



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Unidad Monterrey

**INTERACCIONES ELECTROSTÁTICAS DE
VESÍCULAS LIPÍDICAS CON IONES,
ANESTÉSICOS, NEUROTRANSMISORES Y
PROTEÍNAS: UNA PERSPECTIVA BIOLÓGICA**

Tesis que presenta

Rosendo Pérez Isidoro

Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias en

Ingeniería y Física Biomédicas

Director de la Tesis

Dr. Jesús Carlos Ruiz Suárez

Apodaca, Nuevo León

Agosto, 2017

Agradecimientos

Agradezco infinitamente a mi familia por su complicidad en esta travesía.

Al personal administrativo y directivo de Cinvestav-Monterrey por brindar las facilidades para incursionar en el arte de hacer ciencia.

Al CONACYT por el soporte financiero durante el doctorado.

Al Dr. Carlos Ruíz por su asesoría en el desarrollo de este trabajo.

Al comité de sinodales: Dr. Gabriel Caballero, Dr. Daniel Sánchez, Dr. Moisés Santillán y Dr. Elías Pérez, por sus recomendaciones en este trabajo.

Agradezco especialmente a todos mis compañeros colaboradores: M. I. Pérez-Camacho, J. González-Gutiérrez, F. Sierra-Valdez y A. D. Reyes-Figueroa.

A mis amigos y compañeros.

Rosendo

Agosto 2017, Monterrey-México.

Índice general

Índice de Figuras	ix
Índice de Tablas	xiii
Lista de acrónimos	xv
Resumen	xvii
Abstract	xix
1 Introducción	1
2 Hipótesis	13
3 Objetivos	15
3.1 General	15
3.2 Particulares	15
4 Métodos generales	17
4.1 Calorimetría diferencial de barrido	17
4.2 Liposomas: Un modelo versátil de membrana celular	19
4.3 Elaboración de liposomas	21
4.4 Preparación de muestra y referencia	22

5	Tasa de protonación y difusión de anestésicos en MLV	25
5.1	Estado “anestesiado” vs estado “no anestesiado”	27
5.2	Difusión de anestésicos generales en liposomas MLV	28
5.3	Caracterización de la difusión de tetracaína en MLV	30
5.4	El pH regula el efecto de TC en membranas de DPPC	32
5.5	La tasa de protonación modera la difusión de AT en MLV	36
6	Interacciones de AT y NT con membranas aniónicas	47
6.1	Ca^{2+} y H^+ moderan el efecto de NTs en membranas aniónicas	52
6.2	Ca^{2+} y H^+ moderan el efecto de ATs en membranas lipídicas	59
6.3	Interacciones electrostáticas entre lípidos, NT y AT	61
7	Interacciones lípidos-proteínas y su respuesta ante AT y NT	69
7.1	Respuesta termotrópica de lípidos y proteínas	70
7.2	Respuesta termotrópica de lípidos-proteínas	73
7.3	Evaluación de la desnaturalización de proteínas	75
7.4	Las membranas lipido-proteicas son más sensibles a NT y AT	77
8	Evaporación y patrones de gotas de MLV de DPPC	81
8.1	Morfología de gotas evaporadas en función de la temperatura	82
8.2	Clasificación de patrones	85
8.3	Efecto de la tetracaína sobre los patrones finales	86
9	Fractales inducidos por las interacciones de cationes y DMPC	89
9.1	Cristales y estructuras fractales	92
9.2	Análisis de la morfología de los patrones	95
9.2.1	Distribución radial de densidad	95
9.2.2	Análisis fractal	95
9.3	El rol de las interacciones iónicas	97
9.3.1	Potencial ζ	97

<i>ÍNDICE GENERAL</i>	vii
9.4 Implicaciones mecánicas y termodinámicas	99
9.4.1 Reología	99
9.4.2 Calorimetría	99
10 Conclusiones generales	105

Índice de figuras

1.1	Lípidos de membranas biológicas	5
1.2	Niveles de ensamblaje de aminoácidos	7
1.3	Funciones de la membrana plasmática	9
4.1	Calorímetro diferencial de barrido	18
4.2	Representación de dos tipos de modelos lipídicos. a) Micela y b) Liposoma. .	20
5.1	Perfiles calorimétricos de liposomas MLV y LUV de DPPC bajo la influencia de anestésicos locales.	29
5.2	Comparación entre LUV y MLV de DPPC bajo la influencia de TC.	30
5.3	Perfiles calorimétricos de MLV y LUV de DPPC bajo la influencia de anestésicos generales.	31
5.4	Cinética de difusión de tetracaína a través de multicapas de MLV de DPPC.	33
5.5	Influencia del pH en el efecto que la tetracaína produce en membranas de DPPC.	35
5.6	La cinética difusiva de TC a través de multicapas de DPPC es modulada por la influencia de ácidos carboxílicos.	38
5.7	Experimentos usados como controles para verificar el efecto que los ácidos carboxílicos producen en membranas de DPPC sin la presencia de tetracaína.	39
5.8	Mecanismo molecular propuesto para explicar cómo la tasa de protonación regula la difusión de los anestésicos locales a través de multicapas lipídicas. .	40
5.9	Difusión de tetracaína a través de MLV de DPPC regulado por la acción de diferentes concentraciones de ácido málico.	42

5.10	Perfiles calorimétricos que ilustran la difusión de la TC a diferentes concentraciones.	43
6.1	Perfiles calorimétricos de liposomas de DPPC:SM y DPPC:DPPA bajo el efecto de NT.	53
6.2	Cambios en la entalpía calorimétrica de liposomas de DPPC:SM y DPPC:DPPA bajo el efecto de NT.	54
6.3	Estructura molecular de DPPC, SM, DPPA, DPPG y DMPS.	56
6.4	Perfiles calorimétricos de liposomas de DPPC:DPPA, DPPC:DPPG y DPPC:DMPS bajo el efecto de NT.	57
6.5	Cambios en la entalpía calorimétrica de liposomas de DPPC:DPPA, DPPC:DPPG y DPPC:DMPS bajo el efecto de NT.	58
6.6	Termogramas de liposomas de DPPC:SM y DPPC:DPPA en interacción con AT.	60
6.7	Cambios en la entalpía calorimétrica de liposomas de DPPC:SM y DPPC:DPPA en interacción con AT.	61
6.8	Efecto de TC y PB en la respuesta termotrópica de membranas aniónicas de DPPC:DPPA, DPPC:DPPG y DPPC:DMPS bajo la influencia de Ca^{2+}	62
6.9	Efecto de TC y PB en los cambios de entalpía calorimétrica de membranas aniónicas de DPPC:DPPA, DPPC:DPPG y DPPC:DMPS bajo la influencia de Ca^{2+}	63
6.10	Cambios en los perfiles calorimétricos de membranas de DPPC:DPPA con ACh y TC debido a la influencia de Ca^{2+} y H^+ . Reacciones de equilibrio de DPPC, DPPA, TC y ACh.	64
6.11	Interacciones electrostáticas entre DPPA y NT.	65
7.1	Estructura cristalográfica de OVA y AGP	71
7.2	Caracterización termotrópica de MLV de DMPC, ovoalbúmina y α glicoproteína ácida.	72

7.3	Caracterización termotrópica-temporal de MLV de DMPC, bajo el efecto de α glicoproteína ácida.	73
7.4	Caracterización termotrópica-temporal de MLV de DMPC, bajo el efecto de ovoalbúmina.	74
7.5	Reacción de ácido bicinconínico con cobre reducido.	75
7.6	Perfiles calorimétricos de DMPC-OVA bajo el efecto de OVA desnaturalizada previamente e incubada por 11 días.	76
7.7	Absorbancia y tamaño de ovoalbúmina durante 11 días de incubación.	77
7.8	Perfiles calorimétricos de DMPC y DMPC-OVA bajo el efecto de NTs y ATs.	78
8.1	Efecto de la temperatura en un proceso de evaporación de gotas de liposomas de DPPC.	83
8.2	Efecto de la temperatura en un proceso de evaporación de gotas de liposomas de DPPC/DPPG.	84
8.3	Clasificación de patrones de gotas liposomales evaporadas.	85
8.4	Efecto de un agente hidrófobo en los patrones de gotas de liposomas de DPPC.	86
9.1	Patrones de gota de DMPC y sales alcalinas sobre una superficie de PDMS evaporados por separados.	92
9.2	Patrones de microgotas de suspensión de liposomas en combinación con cloruros de metales alcalinos sobre vidrio.	93
9.3	Patrones de microgotas de suspensión de liposomas en combinación con cloruros de metales alcalinos sobre vidrio.	94
9.4	Perfiles de densidad radial de patrones obtenidos después de la evaporación de microgotas de suspensión de liposomas con cloruros alcalinos.	96
9.5	Análisis multifractal de los patrones obtenidos de gotas evaporadas de LUV/cloruros alcalinos en vidrio y PDMS.	97
9.6	Potencial zeta de liposomas de DMPC en función de la fuerza iónica y en función del radio iónico.	98

9.7	Caracterización microreológica de suspensión de LUV de DMPC en función de la concentración de lípidos y cloruros alcalinos.	100
9.8	Perfiles calorimétricos de liposomas de DMPC bajo la influencia de Li^+ , Na^+ , K^+ y Cs^+	101

