocando que la misma se lleve a cabo a presiones más elevadas a medida que aumenta la proporción de complejo en el sistema. A presiones superiores a la de transición ($\pi > \pi_A$), la monocapa mixta se encuentra en otra fase superficial, distinta a la anterior, formada por complejos $C_{(h-v)}$ mezclados con moléculas de AmB que, en este caso, presentan una orientación vertical ($AmB_{(v)}$).

Por efecto de la compresión, las monocapas mixtas experimentan una segunda transición de fases, **M**, que se atribuye al cambio de orientación de las moléculas de AmB que forman parte del complejo $C_{(h-v)}$. En estas condiciones, el complejo se segrega en sus componentes, por lo que, aplicando de nuevo la regla de las fases a esta situación, se tiene que $L=0$, puesto que la presión de transición correspondiente a **M** prácticamente no varía con la composición del sistema (**Tabla I**). Por lo tanto, existen tres fases en equilibrio ($F=3$) durante la transición **M**. La primera de ellas es la descrita antes, a base de complejos $C_{(h-v)}$ mezclados con moléculas verticales de AmB en exceso ($AmB_{(v)}$). Las otras dos fases están constituidas por los componentes segregados del complejo, es decir, por moléculas de fosfolípido, inmiscibles con las de $AmB_{(v)}$, que constituyen otra fase separada. En definitiva, el cambio de orientación experimentado por las moléculas de AmB que forman parte del complejo, cuando la monocapa mixta se somete a presiones superficiales en torno a 20 mN/m, provoca la segregación del mismo en sus constituyentes, los cuales forman un sistema inmisible en el que también participa la $AmB_{(v)}$ en exceso existente en el sistema en las condiciones que se están considerando.

Fracción molar de AmB	Presión de transición (mN/m) pH=3		Presión de transición (mN/m) pH=6		Presión de transición (mN/m) pH=10	
	M	A	M	A	M	A
DPPS	-	-	-	-	-	-
0.1	18.9	-	19.4	-	16.8	-
0.3	18.7	-	19.3	-	17.2	-
0.5	18.8	-	18.9	-	17.6	-
0.7	18.8	-	19.4	-	18.0	-

0.75	-	-	18.9	-	-	-
0.8	-	-	19.5	11.0	18.9	-
0.85	-	-	19.9	10.5	19.3	-
0.9	17.7	10.3	19.5	9.9	18.3	11.7
AmB	-	9.7	-	9.9	-	9.9

Tabla I.- Valores de la presión de transición correspondientes a monocapas mixtas de AmB y DPPS a diferentes valores de pH.

Cuando la composición en AmB del filme mixto es inferior a la del complejo, es decir, si $X_{AmB} < 0.66$, existe un exceso de fosfolípido en contacto con el complejo, siendo factible averiguar si el sistema formado es miscible o no aplicando para ello, una vez más, la regla de las fases de Crisp. En efecto, los componentes, **C**, del sistema mixto siguen siendo **2** (AmB y DPPS) y el número de grados de libertad, **L**, continúa siendo cero (sistema invariante) (**Tabla I**). Por lo tanto, existen tres fases en equilibrio ($F=3$) a lo largo de la transición **M**, de modo que a presiones inferiores a la de transición, el sistema mixto está formado por una sola fase, constituida por una mezcla de complejos $C_{(h-v)}$ y de moléculas de fosfolípido en exceso, mientras que a presiones superiores, el sistema es inmisible, con dos fases superficiales, a base de los componentes segregados del complejo, junto con el fosfolípido en exceso. Apoya esta interpretación (inmiscibilidad de los componentes cuando se segregan del complejo) el hecho de que en los diagramas que representan el área molecular media en función de la composición de las monocapas (diagramas Am- X_{AmB}) (Figura 4), los valores obtenidos a $\pi = 30$ mN/m se sitúan a lo largo de la línea que corresponde a la aditividad de las áreas moleculares, lo cual, unido a la independencia de la presión de transición con la composición, es indicativo de la inmiscibilidad entre la AmB y el fosfolípido en estas circunstancias.

