Centro de Investigación y de Estudios
Avanzados del Instituto Politécnico Nacional

UNIDAD MONTERREY

Propiedades Termo-Mecánicas de Membranas Lipídicas Artificiales

Tesis que presenta:

María Isabel Pérez Camacho

Para obtener el grado de:

Doctora en Ciencias

en Ingeniería y Física Biomédicas

Director de tesis:

Jesús Carlos Ruiz Suárez

Apodaca, Nuevo León, México Agosto de 2018

Resumen

Las bicapas lipídicas no sólo determinan la arquitectura de las membranas celulares. Fenómenos como el de la anestésia y la transmisión del impulso nervioso son algunos ejemplos de procesos que también dependen de las características electrostáticas, mecánicas y termodinámicas de las membranas. Propiedades como el espesor, el área, la capacidad calorífica, la permeabilidad, la compacidad, entre otras, se pueden ver afectadas por los cambios que ocurren en la membrana plasmática durante su transición de fase. Desde este contexto, en el presente trabajo se ha estudiado en membranas modelo el efecto que tiene la temperatura en las propiedades mecánicas de las bicapas lipídicas. Se diseñó y construyó una configuración experimental para ensamblar membranas lipídicas de longitud comparable a una neurona real (0.1 m). Se encontró que si la bicapa es calentada localmente cerca de su transición de fase, una perturbación termo-mecánica se propaga a largas distancias. Estos resultados apoyan la existencia de ondas solitarias, planteadas con el fin de explicar la propagación de señales isentrópicas ligadas al potencial de acción en las células neuronales. Además se estudió mediante microscopía de fuerza atómica las propiedades mecánicas de bicapas lipídicas soportadas bajo el efecto de la temperatura y la interacción con un anestésico general, como lo es la tetracaína. Se encontró que la fuerzas de adhesión y de ruptura de la membrana también se ven afectadas por la temperatura y que el anestésico produce un efecto similar al de la transición de fase. Los resultados de esta tesis muestran que el cambio de estado no sólo modifica las propiedades termodinámicas de las bicapas, también está involucrado en las propiedades mecánicas y en la propagación de perturbaciones posiblemente asociadas al potencial de acción.

Abstract

Lipid bilayers not only determine the architecture of cell membranes. Phenomena such as anesthesia and nerve pulse transmission are some examples of processes that also depend on the electrostatic, mechanical and thermodynamic properties of the membranes. The thickness, area, heat capacity, permeability, compactness, among others features, may be affected by changes that occur in the plasma membrane during the lipid melting transition. Considering all of this, the effect of temperature on the mechanical properties of lipid bilayers has been studied in model membranes. In this work, we designed and built an experimental setup to assemble long artificial lipid bilayers under water, comparable in length to a large real neuron (0.1 m). It was found that if the bilayer is heated locally near its phase transition, a thermo-mechanical disturbance propagates a long distance. These results support the existence of solitary waves, proposed in order to explain the propagation of isentropic signals linked to the potential for action in neuronal cells. In addition, the mechanical properties of supported lipid bilayers under the effect of temperature and interaction with a general anesthetic, such as tetracaine, were studied using atomic force microscopy. It was found that the adhesion force and yield threshold force of the membrane are also affected by temperature. Moreover, the anesthetic has a similar effect that the phase transition. The results of this thesis show that the change of state not only modifies the thermodynamic properties of the lipid bilayers, it is also involved in the mechanical properties and in the propagation of disturbances possibly associated with the action potential.

Agradecimientos

A mi esposo, por ser el mejor amigo, confidente y hombre que puedo tener a mi lado.

A mi familia por ser mi soporte durante toda mi vida.

Al personal administrativo y directivo de CINVESTAV-Monterrey por todo su esfuerzo para brindar las herramientas necesarias en esta investigación.

Al CONACYT por el soporte financiero durante el doctorado.

Al Dr. Jesús Carlos Ruiz por su asesoría y empeño en el desarrollo de este trabajo.

Al comité de sinodales por su tiempo y sus recomendaciones.

A mis amigos y compañeros.

Índice General

Resumen III

Abstract V

Agradecimientos VII

Índice General IX

Índice de Figuras XIII

Lista de Acrónimos XV

1. Introducción **1**

1.1. Termodinámica de Membranas 4

1.2. Impulso Nervioso 8

1.2.1. Modelo de Hodgkin y Huxley 9

1.2.2. Modelo del Solitón 13

1.3. Efecto de la Anestesia en bicapas lipídicas 17

2. Hipótesis **19**

3. Objetivos **21**

3.1. Objetivo General 21

3.2. Objetivos Específicos 21

4. Propagación de una Perturbación Termo-Mecánica en una Membrana Lipídica **23**

4.1. Materiales y Métodos 23
4.1.1. Reactivos 24
4.1.2. Técnicas 24
4.1.3. Diseño Experimental 25
4.2. Resultados 29
4.2.1. Mediciones de Capacitancia y Corriente 29
4.2.2. Perfiles Calorimétricos y Determinación de las Temperaturas de Transición 31
4.2.3. Medición de perturbaciones Mecánicas 33
4.3. Consideraciones Matemáticas 36

5. Estudio del Efecto de la Tetracaína en Bicapas Planas Soportadas de DMPC por Microscopía de Fuerza Atómica AFM 41
5.1. Materiales y Métodos 42
5.1.1. Reactivos 42
5.1.2. Técnicas 42
5.1.3. Diseño Experimental 45
5.2. Resultados 48
5.2.1. Formación de las SLBs 48
5.2.2. Determinación de las Temperaturas de Transición de los Liposomas y las SLBs 50
5.2.3. Propiedades Mecánicas de las SLBs 53
5.2.4. Difusión de TTC en SLBs de DMPC y su Efecto en las Propiedades Mecánicas 57
5.2.5. Efecto de la Temperatura en las propiedades mecánicas de las SLBs de DMPC 62

6. Conclusiones 67

7. Perspectivas 69

Bibliografía 71

A. Publicaciones y Colaboraciones **81**
*

Índice de Figuras

1.1. Esquema de un fosfolípido y sus configuraciones. 3
1.2. Fases de la membrana lipídica al aumentar la temperatura 4
1.3. Diagrama esquemático circuito modelo de Hokgkin y Huxley . . . 9
1.4. Perfiles termodinámicos para liposomas de DPPC 14
1.5. Solitones 16

4.1. Diseño instrumental 26
4.2. Respuesta eléctrica del sistema durante el pintado de la bicapa a T=25 °C 30
4.3. Análisis calorimétrico para liposomas de DMPC y DPPC 32
4.4. Temperatura en el sistema de calentamiento 33
4.5. Trazo de voltaje registrado por el fotodetector 34
4.6. Voltaje en función de la temperatura 35
4.7. Velocidad lateral del sonido a bajas frecuencias como una función de la densidad de área de la membrana. 37
4.8. Perfiles de solitones negativos. 38

5.1. Preparación de una SLBs 43
5.2. AFM 44
5.3. Diseño instrumental AFM 46
5.4. Formación de la SLBs 49
5.5. Análisis calorimétrico para SUVs de DMPC en presencia de TTC 51
5.6. Cambio del espesor de depósitos de DMPC con respecto a la temperatura 52

5.7. Imágenes de AFM de la transición de fase de una SLB de DMPC 54
5.8. Fuerza de ruptura y fuerza de adhesión SLBs de DMPC 56
5.9. Difusión de TTC en SLBs de DMPC 58
5.10. Fuerza de ruptura y fuerza de adhesión SLBs de DMPC+TTC . . 61
5.11. Efecto de la temperatura en la fuerza de ruptura de SLBs de DMPC con y sin TTC 63
5.12. Efecto de la temperatura en la fuerza de adhesión de SLBs de DMPC con y sin TTC 65

Lista de Acrónimos

AFM	Microscopía de fuerza atómica
BLM	Black Lipid Membrane
c	Velocidad del sonido
C_p	Capacidad calorífica
DMPC	1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DPPC	1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
k_T^V	Compresibilidad volumetrica isotérmica
k_T^A	Compresibilidad de área isotérmica
k_S^A	Compresibilidad de área adiabática
L_β	Estado cristalino
L_0	Fase líquida ordenada
LUV	Vesícula unilaminar grande
NaCl	Cloruro de sodio
ρ^A	Densidad lateral
ρ_{liq}^A	Densidad lateral en fase fluida
ρ_{gel}^A	Densidad lateral en fase gel
L_α	Fase líquida desordenada
$P_{\beta'}$	Fase rizada

SLB Bicapa lipídica soportada

SUV Vesículas unilaminar pequeña

T_m Temperatura de transición

TTC Tetracaína

Capítulo 1

Introducción

Las membranas lipídicas son una parte importante de los sistemas biológicos y el estudio de sus propiedades físicas y químicas es indispensable para comprender el papel que desempeñan. Su rol más importante es ser una barrera selectiva entre el interior y el exterior de la célula y los primeros reportes de su existencia datan de la segunda mitad del siglo XIX. En 1877 se publicó el primer estudio acerca de la presión osmótica dentro de las células, el cual llevó a formular la idea de que los medios intra y extracelular se encuentran separados por una estructura, denominada membrana plasmática, que les permite tener composiciones diferentes [1]. En 1895 Charles E. Overton descubrió que las sustancias liposolubles penetran en las células con mayor facilidad, y que existe una dependencia entre la permeabilidad de las moléculas y el coeficiente de partición del agua y el aceite. Estos descubrimientos llevaron a que dedujera la existencia de una membrana formada por lípidos [2]. El primer registro de la inclusión de las proteínas en el modelo de la membrana celular se conoce como el modelo de Danielli y Davson [3]. Ellos consideraron una bicapa lipídica rodeada por monocapas de proteínas globulares que poseen un interior hidrofóbico y una capa exterior con contenido de agua (esta característica sería la que les permite estar unidas a la superficie de la bicapa). Más adelante y gracias al desarrollo de técnicas como la microscopia electrónica y la cristalografía de rayos X, Singer y Nicolson concluyeron que las proteínas debían ubicarse a través de la membrana, de ahí que se planteara el modelo actual que describe la organización estructural de la membrana plasmática y se conoce como

el modelo de mosaico fluido [4]. En dicho modelo la membrana es una estructura formada por lípidos y proteínas de dos tipos: por un lado, las proteínas periféricas que están unidas a la superficie de la membrana que pueden ser separadas fácilmente, y por otra parte las proteínas integrales que forman la mayor fracción de las proteínas de membrana, se encuentran embebidas en la bicapa y poseen libertad de difusión lateral. Aunque el modelo de Singer y Nicolson mostraba a detalle la estructura conformacional de la membrana, este requirió algunos refinamientos para explicar la formación de dominios de proteínas y la presencia de otras moléculas como el colesterol, los carbohidratos y los glicolípidos, además actualmente se sabe que la composición de la membrana puede variar según el tipo de célula y responde a cambios de temperatura, presión, pH, y concentración del solvente.

El conocimiento de los componentes de la membrana ha permitido estudiar sus propiedades en modelos más simples. El carácter anfipático de los lípidos les confiere la capacidad de ordenarse en forma de bicapas, orientando las cabezas polares hacia el agua, en tanto que los tallos hidrofóbicos se alinean hacia el interior de la membrana. La clase más abundante de lípidos son los fosfolípidos, compuestos por una molécula de glicerol, a la cual se esterifican dos ácidos grasos, y un grupo fosfato, a su vez unido un grupo hidrófilo, ver figura 1.1a. La longitud de la cadena acídica puede variar en el rango de 12 a 20 carbonos, siendo los valores típicos 16 o 18 [5]. Los enlaces entre los átomos de carbono (C-C) de las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos pueden rotar tomando valores de 60, 180 y 300 grados, donde la configuración all-trans (180 grados) es la que se adopta a bajas temperaturas por poseer una entropía mínima, ver figura 1.1b. A altas temperaturas, los estados desordenados 60° (g^+) y 300° (g^-) son igualmente probables, esto desemboca en un aumento en la entropía y una pérdida en la organización cristalina, debido al estado desordenado en las cadenas de los lípidos [6].

El cambio en la estructura de los lípidos y su configuración lateral hacen posible una transición de fase, que ocurre a una temperatura conocida como temperatura de transición (T_m). Dicha temperatura depende de las características moleculares de cada lípido, como lo son la longitud de las cadenas, el número de insaturaciones

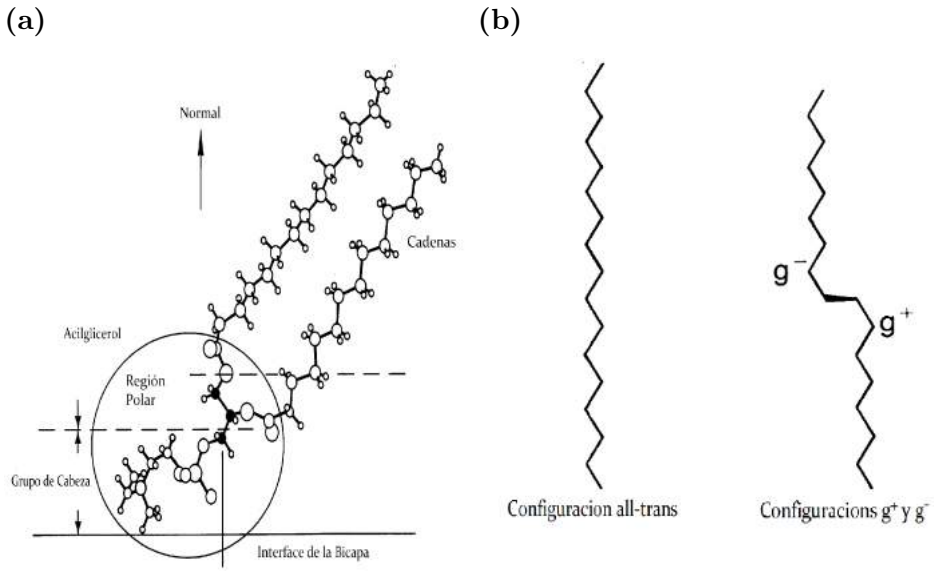

Figura 1.1: Esquema de un fosfolípido y sus configuraciones. a) Esquema de una molécula de fosfatidilcolina mostrando la estructura del fosfolípido y sus principales regiones. Figura adaptada de [6]. b) Ilustración de las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos para la configuración $All - trans$ y g^+, g^-. Figura adaptada de [6].

de las mismas, el tamaño, la carga, etc. y se define como la temperatura a la cual es igualmente probable encontrar cualquiera de los dos estados. A mayor número de carbonos en la cadena, mayor es la temperatura a la que ocurre la transición de fase, pero si existen dobles enlaces en la cadena hidrocarbonada, T_m se desplaza drásticamente a temperaturas bajas. En la literatura han sido reportadas cuatro fases diferentes de los lípidos:

- L_β: Estado cristalino, donde los lípidos están ordenados en una red triangular con las cadenas inclinadas y ordenadas en la configuración all-trans. Se denomina también como fase sólida o fase gel. Se ve favorecida a bajas temperaturas. Ver figura 1.2.

- L_o: Fase líquida ordenada que se observa en membranas que contienen esteroles. Se caracteriza por estar todas las cadenas de los lípidos ordenadas, mientras que el orden lateral de los lípidos es aleatorio.

- L_α: Se presenta a altas temperaturas con una alta entropía. Conocida como la fase líquida desordenada o fase fluida, las cadenas lipídicas se encuentran desordenadas y los lípidos se mueven libremente dentro de la bicapa como un líquido de dos dimensiones. Ver figura 1.2.

- $P_{\beta\prime}$: En esta fase el sistema es parcialmente sólido y parcialmente fluido, posee una súper estructura periódica con una longitud de escala de 100 a 300 $\mathring{A}$. Ver figura 1.2.

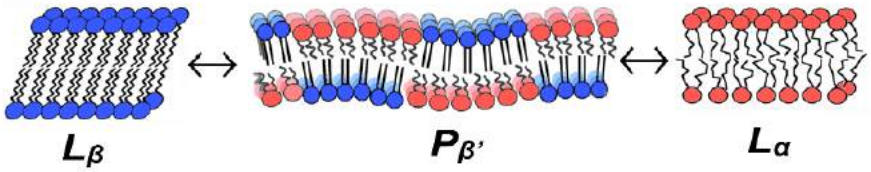

Figura 1.2: Fases de la membrana lipídica al aumentar la temperatura. Figura esquemática de como la membrana puede cambiar de estado, de forma reversible ante un cambio de temperatura. La figura muestra las fase gel, L_β, la fase fluida, L_α, y la fase $P_{\beta\prime}$. Adaptado de [7]

1.1. Termodinámica de Membranas

El estudio de las características químicas y físicas de los compuestos biológicos de las membranas son la base para su comprensión. Desde un enfoque termodinámico, la energía interna de la membrana está dada por:

$$dU = dQ + dW, \tag{1.1}$$

en donde dQ es el cambio en la energía del sistema debido al calor y dW es la energía producto del trabajo realizado por o sobre el sistema. Considerando que el trabajo en la membrana plasmática es una consecuencia del trabajo debido a un cambio en el volumen (PdV), a un cambio en el área (πdA), a un cambio en la longitud (fdl), el trabajo dado por un potencial electrostático (Ψdq) y el

trabajo debido al contenido de moléculas, potencial químico ($\sum_i \mu_i dn_i$), entonces la expresión para el trabajo queda descrita:

$$dW = -PdV - \pi dA - fdl - \Psi dq + \sum_i \mu_i dn_i. \tag{1.2}$$

De la segunda ley de la termodinámica, la entropía es la función de estado que relaciona los cambios en el calor con la temperatura:

$$dQ = TdS, \tag{1.3}$$

entonces la energía interna de la membrana:

$$dU = TdS - PdV - \pi dA - fdl - \Psi dq + \sum_i \mu_i dn_i. \tag{1.4}$$

Para conocer el estado termodinámico de un sistema es necesario conocer la energía del mismo, y esto requiere de la medición de al menos una variable asociada a ésta. Dos variable termodinámicas relativamente fáciles de medir son la capacidad calorífica y la compresibilidad. Estas funciones pueden ser usadas para determinar los cambios en la entalpía y en la entropía del sistema. La capacidad calorífica, es por definición, la energía necesaria para elevar la temperatura de una sustancia 1 °C.

$$C_p = \left(\frac{dQ}{dT}\right)_p, \tag{1.5}$$

donde $dH = dQ + VdP$, a presión constante:

$$C_p = \left(\frac{dH}{dT}\right)_p, \tag{1.6}$$

y de la ecuación 1.3:

$$C_p = T\left(\frac{dS}{dT}\right)_p. \tag{1.7}$$

Integrando con respecto a la temperatura, se pueden determinar los cambios en la entalpía, ΔH, y en la entropía, ΔS, en términos de C_p.

$$\Delta H = \int_{T_0}^{T_1} C_p dT, \tag{1.8}$$

$$\Delta S = \int_{T_0}^{T_1} \frac{C_p}{T} dT. \tag{1.9}$$

Conociendo ΔH y ΔS, se tiene la información de toda la energía involucrada en el sistema. Durante la transición de fase de las membranas, una gran cantidad de entalpía es absorbida durante un intervalo de temperatura muy corto. Estas transiciones se describen por su T_m, y los cambios que ocurren durante este proceso son de gran interés al estar posiblemente vinculados con la actividad biológica de la membrana. La capacidad calorífica describe la cantidad de calor que una muestra absorbe con el aumento de la temperatura a presión constante. De forma análoga, la compresibilidad volumétrica isotérmica describe el cambio en el volumen específico como respuesta a un pequeño cambio en la presión a temperatura constante y está asociada con la propagación de ondas mecánicas de presión.

$$k_T^V = \frac{< V^2 > - < V >^2}{< V > RT}, \tag{1.10}$$

Esto significa que k_T^V está relacionada con las fluctuaciones del volumen. Del mismo modo, la compresibilidad de área está dada por:

$$k_T^A = \frac{< A^2 > - < A >^2}{< A > RT}. \tag{1.11}$$

La relación entre la compresibilidad y la capacidad calorífica pueden explicar una serie de fenómenos interesantes en las membranas cerca a la transición de fase, por ejemplo, la formación de fases de ondulación. En la transición de fase de los lípidos, la capacidad calorífica es proporcional a la compresibilidad mediante:

$$k_T^A(T) = k_{T,0}^A(T) + \Delta k_T^A(T) = k_{T,0}^A(T) + \frac{\gamma_A^2}{A}\Delta C_p(T). \tag{1.12}$$

Donde γ_A=0.89 m^2/J se ha determinado experimentalmente [8]. Se evidencia que la compresibilidad de área alcanza un valor extremo a la temperatura a la cual la capacidad calorífica es máxima. La compresibilidad adiabática puede ser determinada cuando la compresibilidad isotérmica es conocida:

$$k_S^A = k_T^A - \frac{T}{AC_p}\left(\frac{dA}{dT}\right)_p^2. \tag{1.13}$$

Si la membrana sufre una transición de fase, la densidad lateral de la membrana, ρ^A, decrece, en tanto que el área específica, A, aumenta. Ha sido demostrado que el cambio en el área de la membrana es proporcional al cambio en la entalpía, $\Delta A \sim \Delta H$ [8]. Entonces, si la capacidad calorífica es definida por $C_p = (dH/dT)_P$, y la velocidad del sonido a lo largo del plano de la membrana es una función de la compresibilidad adiabática:

$$c = \sqrt[2]{\frac{1}{k_S^A \rho^A}}. \tag{1.14}$$

En el régimen de bajas frecuencias la compresibilidad adiabática es proporcional a la compresibilidad isotérmica, $k_S \approx k_T$, entonces la velocidad de una onda mecánica que viaja a lo largo de la membrana está dada por:

$$c = \sqrt[2]{\frac{1}{k_T^A \rho^A}}. \tag{1.15}$$

La compresibilidad adiabática de la membrana es una función no lineal de la densidad de área, entonces la velocidad del sonido es una función no lineal de la densidad en el régimen de la transición de fase de los lípidos y puede ser expandida en:

$$c^2 = \frac{1}{k_T^A \rho^A} = c_0 + p\Delta\rho^A + q(\Delta\rho^A)^2 + \dots \tag{1.16}$$

Donde c_0 es la velocidad del sonido en la fase fluida de la membrana y los parámetros p y q describen la dependencia de la velocidad del sonido de la densidad cerca de la transición de fase y son calculados experimentalmente.
Para una membrana unilaminar de DPPC con una temperatura de transición $T_m = 314{,}2K$, $p = -16{,}6\ c_0^2/\rho_0^A$, $q = 79{,}5\ c_0^2/(\rho_0^A)^2$ [9], $\Delta H = 35kJ/mol$, $\Delta S = 111{,}4J/mol.K$, $\Delta V/V = 0{,}04$, y $\Delta A/A = 0{,}264$ [10, 11]. Donde $\Delta V/V$ y $\Delta A/A$ corresponden al cambio en el volumen y el área de la membrana respectivamente.