Índice de tablas

5.1	Soluciones búffer usadas para regulación del pH y favorecer la abundancia de alguna de las tres especies químicas de tetracaína.	46
6.1	Búfferes de hidratación usados para la formación de MLVs de mezclas lipídicas.	66

Lista de acrónimos

AC	Ácido(s) carboxílico(s)
ACh	Acetilcolina
AMP	2-Amino-2-metil-1-propanol
AMPD	2-Amino-2-metil-1,3-propanodiol
AT	Anestésico(s)
C_p	Capacidad calorífica
CABS	Ácido 4-(ciclohexilamino)-1-butanosulfónico
ΔH	Entalpía calorimétrica
DLA	Agregación limitada por difusión
DLS	Dispersión dinámica de luz
DMPC	1,2-Dimiristoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidilcolina
DMPG	1,2-Dimiristoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidilglicerol
DMPS	1,2-Ditetradecanoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfo-L-serina sódico
DOPC	1,2-Dioleil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidilcolina
DPPA	1,2-Dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfato sódico
DPPC	1,2-Dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidilcolina
DPPG	1,2-Dihexadecanoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) sódico

DSC	Calorimetría diferencial de barrido
DSPC	1,2-Diestearil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidilcolina
GABA	Ácido γ -aminobutírico
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-etanosulfónico
IEPR	Tasa de protonación efectiva
LGLu	Ácido glutámico
LUV	Liposomas unilamelares extruídas
MD	Dinámica molecular
MDS	Desplazamiento cuadrático medio
MES	Ácido 2-(N-morfolin) etanosulfónico
MLV	Liposomas multilamelares
NT	Neurotransmisor(es)
PB	Pentobarbital
PDMS	Polidimetilsiloxano
PPF	Propofol
SM	N-octadecanoil-D-eritro-esfingosilfosforilcolina de cerebro de cerdo
SUV	Liposomas unilamelares sonicadas
T_m	Temperatura de transición de fase
TC	Tetracaína
Trizma	Tris(hidroximetil)aminometano

Resumen

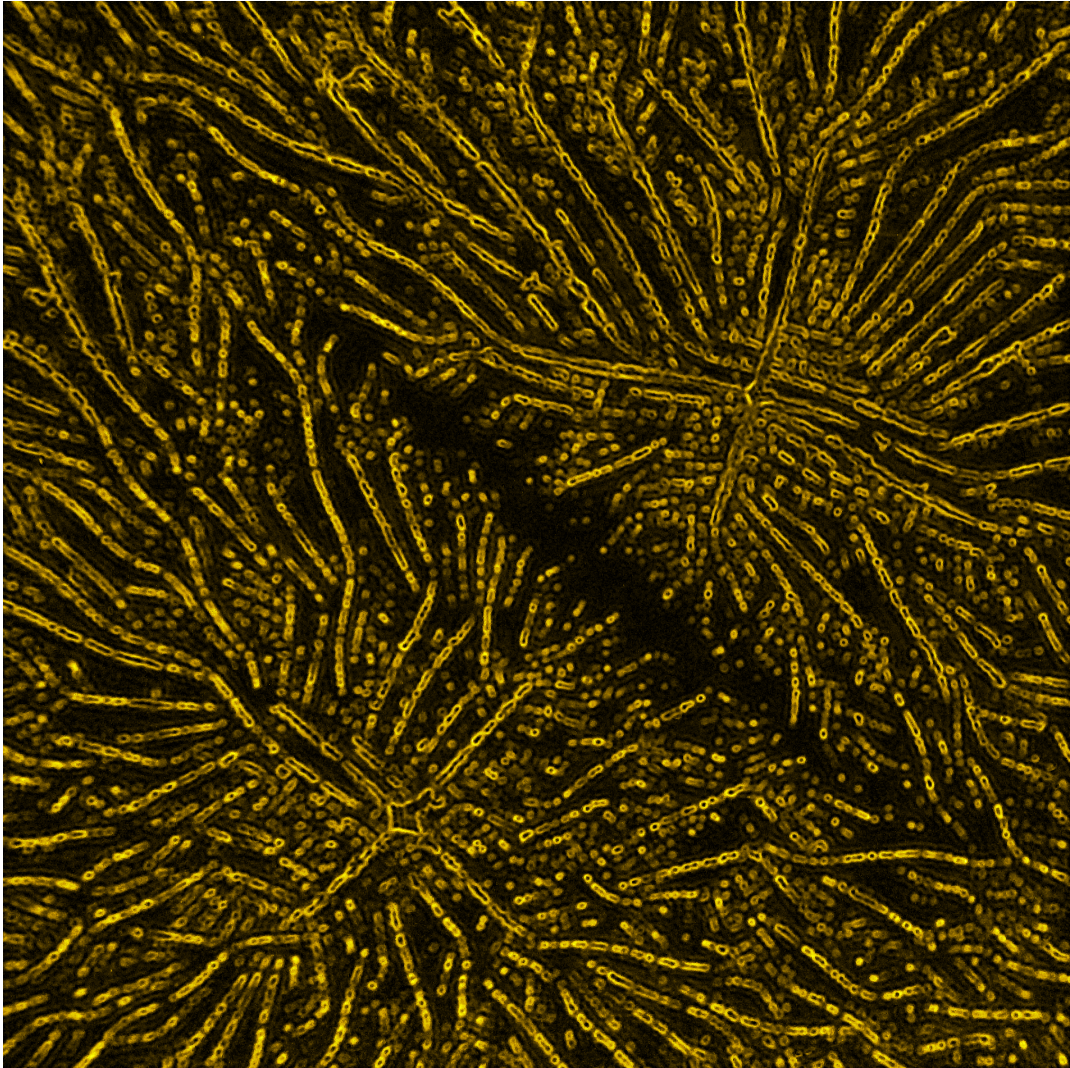
En el presente trabajo se ha explorado en modelos de biomembranas cómo las interacciones de tipo no específicas cambian las propiedades termodinámicas de bicapas lipídicas. Estas interacciones también están presentes en la dinámica de la membrana plasmática, por lo que se sugiere que también contribuyen en la dinámica de la fisiología celular. Para explorar el comportamiento electrostático y las implicaciones en las propiedades mecánicas y termodinámicas de sistemas que mimetizan a los sistemas biológicos, se construyeron modelos de membranas que contienen lípidos zwitteriónicos, lípidos aniónicos y proteínas. A partir de estos modelos de membranas artificiales se exploró su interacción con iones, anestésicos y neurotransmisores bajo diferentes condiciones fisicoquímicas. Durante el desarrollo de este trabajo se hizo uso de técnicas como la calorimetría diferencial de barrido, la dispersión dinámica de luz, espectroscopía uv-visible, microscopía óptica, análisis de imágenes y análisis químico. Encontramos que los cambios en las propiedades de las membranas están íntimamente relacionados con las interacciones electrostáticas intermoleculares, la transferencia de protones y la transposición de cargas en moléculas polarmente inducidas. Además, tales interacciones son conservadas y reflejadas en procesos complejos como en la evaporación de gotas, lo que hace factible el uso de pequeñas gotas para explorar interacciones intermoleculares y obtener información que permitan describir la dinámica del sistema. Los resultados de esta tesis sugieren que es necesario replantear los mecanismos de acción de la anestesia y la sinapsis química tomando en cuenta las propiedades electrostáticas, mecánicas y termodinámicas de sistemas biológicos.

Abstract

In this work, it has been explored how non-specific interactions, which are involved in all living systems, could be playing an important role in the physiology of cell membranes, especially in the dynamics of the plasma membrane. To explore the electrostatic implications of membranes with ions, anesthetics, and neurotransmitters, and their impact on the mechanic and thermodynamic properties, we made lipid and lipid-proteins models and characterized their interactions with the above agents under several physical and chemical conditions. To make this analysis, we used differential scanning calorimetry, dynamic light scattering, UV-visible spectroscopy, optical microscopy, image analysis, and chemical analytic assays. We found that the changes in the membrane properties are intrinsically related to intermolecular electrostatic interactions, proton and ions transfer, and the charge transposition of polarizable molecules. Also, these interactions are conserved macroscopically in other complex systems, for example, in the evaporation process of droplets. This fact is interesting because if droplets are sensible enough to reveal intermolecular interactions, a drop evaporation process could be useful as a method to characterize several systems. Based on our results we propose that a revision of the well-known mechanisms related to anesthesia and neurotransmission is necessary taking into account how the non-specific interactions change the mechanic and thermodynamic properties of membranes.

1

Introducción



El estudio de los sistemas biológicos con herramientas de la física marcó sus inicios con L. Galvani en 1780, cuando produjo contracciones con descargas eléctricas en miembros posteriores de ranas a las cuales les habían retirado el cerebro [1]. Posteriormente, la biología ha ido adoptando poco a poco herramientas provenientes de diversas áreas como la física, química y medicina. Esta adopción ha estado influenciada en gran medida en la teoría cinética de los gases y las leyes de la termodinámica. Ya en el controversial libro *-¿Qué es la vida?-* de Erwin Schrödinger, se puso especial interés en postular que los procesos biológicos no son clásicos sistemas en equilibrio y adiabáticos, sino sistemas complejos que funcionan fuera del equilibrio intercambiando materia y energía con el medio externo [2]. Con el auge de la bioquímica, la electrofisiología y la biología molecular, muchos enigmas y procesos celulares se han logrado descifrar. Enigmas como lo era el código genético, rutas metabólicas energéticas, ciclo celular y vías de señalización por mencionar algunas, han sido, de alguna forma, ampliamente comprendidas. Sin embargo, el estudio de los eventos físico-químicos que se llevan a cabo en los sistemas vivos es tema abierto de investigación.