En definitiva, de todo lo anterior se concluye que en tanto no se alcance la presión correspondiente a la transición de fases **M** (≈ 20 mN/m), los componentes de la monocapa mixta (AmB y DPPS)

constituyen un sistema miscible, resultante de su interacción mutua, la cual da lugar a la formación de complejos de estequiometría 2:1 (AmB/DPPS) en la interfase. El origen de esta interacción debe encontrarse en la posibilidad de formación de enlaces de hidrógeno entre los grupos polares de ambos componentes y en las atracciones de tipo electrostático que se puedan establecer entre ellos. El predominio de uno u otro tipo de interacción depende del pH del sustrato, puesto que el estado de ionización de los componentes varía con el mismo, tal como se puede observar de forma esquemática en la **Figura 9**, que se ha configurado sobre la base de los valores de pK de la AmB (30) y del DPPS (31, 32). De la observación de los mismos, se deduce que a los tres valores de pH estudiados se pueden dar los dos tipos de interacción antes comentados, interviniendo, por una parte, los grupos carboxílicos y amino de la AmB y, por otra, estos mismos grupos (en adición del fosfato) del DPPS. Debe señalarse que estos grupos son los principales responsables de la interacción, puesto que en las condiciones en las que se establece la misma (región por debajo de 20 mN/m), el polieno se encuentra orientado horizontalmente en la interfase A/W, mientras que el DPPS está en posición vertical.

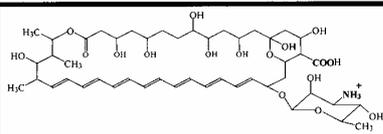
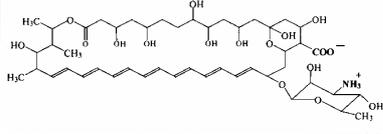
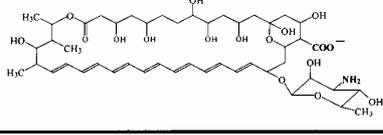
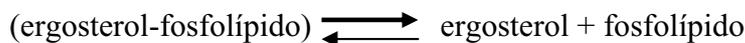
pH	AmB	DPPS
3		$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{NH}_3^+ \\ \diagdown \quad \\ \text{O}^- \quad \text{COOH} \end{array} +$
6		$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{NH}_3^+ \\ \diagdown \quad \\ \text{O}^- \quad \text{COO}^- \end{array} +$
10		$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{NH}_2 \\ \diagdown \quad \\ \text{O}^- \quad \text{COO}^- \end{array}$

Figura 9.- Estado de ionización de los grupos polares de la AmB y del DPPS, en función del pH de la subfase

Superada la presión de 20 mN/m, como consecuencia de la compresión del filme mixto, se produce el levantamiento de las moléculas de AmB que forman parte del complejo, rompiéndose los enlaces existentes entre los grupos polares de los componentes, dissociándose el complejo en sus constituyentes. En estas circunstancias, la posibilidad de que se establezcan interacciones entre los grupos polares de los mismos es muy limitada, debido a que el voluminoso grupo polar de la AmB se encuentra muy hundido en la subfase acuosa, alejado de la cabeza polar del fosfolípido. Por lo tanto, la mayor posibilidad de interacción entre los dos componentes del sistema es a través de sus cadenas apolares, pudiéndose establecer atracciones del tipo de Van der Waals entre las mismas. Ahora bien, la inmiscibilidad de los componentes observada tras la disociación del complejo descarta la importancia de estas atracciones.