1.2. Impulso Nervioso

La rapidez con la cual el cuerpo se encarga de recibir, procesar y dar respuesta a diferentes señales es consecuencia del trabajo realizado por una estructura biológica denominada sistema nervioso, cuya unidad básica son las neuronas. Se estima que el cerebro humano cuenta con un asombroso número de cien mil millones de neuronas y su función es la de coordinar las acciones por medio de señales químicas y eléctricas que viajan de un extremo a otro del organismo a través de los nervios. La transmisión del impulso nervioso, denominado comúnmente como potencial de acción, ha sido foco de estudio en el transcurso del último siglo. Se ha descrito como una señal eléctrica que viaja a lo largo de la membrana celular modificando la distribución de carga de la misma. La descripción mayormente aceptada de este fenómeno es el modelo formulado por Hodgkin-Huxley en 1952, el cual explica la propagación del impulso nervioso mediada por las propiedades eléctricas de la membrana [12]. El modelo se basa en la descripción de un pulso

de voltaje, generado por las corrientes asociadas a la capacitancia de la membrana y al flujo de iones entre el interior y el exterior de la célula. Esto hace que el modelo al ser de naturaleza eléctrica sea un evento disipativo, que además no tiene en consideración ninguna variable termodinámica o mecánica. Sin embargo, estudios recientes han mostrado que más allá de ser un fenómeno puramente eléctrico, el proceso de transmisión de información involucra variables como la temperatura, la capacidad calorífica, la compresibilidad y la transición de fase de los lípidos de membrana, lo cual permite describir este fenómeno en términos de la termodinámica.

1.2.1. Modelo de Hodgkin y Huxley

En 1952 Alan Lloyd Hodgkin y Andrew Huxley publicaron un artículo en el cual se propuso un modelo matemático para describir los mecanismos iónicos del impulso nervioso o potencial de acción. Dicho trabajo se soporta en el comportamiento eléctrico, representado por la capacitancia de la membrana y por las conductancias asociadas al flujo de iones que se modelan como resistencias en paralelo con el capacitor. En el modelo de Hodgkin y Huxley se propuso que la permeabilidad de la membrana al sodio y potasio puede ser selectiva y dependiente del tiempo y el voltaje [12].

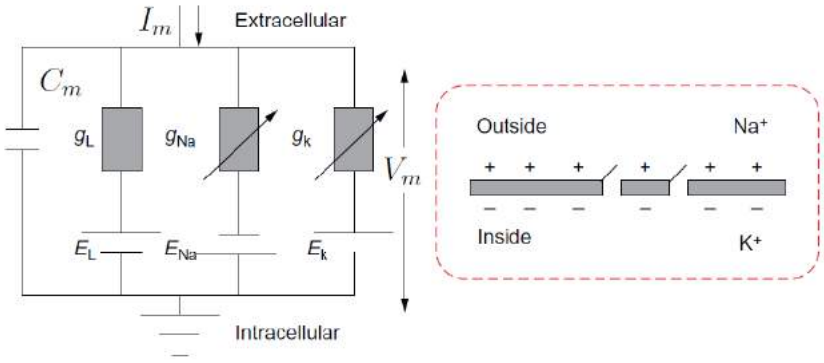

Figura 1.3: Diagrama esquemático para el circuito del modelo de Hodgkin y Huxley. En él se muestra la membrana modelada como un circuito eléctrico con su respectivas capacitancia y conductancias asociadas a los iones. Adaptado de [13]

La membrana celular es una barrera aislante que separa el líquido intracelular del exterior y la cual puede considerarse como un capacitor con un valor de capacitancia constante C_m. En el modelo, las resistencias se describen en término de sus conductancias g_i. Ante un cambio de voltaje, V_m, dos corrientes pueden ser observadas, la corriente capacitiva que carga el capacitor y la corriente iónica. Ver figura 1.3. La corriente total en la membrana, I_m, es la suma de las dos corrientes:

$$I_m(t) = C_m \frac{dV_m}{dt} + g_{Na}(V_m - E_N a) + g_k(V_m - E_K) + g_L(V_m - E_L). \tag{1.17}$$

El término final de la ecuación tiene en cuenta las corrientes de fuga y pueden ser omitidas al ser muy pequeñas en comparación a las corrientes asociadas a los iones sodio y potasio. E_{Na} y E_K corresponden a los potenciales de Nernst, como consecuencia del flujo de corriente en ausencia de un voltaje externo y requiere de las concentraciones intra y extracelular de los diferentes iones c_{in} y c_{out}:

$$E_i = \frac{RT}{zF} ln \frac{c_{out}}{c_{in}}, \tag{1.18}$$

donde z es la valencia del ion con su respectiva carga y F es la constante de Faraday. Si el voltaje externo es igual al potencial de Nernst para un ion en específico, no existe flujo neto de corriente para dicho ion. Las conductancias son función del tiempo y el voltaje:

$$\begin{aligned} g_{Na} &= g_{Na,0} m^3 h, \\ g_K &= g_{K,0} n^4, \end{aligned} \tag{1.19}$$

donde m, h y n pueden tener valores entre 0 y 1 y representa la proporción de

partículas en cierta posición. La descripción de las conductancias entonces es:

$$\begin{aligned} \frac{dm}{dt} &= \alpha_m(V_m)(1-m) - \beta_m(V_m)m, \\ \frac{dn}{dt} &= \alpha_n(V_m)(1-n) - \beta_n(V_m)n, \\ \frac{dh}{dt} &= \alpha_h(V_m)(1-h) - \beta_h(V_m)h. \end{aligned} \tag{1.20}$$

Las funciones $\alpha_m(V_m)$, $\alpha_n(V_m)$ y $\alpha_h(V_m)$, $\beta_m(V_m)$, $\beta_n(V_m)$ y$\beta_h(V_m)$ son constantes dependientes del voltaje obtenidas de forma experimental. La propagación del potencial de acción puede ser calculado usando la ecuación 1.17 y la ley de Kirchhoff para un cable cilíndrico a lo largo del eje x:

$$\frac{\partial^2 V_m}{\partial x^2} = \frac{2R_i}{a} I_m, \tag{1.21}$$

donde R_i es la resistencia especifica del medio intracelular, y a es el radio del cable. Entonces:

$$\frac{\partial^2 V_m}{\partial x^2} = \frac{2r_i}{a}(C_m \frac{dV_m}{dt} + g_{Na}(V_m - E_N a) + g_k(V_m - E_K)). \tag{1.22}$$

Finalmente, se asume que el pulso se propaga a una velocidad constante θ independiente del voltaje:

$$\frac{\partial V_m}{\partial t^2} = \theta^2 \frac{\partial^2 V_m}{\partial x^2}. \tag{1.23}$$

Combinando 1.22 y 1.23:

$$\frac{a}{2R_i\theta^2}\frac{\partial^2 V_m}{\partial t^2} = C_m \frac{dV_m}{dt} + g_N a(V_m - E_N a) + g_k(V_m - E_K). \tag{1.24}$$

La solución de esta ecuación diferencial parcial da como resultado el potencial de acción.

Evidencias posteriores a la formulación del modelo de Hodgkin y Huxley mostraron tanto matemática como experimentalmente que la propagación del impulso nervioso es un fenómeno electromecánico de carácter isentrópico, es decir, el impulso nervioso además de consistir en la propagación de un cambio de potencial eléctrico, consta también de una onda de presión que se transmite sin producir variación en la entropía del sistema. Fue a partir de 1980 cuando se comenzó a mostrar el cambio en el desplazamiento y la fuerza mecánica asociados al potencial de acción [14–16]. Se evidenció finalmente que el potencial de acción más allá de ser un evento netamente eléctrico, requería una explicación en términos de variables mecánicas y térmicas. En 1989, Konrad Kaufmann sugirió la relación existente entre la propagación del pulso mecánico en los nervios y la influencia de las variables termodinámicas que determinan el estado de la membrana. Además abordó el tema a partir de la contribución que los lípidos de membrana pueden tener en respuesta a perturbaciones locales y cómo el comportamiento electromecánico del potencial de acción es una propiedad de los mismos [17, 18]. Otras características como la naturaleza adiabática del potencial de acción también han sido abordadas [16, 19–22]. Procesos como variaciones en el área, el grosor y la presión lateral de la membrana, así como su relación con la termodinámica dan pie a entender este fenómeno desde un punto de vista más integral. Ante estas nuevas evidencias y la necesidad de explicar el impulso nervioso en términos no sólo de la propagación de un potencial eléctrico, en el año 2005 Thomas Heimburg y Andrew D. Jackson desarrollaron un nuevo modelo denominado *Modelo del Solitón* el cual explica por medio de variables termodinámicas la propagación de una onda sonora o un pulso de presión a lo largo de la membrana de una célula nerviosa [10]. El modelo del solitón propone una teoría en la cual la propagación del impulso nervioso es un onda solitaria electromecánica reversible, basada en las propiedades termodinámicas de la membrana y en la característica transición de fase de los lípidos que la conforman. Se sabe que una gran variedad de sistemas biológicos muestran perturbaciones mecánicas espontaneas asociadas con eventos

electricos [16] y transiciones de fase cerca de la temperatura corporal [7,8,10].

1.2.2. Modelo del Solitón

Los lípidos exhiben transiciones de fase reversibles del estado gel ordenado al estado liquido desordenado. Cada una de estas fases están asociadas con diferentes valores de volumen, área y espesor de la membrana [23–26]. Por ejemplo, en una membrana de DPPC el cambio en el volumen de fase gel a fase fluida es cercano al 4 % [10,27,28], el área cambia cerca del 25 % [29] y el espesor decrece alrededor del 16 % [10]. Durante la transición de fase hay una coexistencia de dominios en fase fluida y en fase gel, la entalpía, la capacidad calorífica y la permeabilidad de la membrana alcanzan valores máximos [11,30,31], al igual que la compresibilidad de área y de volumen. Se sabe además que la compresibilidad es dependiente de la frecuencia, lo cual es conocido como *dispersión* [10,31]. La compresibilidad volumétrica k^V describe los cambios en el volumen de la membrana y está relacionada con la propagación de ondas mecánicas de presión. Además $k_T^V \sim C_p$. Considerando la ecuación para la propagación de una onda sonora en una dirección:

$$\frac{\partial^2}{\partial \tau^2}\Delta\rho^A = \frac{\partial}{\partial z}(c^2\frac{\partial}{\partial z}\Delta\rho^A), \tag{1.25}$$

donde τ es el tiempo, z es la posición a lo largo del axón, c es la velocidad del sonido y $\Delta\rho^A = \rho^A - \rho_0^A$ es la diferencia de la densidad lateral de la membrana, con ρ_0^A como la densidad lateral en el equilibrio. Se ha encontrado que en la transición de fase de la membrana, la velocidad del sonido es dependiente de la densidad lateral, ver figura 1.4. Esto permite expandir el término de velocidad mediante la ecuación 1.16. Y, siendo la velocidad del sonido dependiente de la frecuencia, efecto conocido como *dispersión*, se debe incluir entonces un término dispersivo:

$$-h\frac{\partial^4}{\partial x^4}\triangle\rho^A, \tag{1.26}$$

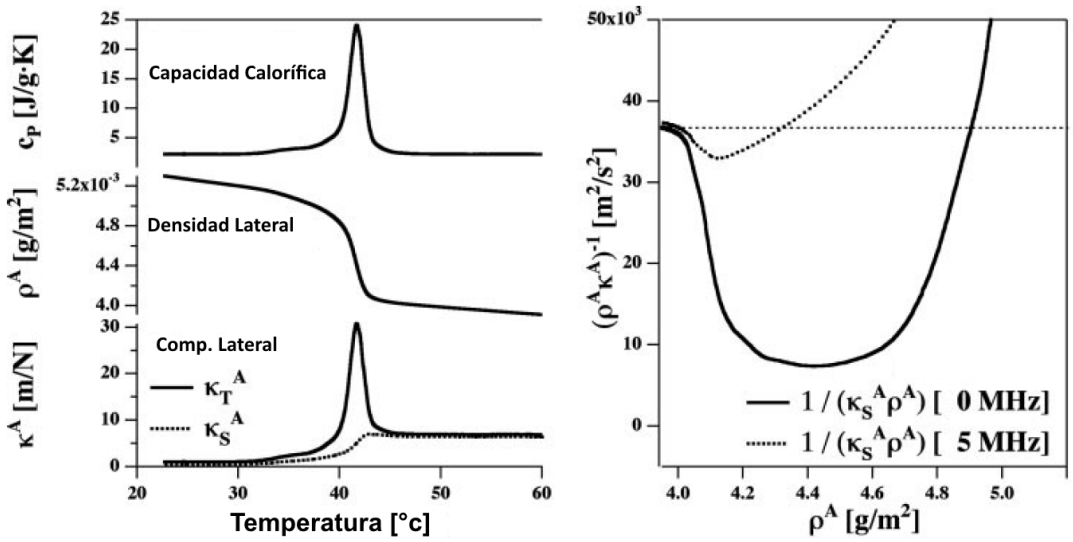

Figura 1.4: Perfiles termodinámicos para liposomas de DPPC. Izquierda, capacidad calorífica (arriba), densidad lateral de área (medio), compresibilidad lateral de área (abajo) para LUVs de DPPC. Derecha, velocidad lateral del sonido a bajas frecuencias como una función de la densidad de área de la membrana. Adaptado de [10].

donde h es una constante que describe la dependencia en frecuencia de la velocidad del sonido y se conoce como el término de dispersión [13]. Combinando las ecuaciones 1.25 y 1.26 se obtiene la ecuación que gobierna la propagación:

$$\frac{\partial^2}{\partial \tau^2}\Delta\rho^A = \frac{\partial}{\partial z}[(c_0^2 + p\Delta\rho^A + q(\Delta\rho^A)^2 + \ldots)\frac{\partial}{\partial z}\Delta\rho^A] - h\frac{\partial^4}{\partial x^4}\triangle\rho^A. \qquad (1.27)$$

Todos los parámetros, exceptuando h, son conocidos de forma experimental. Para LUVs de DPPC $p = -16{,}6c_0^2/\rho_0^A$, $q = 79{,}5c_0^2/\rho_0^{A\,2}$, $\rho_0^A = 4{,}035X10^{-}3\ g/m^2$ y a bajas frecuencias la velocidad del sonido $c_0 = 176{,}6\ m/s$. Los coeficientes p y q describen las propiedades elásticas no lineales de la membrana y son obtenidos haciendo un ajuste a los valores experimentales de velocidad de sonido en función de la densidad, ver figura 1.4. La solución analítica a la ecuación 1.27 fue mostrada

por Lautrup y colaboradores [32], haciendo:

$$u = \frac{\Delta\rho^A}{\rho_0^A}, \qquad x = \frac{c_0}{h}z, \qquad t = \frac{c_0^2}{\sqrt{h}\tau}, \qquad B_1 = \frac{\rho_0}{c_0^2}p, \qquad B_2 = \frac{\rho_0^2}{c_0^2}q \tag{1.28}$$

La ecuación 1.27 se puede reescribir:

$$\frac{\partial^2 u}{\partial t^2} = \frac{\partial}{\partial x}(B(u))\frac{\partial u}{\partial x} - \frac{\partial^4 u}{\partial x^4}, \tag{1.29}$$

con:

$$B(u) = 1 + B_1 u + B_2 u^2. \tag{1.30}$$

Entonces, $B_1 = 16{,}6$ y $B_2 = 79{,}5$ para una membrana lipídica artificial de DPPC [10]. Si se considera un pulso de densidad u propagándose con una velocidad constante, se puede usar una transformación $\chi = x - \beta t$, donde β es la velocidad de propagación adimensional del pulso de densidad. Se puede reescribir la ecuación 1.29 como:

$$\beta^2\frac{\partial^2 u}{\partial \chi^2} = \frac{\partial}{\partial \chi}(B(u))\frac{\partial u}{\partial \chi} - \frac{\partial^4 u}{\partial \chi^4}. \tag{1.31}$$

La anterior ecuación diferencial posee soluciones analíticas dadas por:

$$u(\chi) = \frac{2a_+a_-}{(a_+ + a_-) + (a_+ - a_-)\cosh(\chi\sqrt{1-\beta^2})}, \tag{1.32}$$

con dos raíces reales:

$$a_\pm = \frac{-B_1}{B_2}(1 + -\sqrt{\frac{\beta^2 - \beta_0^2}{1-\beta_0^2}}. \tag{1.33}$$

Para $1 >| \beta |> \beta_0 = \sqrt{1 - \frac{B_1^2}{6B_2}}$, $B_1 = \frac{\rho_0^A}{c_0^2} p$, and $B_2 = \frac{{\rho_0^A}^2}{c_0^2} q$. Para una velocidad de propagación β_0, el solitón tiene una amplitud máxima.

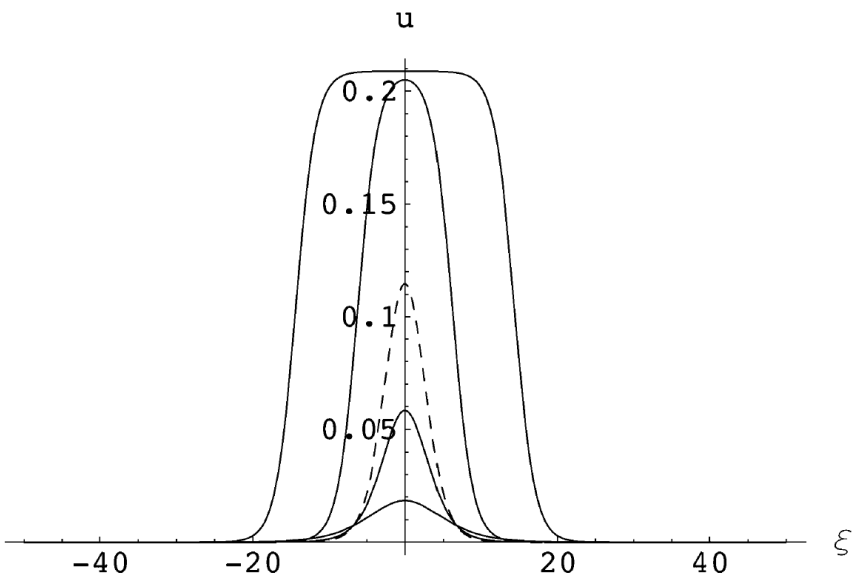

Figura 1.5: Solitones. Perfiles obtenidos para velocidades $\beta = \beta_0 + 4x10^{-9}$, 0.65, 0.734761, 0.85 y 0.95. Adaptado de [32].

El cambio de densidad $u(\chi)$ describe la forma del pulso propagado, el cual depende de la velocidad β. La mínima velocidad de propagación es cercana a $100m/s$, muy similar a la velocidad de propagación en un nervio mielinizado. Dado que el pulso es reversible, lo es también la producción de calor así como los cambios mecánicos producidos en el nervio durante la transmisión del impulso nervioso. Debido a las propiedades electrostáticas de las membranas biológicas, el pulso posee una componente de voltaje, así que, el solitón puede considerarse como un pulso piezoeléctrico. Además, cerca de la transición de fase un cambio local en la temperatura [33], un repentino cambio de pH [34], un incremento local en la concentración de calcio [35], o un potencial electrostático [7, 36] pueden producir el disparo del pulso. La forma típica del pulso resultante de las ecuaciones del modelo es la mostrada en la figura 1.5.

Uno de los rasgos más importantes de este nuevo modelo lo constituye el hecho de ser un proceso adiabático. La característica de solitón está fundada en la no linealidad de las constantes elásticas de los lípidos de membrana, así como de la componente de dispersión del sistema. El periodo refractario y la hiperpolarización son una consecuencia directa de la conservación de masa; de forma precisa el modelo involucra todas las variable termodinámicas. Los últimos trabajos que se han llevado a cabo se han centrado en medir la velocidad de propagación de la onda solitaria a lo largo de una membrana lípidica y su relación con la frecuencia y la presión lateral. Mediciones en monocapas lípidicas arrojaron como resultado velocidades de entre 170 m/s y 300 m/s para monocapas de un solo componente y de 50 m/s a 300 m/s para sistemas de dos componentes, esto valores cerca a la temperatura de transición de fase [37]. Por otra parte, en el 2012, Heimburg y colaboradores publicaron un trabajo que consistió en medir la respuesta eléctrica de los nervios de una pierna de langosta migratoria al movimiento de extensión, con una variación de ángulo de entre 80^0 a 150^0 sobre su eje de rotación [38]. Sus resultados mostraron cómo ante un movimiento de flexión, netamente mecánico, se pueden producir pulsos de voltaje que viajan a lo largo del nervio. Los datos obtenidos con este procedimiento experimental fueron comparados con el modelo matemático del solitón. Una de las grandes incógnitas que hasta el momento se ha formulado consiste en cómo se lleva a cabo la propagación de este pulso solitario que viaja a través de la membrana y cual es su velocidad. Diferentes diseños experimentales han sido construidos con el fin de dar respuesta a este cuestionamiento, muchos de ellos han sido implementados en monocapas lípidicas, las cuales constituyen un esquema simple y de fácil fabricación para evaluar determinadas propiedades de las membranas, como por ejemplo la presión lateral e incluso la propagación de ondas sonoras .

1.3. Efecto de la Anestesia en bicapas lipídicas

El término anestesia fue acuñado por Oliver Wendell Holmes en 1846 para describir la insensibilidad a las sensaciones (particularmente el dolor) inducida por

los medicamentos. Una gran variedad de sustancias causan anestesia. Se tienen anestésicos de tipo alcanos, alcoholes, benzodiacepinas, ésteres, amidas, fenoles, éteres y hasta gases nobles, que dependiendo de sus propiedades anestésicas, como su potencia y duración, al ser aplicadas pueden ser clasificados como generales o locales. Sin embargo, a más de un siglo de estudio, el mecanismo de la anestesia sigue siendo controversial. En la literatura se pueden encontrar dos teorías: la primera, la acción de de los anestésicos sobre las proteínas defiende que la anestesia está íntimamente relacionada con una interacción específica entre el fármaco y receptores proteicos en la membrana, lo cual da como resultado la modificación de la señal excitatoria e inhibitoria del impulso nervioso. Sin embargo, dada la diversidad de estructuras moleculares de los anestésicos y la amplia variedad de sistemas en los que actúa, es difícil considerar una acción específica. En segundo lugar, su efecto sobre las membranas lipídicas postula que dada la naturaleza hidrofóbica de los anestésicos generales, su efecto recae sobre las propiedades físicas masivas de la membrana celular, lo cual defiende que la anestesia es de naturaleza inespecífica. Propiedades de la membrana como la presión lateral, la transición de fase o la permeabilidad se ven afectadas por la presencia de anestésicos. Generalmente, estas sustancias provocan un corrimiento hacia temperaturas de transición más bajas. Esta hipótesis está soportada en la regla de Meyer-Overton, en la que se postula que la potencia anestesia es directamente proporcional al coeficiente de partición entre el agua y el aceite de oliva [39, 40]. Sin embargo, a pesar de estas consideraciones, el mecanismo de la anestesia sigue siendo polémico. Estudios recientes sugieren que la acción de la anestesia podría involucrar la acción de las dos teorías. Por ejemplo, si un compuesto anestésico se inserta en la membrana puede provocar la variación en la presión lateral de la misma, alterando el trabajo realizado por una proteína para abrir o cerrar un canal iónico involucrado en el proceso de neurotransmisión [41]. Esto implicaría que a pesar de que el efecto anestésico no recae directamente en las propiedades físicas de la membrana, indirectamente altera las propiedades mecánicas locales. Por lo tanto, el efecto que los anestésicos tienen sobre la estructura y función de las membranas lipídicas continua siendo fundamental para comprender el mecanismo general de la anestesia.