Si bien es cierto que las aportaciones de la física y la química a la biología ha sido de gran importancia, el aspecto descriptivo de muchos procesos biológicos ha sido imprescindible para entender la especificidad de las interacciones conductoras en la fisiología de la célula. La explicación de muchos mecanismos biológicos descansan en modelos como el de “llave-cerradura”, en donde la parte descriptiva enriquece cómo pueden ser interpretadas las leyes de la física y la química.

Para explicar eventos como las vías de señalización que se proponen en biología molecular se hace uso de hipotéticos estados conformacionales de las proteínas. Esta inclinación hacia lo descriptivo, se ha ido consolidando poco a poco desde los trabajos realizados por Hodgkin y Huxley en la década de los 1950, acerca de la propagación del impulso nervioso y trabajos como los de Singer y Nicholson en los 1970 sobre la membrana plasmática [3, 4]. Fue a partir de estas obras cuando las proteínas fueron las entidades moleculares que ganaron interés para ser mayormente estudiadas, debido a la diversidad de las funciones que cumplen en múltiples procesos celulares. Hoy en día, las proteínas son las estructuras asociadas a una gran diversidad de eventos biológicos. Sin embargo, la aplicación de herramientas de la

física, química, matemáticas y medicina puede ayudar a entender más a detalle estos procesos, facilitando la posibilidad de predicción de diversos estados fisiológicos de los organismos vivos, tomando en cuenta tanto a las interacciones específicas, como a las no específicas.

Para avanzar en la comprensión del funcionamiento de los organismos vivos, no sólo es imprescindible saber los detalles moleculares de sus componentes (lípidos, proteínas y carbohidratos en un medio acuoso-iónico), sino también como éstos interaccionan. Se sabe que las moléculas poseen diversas propiedades como la polaridad, que le confiere características hidrófobas-hidrófilas cuando se encuentran disueltas o formando parte de un medio o sistema. Además, éstas poseen simetrías y asimetrías que dan lugar a determinada forma de interaccionar con otros dominios con las mismas características. Es importante mencionar que, las biomoléculas poseen grupos funcionales que son capaces de formar estados transitorios entre enlaces covalentes y no covalentes. Gracias a técnicas como la cristalografía de rayos X, se conocen cientos de estructuras proteicas. Pero, pese a toda esa información, no es posible reconstruir la información energética de las mismas y viceversa. Es decir, a partir de la información energética no es posible reconstruir la información estructural. Éstas son las dos caras de la moneda que necesitan ser estudiadas para comprender con mayor detalle las propiedades de los sistemas biológicos y por concerniente su expresión macroscópica, es decir, la fisiología de los organismos.

La aplicación de herramientas con un enfoque fisicoquímico en los procesos celulares y la interacción de los organismos vivos con el medio externo es un área que recientemente se ha retomado principalmente en el campo de la biofísica. Temas como el de la anestesia, el impulso nervioso y la sinapsis han resurgido controversialmente. Más aún, se desconoce todavía la información de las variables termodinámicas asociadas a mecanismos como las vías de señalización, la actividad de los canales iónicos y las bombas iónicas.

En el contexto de las funciones celulares, las membranas juegan un papel muy importante, en especial, la membrana plasmática. El conocimiento de cómo funciona la membrana plasmática ha progresado en gran medida. En un inicio se pensó como un sistema falto de estructuración y de distribución homogénea de sus componentes, mientras que a la fecha se considera como un sistema complejamente organizado que contiene microdominios que

están intrínsecamente relacionados con diversos procesos de comunicación celular.

El conocimiento de los componentes químicos que dan lugar a la complejidad de la membrana plasmática es uno de los aportes científicos muy valiosos, ya que ha permitido explorar el comportamiento de sus componentes en modelos más simples para estudiar interacciones entre lípidos, proteínas, carbohidratos y otros compuestos de interés farmacológico en un medio iónico. Las características químicas de estos compuestos son la base de las propiedades que las membranas biológicas poseen. Los lípidos tienen una propiedad indispensable para formar las membranas: su carácter anfipático o anfifílico. Esto quiere decir que poseen un extremo formado por grupos funcionales hidrófobos que repelen el agua y otra zona formada por grupos hidrófilos que son afines a ésta. Entre los lípidos más comunes que forman a la membrana plasmática se encuentran los fosfolípidos, esfingolípidos y esteroides, los cuales se ejemplifican en la Fig. 1.1. En los fosfolípidos, el glicerol es el centro principal al cual se esterifican dos ácidos grasos (zona hidrófoba) y el grupo fosfato al cual se enlaza un grupo hidrófilo como el grupo colina (zona hidrófila). Por otro lado, la columna vertebral en los esfingolípidos es la esfingosina al cual se enlazan un ácido graso y un grupo fosfato, a éste último se une un grupo hidrófilo. En cambio, los esteroides como el colesterol poseen un centro de anillos condensados (ciclopentadoperhidrofenantreno) al cual se pueden unir grupos alcoholes, metilos y cadenas alifáticas.

Los ácidos grasos que conforman la región hidrófoba de los fosfolípidos y esfingolípidos varían entre el ácido palmítico, láurico, mirístico, miristioleico, palmitoleico, esteárico, oleico, linoleico, araquídico, y araquidónico. La longitud de la cadena ácida varía entre los 12 y 20 carbonos. En algunos de estos casos poseen enlaces π dando lugar a insaturaciones como el caso de ácido oleico. Esta característica es determinante de las propiedades macroscópicas de las membranas. Por ejemplo, las membranas lipídicas tienen transiciones de fases termotrópicas y a la temperatura que ocurre se le conoce como temperatura de transición de fase (T_m), estas transiciones de fases dependen de la longitud de la cadena de los lípidos que componen a las membranas, de las insaturaciones presentes en los mismos y de la carga del dominio hidrófilo. 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,

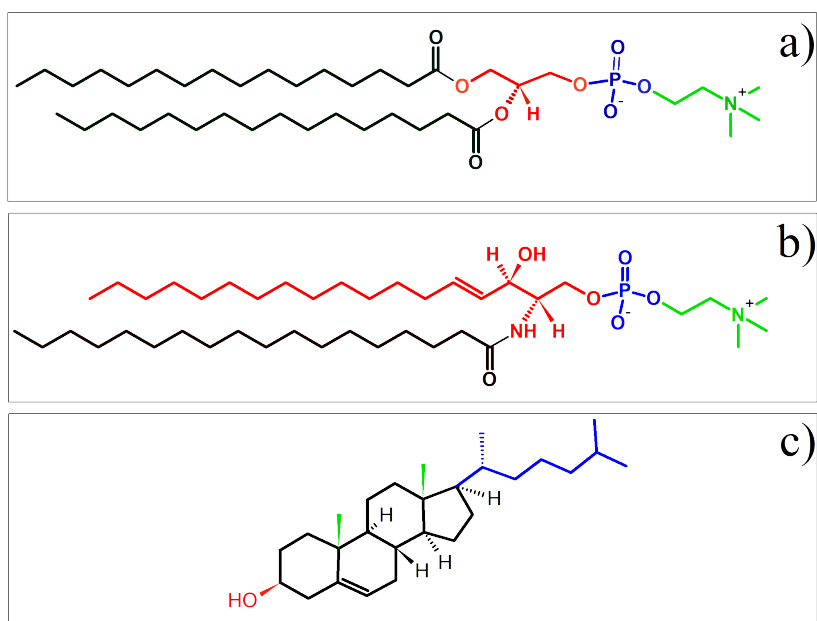


Figure 1.1: Lípidos de membranas biológicas. (a) Estructura química de un fosfolípido, el cual está formado por cuatro grupos característicos: glicerol (rojo), ácidos grasos (en negro), grupo fosfato (azul) y grupo colina (verde). (b) Estructura química de un esfingolípido formado por: esfingosina (rojo), ácido graso (negro), fosfato (azul) y colina (verde). (c) Estructura química de un esteroil formado por: ciclopentanoperhidrofenantreno (negro), un grupo alcohol (rojo), dos grupos metilo (verde) y una cadena alifática (azul).

la T_m se desplaza drásticamente a temperaturas bajas. Los siguientes lípidos ejemplifican dos casos: el efecto de la longitud de la cadena acídica y el efecto de los dobles enlaces. En el primer caso, el 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (DMPC), que tiene una cadena de 14 carbonos (del ácido mirístico), presenta una T_m a 24.5°C ; mientras que el 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (DPPC), con una cadena de 16 carbonos, tiene una T_m a 42°C . En el segundo caso, el 1,2-diestearil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (DSPC) es un fosfolípido de 18 carbonos sin dobles enlaces que tiene una T_m a 53°C ; mientras que el fosfolípido semejante al DSPC, también de 18 carbonos, derivado del ácido oleico: el 1,2-dioleil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (DOPC); tiene un doble enlace entre el carbono 9 y 10 de la cadena acídica oleica y es el responsable de que su T_m se encuentre a -20°C [5].