La existencia de la interacción AmB/fosfolípido que se acaba de describir puede tener especial importancia a la hora de interpretar el mecanismo de acción de la AmB, así como su menor nocividad sobre el huésped cuando es administrado en forma de liposomas. A este respecto se propone que en la membrana celular se establecen tres tipos de interacciones, competitivas entre sí, a saber: esterol-fosfolípido; AmB-esterol y AmB-fosfolípido.

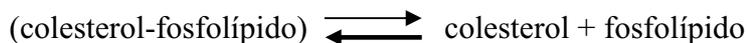
En el caso de la membrana del hongo (que contiene ergosterol), la interacción ergosterol-fosfolípido es muy lábil (33), por lo que el equilibrio:



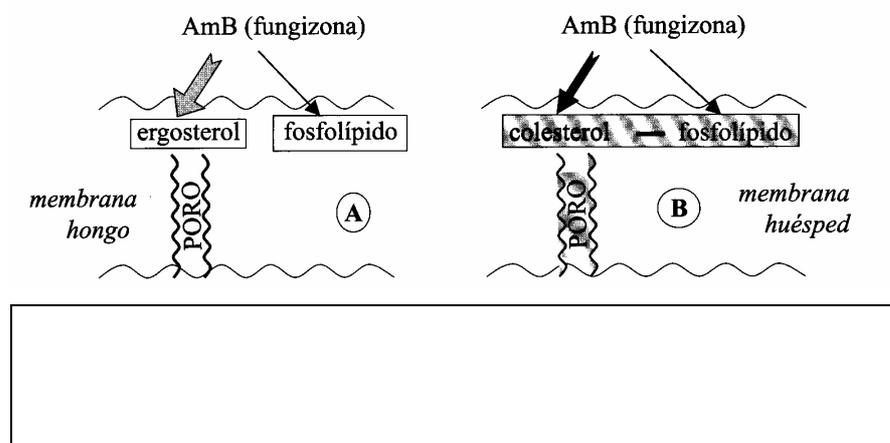
se encuentra desplazado hacia la derecha. En esta situación, cuando la AmB es administrada en forma de “fungizona” (AmB libre), interacciona con el ergosterol y con el fosfolípido libres, estableciéndose una competición entre estos lípidos por el medicamento. Puesto que la afinidad de la AmB por el ergosterol es muy fuerte (3, 34, 35) y mayor que la existente con el fosfolípido (36,37), se forman

poros en la membrana del hongo, que provocan la muerte del mismo (**Figura 10-A**).

Cuando se trata de las membranas celulares de los mamíferos (que contienen colesterol, en lugar de ergosterol), la interacción colesterol-fosfolípido es muy fuerte (38, 39), estando desplazado el equilibrio hacia el complejo:

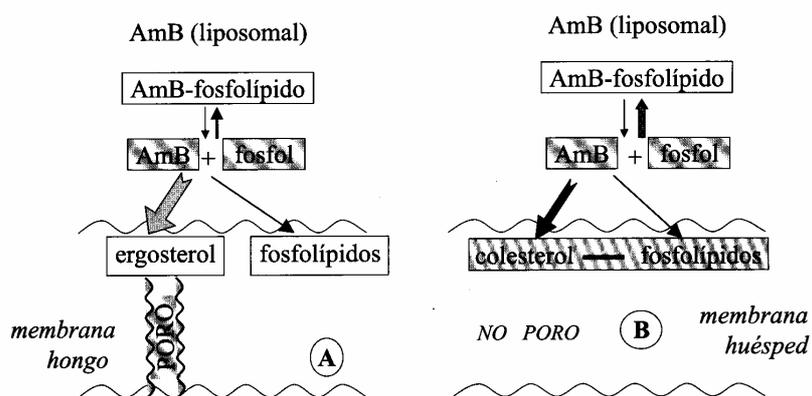


de modo que la cantidad de colesterol libre (y de fosfolípido) es pequeña, por lo que la interacción colest-AmB es poco importante, no sólo por este hecho, sino también por la pequeña afinidad existente entre ambos componentes (34,35) (**Figura 10-B**). En consecuencia, la formación de poros en la membrana del huésped no es tan apreciable como en la del hongo, pero aún así puede llegar a ser lo suficientemente importante como para provocar una toxicidad indeseable.