Capítulo 2

Hipótesis

La respuesta de las bicapas lipídicas a los cambios de temperatura modifica sus características termodinámicas y estructurales, fenómeno que a su vez puede conducir a cambios en sus propiedades mecánicas y a la propagación de perturbaciones a lo largo de membranas lineales modelo.

Capítulo 3

Objetivos

3.1. Objetivo General

Estudiar la propagación de perturbaciones y las propiedades mecánicas de membranas lipídicas artificiales modelo ante cambios de temperatura e interacción con anestésicos.

3.2. Objetivos Específicos

- Estudiar la propagación de perturbaciones mecánicas en una membrana lipídica artificial a partir de un cambio de temperatura localizado cerca a la transición de fase.
- Evaluar los resultados experimentales obtenidos con el modelo matemático para la propagación de solitones en bicapas lipídicas.
- Estudiar las propiedades mecánicas de membranas lipídicas artificiales soportadas en un rango de temperaturas cercano a la transición de fase mediante microscopia de fuerza atómica.
- Analizar el cambio en las propiedades mecánicas de membranas lipídicas soportadas debido a la interacción con un anestésico general.

Capítulo 4

Propagación de una Perturbación Termo-Mecánica en una Membrana Lipídica

Desde el planteamiento del modelo del solitón en 2005, muchos trabajos se han enfocado en determinar su existencia en un sistema de monocapa lipídica [37, 42–45], el cual además de estar ampliamente estudiado y caracterizado es de fácil montaje y medición accesible. No obstante, un sistema más aproximado a una membrana celular es una bicapa lipídica. La técnica de crear bicapas lipídicas artificiales comúnmente es utilizada para elaborar membranas de dimensiones de micrómetros, en algunos casos alcanzan valores máximos, en orificios circulares, de 1 o 2 milímetros de diámetro [6, 30, 46, 47]. La limitante en el tamaño se debe a que dicho sistema es altamente inestable y cualquier perturbación puede hacer que se rompa la bicapa. Sin embargo, la propagación de un pulso a lo largo de una bicapa requiere de la obtención de una membrana lineal de un tamaño mucho mayor. Se hace evidente entonces la necesidad de desarrollar un método mediante el cual la creación de bicapas lipídicas de longitudes del orden de centímetros no sólo sea factible, si no que además permita tener acceso a los procesos mecánicos que ocurren en ella como respuesta a determinado estímulo.

4.1. Materiales y Métodos

En esta sección se describe el protocolo para la preparación de las muestras, así como el diseño experimental utilizado para las mediciones realizadas.

4.1.1. Reactivos

1,2-dipalmitoil-sn-glicerol-3-fosfatidilcolina (DPPC) y 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DMPC) en polvo fueron obtenidos de Avanti Polar Lipids (Birmingham/AL. USA) y usados sin ninguna purificación adicional. n-decano, cloroformo, metanol, n-hexadecano y pentano fueron obtenidos de Sigma Aldrich. Para todos los experimentos se usó agua purificada. Los lípidos fueron preparados en una solución de n-decano, cloroformo, metanol en proporción 7:2:1 y agitados durante un tiempo de 5 minutos para garantizar la homogeneidad de la muestra.

4.1.2. Técnicas

Calorimetría Diferencial de Barrido

La calorimetría diferencial de barrido, o DSC, es una técnica experimental que permite determinar la cantidad de calor que absorbe o libera una sustancia con respecto a una referencia en función de la temperatura. En esta técnica se dispone de dos capilares, uno de ellos contiene la muestra a analizar y la otra la referencia. Ambas celdas son calentadas y un sistema de control comprueba si se producen diferencias de temperatura entre la muestra y la referencia. Si se detecta cualquier diferencia, los calefactores individuales se corregirán de tal manera que la temperatura se mantendrá igual en ambas cápsulas. Es decir, cuando tiene lugar un proceso exotérmico o endotérmico, el instrumento compensa la energía necesaria para mantener la misma temperatura en ambas cápsulas. Esta diferencia de calor, al dividirse entre las unidades de la tasa de barrido, da como resultado las unidades de la capacidad calorífica (J/K), a partir de cual se pueden calcular los cambios en la entalpía ΔH (Eq. 1.8) y en la entropía ΔS (Eq. 1.9). Esto permite conocer la información termodinámica asociada a la transición de fase del sistema.

Bicapas Planas

Las membranas artificiales han sido de gran interés y utilidad en el estudio de las propiedades de los lípidos puros, mezclas de lípidos y sistemas lípido-proteínas. Tradicionalmente, las membranas lipídicas planas son formadas poniendo una

solución de lípidos en un orificio pequeño de un material hidrofóbico que separa dos compartimentos que contienen una solución acuosa. La gran mayoría del solvente se dispersa en el medio, y bajo condiciones apropiadas, la bicapa se forma sobre el orificio espontáneamente. Estas membranas son llamadas BLMs (Black lipid membranes) y son usadas comúnmente para estudiar las propiedades eléctricas de la membrana. Sin embargo, tienen la desventaja de ser altamente inestables y poseer un volumen desconocido del solvente residual.

El método más común para formar membranas lipídicas planas es el método de Montal y Muller [46], en el cual la bicapa es formada sobre una apertura usualmente de 50-250 μm de diámetro en una superficie hidrofóbica delgada como el teflón, que separa dos compartimentos. El orificio es pre-pintado con un solvente orgánico no volátil como el hexadecano cuyo fin es el de reducir la tensión mecánica en los ejes de la apertura. La membrana se crea *pintando* fosfolípidos en la abertura sumergida en soluciones acuosas. En este punto la bicapa se vuelve opaca debido a la interferencia destructiva de la luz reflejada desde el frente y la parte posterior de la película, de ahí su nombre. Los electrodos colocados a ambos lados de la bicapa permiten la medición de la conductividad eléctrica.

4.1.3. Diseño Experimental

Para el desarrollo de los experimentos se diseñó y ensambló el montaje experimental mostrado en la figura 4.1, el cual consta de una cámara de aluminio anodizado con control de temperatura en la cual se pinta la bicapa lipídica. Para la detección de la perturbación se uso un sistema de sensado óptico separado a una distancia de 10 cm del sistema de calentamiento con el cual se produce el estímulo. Todo el sistema se encuentra dentro de una jaula de Faraday, con el objetivo de eliminar el efecto de los campos externos.

Descripción de la cámara

Con el fin de formar una bicapa lipídica artificial lineal de DPPC, se diseñó una cámara de aluminio anodizado con un baño térmico interno. En el interior, dicha

cámara cuenta con dos compartimentos separados por un escalón, cada uno de ellos con su correspondiente entrada de agua y conexión de electrodos. Sobre el escalón que separa los compartimentos se descarga un sistema de placas paralelas de acrílico entre las cuales se prensa una lámina de acetato perforada. La perforación consiste en una rendija de 10 cm de largo por 200 μm de ancho, donde es pintada la bicapa lipídica. Ver figura 4.1 (izquierda). El bloque de aluminio es conectado a un termocirculador Haake DC10, encargado de mantener el sistema a una temperatura determinada mediante el flujo de agua por las paredes de la cámara. Los electrodos son conectados a un electrómetro 6517b (Keithley Instruments, Inc)que permite verificar la formación y posterior ruptura de la bicapa lipídica mediante mediciones de corriente y capacitancia con un pulso de voltaje triangular de 100 mV. En tanto, las entradas de agua cumplen la función de llenar la cámara desde la parte inferior evitando la acumulación de burbujas de aire que puedan romper la membrana.

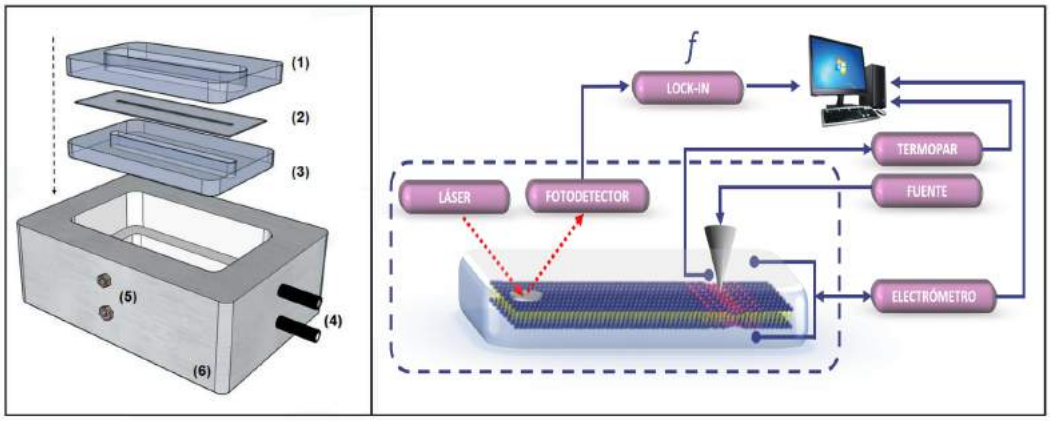

Figura 4.1: Diseño instrumental. El esquema muestra los principales componentes del montaje experimental así como sus respectivas conexiones. Izquierda: (1) placa de acrílico superior, (2) lámina de acetato, (3) placa de acrílico inferior, (4) entradas de agua, (5) conexión de electrodos, (6) cámara de aluminio anodizado. Derecha: diseño esquemático de la bicapa lipídica, en un extremo de la membrana el sistema de sensado óptico y en el otro el sistema de calentamiento.

Pintado de la bicapa

Para formar la bicapa lipídica lineal se preparan soluciones de DPPC y DMPC a 20 mg/ml en n-decano/cloroformo/metanol en proporción 7 : 2 : 1. La lámina de acetato es limpiada minuciosamente con alcohol al 70 % y prepintada con una solución de hexadecano en pentano al 5 %. Una vez hecho el montaje de la cámara se procede a llenar la misma con agua y se deja estabilizar la temperatura durante un tiempo de 15 minutos. Para pintar la bicapa se utiliza una micropipeta con un volumen de 20 μl de la solución de lípidos anteriormente mencionada y se deposita linealmente sobre la rendija de un extremo a otro, todo esto bajo el agua. Mediciones de corriente y capacintancia son tomadas mediante el electrómetro 6517b (Keithley Instruments, Inc), conectado a un computador y controlado a través de una interfaz Labview que permite la adquisición y posterior guardado de los valores registrados por los electrodos. De la literatura, el valor de la capacitancia efectiva para una bicapa de DPPC es de 0.85 ± 0.17 μF/cm^2 [48]. La obtención de un valor cercano al reportado garantiza, además de la formación, que la membrana no se haya organizado en multicapas. Adicional a esto, de manera visual se puede observar el momento en el cual se finaliza el pintado. En cuanto a la corriente, se espera que en el momento de la formación de la membrana se produzca un importante decremento en su valor, dado que la bicapa funge como un sello entre las dos subcámaras.

Los sistemas de detección óptico y de calentamiento se diseñaron de forma tal que no interfiriera con el método de pintado de la bicapa. Esto permite que sean montados y desmontados en la cámara. Una vez que la bicapa es pintada y que se verifica su formación por medio de las mediciones de capacitancia y corriente, se procede a su instalación.

Sistema de sensado óptico

La variación en el espesor de la membrana cuando ésta cambia de estado gel a estado fluido es cercana al 16 % [11], lo cual implica una cambio en el orden de ángstroms. La detección de una perturbación mecánica en una bicapa lipídica requiere de un método de detección de alta sensibilidad. Se construyó un sistema

de sensado óptico para tal fin. El sistema consiste, como se muestra en la figura 4.1 (derecha), de un láser de Neón ML800 (Metrologic Instrument) con una longitud de onda de 632.8 nm y una potencia de 0.5 mW, proyectado en un blanco puesto sobre la bicapa. El blanco consiste en una superficie reflejante hidrofóbica de tereftalato de polietileno (Mylar espejo) de un peso aproximado de 5 μg. Dado que el Maylar es hidrofóbico, se deposita sobre la bicapa manteniéndose sobre la superficie de la misma. El haz reflejado es sensado mediante un fotodetector de silicio de dos segmentos Edmund Optics, que registra los cambios en la iluminación y los transduce a una señal de voltaje enviado a un amplificador Lock-in HF2LI (Zurich Instruments). Los datos son adquiridos a una frecuencia de referencia, lo que garantiza una mejor relación señal-ruido. El amplificador Lock-in se conecta a un computador y los valores de voltaje son almacenados mediante el software Zi-Control proporcionado por el fabricante.

Sistema de calentamiento

El sistema de calentamiento consiste de un cono hueco con una punta fina(100 μm) conectado a un cilindro de aluminio bobinado con alambre de cobre delgado (n10). Los extremos del alambre están conectados a una fuente de voltaje directo. Cuando la fuente es encendida y la corriente fluye, el alambre se calienta y eventualmente la temperatura en la punta del cono también incrementa. Dicha temperatura es medida mediante un termopar en contacto con la punta. El cilindro está sujeto a un tornillo micrométrico de movimiento vertical que permite el contacto entre la punta cónica y la membrana de forma precisa, ver figura 4.1 (derecha).

Análisis calorimétrico

Dado que la solución de lípidos usada para fabricar las membranas lineales contiene solventes, se requiere determinar las temperaturas a las cuales las muestran tienen su transición de fase. Para ellos de llevo a cabo un análisis calorimétrico. Se realizaron perfiles de capacidad calorífica a una velocidad de scan de 1 °C/min a una presión constante de 3 atm. Una concentración de lípidos de 20 mg/ml fue disuelta en n-decano/cloroformo/metanol en proporciones 7:2:1 y posteriormen-

te resuspendida en agua para inducir la formación de vesículas. Dicha solución fue mezclada a 500 rpm por un tiempo de 30 min a una temperatura superior a la temperatura de transición de la especie lipídica. Posteriormente la muestra fue centrifugada a 10 000 rpm en una centrifuga Ependorf 5804R con un rotor F-45-30-11 durante un tiempo de 20 min y el supernadante fue removido con el objetivo de eliminar el exceso de solvente. Para experimentos sin solvente, una concentración de 3 mg/ml de lípido fue hidratada con agua Milli-Q y mezclada a 500 rpm durante 30 min a una temperatura mayor a la temperatura de transición. En todas las muestras, pequeñas vesículas unilaminares (SUVs) fueron obtenidas por extrusión de la muestra mediante un Mini-Extruder, Avanti Polar Lipids, Inc., a través de un filtro de policarbonato (Nucleopore Track-Etched Membranes, Whatman)con un tamaño de poro de 100 nm. Los perfiles calorimétricos se obtuvieron mediante un microcalorímetro (NanoDSC, TA Instrument) conectado a una computadora. Cada muestra fue equilibrada durante un tiempo de 600 s a 2 °C. Perfiles de calentamiento de 2 hasta 50 °C fueron tomados seguidos por perfiles de enfriamiento. Este proceso se repitió 3 veces para cada una de las muestras. El análisis de los datos se realizó mediante el software suministrado por el fabricante del equipo.

4.2. Resultados

En esta sección se presentan los resultados obtenidos en las mediciones de capacitancia y corriente, así como las temperaturas de transición obtenida para cada una de las muestras durante el análisis calorimétrico. Adicional a lo anterior, se presentan también los resultados medidos por el sistema de sensado óptico ante un aumento de temperatura localizado y las posibles implicaciones que éstos pueden tener.

4.2.1. Mediciones de Capacitancia y Corriente

Las mediciones de capacitancia y corriente se llevaron a cabo simultáneamente mediante la aplicación de un impulso de entrada de 100 mV a una frecuencia de

20 Hz. Los electrodos seleccionados fueron de cobre, colocados a una distancia de separación de 3.5 cm, sumergidos en el agua y ubicados cada uno en una de las subcámaras. La medición registrada por los electrodos se debe exclusivamente a la comunicación que tienen los dos compartimentos a través de la rendija, dado que el resto del sistema se encuentra aislado eléctricamente.

La figura 4.2 muestra los valores de capacitancia y corriente obtenidos durante el proceso de pintado para 5 diferentes bicapas a una temperatura de 25 °C y una concentración de lípidos de 20 mg/ml. Se puede observar que los valores de capacitancia registrados al pintar la bicapa decrementan hasta dos órdenes de magnitud, ver figura 4.2a. Además se aprecia que la formación de la membrana produce un sello que evita el flujo de corriente a través de la rendija, figura 4.2b. Se sabe que la formación de la membrana es un proceso espontáneo dado que un hoyo en la bicapa resultaría energéticamente desfavorable [49]. Al pintar la membrana bajo el agua, los lípidos se organizan de forma tal que las cabezas polares se orientan hacia el agua, mientras que las cadenas hidrocarbonadas se orientan hacia el centro de la misma. Al ser el acetato un material hidrófobo, los lípidos se unen a

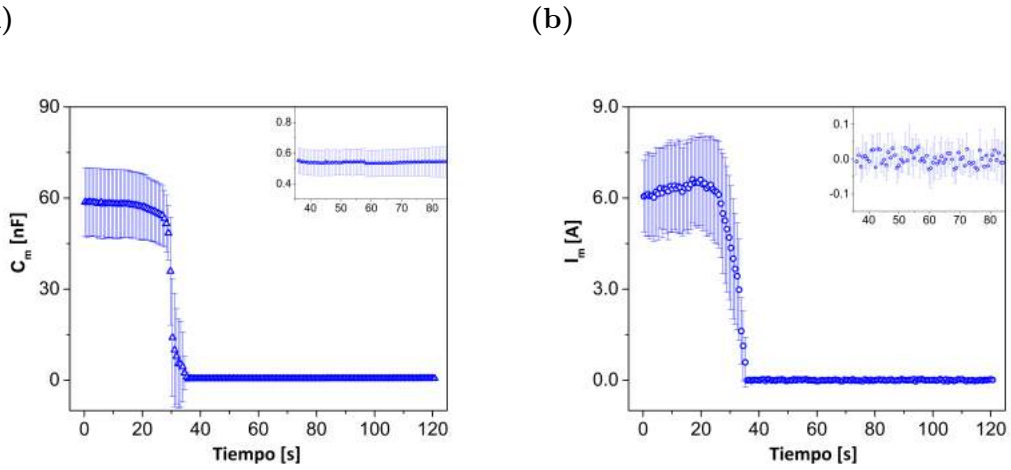

Figura 4.2: Respuesta eléctrica del sistema durante el pintado de la bicapa a T=25 °C a) Triángulos azules corresponden a la capacitancia medida en una bicapa de DPPC. b) Círculos azules muestran el efecto de la bicapa de DPPC en la corriente registrada por los electrodos. En los recuadros se muestran los valores de capacitancia y corriente registrados una vez la bicapa está formada. Las lineas verticales marcan la desviación estándar con n=5.

las paredes de la rendija con la ayuda del n-decano, cuya función consiste en llenar los espacios libres en el interior de la bicapa. Se debe tener en cuenta que todas las membranas son diferentes, por lo tanto los valores registrados por el electrómetro varían entre cada prueba. Una posible causa de esto es que no se puede asegurar el contenido de solvente que posee cada bicapa. La solución de lípidos tiene un alto grado de volatilidad, y su concentración puede cambiar en cada experimento. Otra causa es que a diferencia de las técnicas de pintado comúnmente utilizadas en BLM, donde el solvente se deja evaporar sobre la superficie del líquido, en la técnica utilizada en el presente proyecto la membrana es pintada con la solución de lípidos sin previa evaporación, resultando en bicapas con diferentes contenidos de solvente en su interior y por ende posibles diferencias en las mediciones de capacitancia y corriente. Esto se refleja en la desviación estándar de los datos mostrados en la figura 4.2b. En cuanto a la estabilidad, previamente se determinó que las membranas permanecen formadas hasta 40 minutos, tiempo suficiente para llevar a cabo los experimentos.

4.2.2. Perfiles Calorimétricos y Determinación de las Temperaturas de Transición

Mediante la técnica de calorimetría diferencial de barrido se suele obtener información termodinámica relevante a los modelos de membranas [6]. El valor de temperatura de transición para modelos de DPPC y DMPC ha sido reportado en 41,5 y 24 °C respectivamente. Por debajo de esta temperatura la membrana lipídica se encuentre en estado gel, lo cual implica una organización tanto de las colas de los lípidos como de la estructura transversal de la bicapa. Para un valor de temperatura superior a T_m la membrana se desordena y pasa a estado fluido, se produce un ensanchamiento del área transversal cercano al 25 % [50] y una disminución en el espesor de la membrana cercano al 16 % [10, 11].