Similarmente, los grupos funcionales que forman parte de la región hidrófila de los lípidos de membranas influyen en las propiedades microscópicas y macroscópicas de las membranas

influenciado principalmente la electrostática y la T_m de estos sistemas. Entre estos grupos se encuentran: colina, serina, etanoamina, otra unidad de glicerol, algunos polialcoholes cíclicos como el inositol, grupos fosfatos, en algunos casos dímeros de fosfolípidos y carbohidratos.

Por otro lado, las proteínas son otros de los componentes más importantes de la membrana plasmática, ellas se han especializado para dar lugar a diversos procesos. Las proteínas son el resultado del ensamblaje de aminoácidos a diferentes niveles. La Figura 1.2 muestra estos niveles de organización. Un aminoácido está compuesto por un carbono asimétrico, un grupo carboxílico (-COOH), un grupo amino ($-\text{NH}_2$) y un grupo alquilo alifático o aromático (R). Las cargas y la simetría de los grupos que componen a los aminoácidos son los responsables de la dinámica de los ensamblajes proteicos. Para formar una proteína, los aminoácidos se enlazan mediante un enlace peptídico y se concatenan, según el código genético, pudiendo alcanzar la estructura cuaternaria (ver Fig. 1.2).

Lípidos y proteínas son las moléculas encargadas de ensamblar la estructura básica que limita el exterior con el interior de la células: la membrana plasmática. La Figura 1.3 muestra que estas funciones pueden llevarse a cabo considerando dos tipos de interacciones, específicas (Fig. 1.3 a) y no específicas (Fig. 1.3 b). Sin embargo, las funciones que se muestran en la Fig. 1.3 c, están basadas principalmente en las interacciones específicas. Así, las funciones de la membrana plasmática son:

- 1. Regulación del transporte de componentes. La membrana plasmática es una barrera selectiva entre el interior de la célula y el medio extracelular, permitiendo la entrada a moléculas esenciales como iones, glucosa, aminoácidos y algunos lípidos; y bloquea el paso de moléculas que pueden dañarla.
- 2. Desencadena vías de señalización. Proteínas periféricas que se encuentran hacia la matriz extracelular son las responsables de identificar moléculas específicas para desencadenar vías de señalización. Estas proteínas actúan como receptores que identifican su ligando en la superficie de la membrana plasmática que al unirse dan lugar a cambios conformacionales en dominios ubicados hacia el citosol que son responsables de inducir respuestas específicas en la célula.

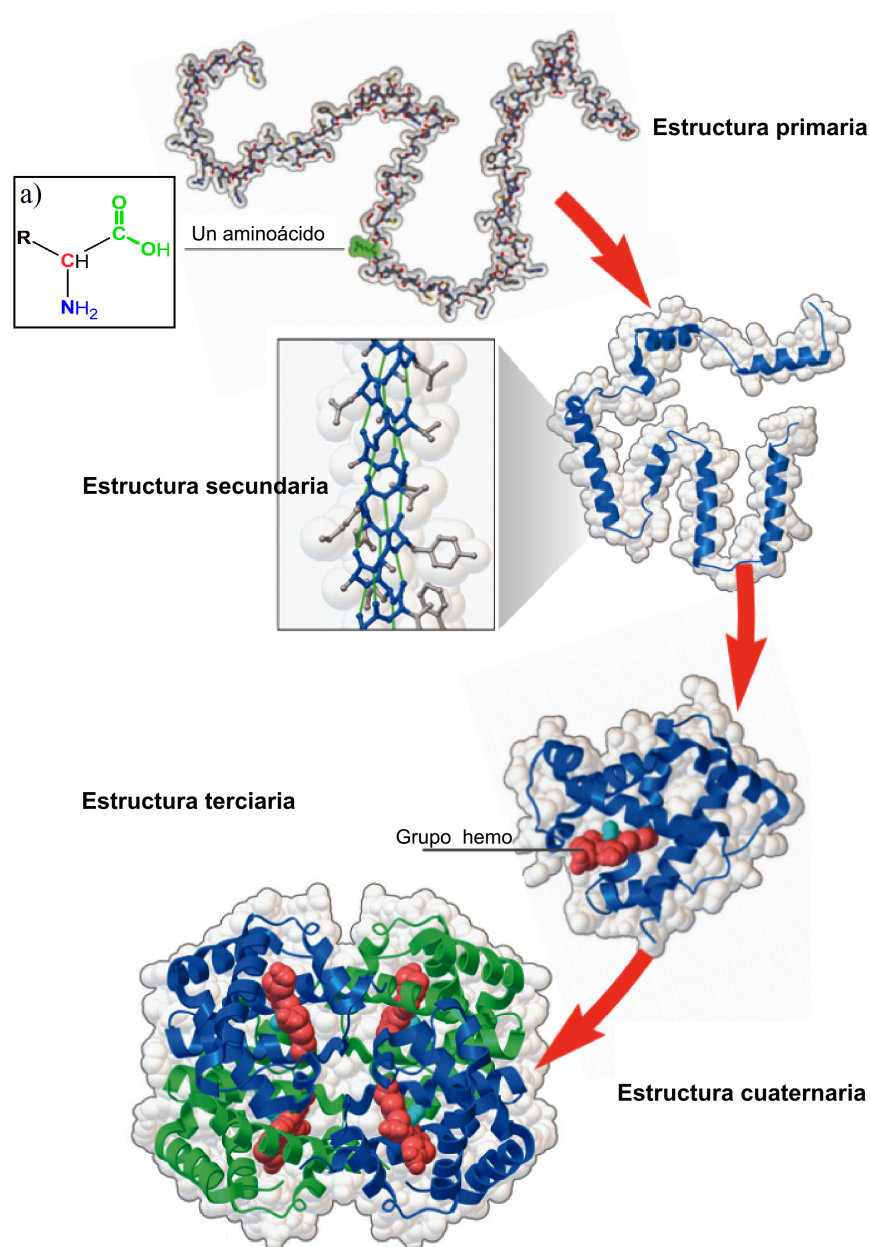


Figure 1.2: Niveles de estructuración de aminoácidos. (a) Estructura química de un aminoácido formado por: un carbono quiral (negro), un grupo carboxílico (verde), un grupo amino (azul) y un grupo alquilo (negro). Los aminoácidos se ensamblan a través de enlaces peptídicos y pueden alcanzar 4 niveles de organización: estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria. Adaptada de www.rcsb.org/pdb-101.

- 3. Lleva a cabo procesos de comunicación intercelular. Las células adyacentes frecuentemente se comunican mediante un mecanismo que involucra contacto entre

ellas, intercambiando moléculas pequeñas para coordinar procesos metabólicos.

- 4. Desarrolla procesos de catalisis enzimática. El transporte de moléculas a través de la membrana plasmática que requieren de una transformación de la molécula en cuestión, regularmente es llevada a cabo por vías enzimáticas.
- 5. Está relacionada con el movimiento de macromoléculas que permiten la motilidad de la célula. Para llevar a cabo tareas que involucren movimiento, la célula ha desarrollado complejos arreglos que involucran el acoplamiento de redes de proteínas en ciertos dominios lipídicos. Estos complejos son conocidos como motores moleculares y las proteínas involucradas son llamadas proteínas motoras.
- 6. Brinda soporte y estructura a la célula. Las proteínas periféricas y transmembranales de la membrana plasmática pueden unirse a una red de filamentos ubicados hacia el citosol proporcionándole soporte y estructura [6].

Por algunas razones, quizá influenciados por la bioquímica, dichos procesos fueron estudiados bajo una perspectiva de las interacciones específicas, dejando un poco rezagado el estudio de la contribución de las interacciones no específicas. Así se logró acuñar que los procesos que la membrana plasmática desarrolla están ligados a interacciones específicas. Sin embargo, una pregunta importante que deberíamos hacernos es de qué depende esta especificidad, ¿Cuáles son las interacciones fundamentales que la rigen? Por un lado, la especificidad básicamente depende del arreglo molecular, esto es, de la composición, conectividad, configuración (recordemos que la vida es homoquiral) y la conformación. Similarmente, la no especificidad también depende de la conformación.

En la configuración, la formación de los enlaces covalentes cobra más sentido; pero en la conformación son las interacciones de tipo no covalente las que recobran importancia. Las interacciones de tipo no covalente las podemos agrupar en tres: interacciones electrostáticas iónicas, puente de hidrógeno y van der Waals. Éstas están presentes en una gran diversidad de moléculas, por ejemplo en lípidos, proteínas, anestésicos, neurotransmisores, hormonas, entre muchas otras.