Cuando la AmB se administra en forma de liposomas, se establece en la cubierta de los mismos una interacción AmB-fosfolípido que reduce considerablemente la cantidad de AmB libre que llega a la membrana celular. Aún así, en el caso del hongo, la pequeña cantidad de AmB es suficiente para provocar una fuerte interacción con el ergosterol en exceso, ejerciendo de este modo su acción fungicida

(Figura 11-A). En el huésped, esta pequeña cantidad de AmB origina una insignificante formación de poros con el colesterol (también en pequeña proporción), por lo que la AmB liposomal se muestra inocua, sin efectos secundarios (Figura 11-B).



Agradecimientos.

Este trabajo está encuadrado dentro del Proyecto PGIDT99PXI20302B subvencionado por la Xunta de Galicia.

BIBLIOGRAFIA

- (1) MEDOFF, G.; BRAJTBURG, J.; KOBAYASHI, G.S. (1983) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 23: 30.
- (2) ANDREOLI, T. E. (1974) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 235: 469.
- (3) BOLARD, J. (1986) *Biochim. Biophys. Acta.* 864: 257-304.
- (4) KINSKY, S.C. (1970) *Ann. Rev. Prharmacol.* 10: 119.

- (5) LEGRAND, P.; ROMERO, E.A.; COHEN, B.E.; BOLARD, J. (1992) *Antimicrob. Agents Chemoter.* 36: 2518.
- (6) LAMBIN, H.E.; WOLF, B.D.; HARTSEL, S.C. (1993) *Biochim. Biophys. Acta.* 1152: 185.
- (7) WEETE, J.D. (1973) *Photochemistry.* 12: 1843.
- (8) HERVÉ, M.; DEBOUZY, J.C.; BOROWSKI, E.; CYBULSKA, B.; GARY-BOBO, C.M. (1989) *Biochim. Biophys. Acta.* 980: 261.
- (9) SEOANE, R.; MIÑONES, J.; CONDE, O.; CASAS, M.; IRIBARNEGARAY, E. (1998) *Biochim. Biophys. Acta.* 1375: 73.
- (10) SAINT-PIERRE-CHAZALET, M.; THOMAS, C.; DUPEYRAT, M.; GARY-BOBO, C.M. (1988) *Biochim. Biophys. Acta.* 944: 477.
- (11) BOLARD, J.; VERTUT-CROQUIN, A.; CYBULSKA, B.; GARY-BOBO, C.M. (1981) *Biochim. Biophys. Acta.* 647: 241.
- (12) FUJII, G.; CHANG, J.E.; COLEY, T.; STEERE, B. (1997) *Biochemistry.* 36: 4959.
- (13) KLEIMBERG, M.E.; FILKENSTEIN, A. (1984) *J. Membr. Biol.* 80: 257.
- (14) HSUCHEN, C.C.; FEINGOLD, D.S. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 51: 972.
- (15) COTERO, B.V.; REBOLLEDO-ANTÚNEZ, S.; ORTEGA-BLAKE, I. (1998) *Biochim. Biophys. Acta.* 1375: 43.
- (16) RUCKWARDT, T.; SCOTT, A.; SCOTT, J.; MIKULECKY, P.; HARTSEL, S.C. (1998) *Biochim. Biophys. Acta.* 1372: 283.
- (17) HOEPRICH, P.D. (1992) *J. Clin. Infect. Dis.* 14 (Suppl. 1): S114.
- (18) CARLSON, M.A.; CONDON, R.E. (1994) *J. Amer. Coll. Surg.* 179: 361.
- (19) CHAVANET, P.Y.; GARY, I.; CHARLIER, N.; CAILLOT, D.; KISTERMAN, J.P.; D'ATHISETAL, M. (1992) *J. Brit. Med.* 305: 921.
- (20) FIELDING, R.M.; SINGER, A.W.; WANG, L.H.; BABBAT, S.; GUO L.S.S. (1992) *Antimicrobial agents. Chemother.* 36: 299.
- (21) LÓPEZ-BERESTEIN, G.; MEHTA, R.; HOPFER, R.L.; MILLS, K.; KASI, L.; METHA, K.; FAINSTEIN, V.; LUNA, M.; HERSH, E.M.; JULIANO, R. (1983) *J. Infect. Dis.* 147: 939.