La figura 4.3 muestra los perfiles calorimétricos para cada una de las muestras analizadas. Como ya se mencionó con anterioridad, la presencia de n-decano, cloroformo y metanol son necesarios para proporcionar estabilidad en la bicapa lipídi-

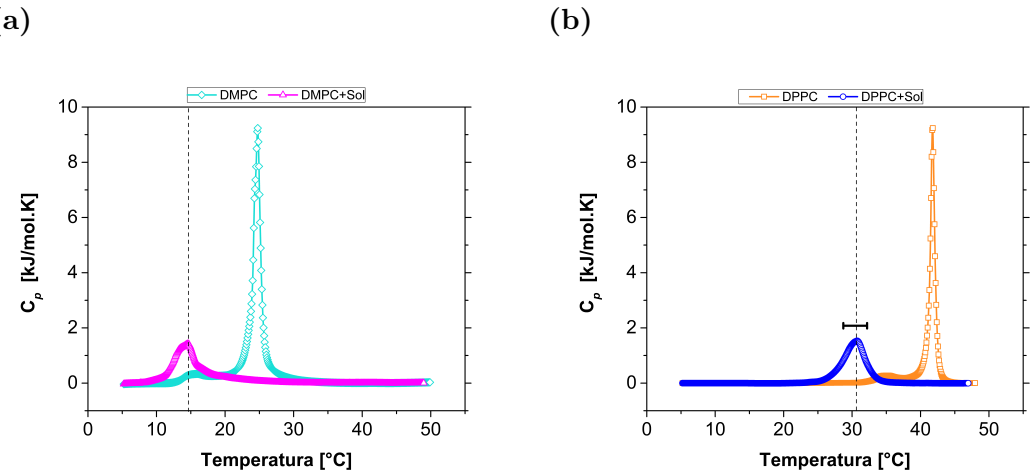

Figura 4.3: Análisis calorimétrico para liposomas de DMPC y DPPC. a) Diamantes cían corresponden al perfil calorimétrico de liposomas de DMPC libres de solvente a concentración de 3 mg/ml. Los triángulos magenta muestran el efecto que tiene la adición de solventes en la temperatura de transición de los liposomas de DMPC. b) Perfiles calorimétricos para liposomas de DPPC. Los cuadrados amarillos corresponden a las vesículas libres de solvente. Los círculos azules, muestran el corrimiento en el perfil como resultado de la adición de solventes a los liposomas. Los datos corresponde al tercer escán en modo calentamiento para cada muestra. Las lineas punteadas denotan el corrimiento en las temperaturas de transición, el cual es aproximadamente ΔT_m=10 °C.

ca y permitir que la misma sea pintada bajo el agua. Sin embargo, la presencia de dichos solventes provoca un corrimiento en la temperatura de transición de la membrana. Los liposomas de DPPC y DMPC libres de solventes muestran un máximo en la capacidad calorífica alrededor de 41 y 24 °C respectivamente. La adición de solventes orgánicos durante el proceso de preparación de las vesículas da como resultado un pico de menor tamaño y una disminución en la temperatura de transición. Se puede observar que los liposomas provenientes de las muestras con contenido de solventes muestran un corrimiento en su transición de fase de alrededor de 10 °C. En el caso de DPPC el máximo en la capacidad calorífica se encuentra a una temperatura de 30.7 °C, ver figura 4.3b. En tanto, para el caso del DMPC la temperatura disminuyó a un valor de 14.6 °C, figura 4.3a.

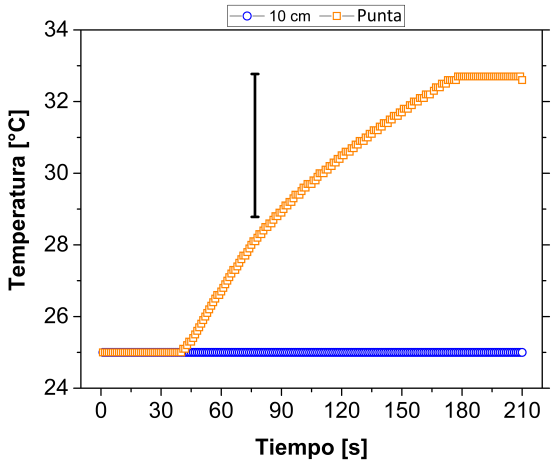

Figura 4.4: Temperatura en el sistema de calentamiento. En cuadros amarillos se muestran los valores de temperatura registrados por el termopar justo debajo de la punta. Los círculos azules corresponden a la temperatura medida a 10 cm de la punta, donde el blanco de Mylar es posicionado.

Estos resultados concuerdan con reportes previos donde la presencia de alcanos de cadena corta producen una disminución en las temperaturas de transición así como un ensanchamiento de los perfiles [51–55]. Sin embargo, se debe tener en cuenta que estas temperaturas registradas no representan con exactitud las temperaturas correspondientes a las bicapas lipídica y esto debido principalmente a dos aspectos: primero, la evaporación y la variación en el contenido de los solventes de cada bicapa puede producir un leve corrimiento en la temperatura de transición; y segundo, la curvatura de la bicapa lipídica juega un papel importante en la transición de fase, en una bicapa plana se espera que haya un corrimiento en la temperatura de transición del orden de décimas de grado en comparación con vesículas de la misma especie lipídica [56, 57]. Si embargo, para este trabajo, nosotros consideramos temperaturas de transición cercanas a las registrados en los experimentos de calorimetría para liposomas con solventes orgánicos.

4.2.3. Medición de perturbaciones Mecánicas

Para las membranas de DPPC, el rango de temperatura en la punta se seleccionó entre 25 y 33 °C. Con el fin de corroborar que el aumento de temperatura fuera localizado, a fin de producir una transición de fase puntual, se verificó mediante un termopar la temperatura en la membrana justo debajo del sistema de calentamiento y en la posición del blanco. Se encontró que a pesar del incremento de la

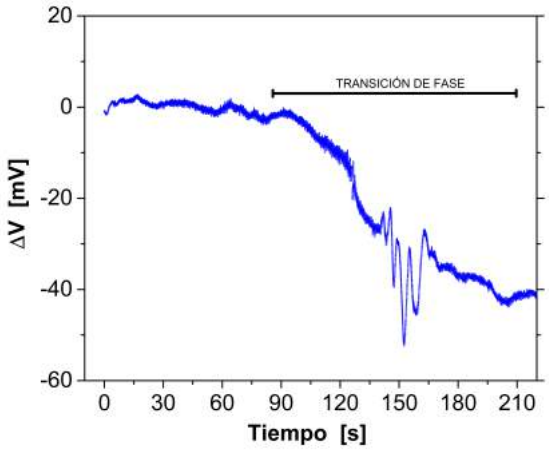

Figura 4.5: Trazo de voltaje registrado por el fotodetector. Trazo de voltaje representativo medido por el fotodiodo en función del tiempo para una bicapa de DPPC. ΔV es la diferencia entre el cambio de voltaje y el voltaje inicial V_0. El cambio en la señal de voltaje es producido durante la transición de fase.

temperatura en la punta, en el lugar donde se encuentra el sistema de detección óptico la temperatura permanece constante, ver figura 4.4.

Para las mediciones en bicapas de DPPC la temperatura de la cámara se fijo a T=25 °C, la cual está por debajo de la temperatura de transición de fase ($T < T_m$). Una vez que la membrana es pintada, el blanco de Mylar se deposita sobre la bicapa y el láser y el fotodetector son alineados buscando el máximo voltaje V_0. Luego se realiza el montaje del sistema de calentamiento en el extremo contrario de la rendija. Entonces, la fuente de voltaje es encendida y la temperatura en la punta incrementa como se puede observar en la figura 4.4. La figura 4.5 muestra un registro del voltaje representativo ($\Delta V = V - V_0$) medido por el fotodetector conforme avanza el tiempo y la temperatura en la punta incrementa. Se puede observar como hay una variación significativa en la señal de voltaje. Con el fin de determinar la relación entre la cambio de voltaje y el aumento de la temperatura en el sistema de calentamiento, se procedió a graficar ΔV vs. T. La figura 4.6a muestra las variaciones en el voltaje para 3 membranas de DPPC diferentes. Se puede observar que cuando la temperatura de la membrana justo debajo de la punta se acerca a los 27.7 °C, dos grados por debajo de la temperatura de transición para el sistema DPPC/solventes (T_m = 30,7 °C), los valores en el voltaje registrado empiezan a presentar variaciones. Esto significa un cambio en la alineación del láser y el fotodetector causado por un cambio en la posición del

blanco de Mylar. Se sugiere que los lípidos cercanos a la punta cambian de fase gel a fase fluida, cambiando el espesor y la densidad lateral de la bicapa. Esta transición de fase produce una deformación que se propaga a lo largo de la bicapa hasta alcanzar la posición del blanco.

Ahora bien, considerando el caso de las bicapas de DMPC, con una T_m = 14,6 °C, la temperatura de la cámara se fijó a T = 35 °C; esto con dos objetivos: primero, que la temperatura del sistema siempre fuera superior a la temperatura de transición de la especie lipídica; y segundo, para evaluar si se producen fluctuaciones producto del cambio en el volumen de agua o la expansión del metal con el aumento de la temperatura. Las variaciones de la temperatura en el sistema de calentamiento se realizaron entre 35 °C y 42 °C. La figura 4.6b muestra la señal de voltaje con respecto al aumento de la temperatura en la punta. Se puede observar que ΔV es constante, lo que implica que no hubo un cambio en la posición del blanco. Esto tiene sentido dado que para este experimento control, la membrana siempre se encontró en estado fluido donde el incremento de temperatura del sistema de calentamiento no produjo una transición de fase.

(a) **(b)**

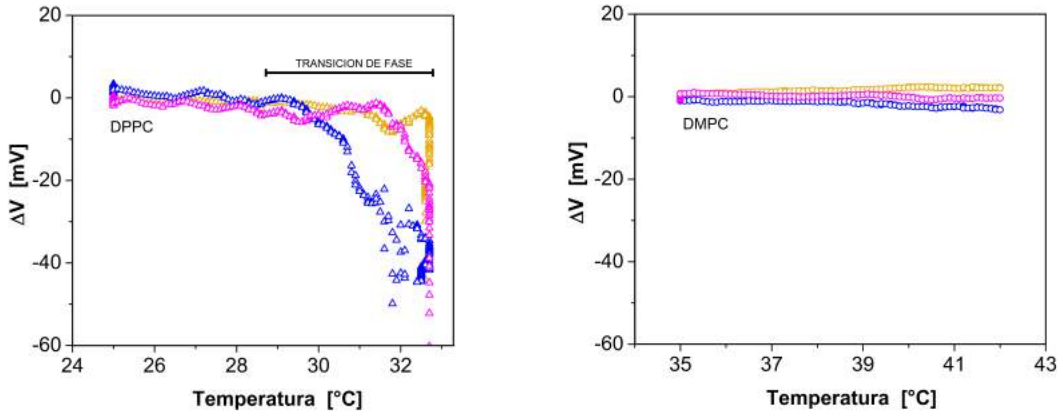

Figura 4.6: Voltaje en función de la temperatura. a) Combinando las figuras 4.4 y 4.5 se obtiene el voltaje como función de la temperatura en la punta del sistema de calentamiento. a) Tres experimentos de DPPC independientes. La línea negra corresponde a la transición de fase observada en la figura 4.3. b) Datos obtenidos para tres experimentos de DMPC.

4.3. Consideraciones Matemáticas

Retomando la ecuación de onda para cambios en la densidad de área propuesta para el modelo del soliton [10], ecuacion 1.27:

$$\frac{\partial^2}{\partial \tau^2}\Delta\rho^A = \frac{\partial}{\partial z}\left((c_0^2 + p\Delta\rho^A + q(\Delta\rho^A)^2\frac{\partial}{\partial z}\Delta\rho^A\right) - h\frac{\partial^4}{\partial z^4}\Delta\rho^A, \tag{4.1}$$

donde:

$$c^2 = \frac{1}{\rho^A k_S^A} = c_0^2 + p\Delta\rho^A + q(\Delta\rho^A)^2\frac{\partial}{\partial z}\Delta\rho^A..., \tag{4.2}$$

y:

$$\Delta\rho^A = \rho^A - \rho_{liq}^A > 0, \tag{4.3}$$

Los parámetros p y q describen las propiedades elásticas no lineales de la membrana y Heimburg y Jackson los obtienen mediante un ajuste a los datos experimentales para la velocidad del sonido como una función de la densidad de área de la membrana (ver figura 1.4). Los valores obtenidos para LUVs de DPPC son $c_0 = 176{,}6m/s$, $p = -16{,}6c_0^2/\rho_{liq}^A$, $q = 79{,}5c_0^2/(\rho_{liq}^A)^2$ y $\rho_{liq}^A = 4{,}035x10^{-3}g/m^2$, asumiendo una temperatura de bulto de T=45 °C mayor a la temperatura de transición. Para una temperatura superior a la temperatura de transición, se requieren valores de $p < 0$ y $q > 0$, dado que la velocidad tiene un mínimo durante la transición de fase.

La solución analítica para la ecuación 4.1, formulada por Lautrup y colaboradores [32] tiene la forma:

$$u(\epsilon) = \frac{2a_+a_-}{(a_+ + a_-) + (a_+ - a_-)cosh(\epsilon\sqrt{1-\beta^2})} \tag{4.4}$$

Para una membrana lipídica cuya temperatura se encuentra ligeramente por encima de la temperatura de transición, similar a lo que sucede en sistemas biologicos [7, 8, 10], dichas soluciones tienen la forma de solitones positivos con una amplitud máxima de $\beta_0 = \sqrt{1 - \frac{B_1^2}{6B_2}}$, ver figura 1.5.
En nuestro caso, cuando la membrana está en estado gel:

$$\Delta\rho^A = \rho^A - \rho^A_{gel} < 0, \tag{4.5}$$

ahora, los valores de p y q deben ser > 0. Considerando que c^2 tiene un mínimo durante la transición, se puede hacer un ajuste con los valores obtenidos de la ecuación 4.2 para el valor de temperatura reportado (T=45 °C) y obtener nuevos parámetros para una membrana a temperatura menor a la temperatura de transición.

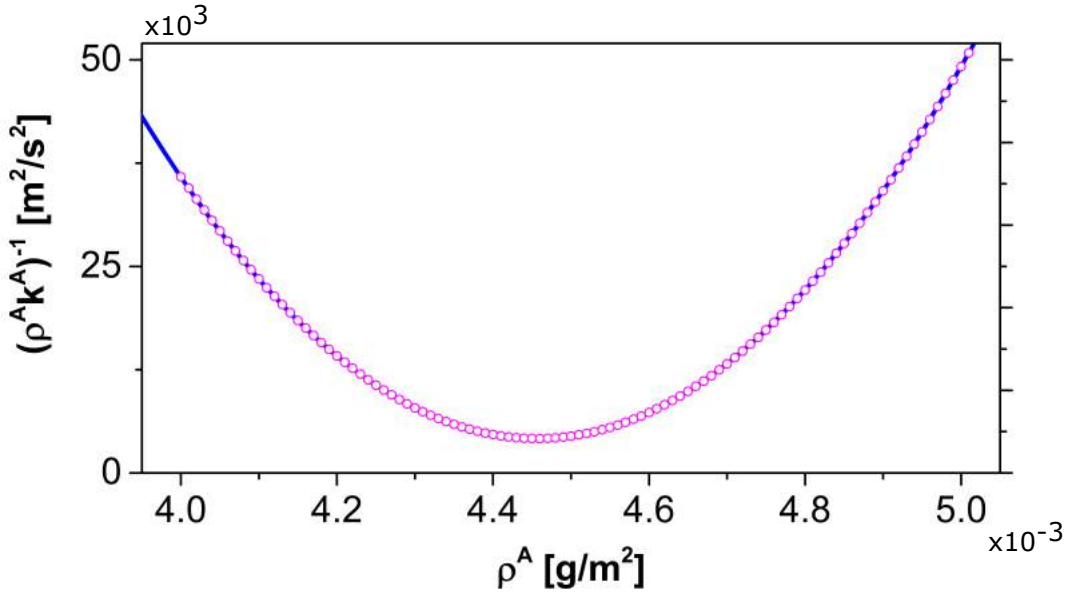

Figura 4.7: Velocidad lateral del sonido a bajas frecuencias como una función de la densidad de área de la membrana. La línea azul muestra los resultados obtenidos para LUVs de DPPC con $\rho^A_{liq} = 4{,}035x10^{-3}$ gm^{-2} a $T = 45°C$. Los círculos magenta muestran el ajuste para ρ^A_{gel} a $T < T_m$.

El ajuste permite obtener nuevos valores, $c_0 = 177{,}2m/s$, p=20.01 c_0^2/ρ_{liq}^A, q=115.4 $c_0^2/(\rho_{liq}^A)^2$ y ρ_{gel}^A=4.877x10^{-3}g/m^2 a una temperatura en fase gel de alrededor de T=38 °C. Usando el procedimiento planteado por Lautrup el al., $B_1 = 20{,}01$, $B_2 = 115{,}4$ y $\beta_0 \approx 0{,}6494$.

Los perfiles obtenidos de la ecuación 4.4 mostrados en la figura 4.8 son solitones negativos de amplitud similar a los obtenidos para una temperatura superior a la temperatura de transición (figura 1.5). Se puede observar que u será negativo para todo los valores de ϵ, esto se debe a que $\Delta\rho < 0$.

El máximo cambio en la densidad lateral posible es:

$$\Delta\rho_{max}^A = \frac{|p|}{q}. \tag{4.6}$$

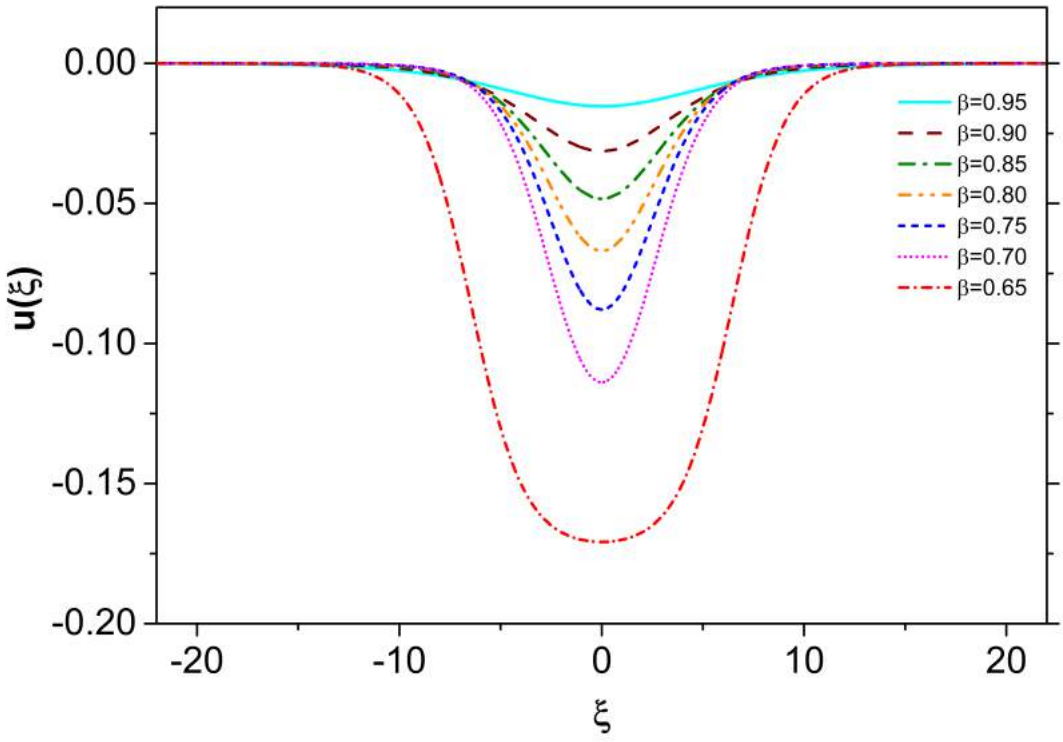

Figura 4.8: Perfiles de solitones negativos. Perfiles de solitones para DPPC a T≈38 °C con diferentes velocidades β.

Considerando la membrana en fase gel, y de acuerdo con los parámetros p y q calculados, el máximo cambio en la densidad lateral es de 0.174 (17 %). Este cambio corresponde a $\approx$ 71 % del cambio total en el área durante la transición de fase para una membrana de DPPC, el cual es de $\approx$ 25 % [11]. Sin embargo, a pesar de corroborar que el modelo del soliton tiene solución para las condiciones dadas en nuestro sistema experimental, para nosotros no es posible calcular c^2 en función de ρ^A ya que la información es insuficiente.

La evidencia de los cambios mecánicos y térmicos que ocurren en la membrana durante la propagación del potencial de acción [14, 15] han sido el origen de las nuevas teorías que tratan de ligar los cambios que acontecen en la bicapa lipídica durante la transmisión del impulso nervioso. Tanto en membranas biológicas como artificiales, las propiedades termodinámicas se encuentran estrechamente ligadas a los cambios de volumen y de área [8,11]. Y más destacable, el proceso de transición de fase provoca cambios no sólo en el espesor de la bicapa, la presión lateral, la capacidad calorífica y la compresibilidad, si no que además puede afectar las propiedades mecánicas de la bicapa. El modelo del Hodgkin y Huxley falla en explicar estos fenómenos y ha sido necesario una nueva teoría que explique los cambios que suceden en la membrana durante el potencial de acción [13,58]. El modelo del solitón propone la propagación de un pulso isentropico cerca de la transición de fase de los lipidos [10] y su posible relación con las dislocaciones mecánicas a lo largo de la membrana. Según el modelo, se espera que la amplitud del pulso que viaja a lo largo de la membrana celular sea de la magnitud del cambio que se produce en el espesor de la bicapa al pasar de estado fluido a estado gel, es decir cercano a 7 $\mathring{A}$ y con una velocidad de propagación de cerca de 176.6 m/s [10]. La concepción inicial del modelo plantea un cambio de fase fluido-gel, bajo dichas condiciones, la propagación del pulso produce un ensanchamiento de la bicapa como una respuesta al cambio de área y de volumen, contrario a los planteado experimentalmente en este trabajo. Sin embargo, el análisis matemático muestra que el modelo se ajusta a un cambio de estado gel-fluido bajo la consideración de que el pulso es negativo, contrario a un ensanchamiento, se produce una compre-

sión de la bicapa. La existencia de ondas de sonido adiabáticas ha sido estudiado previamente en monocapas lipídicas en interface aire-agua, donde el estado termodinámico se puede modificar facilmente a través de la presión lateral en una balanza de Langmuir [59]. Ahí mostraron la dependencia que tiene la velocidad del sonido de las ondas del estado de la monocapa de lípidos [37, 42, 43, 45]. A pesar de que el sistema de monocapas es fácil de usar, una bicapa es un modelo más aproximado a un sistema biológico real, donde la densidad y la presión lateral son intrínsecas al estado final. En este trabajo se mostró que dicho estado puede ser modificado localmente por un estímulo de temperatura, lugar en el cual los lípidos sufren una transición de fase gel-fluido y se produce una deformación que se propaga a lo largo de la membrana.

Capítulo 5

Estudio del Efecto de la Tetracaína en Bicapas Planas Soportadas de DMPC por Microscopía de Fuerza Atómica AFM

La comprensión de la membrana celular, con su enorme número de componentes, su naturaleza dinámica y su función biológica requiere, sin duda, de un gran esfuerzo y estudiar sus características físicas en sistema más simples es de gran ayuda dada su complejidad. Sistemas modelo como los liposomas, las BLMs y las bicapas lipídicas soportadas SLBs pueden ser útiles para comprender el aspecto físico básico común a las membranas biológicas. La relevancia que tienen las transiciones de fase en la estructura y función de las membranas ha tomado posición en muchos estudios, sin embargo, abordar sus propiedades termodinámicas plantea un gran reto experimental. La microscopía de fuerza atómica (AFM) permite estudiar el comportamiento termodinámico de una bicapa gracias a las variaciones en el espesor que acompañan su transición, además facilita obtener información mecánica propia de cada fase y de su interacción con otras moléculas. Esto resulta en un técnica destacada que ayuda a establecer una correlación entre la termodinámica y la mecánica de las bicapas lipídicas.