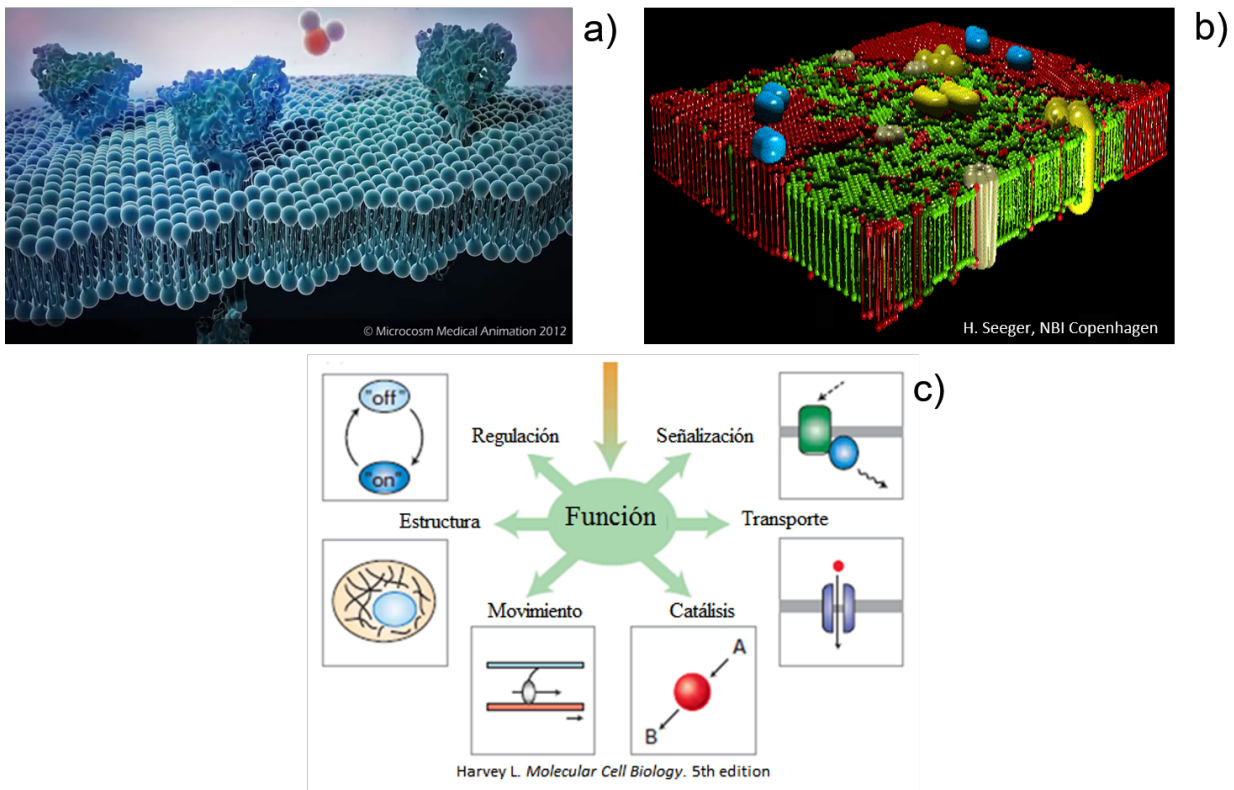


Figure 1.3: a) Interacciones específicas a nivel de la membrana plasmática. b) Estructuración de la membrana debido a interacciones no específicas. c) Funciones de la membrana plasmática.

Una pregunta relevante a considerar es ¿qué tan específica es una molécula? En fisiología, esta característica se monitorea con base en la concentración, así que entre menos concentración se requiera de una molécula para una acción fisiológica o farmacológica, se dice que es más específica. Por ejemplo la hidroxí-4-pregnen-3-ona es una hormona esteroidea que produce la hembra del pez dorado para madurar los huevos, y posteriormente la excreta al medio y lo utiliza como feromona para atraer al macho, el cual es capaz de identificarla en el orden de femtogramos/ml.

Sin embargo algunos procesos relacionados con la especificidad en procesos celulares, también están ligadas a cambios producidos por interacciones no específicas, por ejemplo el fenómeno de la anestesia.

La anestesia es un fenómeno por el cual se puede inhibir de cierto modo la comunicación celular. El término anestesia fue introducido por Oliver Wendell Holmes para definir la

eliminación del dolor quirúrgico. La anestesia involucra la presencia gradual de efectos como la inmovilidad, eliminación del dolor, amnesia, inconsciencia y muerte de un paciente. Estos efectos son provocados por agentes anestésicos que afectan diferentes zonas del sistema nervioso central de forma reversible, con excepción de la muerte. Cuando el efecto en el organismo alcanza el estado de inconsciencia, se da una anestesia general; cuando el efecto es localizado y no se llega al estado de inconsciencia es una anestesia local. Los agentes anestésicos son estructuras moleculares que difieren en gran medida que parecieran no tener patrón molecular. Así, se tienen anestésicos de tipo alcanos, alcoholes, benzodiazepinas, 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.

El mecanismo de la anestesia, a más de un siglo de estudio, aún no se ha logrado elucidar plenamente. En el intento por elucidar los mecanismos detrás de la anestesia se han postulado dos teorías. Por un lado, la teoría de la membrana lipídica como blanco de los anestésicos propuesta en el siglo pasado por Meyer y Overton, descansa en la tan citada regla de Meyer-Overton, la cual es una interpretación macroscópica de la solubilidad de las moléculas en medios hidrófobos [7, 8]. Por tal razón, no es aplicable para muchas entidades moleculares que pudiéndose disolver en medios hidrófobos no presentan actividad anestésica. Recientemente, basado en la regla de Meyer-Overton, T. Heimburg ha propuesto una teoría sobre la termodinámica de la anestesia general y local, la cual asume que el fenómeno de la anestesia está relacionado con los cambios en la energía libre de la membrana [9, 10]. Por otro lado, la teoría de los receptores proteicos, asume que la anestesia está íntimamente relacionada con una interacción específica entre el fármaco y receptores proteicos de la membrana, lo cual da como resultado la modificación de la señal excitatoria e inhibitoria del impulso nervioso. Entre los receptores asociados con la actividad anestésica se encuentran los receptores GABA_A, glicina, dopamina, nicotínicos, glutamato, NMDA_R y AMPA_R [11, 12].

De igual manera que el controvertido tema de la anestesia, lo es el impulso nervioso y la sinapsis, pues ambos procesos están íntimamente relacionados. La anestesia pareciera que inhibe la comunicación nerviosa, mientras que la sinapsis y el impulso nervioso

son los procesos que llevan a cabo la comunicación neuronal. R. Cantor sugiere que los neurotransmisores podrían ser los anestésicos endógenos de los organismos vivos de orden superior [13, 14] y comenta que la funcionabilidad de los neurotransmisores y receptores proteicos debe estar relacionada con los cambios en las propiedades físicas de la membrana. En este sentido, trabajos recientes han demostrado interacción de lípidos con neurotransmisores sin la presencia de proteínas, sugiriendo que las interacción específicas ligando-proteína no son las únicas involucradas en el proceso de la comunicación nerviosa [15–17].

Previamente, usando técnicas de dispersión láser, calorimetría, microscopía de fuerza atómica y simulaciones de dinámica molecular, se ha estudiado cómo cambian las propiedades de modelos de membranas y sistemas biológicos; tales como la motilidad de espermatozoides ante moléculas anestésicas, modelos lipídicos para el estudio de moléculas apolares y polares, incluyendo anestésicos, metilxantinas y neurotransmisores, en su interacción con membranas lipídicas. [18–20].

Esta tesis se encuentra enmarcada en el área de la biofísica, en dónde el interés principal es el estudio de las propiedades fisicoquímicas de materiales complejos con interés biológico. Esto incluye, el estudio de las interacciones de tipo no específicas entre los componentes de las membranas y otros agentes como los iones, los anestésicos (AT), los neurotransmisores (NT) y las proteínas. Puesto que, en esta área aún hay muchas preguntas por responder, como por ejemplo:

- ¿Cómo influyen las interacciones no específicas en los procesos que incluyen membranas lipídicas?
- ¿Qué dominios químicos de la membrana intervienen en las interacciones con otras moléculas, iones y átomos?
- ¿De qué manera tales interacciones modifican las propiedades termodinámicas y mecánicas de sistemas lipídicos?
- ¿Cómo influyen las propiedades hidrófilos-hidrófobos de las moléculas en tales interacciones?

- ¿Qué efectos producen las proteínas en las propiedades físicas de las membranas?
- ¿Cómo cambian dichas propiedades en función de la fuerza iónica?
- ¿Qué cambios fisicoquímicos ocurren en la membrana ante un cuadro patológico, por ejemplo ante las enfermedades neurodegenerativas o cáncer?

Basados en este contexto, en el trayecto de este trabajo se abordarán algunas de estas interrogantes y se discutirán cómo las interacciones intermoleculares determinan el comportamiento macroscópico de modelos que reflejan propiedades de los sistemas biológicos.

2

Hipótesis

Las propiedades mecánicas y termodinámicas de membranas lipídicas modelo cambian debido a las interacciones electrostáticas no específicas con iones, anestésicos, neurotransmisores y proteínas. Estos cambios nos permiten caracterizar desde un enfoque bio-fisicoquímico las propiedades de las membranas artificiales y esbozar el papel de las interacciones no específicas en el funcionamiento de membranas biológicas en procesos como la anestesia y la sinapsis química. Además, así como, diseñar nuevos protocolos de caracterización de estos sistemas basados en los cambios de sus propiedades fisicoquímicas.

3

Objetivos

3.1 General

Estudiar los cambios en las propiedades termodinámicas de vesículas lipídicas debido a interacciones electrostáticas con iones, anestésicos, neurotransmisores y proteínas para esbozar el rol de las interacciones no específicas en procesos como la anestesia y la sinapsis química; además, de permitir la implementación de nuevos protocolos de caracterización basados en dichas propiedades.

3.2 Particulares

- Caracterizar cómo influye la variabilidad de protones en el efecto mecánico y termodinámico que anestésicos locales y generales producen en membranas lipídicas.
- Explorar las interacciones electrostáticas de liposomas (construidos a partir de lípidos zwitteriónicos y aniónicos) con iones, anestésicos y neurotransmisores.
- Explorar la respuesta termotrópica de proteoliposomas en interacción con anestésicos y neurotransmisores.
- Analizar cómo cambian las propiedades termotrópicas y reológicas de liposomas debido a interacciones con iones.