- (22) LÓPEZ-BERESTEIN, G. (1989) Liposomes in therapy of infectious diseases and cancer. López-Berestein, G.; Fidler, J.J. Eds: Alan R. Liss Inc. New York. p.317-327.
- (23) LÓPEZ-BERESTEIN, G.; FAINSTEIN, V.; HOPFER, R.; MEHTA, K.; SULLIVAN, M.P.; KEATING, M.; ROSEMBLUM, M.G.; MEHTA, R.; LUNA, M.; HERST, E.M.; REUBEN, J.; JULIANO, R.L.; BODEY, G.P. (1985) *J. Infect. Dis.* 151: 704.
- (24) SCULIER, J.P.; COUNE, A.; MEUNIER, F.; BRASSINNE, C.; LADURON, C.; HOLLAERT, C.; COLLETE, N.; HEYMAN, C.; KLASTERSKY, J. (1988) *Eur. J. Cancer. Clin. Oncol.* 24: 527.
- (25) JULIANO, R.L.; GRANT, C.W.M.; BARBER, K.R.; KALP, M.A (1987) *Molec. Pharmacol.* 31: 1.
- (26) VAN DEENEN, L.L.M.; HOUTSMULLER, U.M.T.; DE HAAS, G.H.; MULDER, E. (1962) *J. Pharmacy Pharmacol.* 14: 429.
- (27) CADENHEAD, D.A.; PHILLIPS, M.C. (1968) *Adv. Chem. Ser.* 8: 131.
- (28) GAINES, G. L. (1966) Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces. Prigogine, I. Ed: Interscience Publ. New York.
- (29) CRISP, D.J. (1949) Surface Chemistry (Suppl. Research). Butterworths. London. pp.17-35.
- (30) ETINGOV, E.D.; KHOLODOVA, G.V.; KUL'BAKH, V.O.; KARNATUSHKINA, A.I. (1972) *Antibiotiki.* (Russ.) 17: 301.
- (31) HAUSER, H.; DARKE, A.; PHILLIPS, M.C. (1976) *Eur. J. Biochem.* 62: 335.
- (32) SEIMIYA, T.; OHKI, S. (1972) *Nature New Biol.* 239: 26.
- (33) DEMEL, R.A.; BRUCKDORFER, K.R.; VAN DEENEN, L.L M. (1972) *Biochim. Biophys. Acta.* 255: 321.
- (34) KINSKY, S.C.; LUSE, S.A.; VAN DEENEN, L.L. (1996) *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 25: 1503.
- (35) BRUTYAN, R.A.; MCPHIE, P. (1996) *J. Gen. Physiol.* 107: 69.
- (36) SAKA, Y.; MITA, T. (1998) *J. Biochem.* 123: 789.
- (37) DEMEL, R.A.; VAN DEENEN, L.L.M.; KINSKY, S.C. (1965) *J. Biol. Chem.* 240: 2749.
- (38) PHILLIPS, M.C. (1972) Progress in Surface and Membrane Science. Danielli, J.F.; Rosenberg, M.D.; Candenhead, D.A. Ed: Academic Press. New York. 5. pp.139-221.

- (39) HUANG, C.; MASON, J.T. (1982) Molecules in the Bilayer. Ed: Martonosi. pp.15-23.