5.1. Materiales y Métodos

En está sección se presentan el procedimiento para la preparación de las muestras, las técnicas usadas para llevar a cabo las pruebas y demás consideraciones experimentales que se tuvieron en cuenta.

5.1.1. Reactivos

1,2-dimiristoil-sn-glicerol-3-fosfatidilcolina (DMPC) en polvo fue obtenido de Avanti Polar Lipids (Birmingham/AL. USA) y usado sin ninguna purificación adicional. Los lípidos fueron preparados en una solución de cloruro de sodio (NaCl) a 10 y 100 mM. Se usó tetracaína (TTC), la cual es un anestésico general a concentración de 25 mM.

5.1.2. Técnicas

Bicapas Planas Soportadas SLBs

Las bicapas lipídicas soportadas o por sus siglas en ingles SLBs son sistemas modelo valiosos para estudiar las propiedades de las membranas biológicas y procesos dependientes del tiempo, como la interacción de las membranas lipídicas con proteínas, péptidos, fármacos y la formación de dominios. El método consiste en ensamblar una bicapa de lípidos sobre un sustrato rígido, usualmente hidrofóbico como el vidrio, el oxido de silicio o la mica, siendo ésta última la comúnmente más usada. La mica es un material no conductivo compuesto de múltiples capas de 1 nm de espesor que pueden separarse fácilmente con la ayuda de cinta adhesiva para producir superficies limpias y atómicamente planas. Las SLBs pueden ensamblarse siguiendo dos estrategias diferentes: el método de Langmuir-Blodgett y la fusión de vesículas lipídicas. El primero se basa en la transferencia consecutiva a un sustrato sólido de dos monocapas lipídicas formadas en una interfaz agua-aire. El segundo método y el más popular consiste en preparar pequeñas vesículas unilaminares de lípidos (SUVs) las cuales al entrar en contacto con la superficie pasan por un proceso de absorción, deformación, aplanado y ruptura para formar

una SLBs, ver figura 5.1 [60–62]. Por muy simple que parezca el método, este proceso aun no es del todo comprendido. Cuando no existe una tensión inducida osmóticamente, la ruptura se debe a un equilibrio entre la atracción de la bicapa lipídica por el soporte y la tensión de curvatura en los lados de las vesículas. Una fuerte atracción induce una alta curvatura en la bicapa llevando eventualmente a formaciones de poros y ruptura de la bicapa. Si hay suficiente material lípido en contacto con la superficie, este proceso conduce a una bicapa plana continua [61].

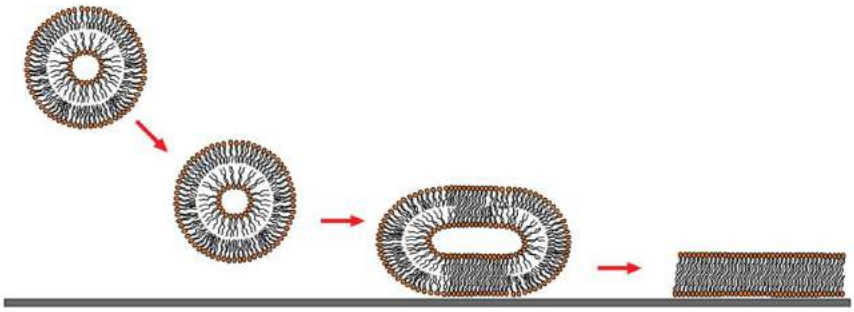

Figura 5.1: Preparación de una SLBs. Figura esquemática del mecanismo de formación de la bicapa por el método de fusión de vesículas lipídicas. Adaptado de [60].

Microscopía de Fuerza Atómica

La microsopía de fuerza atómica (AFM) es una técnica experimental versátil para obtener imágenes de alta resolución de una superficie. Consiste en escanear la superficie de una muestra a la vez que se registran las fuerzas de interacción con la punta de un cantilever. La posición de la muestra (x, y, z) se ajusta mediante un escáner piezoeléctrico para garantizar una alta resolución en el movimiento. Un láser se refleja sobre la superficie del cantilever y el haz reflejado es recolectado por un fotodiodo mediante el cual se registra la desviación de la punta. Un circuito de retroalimentación mantiene la interacción entre la punta y la muestra a un valor fijo. La cantidad de señal de retroalimentación, medida en cada punto de una matriz 2D, permite hacer una reconstrucción 3D de la topografía de la muestra [63], ver figura 5.2. El AFM es particularmente adecuado para caracterizar muestras biológicas ya que permite hacer mediciones en soluciones acuosas bajo condiciones

fisiológicas, en tiempo real y con una resolución nanométrica, además se ha convertido en una técnica bien establecida para obtener imágenes de las SLBs [64]. Una característica única de AFM es su capacidad de monitorear procesos dinámicos, como la interacción de las bicapas con proteínas y fármacos [65–72].

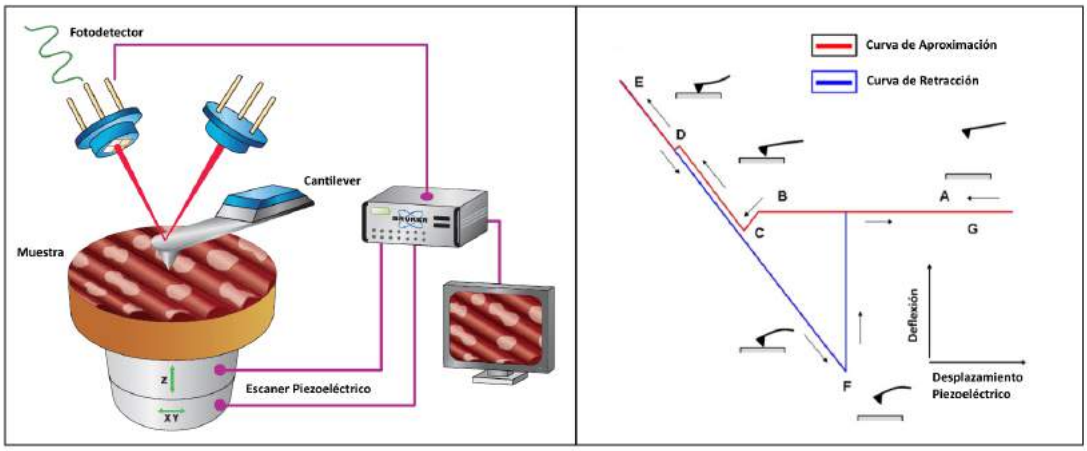

Figura 5.2: AFM. Izquierda, esquema de un microscopio de fuerza atómica. Derecha, figura esquemática de una curva de fuerza con las diferentes regiones para la aproximación y la retracción de la punta, adaptado de [73].

Curvas de fuerza

El AFM además de ser una herramienta muy útil para obtener imágenes de alta resolución, ofrece la posibilidad de estudiar las fuerzas intramoleculares e intermoleculares, para ello hace uso de las curvas de fuerza. Una curva de fuerza consiste en un ciclo de aproximación y retracción del cantilever sobre la muestra durante el cual se mide la deflexión como una función del movimiento relativo. En la figura 5.2, *derecha* se muestra una curva de fuerza típica para una bicapa lipídica. A grandes distancias (A) el cantilever y la muestra están muy separados y no se presenta una deflexión. Al acercarse, la punta comienza a sentir las interacciones de Van der Waals (B). Estas fuerzas hacen que la punta entre en contacto con la muestra. El punto "salto a contacto"(C) corresponde a la posición en la cual el gradiente de la fuerza de interacción supera la constante del resorte del cantilever. Después del contacto, cuando el cantilever se acerca más a la superficie, se

produce una deflexión positiva del cantilever al estar físicamente en contacto con la muestra. A partir de este punto, la membrana se deforma elásticamente, hasta que se alcanza una fuerza de fluencia crítica (D), a este valor de fuerza se produce un salto que corresponde a la fuerza máxima que la membrana puede soportara antes de romperse o fuerza de ruptura. Ésta es la región de contacto de la curva de fuerza, donde se pueden medir las propiedades elásticas de la muestra. Una mayor deflexión del cantilever es resultado de una mayor compresión sobre el sustrato (E). A continuación se invierte el sentido del desplazamiento y el cantilever se aleja de la muestra (curva azul). Inicialmente el comportamiento de retracción es igual al de aproximación, pero debido a la adhesión entre la punta y la muestra, el cantilever se desvía negativamente, hasta que la fuerza de adhesión es superada por la fuerza de restauración y el contacto se rompe (F). Una vez que el cantilever supera la fuerza de adhesión, este se separa de la superficie (G). La magnitud de la fuerza de adhesión y de ruptura proporcionan información útil para comparar las fuerzas de interacción entre diferentes moléculas [73].

5.1.3. Diseño Experimental

Con el fin de determinar la dependencia de las propiedades mecánicas de las SLBs con respecto a la temperatura, se construyó en el AFM un control de temperatura que permite realizar incrementos en intervalos de 1 °C, ver figura 5.3. Dicho sistema consta de una una cámara de aluminio (3) acoplada a un extremo de una placa metálica (1). Dicha placa es colocada en el AFM mediante un par de imanes, uno de ellos (5) se encarga de sostener la muestra (4) y el otro de fijar la posición de la cámara sobre el escáner (6). En el extremo opuesto de la placa metálica, un serpentín de alambre de cobre (2) es colocado y sus extremos conectados a un controlador de temperatura alimentado a 12 V. A su vez, un termopar posicionado en el interior de la cámara y en contacto con la solución acuosa de la muestra alimenta la señal de temperatura del controlador. Una vez la temperatura deseada es fijada en el controlador, el termopar registra la temperatura de la cámara. De ser necesario un incremento, la señal de voltaje es enviada a modo de pulsos al serpentín incrementando su temperatura y la de la placa metálica. Dado

que la placa se encuentra en contacto con la cámara de aluminio, ésta también se calentará por conducción hasta alcanzar la temperatura deseada, momento en el cual el ΔT entre la cámara y el controlador es igual a cero.

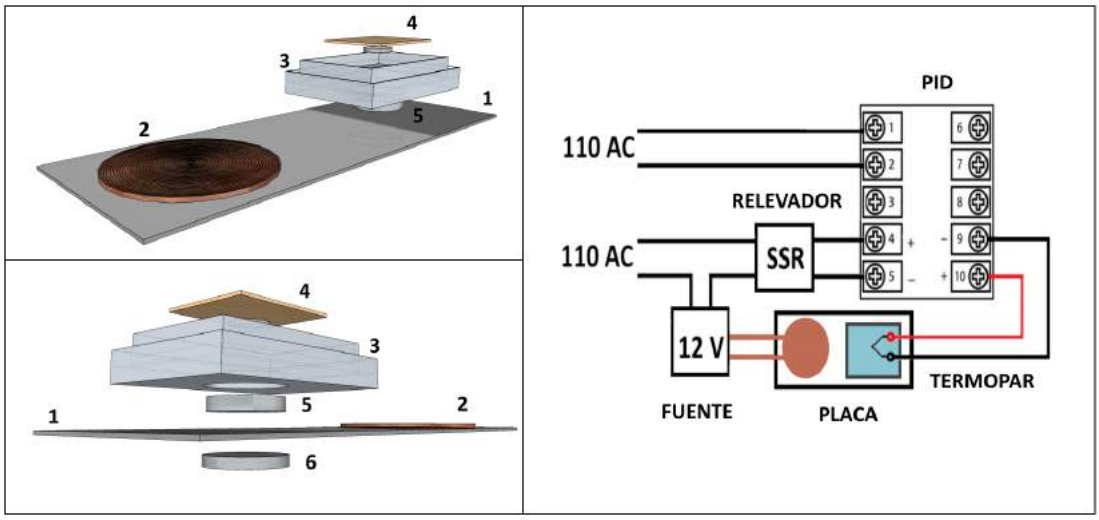

Figura 5.3: Diseño instrumental AFM. Figura esquemática de los principales componentes del montaje experimental para el control de temperatura. Izquierda: (1) placa metálica, (2) serpentín de cobre, (3) cámara de aluminio, (4) muestra, (5-6) par de imanes. Derecha: diseño esquemático del circuito del controlador PID, el termopar en contacto con el medio acuoso se encarga de registrar la temperatura de la muestra, en tanto que la fuente de 12 V calienta el serpentín de cobre mediado por la acción del controlador a través de el relevador.

Formación de las SLBs

Las SLBs fueron preparadas mediante el método de fusión de vesículas sobre un sustrato de mica. Una concentración de 1 mg/ml de DMPC fue disuelta en 10-100 mM de NaCl y posteriormente sonicada durante 30 min a 45 °C para inducir la formación de LUVs. Posteriormente pequeñas vesículas unilaminares (SUVs) fueron obtenidas por extrusión de la muestra mediante un Mini-Extruder, Avanti Polar Lipids, Inc., a través de un filtro de policarbonato (Nucleopore Track-Etched Membranes, Whatman)con un tamaño de poro de 100 nm. La solución de liposomas se depositó sobre la mica recién descubierta a una temperatura de 23

°C. Después de un periodo de tiempo controlado ($\sim$ 3 min) la mica fue suavemente enjuagada con la solución de NaCl con el fin de remover el exceso de vesículas de DMPC, teniendo especial cuidado de que la muestra no se deshidrate. La incorporación de TTC se realizó mediante la adición de un pequeño volumen del anestésico a 25 mM en la celda líquida que contiene la SLB previamente formada. Después del tiempo de incubación adecuado se realizaron nuevamente lavados para eliminar el exceso de TTC que no se insertó en la membrana.

Análisis calorimétrico

Para determinar las transiciones de fase de las vesículas de lípidos sin y con TTC se realizaron perfiles de capacidad calorífica a una velocidad de escan de 1 °C/min a una presión constante de 3 atm. Una concentración de lípidos de 3 mg/ml fue disuelta en 100 mM de NaCl y posteriormente sonicada por un tiempo de 30 min a una temperatura superior a la temperatura de transición de la especie lipídica. Para experimentos con TTC una concentración de 3 mg/ml de lípido fue hidratada con una solución de 100 mM de NaCl y 25 mM de TTC y sonicada 30 min a una temperatura mayor a la temperatura de transición. En todas las muestras, pequeñas vesículas unilaminares (SUVs) fueron obtenidas por extrusión de la muestra mediante un Mini-Extruder, Avanti Polar Lipids, Inc., a través de un filtro de policarbonato (Nucleopore Track-Etched Membranes, Whatman)con un tamaño de poro de 100 nm. Los perfiles calorimétricos se obtuvieron mediante un microcalorímetro (NanoDSC, TA Instrument) conectado a una computadora. Cada muestra fue equilibrada durante un tiempo de 600 segundos a 2 °C. Perfiles de calentamiento de 5 hasta 30 grados fueron tomados seguidos por perfiles de enfriamiento. Este proceso se repitió 3 veces para cada una de las muestras. El análisis de los datos se realizó mediante el software suministrado por el fabricante del equipo.

Imágenes y Curvas de Fuerza

Las imágenes de AFM fueron obtenidas con un microscopio Innova Bruker (Santa Barbara, CA) equipado con un escáner grande. La imágenes se realizaron en modo

contacto a una resolución de 512 pixeles/línea y a una velocidad de 1.0 Hz. Se usó un cantilever de silicio dopado con nitruro con un radio de curvatura nominal de 45 nm y una constante del resorte 0.350 N/m a una frecuencia de resonancia de entre 50-80 kHz en seco. Todas las imágenes y curvas de fuerza fueron tomadas en la celda líquida bajo el medio acuoso. La escala de altura fue calibrada mediante el software del equipo teniendo en cuenta que bajo el agua la constante del resorte es aproximadamente 1/3 de su valor nominal. Las curvas de fuerza se realizaron en bicapas de DMPC con y sin TTC, en un área no mayor a 5x5 μm y con un total de 50 curvas de fuerza por experimento a una velocidad de aproximación de 70.5 nm/s. Para la edición de las imágenes de AFM se usó el software Gwyddion 2.50 (Czech Metrology Institute) de licencia libre.

5.2. Resultados

En esta sección se presentan los resultados del estudio del efecto de la temperatura y la tetracaína en las propiedades mecánicas de SLBs de DMPC.

5.2.1. Formación de las SLBs

El mecanismo de formación de las SLBs a partir de una solución de liposomas unilaminares requiere de la fusión y ruptura de las vesículas sobre la superficie del substrato. Este método produce una bicapa plana en la cual la capa interna de los liposomas ahora se encuentra con la solución acuosa [61]. En la figura 5.4 $(b-e)$ se muestra el proceso de formación de una SLB usando una concentración iónica de 10 mM de NaCl. A partir de la superficie plana de mica (a) se observa la adhesión de múltiples vesículas hasta que eventualmente se obtiene una bicapa plana que cubre la totalidad de la superficie. La presencia de pequeños defectos y la medicion de su diferencia de alturas permite corroborar la presencia de la bicapa soportada. Un perfil transversal muestra alturas de alrededor de 5 nm (g) lo cual coincide con el espesor reportado para una SLB de DMPC [64, 74]. Un incremento en la concentración iónica aumenta el grado de cobertura de la superficie (f), donde la SLB formada a partir de una solución de 100 mM de NaCl

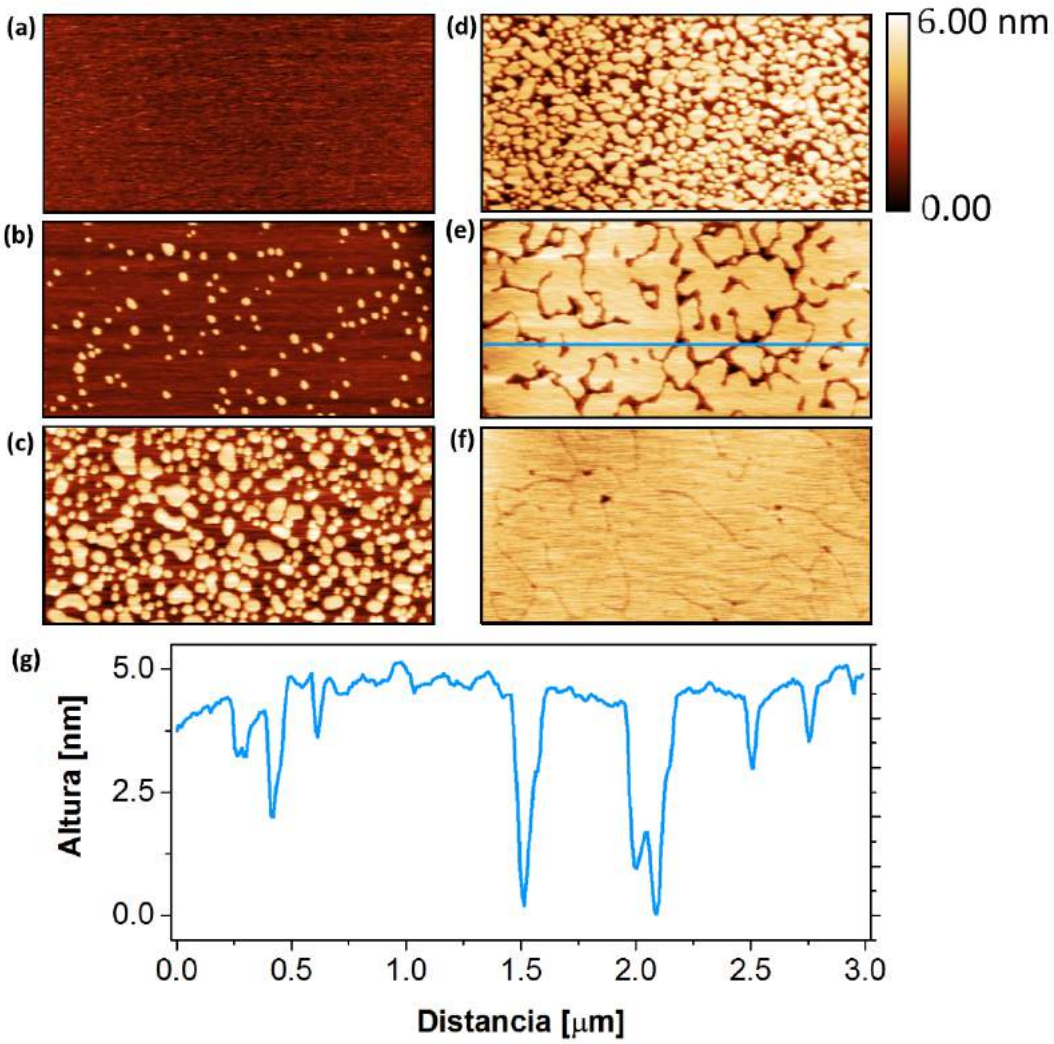

Figura 5.4: Formación de la SLBs. Imágenes de AFM (3x1.5 μm) de la formación de una bicapa lipídica soportada en solución de 10 mM de NaCl ($a - e$) y 100 mM de NaCl (f). Cada imagen corresponde a un tiempo de incubación diferente desde 0 min a 3 min. La fusión de las vesículas de lípidos se limita a la formación de una bicapa única con un espesor de $\sim$ 5 nm (g).

se muestra más compacta. La formación de una bicapa única o múltiples capas se ha reportado que depende tanto de la especie lipídica como de la salinidad de la solución. Por ejemplo, DMPC en 10 mM de $MgCl_2$ o isoporopanol puede producir multicapas al entrar en contacto con el sustrato [75] en tanto que 10 mM de NaCl

limita la formación a una bicapa que modifica sus propiedades estructurales y mecánicas si la concentracion iónica incrementa [64]. Iones monovalentes como el Na^+ penetran al interior de la membrana a la altura de los grupos fosfato, y a pesar de que su efecto en las propiedades físicas de la bicapa es poco, se sabe que el incremento de la concentración de iones sodio produce una disminución en el área por lípido, un leve aumento en el ancho de la membrana y un incremento en el potencial ζ resultado de la adsorción de los cationes en la superficie de la cabeza polar de la molécula fosfolipídica [64, 76, 77]. A pesar de que el DMPC es zwitterionico, posee un potencial negativo en agua mili-Q. El proceso de fusión de las vesículas con el sustrato se asume está gobernado por fuerzas electrostáticas, la mica está cargada negativamente bajo el efecto de la carga iónica [77], entonces a mayor carga iónica, mayor y más rápida será la adhesión de las vesiculas sobre la mica [64]. Estos resultados muestran que tanto en una solución de 10 o 100 mM de NaCl la formación de la SLB está limitada a una bicapa única sin evidencia de la formación de bicapas adicionales.