4

Métodos generales

4.1 Calorimetría diferencial de barrido

Las membranas lipídicas pueden adoptar diversas configuraciones polimórficas que pueden interconvertirse en función de la temperatura, a esto se le conoce como transiciones de fase termotrópicas. La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una técnica simple, poderosa y superprecisa usada ampliamente para la caracterización termodinámica de las transiciones termotrópicas en modelos de membranas lipídicas y membranas biológicas [5,21,22]. Debido a esto, en este trabajo el uso de la DSC es esencial para responder las preguntas previamente planteadas.

La información termodinámica de un sistema como las membranas puede ser fácilmente obtenida a partir de la capacidad calorífica (C_p) medida en un calorímetro DSC. El cual se basa en medir la cantidad de calor de una muestra con respecto a una referencia en función de la temperatura. Un calorímetro DSC consta de dos celdas (muestra y referencia) y de un sistema de calentamiento (ver Fig. 4.1a).

En un experimento calorimétrico, la celda de muestra y de referencia son calentadas a una tasa constante. En el proceso de calentamiento o enfriamiento (escaneo o barrido), tanto la muestra como la referencia se mantienen a la misma temperatura. Si la muestra experimenta un cambio de fase, el sistema de calentamiento del calorímetro ajusta la temperatura de las celdas de muestra con respecto a la celda de referencia para mantener una diferencia de

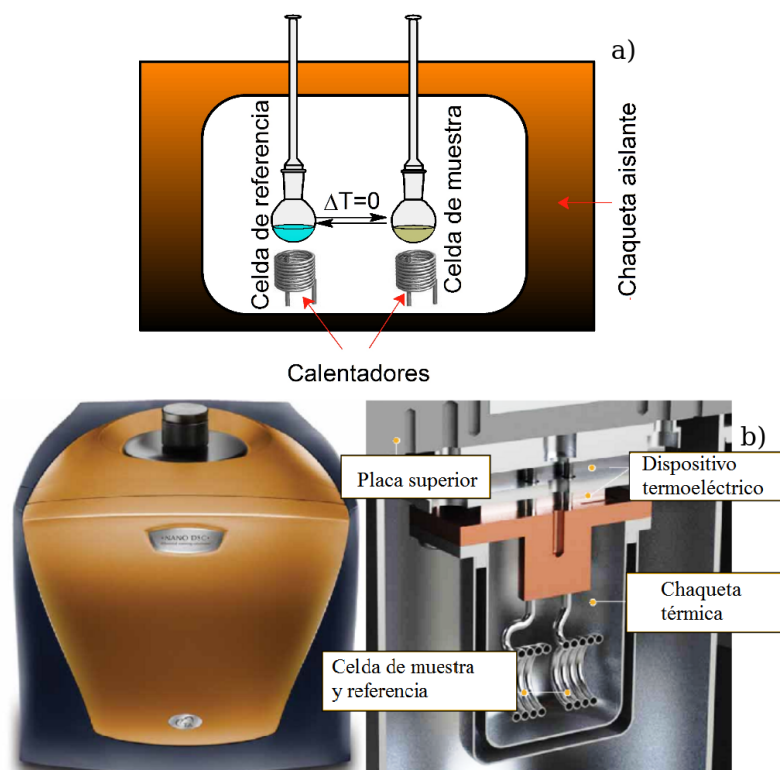


Figure 4.1: a) Diagrama de un calorímetro. b) Calorímetro nanoDSC TA instruments.

temperatura muy cercano a cero entre ambas celdas. Cabe mencionar que no siempre se cuantifica calor absorbido, también puede ser calor liberado, esto depende de la naturaleza del experimento, si es endotérmico o exotérmico.

La DSC que se ha utilizado en este trabajo haciendo uso de un calorímetro Nano-DSC de TA Instruments (ver Fig. 4.1b), permite utilizar cantidades pequeñas de muestra del orden de $2 \mu\text{g}$ en un volumen de $300 \mu\text{L}$. Además, posee un sistema de detección de calor en el orden de los microjoules, la generación de ruido que produce dada su funcionalidad es del orden de ± 15 nanowatts y la reproducibilidad de las líneas bases es de ± 28 nanowatts. Características que le confieren al Nano-DSC de TA Instruments su amplio uso en el estudio de biomoléculas.

En un análisis calorimétrico la capacidad calorífica está dada por

$$C_p = \left(\frac{\partial Q}{\partial T} \right)_P, \quad (4.1)$$

en donde Q es la cantidad de calor absorbido por el sistema y T es la variación de la

temperatura.

A partir de la capacidad calorífica se pueden calcular los cambios en la entalpía, ΔH ; y los cambios de entropía, ΔS , lo cual está relacionado con la energía involucrada cuando el sistema evoluciona de un estado a otro. Para la entalpía tenemos que:

$$dH = dQ + VdP. \quad (4.2)$$

Si se mantiene la presión constante, podemos expresar la capacidad calorífica en términos de la entalpía:

$$C_p = \left(\frac{\partial H}{\partial T} \right)_P. \quad (4.3)$$

Entonces, la entalpía calorimétrica (ΔH) puede ser obtenida por la integración de la capacidad calorífica de una temperatura T_0 a T_1 :

$$\Delta H = \int_{T_0}^{T_1} C_p dT. \quad (4.4)$$

La segunda ley de la termodinámica nos permite expresar el factor asociado al calor en términos de la temperatura y la entropía:

$$dQ = TdS, \quad (4.5)$$

Entonces, para el cambio en la entropía se tiene que:

$$C_p = T \left(\frac{\partial S}{\partial T} \right)_P, \quad (4.6)$$

y al integrar desde T_0 a T_1 :

$$\Delta S = \int_{T_0}^{T_1} \frac{C_p}{T} dT. \quad (4.7)$$

Si se conocen los cambios de ΔH y ΔS , tendríamos la información termodinámica asociada a la transición de fase del sistema.

4.2 Liposomas: Un modelo versátil de membrana celular

El estudio de las biomembranas a través de modelos es una de las opciones dada la complejidad que las membranas reales engloban. Las membranas lipídicas, como por ejemplo

los liposomas, han sido usadas como modelos de membrana plasmática para caracterizar su comportamiento ante la presencia de fármacos como los AT [23]. Estos modelos son usados principalmente para explorar el rol que los lípidos podrían ejercer en tan complicados procesos. Una de las herramientas de la física aplicable al estudio de estos sistemas, y en general aplicable a diversos fenómenos de cualquier escala, es la termodinámica. Ésta tiene su fortaleza en fenómenos colectivos, y nos permite conocer desde una visión macroscópica los acontecimientos energéticos a nivel microscópicos implicados en los sistemas.

La versatilidad de los liposomas radica en que se les puede extraer información termodinámica con técnicas termoanalíticas como la calorimetría diferencial de barrido (DSC) y la simplicidad que se tiene para formarlos. Básicamente, al depositar lípidos en un medio acuoso, éstos se reestructurarán minimizando su energía formando dominios como los liposomas y las micelas. En la Figura 4.2 se muestran unas caricaturas de estos arreglos.

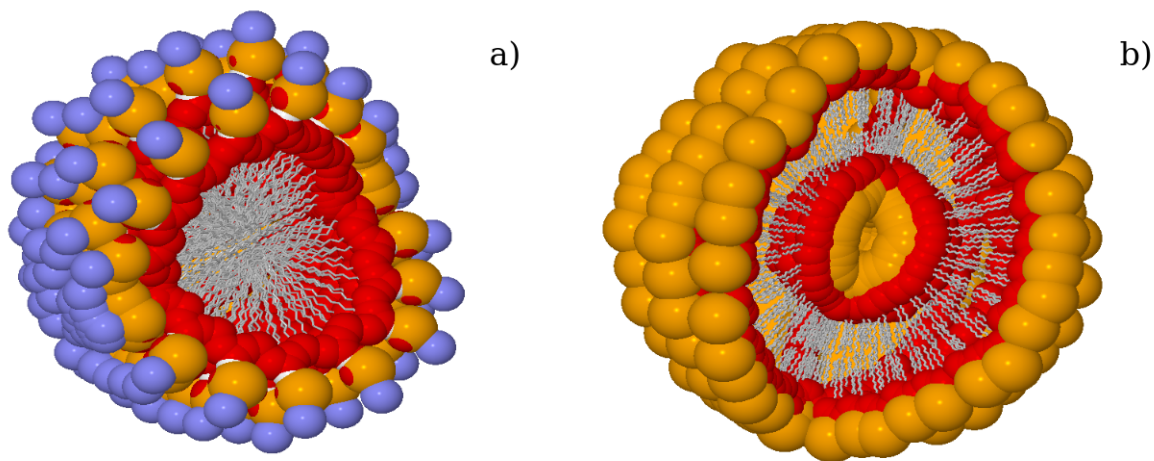


Figure 4.2: Representación de dos tipos de modelos lipídicos. a) Micela y b) Liposoma.

En el desarrollo de este trabajo, los liposomas han sido el principal modelo utilizado. Por ello se explicará de manera genérica la preparación de estas vesículas, dejando los detalles para ser abordados en cada sección experimental correspondiente al capítulo de resultados.

4.3 Metodología para la obtención de vesículas lipídicas

Los modelos de membranas utilizados en el desarrollo de la presente tesis incluye tres tipos de vesículas lipídicas principalmente: liposomas multilamelares (MLV por sus siglas en inglés, Multilamellar Vesicles), liposomas unilamelares (LUV, Large Unilamellar Vesicles) y vesículas pequeñas o sonicadas (SUV, Small Unilamellar Vesicles).

El siguiente protocolo describe genéricamente la metodología de manufactura de los liposomas:

Mezcla de lípidos utilizando solvente. Si el experimento involucra a una mezcla lipídica, cada lípido deberá disolverse por separado en el solvente o mezcla de solventes apropiados y luego deberán mezclarse para formar una sola solución orgánica que contenga disuelto homogéneamente a los lípidos de interés. Posteriormente, el solvente de la mezcla orgánica puede ser evaporado, ya sea por corrientes de nitrógeno o separado haciendo uso de un rotavapor o liofilizadora. Si el solvente que contiene a los lípidos es mayor a 2 ml, se recomienda hacer uso del rotavapor. Sin importar cual técnica se use para separar el solvente de la mezcla lipídica, que regularmente forma una película adherida a las paredes del contenedor, se someten a vacío por lo menos 3 hrs para eliminar posibles trazas de solvente.

Hidratación y formación de MLV. A una muestra de lípido en polvo (cuando se elaboran liposomas de un solo lípido) o una muestra en película de mezcla de lípidos secos se añade la cantidad requerida de solución búffer o agua por arriba de la temperatura de transición de fase. Se agita la solución acuosa entre a 600 y 1000 rpm durante por lo menos 30 minutos. Al finalizar este proceso se obtienen liposomas tipo MLV.

Sonicación y formación de SUV. Después de la hidratación la muestra de liposomas multilamelares se termaliza y sonica a la temperatura de transición de fase por al menos 30 minutos. Este paso tiene la finalidad de homogenizar y disminuir el tamaño de los MLV formados en el paso anterior, transformándose ahora en SUV.

Extrusión y formación de LUV. Para formar LUV, se toma suspensión de MLV y se moldean mecánicamente por medio de un proceso de extrusión. Regularmente, este proceso se realiza en un Mini-Extruder, Avanti Polar Lipids, Inc. usando membranas de policarbonato (Nucleopore Track-Etched Membranes, Whatman), con un tamaño de poro de $0.1 \mu\text{m}$ ó $0.2 \mu\text{m}$. Para obtener LUVs con una distribución de tamaño homogénea se requiere de por lo menos 15 pases a través de la membrana. Se recomienda que los pases sean alrededor de 1 ml/min, aunque esto puede variar dependiendo de la concentración.

4.4 Preparación de muestra y referencia

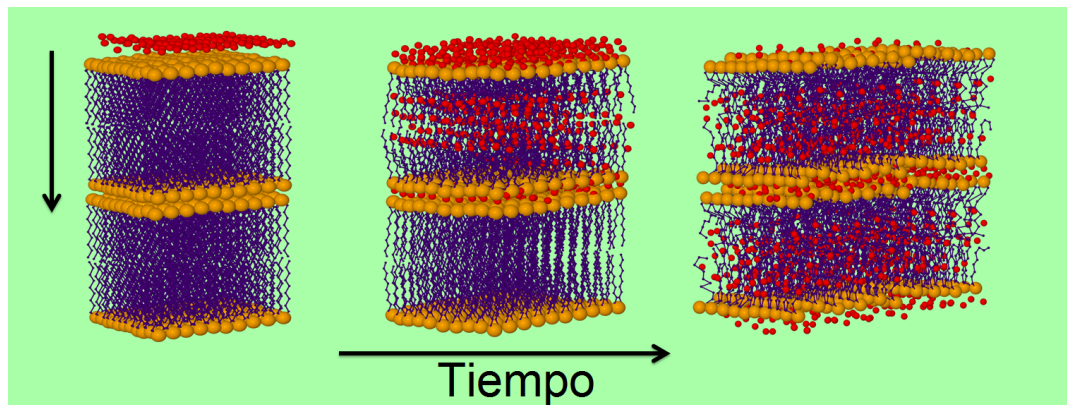
De los liposomas preparados ya sea MLV, SUV o LUV se toma alrededor de 1 ml y se les añade la cantidad necesaria de fármaco y se agita hasta homogenizar completamente. Las referencias que se requiere para el caso de los análisis de calorimetría se prepararan de la misma manera sólo que en lugar de liposomas se utiliza la solución búffer. Tanto la muestra como la referencia deben de ser degasificadas para evitar que las posibles burbujas de aire interfieran con la medición.

Resultados

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis están desglosados en los capítulos 5-9. En cada uno de estos capítulos se presentan los resultados tomando en cuenta información relevante del estado del arte en el área. Cada capítulo cuenta con una breve introducción, una discusión y una conclusión. Adicionalmente, en cada uno de ellos, se desglosan los detalles experimentales asociados con los resultados.

5

Tasa de protonación y difusión de anestésicos en MLV



Diversos estudios afirman que tanto moléculas alifáticas como aromáticas, incluso gases nobles poseen propiedades anestésicas [24–31]. Sin embargo, una teoría que incluya a todos los aspectos de la anestesia continúa en formación. Un primer enfoque dicta un mecanismo de la anestesia basado en proteínas como un proceso ligando-receptor. Un segundo, postula un blanco de acción basado en lípidos [9, 23, 32–34]. Las moléculas con propiedades anestésicas han sido usadas tanto en anestesia local como en general dependiendo del balance entre su farmacocinética y su toxicidad, pero debido a esta misma razón muchas de ellas han sido discontinuadas [35]. La difusión de los anestésicos a través de los tejidos es uno de los procesos farmacocinéticos más relevante y está intrínsecamente relacionado con su solubilidad orgánica y acuosa, lo que conlleva a que un anestésico pueda ser local o general. Por esta razón, la correlación entre la disminución de la temperatura de transición de fase gel-fluido de membranas lipídicas causadas por los anestésicos, el coeficiente de partición y el pH determinan la acción de un anestésico [36–40]. Así se tiene que, los anestésicos locales poseen una estructura química con tres dominios importantes para llevar a cabo el efecto anestésico: i) un anillo aromático lipofílico, ii) una cadena intermediaria formada por un grupo éster o amida, y iii) un grupo amino terminal. Los dos primeros determinan el grado de lipofilidad de dichas moléculas. Sin embargo, el carácter lipofílico puede ser modificado por la actividad del grupo amino dependiendo de las condiciones de pH en que se encuentre. Esta característica molecular determina la farmacocinética y la acción de los anestésicos locales. Una base débil en su forma protonada está asociada con el reconocimiento de su receptor proteico, mientras que en su forma no protonada aumenta su lipofilidad y por ende difunde más rápido a través de los tejidos. La dinámica molecular que presentan los anestésicos locales conllevan a un fin: bloquear la transmisión del impulso nervioso.

En esta sección se presentan resultados experimentales sobre la dinámica molecular de los anestésicos locales y generales, para sustentar que un componente importante en el proceso de protonación y desprotonación de las moléculas anestésicas juega un papel preponderante en el proceso de difusión de los fármacos a través de las membranas: la tasa de protonación.

5.1 Difusión de anestésicos locales en liposomas multilamelares. Capas “anestesiadas” vs capas no “anestesiadas”: dos transiciones de fases

La difusión de los anestésicos en los tejidos es una propiedad importante a considerar para determinar su uso clínico. Técnicas como DSC han sido previamente usadas para estudiar la permeabilidad de fármacos a través de membranas lipídicas [41, 42]. Con el objetivo de evaluar termodinámicamente cómo los anestésicos locales difunden a través de multicapas de lípidos, se realizó un análisis focalizado en la medición de la entalpía calorimétrica de un sistema de MLV y fue comparado con un sistema de monocapa (LUV). Ambos sistemas fueron ensamblados de DPPC y expuesto a diferentes dosis de tres anestésicos locales: procaína, lidocaína y tetracaína. Los experimentos fueron llevados a cabo en un medio de 100 mM de NaCl, pH 4-6 y con el objetivo de mimetizar las condiciones de aplicación clínica en donde el uso de la anestesia va acompañada de dosis mínimas de fenilefrina, la cual es usada para contrarrestar el efecto hipotensivo de los anestésicos locales en sistemas vivos, se estudió un modelo conteniendo $0.97 \mu\text{M}$ de fenilefrina [43]. Los perfiles calorimétricos se muestran en la figura 5.1. Como se puede observar, tanto el sistema MLV como el LUV presentan una disminución de la temperatura de transición de fase. Sin embargo, en el sistema MLV se observan dos transiciones de fases (Fig. 5.1 a-c); mientras que en el sistema LUV únicamente se aprecia una transición (Fig. 5.1 d-f). La existencia de dos temperaturas de transición refleja dos cambios de fase y consecuentemente se puede deducir que en este sistema existen dos estados termodinámicamente favorecidos. El primer estado corresponde a las capas más externas de los liposomas que han sido afectadas por el efecto del fármaco: las capas “anestesiadas”. El segundo corresponde a capas más internas que aún no han sido “anestesiadas”. El corrimiento de la T_m a bajas temperaturas causado por los anestésicos es dependiente de la concentración. Sin embargo, no se observan múltiples señales, esto sugiere que la concentración del anestésico tiene que alcanzar los niveles de saturación en las capas externas antes de difundir a los niveles más internos. Cuando llega el punto de saturación, el anestésico difunde a las otras capas e inmediatamente es compensado por

anestésico proveniente del medio acuoso. Por lo tanto, si sólo dos estados son posibles, el “anestesiado” y el no “anestesiado”, dos temperaturas de transición son observadas. La primera debería ser a temperaturas similares a la que membranas se saturan de anestésico y la segunda a temperaturas cercanas a membranas sin fármaco, tal como sucede. Este efecto difusivo fue característico de los tres anestésicos locales aquí usados. La disminución de la temperatura de transición correlaciona con su hidrofobicidad y potencia anestésica, en donde la tetracaína tiene un mayor efecto, seguido de lidocaína y procaína (ver Fig. 5.1 a-c) [38,44].