5.2.2. Determinación de las Temperaturas de Transición de los Liposomas y las SLBs

La transición de fase de una SLBs en comparación con otros sistemas lipídicos exhibe características propias como lo son un corrimiento en la temperatura de transición hacia valores más altos [74, 78], una disminución en la cooperatividad al poseer un mayor rango de temperaturas para la coexistencia de fases [78] y temperaturas de transición independientes para cada una de las capas [74, 79, 80]. El método más común para determinar la temperatura a la cual sucede la transición de fase es DSC. La figura 5.5 (azul) muestra el perfil calorimétrico para SUVs de DMPC en solución de 100 mM de NaCl, en ella se puede observar que posee una transición de fase al rededor de los 24 °C. Sin embargo, la presencia del soporte y el tipo de sustrato altera la termodinámica de la transición de fase de la bicapa lipídica soportada [61, 81]. Dado que el cambio reversible de fase gel a fase fluida consiste en un desorden de las cadenas hidrofóbicas de los lípidos, existe un

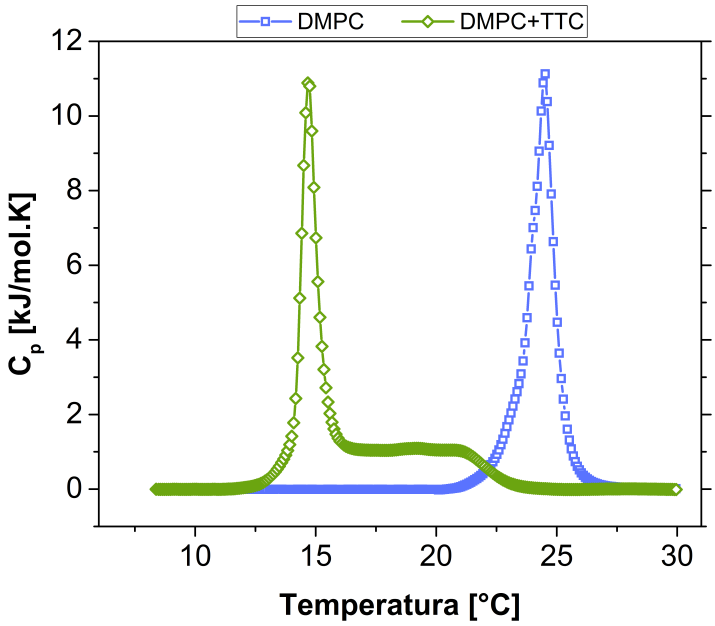

Figura 5.5: Análisis calorimétrico para SUVs de DMPC en presencia de TTC. Cuadros azul corresponden al termograma para liposomas de DMPC a concentración de 3 mg/ml en solución de 100 mM de NaCl. Los diamantes verdes muestran los datos registrados para SUVs de DMPC en solución de 100 mM de NaCl y 25 mM de TTC con igual concentración. Los datos corresponden al tercer escán en modo calentamiento para cada muestra.

decremento en el espesor de la membrana el cual puede ser observado mediante AFM. Con el objetivo de determinar la transición para las SLBs formadas sobre mica a partir de los liposomas unilaminares de DMPC, se decidió medir el cambio en el espesor de los depósitos formados sobre el sustrato durante la fase inicial de la formación de la bicapa soportada, ver figura 5.6a. A 23 °C los perfiles de altura de los depósitos es cercano a los 5 nm (figura 5.6b), a esta temperatura los lípidos se encuentran en estado gel con las cadenas hidrocarbonadas ordenadas. Un incremento en la temperatura produce un desorden en las cadenas lipídicas que se ve reflejado en un decremento en el espesor de la bicapa. Para determinar la temperatura de transición se midió la altura de un conjunto de 10 depósitos en 3 experimentos independientes para un total de 30 depósitos para cada una de las temperaturas desde 23 a 34 °C. Los valores obtenidos se muestran en la figura 5.6c

con sus respectivas desviaciones estándar. Se puede observar que el incremento en la temperatura produce una disminución en la altura de los perfiles, siguiendo una función sigmoidea decreciente hasta alcanzar valores de hasta 3.9 nm. La derivada negativa de esta función muestra un máximo en 28 °C, valor donde se espera se

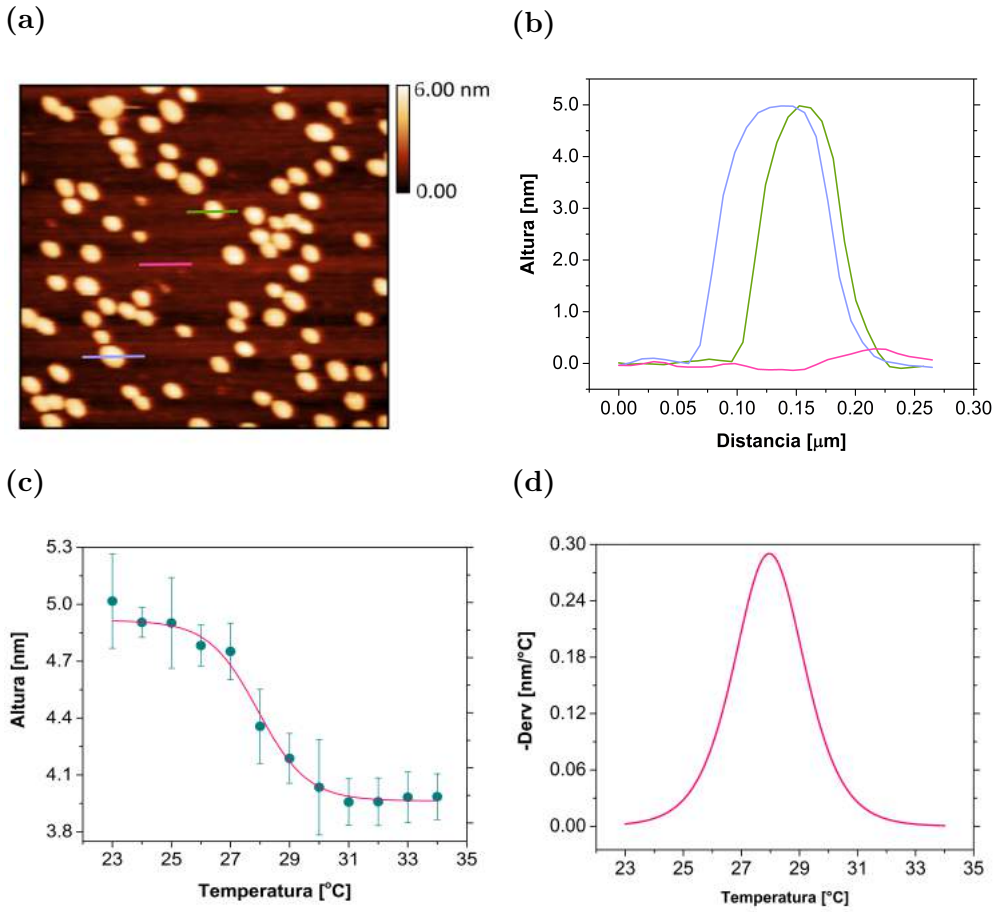

Figura 5.6: Cambio del espesor de depósitos de DMPC con respecto a la temperatura. a) Depósitos de DMPC sobre mica a T=23 °C a partir de una solución de SUVs en 10 mM de NaCl. b) En azul y verde perfiles de espesor de los depósitos de DMPC marcado en la figura *a* con respecto al sustrato (perfil rosa). c) Cambio en la altura de los depósitos con respecto a la temperatura, las barras de error corresponden a la desviación estándar para un total de 30 perfiles en 3 experimentos independientes. La línea magenta muestra el ajuste de los datos a una curva sigmoidea. d) Derivada negativa del ajuste sigmoideo de la figura *c*. La derivada exhibe un máximo alrededor de 28 °C, temperatura a la cual se espera tener la transición de fase de los depósitos al presentarse el mayor cambio en la altura.

encuentre la transición de fase de los depósitos, ver figura 5.6d. Sin embargo, se debe tener en cuenta que dicha curva muestra un perfil más amplio, lo que implica una menor coopertatividad de los lípidos depositados sobre el sustrato. La presencia del sustrato cambia y ensancha significativamente la temperatura de la transición de fase L_β-L_α en comparación a lo reportado por DSC. Una posible explicación es que la mica inhibe la migración de las áreas en fase fluida, reduciendo la cooperatividad de la transición.

La variación de la temperatura para una SLB formada permite analizar su transición de fase a partir de una secuencia de imágenes, ver figura 5.7. La muestra se calentó desde una temperatura de 24 °C hasta los 34 °C en intervalos de 1 °C. Las imágenes muestran la evolución de la transición de fase al aparecer la formación de dominios de altura diferente con respecto a la imagen inicial. Al principio de la secuencia, a una temperatura de 24 °C la bicapa se muestra uniforme con los defectos de altura propios con respecto al sustrato y probablemente en fase solida ordenada. Al aumentar la temperatura, aparecen zonas de menor altura, estas áreas representan la formación de dominios en fase fluida. Con un aumento mayor de la temperatura se obtiene nuevamente una imagen plana que probablemente corresponde a la fase fluida. Sin embargo, en la literatura se ha reportado que ante un incremento superior de la temperatura, se produce una segunda transición con un comportamiento similar [74, 80]. Esto indica una transición independiente para cada una de las capas de la bicapa, resultado de la interacción entre la capa inferior y el sustrato, lo cual implica necesariamente que la transición de fase que se está observando en la secuencia de imágenes de la figura 5.7 corresponde a la de la capa superior, con un máximo alrededor de los 29 °C.

5.2.3. Propiedades Mecánicas de las SLBs

La transición de fase es un proceso cooperativo de reordenamiento de las moléculas que componen el sistema, esto implica un cambio en las propiedades de empaquetamiento que afecta las interacciones entre moléculas vecinas que al final puede repercutir en las propiedades mecánicas de la bicapa. La figura 5.8 muestra en verde y azul las curvas de fuerza típicas para SLBs de DMPC en solución de 10

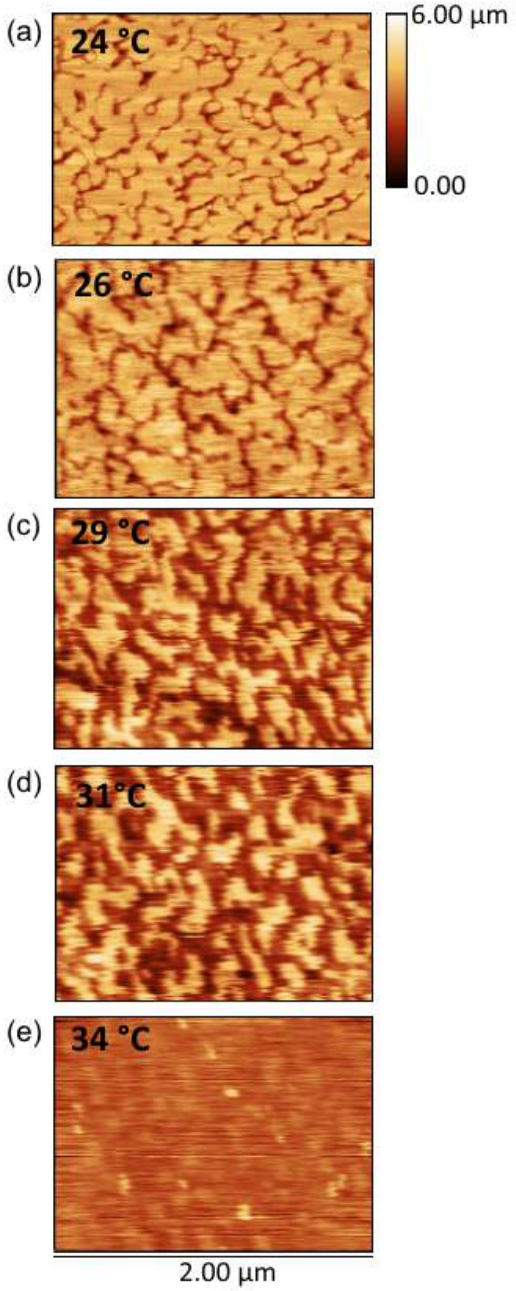

Figura 5.7: Imágenes de AFM de la transición de fase de una SLB de DMPC. Secuencia de imágenes de una bicapa lipídica soportada de DMPC para diferentes temperaturas. Todas las imágenes fueron tomadas en modo contacto aplicando una fuerza de 1 nN y muestran la formación de dominios de diferente altura durante la transición de fase para una SLB en 10 mM de NaCl calentando la muestra de 24 a 34 °C.

y 100 mM de NaCl respectivamente a 23 °C. En ella se puede observar la fuerza de ruptura para una bicapa en estado gel además de la fuerza de adhesión entre la punta y la bicapa que se presenta durante la retracción. La fuerza a la cual la ruptura ocurre es la máxima fuerza que la bicapa puede soportar antes de se produzca una deformación plástica, reflejo de las fuerzas laterales entre las moléculas. Un conjunto sucesivo de curvas en lugares diferentes de la bicapa permite crear un histograma para las curvas de fuerza. Dichos histogramas se construyeron teniendo en cuenta sólo aquellas curvas de fuerza que presentan un solo salto durante la deflexión para el caso de la fuerza de ruptura. Aquellas que no lo muestran pueden corresponder a un registro hecho sobre el sustrato. Por el contrario, algunas presentan dos valores para la fuerza de ruptura, fenómeno que puede deberse a la formación de una bicapa provisional sobre la punta del cantilever y que llevan a ser registros descartados. Este fenómeno ha sido reportado como una consecuencia de la interacción de la punta de nitruro de silicio con la bicapa, especialente en condiciones de alta carga iónica [73].

Los histogramas mostrados corresponden a 3 bicapas diferentes con un registro de 100 curvas cada una a 23 °C. Como puede observarse y como ha sido reportado previamente [64], el incremento en la concentración iónica produce un leve incremento en la fuerza necesaria para romper la bicapa. La fuerza de ruptura para las bicapas en solución de 10 mM de NaCl es de $4{,}63 \pm 0{,}86$ nN. Un incremento en la carga iónica a 100 mM de NaCl produce un incremento de la fuerza necesaria para penetrar la bicapa a valores de $6{,}00 \pm 1{,}14$ nN. La estructura de la bicapa es el resultado de las interacciones entre las moléculas que la conforman. Aparte de las interacciones hidrofóbicas entre las cadenas hidrocarbonadas vecinas, la cabeza contiene grupos que tienen alta electronegatividad (óxigeno del grupo fosfato) y ausencia de ésta (amina cuaternaria en la colina). Esto conlleva a dos clases de interacciones: Primero, la formacion de puentes de agua entre los grupos cargados negativamente, una molécula de agua se une simultáneamente a dos moléculas de fosfatidilcolina. Cada molécula de DMPC es unida en promedio a 4.5 moléculas de agua [82]. Segundo: pares de carga (colina-fosfato, colina-carbonilo), formados cuando los grupos con carga opuesta están localizados a una distancia no mayor a

$4\mathring{A}$ [83]. Estas interacciones dan lugar a una red de uniones responsable de la estabilidad de la membrana y del repentino salto en la curva de deflexión. Sin embargo esto no explica la dependencia del valor de la fuerza de ruptura con la carga iónica. Garcia-Manyes y colaboradores sugieren que, teniendo en cuenta que la punta de nitruro de silicio posee una carga negativa y que el potencial ζ incrementa al incrementar la carga iónica, la interacción de la superficie de la bicapa con el cantilever pasa de ser un proceso de repulsión a tener una fuerza de atracción, lo cual desencadenaría una mayor resistencia de la bicapa a la ruptura [64].

Análogamente, la fuerza de adhesión también se ve afectada por el incremento de la concentración iónica en la muestra, aunque en este caso el cambio se hace más

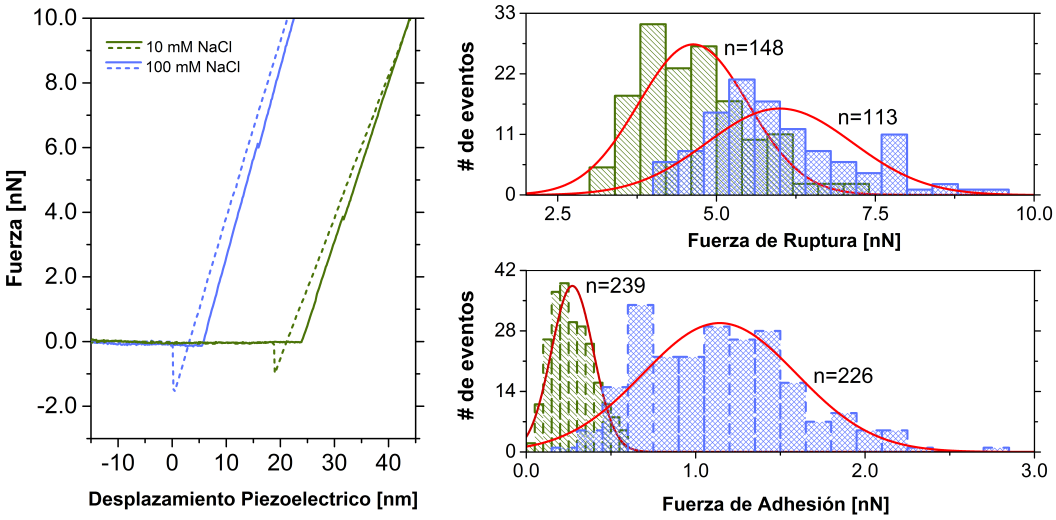

Figura 5.8: Fuerza de ruptura y fuerza de adhesión SLBs de DMPC. Derecha: curvas de fuerza obtenidas para una bicapa soportada de DMPC en 10 (verde) y 100 (azul) mM de NaCl. En línea continua la curva de deflexión donde se puede observar un pequeño salto correspondiente a la fuerza de ruptura de la bicapa. En línea puntada la curva de retracción y la fuerza de adhesión producto de la interacción entre la punta y la muestra. Izquierda: Histogramas correspondientes a los valores de fuerza de ruptura y de adhesión obtenidos de SLBs de DMPC a 10 y 10 mM de NaCl. La bicapa fue soportada en mica y las mediciones se realizaron a T=23 °C. Los histogramas fueron ajustados a una distribución normal (linea roja) con $x = 0{,}27 \pm 0{,}12$ nN y $1{,}14 \pm 0{,}45$ nN para la fuerza de adhesión a 10 y 100 mM de NaCl respectivamente; y $4{,}63 \pm 0{,}86$ nN y $6{,}00 \pm 1{,}14$ nN para la fuerza de ruptura.

evidente. La fuerza de adhesión para las bicapas en solución de 10 mM de NaCl es de $0{,}27 \pm 0{,}12$ nN. Un incremento en la carga iónica a 100 mM de NaCl produce un incremento de la fuerza de interacción entre la muestra y la punta a $1{,}14 \pm 0{,}45$ nN. Dado que el incremento de la carga iónica produce un aumento del potencial ζ, lo cual a su vez repercute en la fuerza de atracción entre la bicapa y la punta, tiene sentido que haya un incremento en la fuerza de adhesión, como respuesta a una mayor fuerza de atracción producto de aumentar la concentración de catiónes en el medio.

5.2.4. Difusión de TTC en SLBs de DMPC y su Efecto en las Propiedades Mecánicas

Ahora, la estructura y propiedades de las membranas biológicas pueden verse afectadas por la interacción con diferentes drogas. El espesor de la bicapa, la temperatura de transición, el potencial de membrana y las características mecánicas son algunos ejemplos de cualidades que pueden modificarse. Esto ha llevado a que actualmente exista un gran interés en comprender cómo ocurren este tipo de interacciones a nivel molecular. Diversos estudios se han enfocado en el efecto que diferentes drogas tienen en las propiedades termodinámicas de las membranas. Por ejemplo, la TTC tiene un efecto fluidizante al causar desestabilización de la estructura lipídica, efecto que puede verse haciendo un estudio de calorimetría. La figura 5.5 muestra los perfiles calorimétricos para SUVs de DMPC con y sin presencia de TTC. Se puede observar cómo la adición de 25 mM de TTC produce un corrimiento en la transición de fase de los liposomas cerca de 10 °C lo que sugiere un efecto de desorden de las cadenas hidrocarbonadas. Se puede ver también la aparición de un hombro al lado del pico principal. Previamente se ha reportado que este efecto aumenta con el aumento de la concentración de TTC y sugiere la formación de dos fases, una rica y otra pobre en anestésico [84].

Estudiar cómo afecta la presencia de este tipo de drogas a las membranas biologías es de gran importancia para comprender el mecanismo de acción de la anestesia. SLBs de DMPC en 100 mM de NaCl previamente formadas fueron incubadas

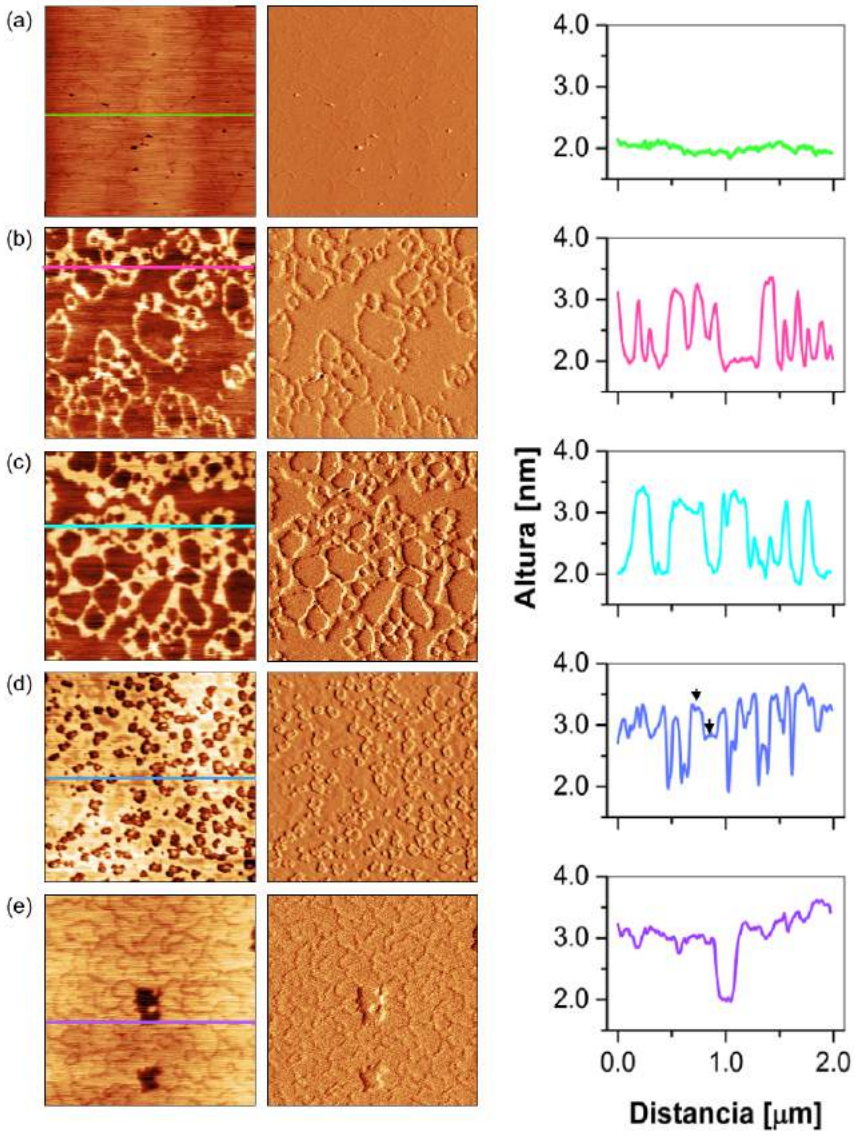

Figura 5.9: Difusión de TTC en SLBs de DMPC. Izquierda: Imágenes de AFM topográficas y de deflexión para el proceso de difusión de tetracaína en bicapas soportadas de DMPC. La SLB fue formada sobre mica a partir de SUVs de DMPC en 100 mM de NaCl (a). Posteriormente se adicionó 25 mM de TTC durante diferentes tiempos de incubación: (b) 1 min, (c) 3 min, (d) 5 min, (e) 10 min. Derecha: Perfiles de altura para cada una de las líneas marcadas en las imágenes de AFM. El perfil de la figura *d* muestra marcadas con flechas diferentes alturas para las zonas con contenido de TTC.

con 25 mM de TTC a fin de estudiar el efecto de este fármaco en las propiedades mecánicas. La figura 5.9 muestra las imágenes de AFM topográficas y de deflexión del proceso de difusión del anestésico a diferentes tiempos de incubación. En ella se puede observar que a partir de una bicapa pura de DMPC (a), la adición de TTC provoca la aparición de dominios de mayor altura que se van extendiendo sobre toda la bicapa (b-d). Un rasgo a destacar es que durante el proceso de difusión, los dominios presenta dos diferentes alturas con respecto a la bicapa libre de anestésico, este efecto se puede observar más fácilmente en el perfil de alturas de la figura *d*, donde se marca con flechas dos elevaciones diferentes para zonas con contenido de TTC. La formación de regiones con mayor y menor contenido de anestésico puede ser una posible explicación para la aparición del hombro en el perfil calorimétrico de la figura 5.5. Para un tiempo $t = 10$ min se puede observar un efecto de saturación, en el cual la totalidad de la bicapa se muestra plana, con algunos pequeños defectos remanentes y la formación de fronteras resultado del crecimiento de los dominios durante el proceso de difusión de la TTC. Otro punto a tener en cuenta es que la difusión del anestésico muestra dominios de mayor altura con respecto a la bicapa. Se podría pensar que dado que el efecto de la tetracaína es el de fluidizar la bicapa, proceso que suele ser el resultado del desorden en las colas de los lipidos, la difusión resultaría en dominios de menor altura. Pequeñas moléculas, como los alcoholes de cadena corta, pueden actuar como anestésicos. Se sabe que los alcoholes causan cambios en la transición de fase de las membranas y provocan la formación de dominios de espesor menor al producirse una intercalación entre las cadenas hidrocarbonadas de las capas inferior y superior de la bicapa [65], además la adición de los alcoholes incrementa significativamente el área/lípido. Trabajos en SLBs han mostrado que la adición de halotano o etanol inducen cambios estructurales en la bicapa, causando una disminución en el espesor de la bicapa en fase fluida y la formación de dominios de menor espesor en la fase gel [65, 72]. Esto es contrario a lo que sucede ante la adición de tetracaína, la cual a pesar de tener un efecto anestésico no actúa de la misma manera que el etanol o el halotano. Las imágenes de AFM muestran que la incorporación de este fármaco en la bicapa produce un ensanchamiento de los

dominios. Esto puede deberse al tamaño de la molécula que al insertarse en la bicapa produce un desorden no sólo de las colas de los fosfolípidos. Trabajos de dinámica molecular han mostrado que la molécula de TTC se posiciona entre la región superior de las colas de la bicapa y la cabeza [85, 86] lo cual puede causar un aumento en el espesor de la bicapa en respuesta al cambio de volumen que produce la inserción de dicho fármaco.

Teniendo en cuenta que las propiedades mecánicas guardan relación con el orden molecular y éste a su vez se ve afectado por la interacción con fármacos, se procedió a estudiar cómo la adición de tetracaína en bicapas soportadas puede modificar su fuerza de ruptura y de adhesión. Para ello, a SLBs de DMPC en 100 mM de NaCl previamente formadas sobre mica se les adicionó un volumen de 25 mM de TTC y se dejó incubar durante un tiempo de 10 min, esto considerando alcanzar la saturación del fármaco en la membrana. Posteriormente se procedió a hacer un conjunto sucesivo de 100 curvas de fuerza en lugares diferentes de la bicapa a T=23 °C. A partir de estas curvas se construyeron los histogramas de la figura 5.10 teniendo en cuenta las mismas consideraciones para las bicapas libres de solvente. Los histogramas mostrados corresponden a 3 bicapas diferentes. La incorporación de la tetracaína produce un cambio significativo en las fuerzas en comparación con los valores registrados para SLBs de DMPC puras mostrados en las bandas verticales. La adición del anestésico produce una disminución en la fuerza de ruptura, en tanto que la fuerza de adhesión incrementa considerablemente con valores más dispersos; existe un incremento en la fuerza requerida para separar la punta de la bicapa, pero este fenómeno no sucede en todas las mediciones y esto puede deberse a la formación de dominios con diferente contenido de TTC.

Como se mencionó anteriormente, el papel de las interacciones moleculares son cruciales en la estabilidad de la bicapa. Se puede pensar entonces, que si la molécula de anestésico al insertarse en la bicapa está rompiendo parcialmente las uniones entre las cabezas de los lípido, entonces las propiedades mecánicas de la bicapa se verán afectadas. La fuerza de ruptura disminuye ante la difusión de TTC a valores de $3{,}54 \pm 1{,}3$ nN, mucho menores a los registrados para una SLB pura. El incremento en la fuerza de adhesión al adicionar TTC a valores de $1{,}85 \pm 0{,}94$ nN

es consistente con lo sucedido al adicionar halotano o etanol, donde se cree que este efecto es una respuesta a la disminución de las fuerzas electrostáticas al ser reemplazadas las moléculas de agua por las del anestésico. Estudios de dinámica molecular mostraron que la tetracaína no sólo establece un gran numero de puentes de hidrogeno con los grupos fosfato y carbonilo de la membrana al ubicarse en la región superior de las colas de la bicapa y la cabeza, además el potencial electrostático en el centro de la bicapa aumenta [86]. Este incremento en el potencial puede ser el que causante del aumento en la fuerza de interacción entre la punta (cargada negativamente) y la muestra una vez la bicapa ha sido perforada.

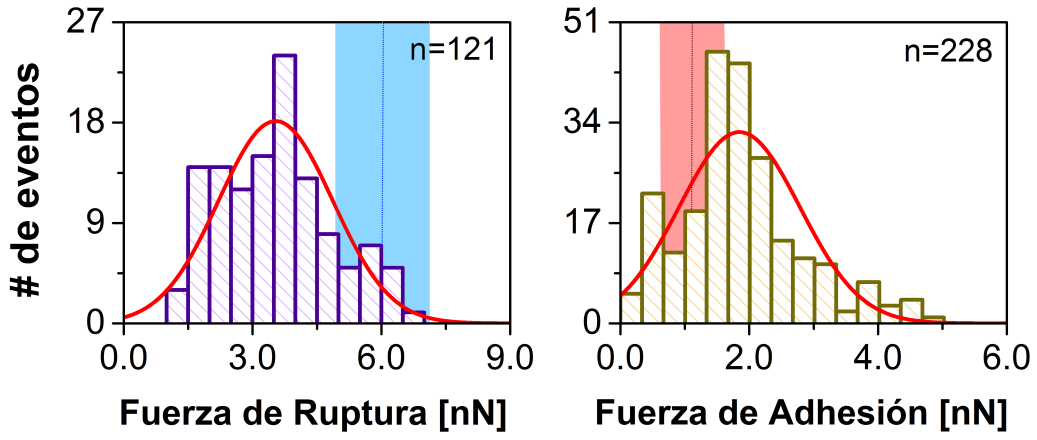

Figura 5.10: Fuerza de ruptura y fuerza de adhesión SLBs de DMPC+TTC. Histogramas correspondientes a los valores de fuerza de ruptura y de adhesión obtenidos de SLBs de DMPC a 100 mM de NaCl e incubadas durante 10 min con 25 mM de tetracaína. La bicapa fue soportada en mica y las mediciones se realizaron a T=23 °C. Los histogramas fueron ajustados a una distribución normal (linea roja) con $x = 3{,}54 \pm 1{,}3$ nN y $1{,}85 \pm 0{,}94$ nN para la fuerza de ruptura y la fuerza de adhesión respectivamente. Las bandas verticales muestran la media y desviación estándar para los histogramas de fuerza de ruptura (azul) y fuerza de adhesión (rosa) para SLBs de DMPC puras en 100 mM de NaCl.

5.2.5. Efecto de la Temperatura en las propiedades mecánicas de las SLBs de DMPC

El estudio de las propiedades de las bicapas es crucial para comprender el papel que desempeñan las membranas. Cambios en el espesor, el área por lípido, la permeabilidad entre otros parámetros son gobernados por la temperatura. En efecto, las membranas poseen transiciones de fase y durante este proceso existe un reordenamiento de las moléculas que puede afectar sus propiedades mecánicas. Se debe considerar entonces el cambio en la fuerza de ruptura y de adhesión al someter a una bicapa a una transición de fase. Para esto se depositaron SLBs en concentración de 100 mM de NaCl. Una vez se verificó su correcta formación, un conjunto de 50 curvas de fuerza consecutivas fueron tomadas en lugares diferentes de la bicapa. A continuación, la temperatura fue incrementada 1 °C con un tiempo de estabilización de 5 min. Entonces, se realizó un nuevo set de 50 curvas. Este proceso se repitió variando la temperatura desde 23 a 34 °C para un mínimo de 3 y un máximo de 5 SLBs por temperatura. Lo anterior se hizo teniendo en cuenta que mediante las imágenes de las figuras 5.6 y 5.7 se determinó una temperatura de transición al rededor de los 28-29 °C para las SLBs libres de anestésico. Análogamente, este mismo proceso se repitió en SLBs incubadas durante 10 min con 25 mM de TTC.

Previamente ha sido reportado en la literatura un mínimo durante la transición en un rango de $\sim$ 25-33 °C [64,79]. La figura 5.11 muestra la evolución de la fuerza de ruptura para tres experimentos independientes (diferente punta y diferente bicapa). Cada punto en la gráfica corresponde a la media de la distribución Gaussiana y la banda corresponde a la desviación estándar. En azul los datos correspondientes a SLBs de DMPC en 100 mM de NaCl muestran que, ante un incremento de la temperatura, la fuerza de ruptura alcanza un mínimo alrededor de los 28 °C. Esta temperatura corresponde a la de la transición de fase encontrada mediante las imágenes de AFM y la medición del cambio de altura en los perfiles de los depósitos mostrados en secciones anteriores. A pesar de estar en régimen de transición, el salto en la curva de deflexión sigue estando presente. Esto sugiere que a pesar de la fuerza de ruptura disminuye, la membrana no pierde su compacidad. Un

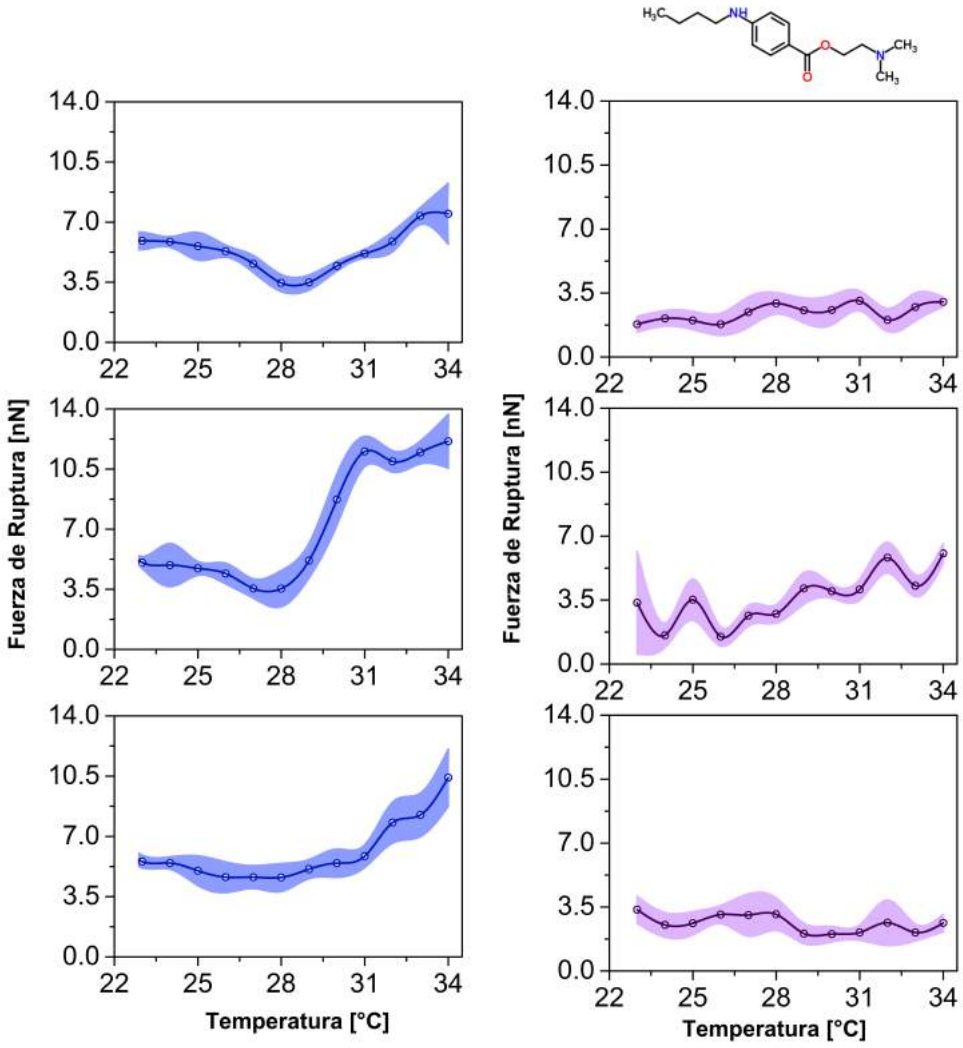

Figura 5.11: Efecto de la temperatura en la fuerza de ruptura de SLBs de DMPC con y sin TTC. Dependencia de la fuerza de ruptura de una SLB de DMPC soportada en mica con la temperatura para tres experimentos independientes. Izquierda: en azul SLBs de DMPC puras, se puede observar un mínimo en la fuerza de ruptura cerca a la temperatura de transición. Derecha: arriba, estructura química de la molécula de tetracaína; en morado, mediciones en SLBs de DMPC incubadas durante 10 min con 25 mM de TTC, la fuerza de ruptura es menor en todo el rango de temperatura con valores similares a los de bicapas de DMPC puras durante la transición. Todos los experimentos se llevaron a cabo en SLBs en solución de 100 mM de NaCl.

aumento mayor en la temperatura del sistema muestra un aumento en los valores de fuerza de ruptura. En resumen, para temperaturas por debajo y por encima de la transición de fase los valores de la fuerza de ruptura son mayores, en tanto que a temperaturas al rededor de T_m (28 °C) la fuerza disminuye alcanzando un valor mínimo.

Ahora, se evaluó el efecto que tiene la temperatura en SLBs de DMPC con tetracaína. La figura 5.11 muestra en morado tres experimentos independientes. Al igual que en el caso anterior, cada punto en la gráfica corresponde a la media de los datos para cada temperatura y la franja lila corresponde a la desviación estándar. Se puede observar que la fuerza de ruptura de la bicapa es menor para todo el rango de temperatura, con valores similares a los alcanzados por las SLBs libres de anestésico en el régimen de transición. Esto coincide con el efecto fluidizante que tiene la TTC en sistemas liposomales, sin embargo se debe tener en cuenta que probablemente la temperatura a la cual las SLBs con TTC tienen su transición de fase es menor al rango de temperaturas en que se desarrolla este experimento, es decir, la bicapa siempre se encuentra en estado fluido. Una estructura más compacta resulta en un aumento del parámetro de orden y una mayor interacción entre los grupos vecinos. Esto explica mayor resistencia en la bicapa durante la fase gel, y un menor valor en la fuerza de ruptura durante la transición o durante la interacción con la TTC, en concordancia con el aumento en el área/lípido de las moléculas de la membrana. Durante la transición de fase la bicapa sufre un proceso de desordenamiento de las cadenas hidrocarbonadas que repercute en el espesor, la conductividad, la permeabilidad, la capacidad calorífica, entre otras propiedades. El efecto de la tetracaína es similar al efecto que tiene la transición de fase, produciendo una fluidización de la bicapa y mostrando una disminución en la fuerza necesaria para romperla.

Considerando las mediciones de la fuerza de adhesión, estudios previos en SLBs de DPPC mostraron un incremento en la fuerza de adhesión en la bicapa al pasar de fase gel a fase fluida [68]. Se puede observar que para bicapas soportadas de DMPC puras a temperaturas en fase gel, la fuerza se mantiene constante en valores inferiores a los 1.0 nN, sin embargo, el incremento de la temperatura

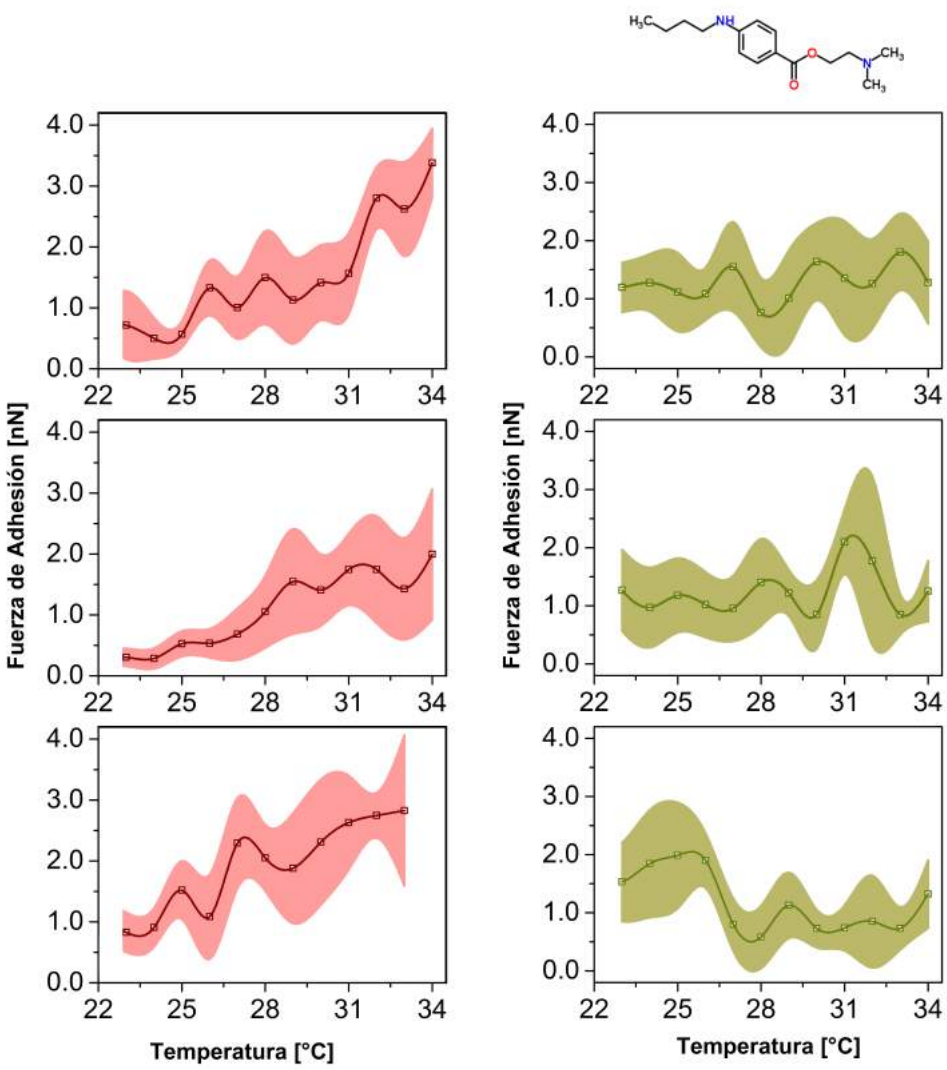

Figura 5.12: Efecto de la temperatura en la fuerza de adhesión de SLBs de DMPC con y sin TTC. Dependencia de la fuerza de adhesión de una SLB de DMPC soportada en mica con la temperatura para tres experimentos independientes. Izquierda: en granate SLBs de DMPC puras, se puede observar un incremento en la fuerza de adhesión conforme se aumenta la temperatura. Derecha: arriba, estructura química de la molécula de tetracaína; en verde, mediciones en SLBs de DMPC incubadas durante 10 min con 25 mM de TTC, la fuerza de adhesión es mayor en valores iniciales de temperatura y similares a los de bicapas de DMPC puras durante la transición. Todos los experimentos se llevaron a cabo en SLBs en solución de 100 mM de NaCl.

conduce a un incremento en la fuerza de adhesión registrada, ver figura 5.12, *granate*. El rango de temperatura seleccionado no permite determinar si una vez la bicapa se encuentre en su totalidad en fase fluida, los valores en la fuerza de adhesión dejarán de aumentar y se mostrarán menos dispersos. El aumento en la temperatura incrementa la movilidad, esto incrementa en número de moléculas en contacto con la punta, lo que repercute finalmente en una mayor fuerza de adhesión [68]. Para las bicapas de DMPC con tetracaina, figura 5.12 *verde*, los valores iniciales de fuerza de adhesión son mayores a los registrados por las bicapas libres de anestesico ($\sim$ 1.5 nN). Aparentemente, la adición de TTC en la bicapa incrementa la fuerza de interacción entre la punta y la muestra a valores similares a los encontrado durante la transición de fase. Este comportamiento se asemeja al encontrado en bicapas de DPPC con halotano [65, 72], donde los valores de fuerza de adhesión de las bicapas con el anestésico son comparables a los valores en régimen de transición. La incorporación de la TTC produce un efecto similar al de la temperatura durante la transición de fase, fluidizando la membrana e incrementando la fuerza de adhesión. Sin embargo, la temperatura ya no parece tener un efecto adicional en la fuerza de interacción entre la muestra y la punta. Esto se puede deber a que el desorden producido por la TTC en la bicapa ha movido la transición de fase a temperaturas menores a 23 °C, la bicapa ya se encuentra en estado fluido y un reordenamiento de las moléculas de fosofolípidos ya no es posible.

Capítulo 6

Conclusiones

En este trabajo se investigó la capacidad de las membranas artificiales de propagar información, en forma de una perturbación mecánica, asociada al estado de los lípidos. Se diseñó y construyó un sistema sobre el cual se puede crear una bicapa lipídica artificial del orden de centímetros, y posteriormente se calentó una pequeña zona la membrana a fin de producir una transición de fase localizada. En cuanto a los experimentos hechos mediante la técnica de microscopía de fuerza atómica, se estudió la dependencia que tienen las bicapas lipídicas soportados con la temperatura y la interacción con la tetracaína durante la transición de fase. Los resultados permiten concluir que:

- La propagación de ondas en las bicapas no es exclusiva a un cambio de estado fluido-gel como inicialmente se planteó en el modelo del solitón. Una transición de fase gel-fluido localizada puede alterar el estado de la bicapa y esta perturbación puede propagarse a lo largo de la membrana.

- El ajuste de las condiciones experimentales al modelo del solitón muestra que durante un cambio de estado de gel-fluido se producen solitones negativos, en forma de una comprensión de la bicapa que tiene un menor espesor en la fase fluida.

- La fuerza de ruptura y de adhesión de las bicapas lipídicas tienen una dependencia con la carga iónica, efecto que puede deberse al apantallamiento que los iones producen en la carga electrostática de la membrana.

- Durante la transición de fase, las propiedades mecánicas de la bicapa se ven afectadas. La fuerza de ruptura de la bicapa muestra un mínimo, indicando una disminución de la compacidad de la bicapa. En tanto, la fuerza de adhesión incrementa con el aumento de la temperatura, resultado de un mayor numero de interacciones entre las moléculas y la punta.

- El proceso de difusión de la tetracaína en la bicapa lipídica soportada parte de la formación de dominios de mayor altura que van incrementando su tamaño hasta un proceso de saturación. Se cree que el aumento en el espesor es el resultado de la compensación en el volumen de la bicapa al insertarse las moléculas del anestésico entre las colas y las cabezas de los lípidos.

- La tetracaína tiene, en las propiedades mecánicas de la bicapa, un efecto fluidizante similar al que tiene la temperatura, con valores de fuerza de ruptura y de adhesión similares a los que muestran las membranas puras durante la transición de fase.

Las conclusiones anteriores tienen implicaciones en la concepción de algunos procesos biológicos. La propagación del potencial de acción y el fenómeno de la anestesia pueden verse influidos por los cambios termodinámicos y mecánicos que ocurren en las bicapas y que guardan una estrecha relación con la transición de fase de los lípidos que conforman las membranas. Sin embargo, la simplicidad de los modelos presentados en este trabajo hace necesario hacer una exploración más a fondo que amplíe el conocimiento sobre las procesos que ocurren a nivel molecular en las membranas de las células.

Capítulo 7

Perspectivas

Las bicapas modelo son consideradas una buena herramienta para explorar los procesos que ocurren en las membranas celulares. Sin embargo, la propagación de perturbaciones y el cambio en las propiedades mecánicas explorados en este trabajo están limitados a sistemas muy simplistas de sólo una especie lipídica, la interacción con un fármaco y un rango de temperatura muy acotado. Es necesario explorar sistemas más complejos, con mezclas de lípidos, otro tipo de anestésicos y en rangos de temperatura mayores a fin de evaluar la robustez de los resultados aquí obtenidos. Por el momento, se está trabajando en el impacto que tiene la TTC en la propagación de las perturbaciones mecánicas en la bicapa, esto bajo la consideración del efecto fluidizante que tienen los anestésicos. Estudios preliminares de DSC mostraron que una concentración de 25 mM de tetracaína y 5 mM de pentobarbital bloquea la transición de fase en el sistema de lípidos-solventes usado en la primera parte de esta tesis. Además, trabajos del grupo de investigación sugieren que el pentobarbital, siendo un anestésico general, en acción conjunta con la tetracaína mueve la transición de fase de las vesículas lipídicas a temperaturas menores. Sería interesante explorar el proceso de difusión mediante microscopía de fuerza atómica de éste y otros sistemas.

Bibliografía

[1] W. Pferrer. *Osmotische Untersuchngen, Studien zur Zellmechanik.* W. Engelmann, 1 edition, 1877.

[2] E. Overton. About the osmotic properties of livin plants and animal cell. *Vierteljahresschrift der Naturforschende Gesselchaft, Zurich*, 40:159–201, 1895.

[3] J. F. Danielli and H. Davson. A contribution to the theory of permeability of thin films. *J. Cell Comp. Physiol*, 5:595–508, 1935.

[4] S. J. Singer and G. L. Nicolson. The fluid mosaic model. *Science*, 175:720–731, 1972.

[5] A. Blicher. *Electrical aspects of lipid membranes.* PhD thesis, University of Copnhagen, Denmark, 2011.

[6] R. B. Gennis. Biomembranes - molecular structure and function. pages 36–84. Springer New York, 1989.

[7] T. Heimburg. *Thermal Biophysics of membranes.* Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Germany, 2007.

[8] H. Ebel, P. Grabitz, and T. Heimburg. Enthalpy and volume changes in lipid membranes. i. the proportionality of heat and volume changes in the lipid melting transition and its implication for the elastic constants. *J. Phys. Chem*, 105:7353–7360, 2001.

[9] T. Heimburg and A. D. Jackson. *Thermodinamics of the nervous impulse.* Wiley and Sons, 2008.

[10] T. Heimburg and A. D. Jackson. On soliton porpagation in biomembranes an nerves. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102(28):9790–9795, 2005.

[11] T. Heimburg. Mechanical aspects of membrane thermodynamics, estimation of the mechanical properties of lipid membranes close to the chain melting transition from calorimetry. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes*, 1415:147–162, 1998.

[12] A. L. Hodgkin and A. F. Huxley. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol*, 117:500–544, 1952.

[13] R. Appali, U. van Rienen, and T. Hemimburg. *A comparison of the Hodgkin-Huxley model and the soliton theroy for the action potential in nerves*, volume 16 of *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*. Academic Press, 2012.

[14] K. Iwasa and I. Tasaki. Mechanical changes in squid giant axons associated with production of action potentials. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 95(3):1328–1331, 1980.

[15] K. Iwasa, I. Tasaki, and R. C. Gibbons. Swelling of nerve fiber associated with action potentials. *Science*, 210:338–339, 1980.

[16] G. H. Kim, P. Kosterin, A. L. Obaid, and B. M. Salzberg. A mechanical spike accompanies the action potential in Mammalian nerve terminals. *Biophys. J*, 92(9):3122–3129, 2007.

[17] K. Kaufmann. *On the role of the phospholipid membrane in free energy coupling.* 1st edn. Brasil: Caruaru, 1989.

[18] K. Kaufmann. *Action potentials and electrochemical coupling in the macroscopic chiral phospholipid membrane.* 1st edn. Brasil: Caruaru, 1989.

[19] I. Tasaki, K. Kusano, and P. M. Byrne. Rapid mechanical and thermal changes in the garfish olfactory nerve associated with a propagated impulse. *Biophys. J*, 55:1033–1040, 1989.

[20] I. Tasaki, K. Kusano, and P. M. Byrne. Mechanical and thermal changes in the torpedo electric organs associated with its postsynaptic potentials. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 215:654–658, 1995.

[21] B. C. Abbott, A. V. Hill, and J. V. Howarth. The positive and negative heat production associated with a nerve impulse. *Proc Biol Sci*, 148(931):149–87, 1958.

[22] J. V. Howarth, R. D. Keynes, and J. M. Ritchie. The origin of the initial heat associated with a single impulse in mammalian non-myelinated nerve fibres. *J. Physiol.*, 194(3):745–93, 1968.

[23] K. R. Srinivasan, R. L. Kay, and J. F. Nagle. Pressure dependence of the lipid bilayer phase transition. *Biochemistry*, 13(17):3494–3496, 1974.

[24] N. I. Liu and R. L. Kay. Redetermination of the pressure dependence of the lipid bilayer phase transition. *Biochemistry*, 16(15):3484–6, 1977.

[25] E. Evans and R. Kwok. Mechanical calorimetry of large dimyristoylphosphatidylcholine vesicles in the phase transition region. *Biochemistry*, 21(20):4874–4879, 1982.

[26] D. Needham and E. Evans. Structure and mechanical properties of giant lipid (DMPC) vesicle bilayers from 20 degrees C below to 10 degrees C above the liquid crystal-crystalline phase transition at 24 degrees C. *Biochemistry*, 27(21):8261–8269, 1988.

[27] P. L. Chong, R. Ravindra, M. Khurana, V. English, and R. Winter. Pressure perturbation and differential scanning calorimetric studies of bipolar tetraether liposomes derived from the thermoacidophilic archaeon sulfolobus acidocaldarius. *Biophys. J.*, 89(3):1841 – 1849, 2005.

[28] J. F. Nagle and D. A. Wilkinson. Lecithin bilayers. density measurement and molecular interactions. *Biophys. J.*, 23(2):159 – 175, 1978.

[29] J. F Nagle. Area/lipid of bilayers from NMR. *Biophys. J.*, 64:1476–1481, 1993.

[30] A. Blicher, K. Wodzinska, M. Fidorra, M. Winterhalter, and T. Heimburg. The temperature dependence of lipid membrane permeability, its quantized nature, and the influence of anesthetics. *Biophys.l J.*, 96(11):4581–4591, jun 2009.

[31] S. Mitaku and T. Date. Anomalies of nanosecond ultrasonic relaxation in the lipid bilayer transition. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes*, 688(2):411–421, jun 1982.

[32] B. Lautrup, R. Appali, A. D Jackson, and T. Heimburg. The stability of solitons in biomembranes and nerves. *Eur. Phys. J. E*, 34(6):1–9, 2011.

[33] C. S. Spyropoulos. Initiation and abolition of electric response of nerve fiber by thermal and chemical means. *Am. J. Physiol.*, 200(2):203–208, 1961.

[34] H. Tyäuble, M. Teubner, P. Woolley, and H. Eibl. Electrostatic interactions at charged lipid membranes. I. Effects of ph and univalent cations on membrane structure. *Biophys. Chem.*, 4(4):319–342, 1976.

[35] W. H. Moolenaar and I. Spector. The calcium action potential and a prolonged calciym dependent after-hyperpolarization in mouse neroblastoma cells. *J. Physiol.*, 292:297–306, 1979.

[36] Y. Kobatake, I. Tasaki, and A. Watanabe. Phase transition in membrane with reference to nerve excitation. *Adv. Biophy.*, 2:1–31, 1971.

[37] J. Griesbauer, S. Bössinger, A. Wixforth, and M. F. Schneider. Propagation of 2D pressure pulses in lipid monolayers and its possible implications for biology. *Phys. Rev. Lett.*, 108(19):198103, 2012.

[38] E. Villagran, A. Ludu, R. Hustert, P. Gumrich, and T. Heimburg. A. D. Jackson. Periodic solution and refractory periods in the soliton theroy for nerves and the locust femoral nerve. *Biophysical Chemistry*, 153(2-3):159–167, 2011.

[39] H. H. Meyer. Zur theorie der alkoholnarkose. iii. der einfluss wechselender temperatur auf wirkungs-starke und teilungs koefficient der nalkolicka. *Arch. Exp. Patol. Pharmacol.*, 154:338–346, 1901.

[40] C. E. Overton. *Studien uber Narkose, zugleich ein Beitrag zur allgemeinen Pharmakologie.* Fisher, Jena., 1901.

[41] R. S. Cantor. Receptor desensitization by neurotransmitters in membranes. are neurotransmitters the endogenous anesthetics. *Biochemistry*, 42(41):11891–11897, 2003.

[42] S. Shrivastava, K. H. Kang, and M. F. Schneider. Solitary shock waves and adiabatic phase transition in lipid interfaces and nerves. *Phys. Rev. E.*, 91(1):012715, 2015.

[43] J. Griesbauer, A. Wixforth, and F. Schneider. Wave propagation in lipid monolayers. *Biophys. J.*, 97(10):2710–2716, 2009.

[44] S. Shrivastava and M. F. Schneider. Opto-Mechanical Coupling in Interfaces under Static and Propagative Conditions and Its Biological Implications. *PLOS ONE*, 8(7), 2013.

[45] S. Shrivastava and M. F. Schneider. Evidence for two-dimensional solitary sound waves in a lipid controlled interface and its implications for biological signalling. *J. R. Soc. Interface*, 11(97):20140098, Jun 2014.

[46] M. Montal and P. Muller. Formation of bimolecual membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 69:3561–3566, 1972.

[47] A. Honigmann. *Simultaneous optical and electrical recordings in horizontal lipid bilayers. Membrane dynamics and protein interactions.* PhD thesis, University Osnabrueck, June 2010.

[48] U. Peterson, D. A. Mannock, R. N. Lewis, P. Pohl, R. N. McElhaney, and E. E. Pohl. Origin of membrane dipole potential: Contribution of the phospholipid fatty acid chains. *Chemistry and Physics of Lipids*, 117:19–27, 2002.

[49] L. Stryer J. M. Berg, J. L. Tymoczko. *Biochemistry.* New York: W H Freeman, 2002.

[50] J. Yang. and J. Appleyard. The main phase transition of mica-supported phosphatidylcholine membranes. *The Journal of Physical Chemistry B*, 104(34):8097–8100, 2000.

[51] T. J. McIntosh, S. A. Simon, and R. C. MacDonald. The organization of n-alkanes in lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes*, 597(3):445 – 463, 1980.

[52] J. M. Pope and D. W. Dubro. The interaction of n-alkanes and n-alcohols with lipid bilayer membranes: a 2h-nmr study. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes*, 858(2):243 – 253, 1986.

[53] K. Lohner. Effects of small organic molecules on phospholidpid phase transitions. *Chem. Phys. Lipids*, 57(2):341 – 362, 1991.

[54] M. Darvas, P. N. Hoang, S. Picaud, M. Sega, and P. Jedlovszky. Anesthetic molecules embedded in a lipid membrane: a computer simulation study. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 14:12956–12969, 2012.

[55] B. Fabian, M. Darvas, S. Picaud, M. Sega, and P Jedlovszky. The effect of anaesthetics on the properties of a lipid membrane in the biologically relevant phase: a computer simulation study. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 17:14750–14760, 2015.

[56] T. Brumm, K. Jørgensen, O. G. Mouritsen, and T. M. Bayerl. The effect of increasing membrane curvature on the phase transition and mixing behavior of a dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine/ distearoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine lipid mixture as studied by fourier transform infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry. *Biophys. J.*, 70(3):1373 – 1379, 1996.

[57] V. P. Ivanova and T. Heimburg. Histogram method to obtain heat capacities in lipid monolayers, curved bilayers, and membranes containing peptides. *Phys. Rev. E*, 63:041914, Mar 2001.

[58] R. Appali, S. Petersen, and U. van Rienen. A comparasion of hodgkin-huxley and soliton neutral theories. *Adv. Radio Sci*, 8:75–79, 2010.

[59] O. Albrecht, H. Gruler, and E. Sackmann. Polymorphism of phospholipid monolayers. *Journal de Physique*, 39(3):301–313, 1978.

[60] M. P. Mingeot-Leclercq, M. Deleu, R. Brasseur, and Y. F. Dufrêne. Atomic force microscopy of supported lipid bilayers. *Nature Protocols*, 3(10):1654–1659, 2008.

[61] P. Facci and A. Alessandrini. Phase transitions in Supported Lipid Bilayers studied by AFM. *Soft Matter*, 10:7145–7164, 2014.

[62] E. I. Goksu, J. M. Vanegas, C. D. Blanchette, W. C. Lin, and M. L. Longo. AFM for structure and dynamics of biomembranes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1788(1):254–266, 2009.

[63] A. Alessandrini and P. Facci. Afm: a versatile tool in biophysics. *Measurement Science and Technology*, 16(6):R65, 2005.

[64] S. Garcia-Manyes, G. Oncins, and F. Sanz. Effect of ion-binding and chemical phospholipid structure on the nanomechanics of lipid bilayers studied by force spectroscopy. *Biophysical Journal*, 89(3):1812–1826, 2005.

[65] Z. Leonenko, E. Finot, and D. T. Cramb. Afm study of interaction forces in supported planar dppc bilayers in the presence of general anesthetic halothane. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2006.

[66] L. G. Shamrakov and D. T. Cramb. Induced structural changes of a supported planar bilayer after exposure to halothane. A real time atomic force microscopy study. 2005.

[67] L. G. Shamrakov, Z. V. Leonenko, E. Finot, and D. T. Cramb. Interaction forces of a supported DOPC bilayer in the presence of the general anaesthetic halothane - An atomic force microscopy study. *Australian Journal of Chemistry*, 59(6):386–389, 2006.

[68] Z. V. Leonenko, E. Finot, H. Ma, T. E. S. Dahms, and D. T. Cramb. Investigation of temperature-induced phase transitions in DOPC and DPPC phospholipid bilayers using temperature-controlled scanning force microscopy. *Biophysical Journal*, 86(6):3783–3793, jun 2004.

[69] A. Carnini, H. A. Phillips, L. G. Shamrakov, and D. T Cramb. Revisiting lipid, general anesthetic interactions (II): Halothane location and changes in lipid bilayer microenvironment monitored by fluorescence.

[70] J. Mou, D. M. Czajkowsky, and Z. Shao. Gramicidin A Aggregation in Supported Gel State Phosphatidylcholine Bilayers.

[71] Z. V. Leonenko, A. Carnini, and D. T. Cramb. Supported planar bilayer formation by vesicle fusion: The interaction of phospholipid vesicles with surfaces and the effect of gramicidin on bilayer properties using atomic force microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1509(1-2):131–147, 2000.

[72] Z. V. Leonenko and D. T. Cramb. Revisiting lipid, general anesthetic interactions (I): Thinned domain formation in supported planar bilayers induced by halothane and ethanol. *Canadian Journal of Chemistry*, 82(7):1128–1138, 2004.

[73] S. Garcia-Manyes and F. Sanz. Nanomechanics of lipid bilayers by force spectroscopy with afm: A perspective. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1798(4):741 – 749, 2010. A Surface View on Membrane Structure, Dynamics and Applications.

[74] A. Charrier and F. Thibaudau. Main phase transitions in supported lipid single-bilayer., 2005.

[75] M. L. Munford, V. R. Lima, T. O. Vieira, G. Heinzelmann, T. B. Creczynski-Pasa, and A. A. Pasa. AFM in-situ characterization of supported phospholipid layers formed by vesicle fusion. *Microscopy and Microanalysis*, 11(SUPPL. 3):90–93, 2005.

[76] R. A. Böckmann, A. Hac, T. Heimburg, and H. Grubmüller. Effect of Sodium Chloride on a Lipid Bilayer. *Biophysical Journal Volume*, 85:1647–1655, 2003.

[77] H. Egawa and K. Furusawa. Liposome adhesion on mica surface studied by atomic force microscopy. *Langmuir*, 15(5):1660–1666, 1999.

[78] F. Tokumasu, A. J. Jin, G. W. Feigenson, and J. A. Dvorak. Atomic force microscopy of nanometric liposome adsorption and nanoscopic membrane domain formation. *Ultramicroscopy*, 97(1-4):217–227, oct 2003.

[79] S. Garcia-Manyes, G. Oncins, and F. Sanz. Effect of temperature on the nanomechanics of lipid bilayers studied by force spectroscopy. *Biophysical journal*, 89(6):4261–74, dec 2005.

[80] D. Keller, N. B. Larsen, I. M. Moller, and O. G. Mouritsen. Decoupled phase transitions and grain-boundary melting in supported phospholipid bilayers. *Physical Review Letters*, 94(2):1–4, 2005.

[81] M. C. Giocondi, D. Yamamoto, E. Lesniewska, P. E. Milhiet, T. Ando, and C. Le Grimellec. Surface topography of membrane domains. *Biochimica et biophysica acta*, 1798(4):703–718, 2010.

[82] M. Pasenkiewicz-Gierula, Y. Takaoka, H. Miyagawa, K. Kitamura, and A. Kusumi. Hydrogen bonding of water to phosphatidylcholine in the membrane as studied by a molecular dynamics simulation: Location, geometry, and lipid-lipid bridging via hydrogen-bonded water. *Journal of Physical Chemistry A*, 101(20):3677–3691, 1997.

[83] M. Pasenkiewicz-Gierula, Y. Takaoka, H. Miyagawa, K. Kitamura, and A. Kusumi. Charge pairing of headgroups in phosphatidylcholine membranes: A molecular dynamics simulation study. *Biophysical Journal*, 76(3):1228–1240, 1999.

[84] A.P. Serro, R. Galante, A. Kozica, P. Paradiso, A.M.P.S. Gonçalves da Silva, K.V. Luzyanin, A.C. Fernandes, and B. Saramago. Effect of tetracaine on DMPC and DMPC + cholesterol biomembrane models: Liposomes and monolayers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 116:63–71, apr 2014.

[85] P. A. Zapata-Morin, F. J. Sierra-Valdez, and J. C. Ruiz-Suárez. The interaction of local anesthetics with lipid membranes. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 53:200–205, sep 2014.

[86] S. Jalili and M. Saeedi. Study of procaine and tetracaine in the lipid bilayer using molecular dynamics simulation. *European Biophysics Journal*, 46(3):265–282, 2017.

Anexos A

Publicaciones y Colaboraciones

- Pérez-Camacho, M. I., Ruiz-Suárez, J. C. (2017). Propagation of a thermo-mechanical perturbation on a lipid membrane. Soft Matter, 13, 6555-6561. https://doi.org/10.1039/c7sm00978j
- González-Gutiérrez, J., Pérez-Isidoro, R., Pérez-Camacho, M. I., Ruiz-Suárez, J. C. (2017). The calorimetric properties of liposomes determine the morphology of dried droplets. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 155, 215-222. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.04.022
- Carreón, Y. J. P., González-Gutiérrez, J., Pérez-Camacho, M. I., Mercado-Uribe, H. (2018). Patterns produced by dried droplets of protein binary mixtures suspended in water. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 161, 103-110. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.10.028