Para comparar con el sistema en donde el anestésico difunde a la siguiente capa hasta que ha alcanzado su saturación, se realizaron experimentos con un sistema completamente “anestesiado”, en los cuales el anestésico fue añadido a un sistema MLV durante el proceso de hidratación, y garantizar que el fármaco está distribuido por igual en todas las capas. El resultado fue comparado con un sistema LUV, al cual se le añadió anestésico posterior a la hidratación. Los perfiles calorimétricos demuestran que, efectivamente, en el sistema MLV únicamente existe una transición de fase, perteneciente al sistema “anestesiado”. Una transición de fase muy similar puede ser observada para el sistema LUV (Fig. 5.2).

5.2 Difusión de anestésicos generales en liposomas multilamelares

Con el objetivo de comparar la difusión que presentan anestésicos locales y generales en un sistema de MLV, se realizaron experimentos calorimétricos con anestésicos generales inhalatorios, óxido nitroso (N_2O) y xenón (Xe); e intravenosos, pentobarbital (PB) y propofol (PPF). Los resultados calorimétricos se muestran en la Figura 5.3, en donde se puede observar el efecto que anestésicos generales producen tanto en el sistema MLV como el LUV. Los perfiles calorimétricos reflejan que ambos sistemas únicamente poseen una temperatura de transición de fase. Este hecho sugiere que los anestésicos generales presentan una difusión más rápida que los locales. Además, los fármacos intravenosos producen un efecto mayor que los inhalatorios, recorriendo la T_m a temperaturas más bajas. Cabe mencionar que la incorporación de N_2O y Xe al sistema de liposomas fue realizado usando altas presiones y de

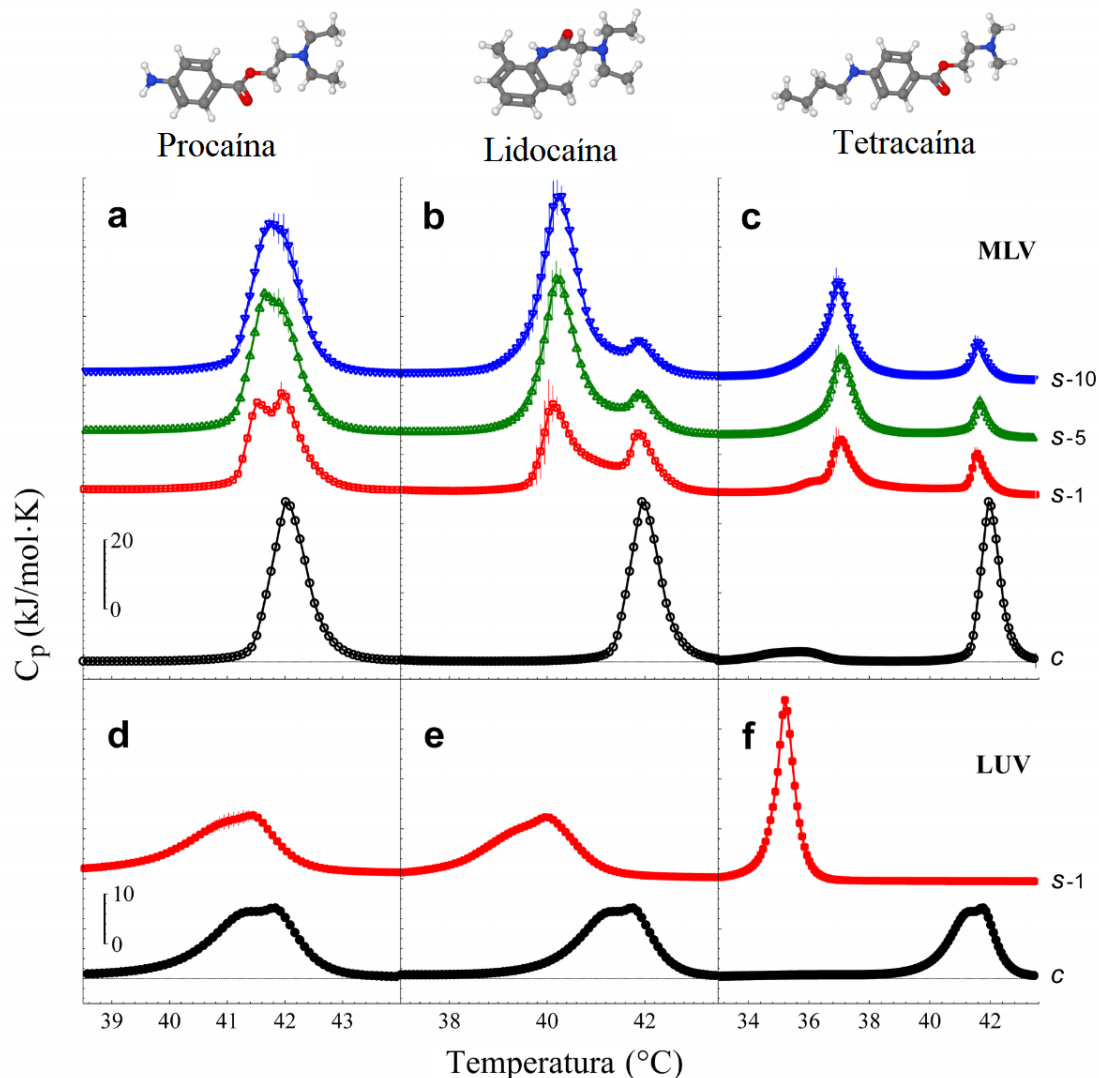


Figure 5.1: Perfiles calorimétricos de liposomas MLV y LUV de DPPC bajo la influencia de anestésicos locales. La solución anestésica fue añadida a las muestras de suspensión liposomal a la concentración requerida. Después de 10 min, se realizaron 10 barridos consecutivos. a) Procaína (73 mM), b) lidocaína (69 mM) y c) tetracaína (25 mM). Los experimentos sin anestésico, usados como controles (línea con círculos negros c), muestran que la transición principal se encuentra alrededor de 42°C. S-1, s-5 y s-10 representan los barridos del número respectivo de una serie sucesiva de barridos. Para el sistema LUV únicamente se muestra el barrido 1 debido a que los posteriores no mostraron diferencias. Las barras de error representan la desviación estándar de dos muestras diferentes.

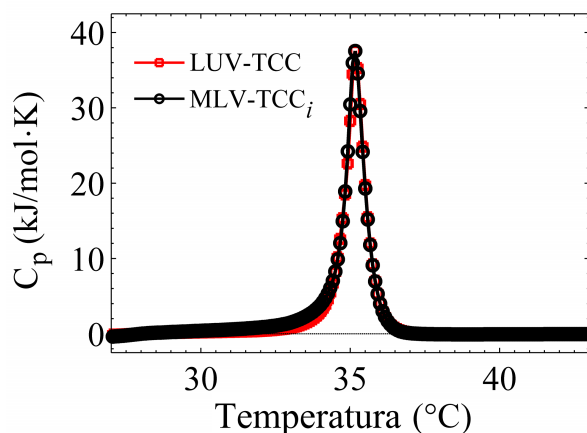


Figure 5.2: Comparación entre LUV y MLV de DPPC bajo la influencia de TC. Para el caso de LUV, la TC fue añadida posteriormente a la fabricación de los liposomas. Mientras que para el caso de MLV, la tetracaína fue mezclada con los lípidos en solución orgánica de cloroformo/metanol 2:1 v/v; y posteriormente se realizó la hidratación de los liposomas. Con este proceso se espera que la TC se encuentre homogéneamente distribuída por todos los liposomas. Se usó la misma concentración de TC (25 mM) para ambos casos. Como se puede observar, ambos sistemas sólo muestran una sola transición de fase. La barra de error es la desviación estándar de dos experimentos con alta reproducibilidad.

acuerdo con la Ley de Henry 40 atm fue necesario para alcanzar el régimen de saturación [19]. Tal efecto correlaciona con las características hidrófobas y la potencia anestésica que tales compuestos poseen [45].

5.3 Caracterización de la difusión de tetracaína en MLV

Como se observó anteriormente, la tetracaína produce la mayor disminución de la T_m ; por ello fue utilizada para caracterizar cinéticamente el proceso de difusión de los anestésicos locales a través de membranas multilamelares. Para ello se midieron las entalpías calorimétricas de las transiciones de fases de 65 barridos (en modo calentamiento) de los estados “anestesiados” (H_1) y no “anestesiados” (H_2) (ver Fig. 5.4), tomando como referencia el punto medio entre ambas transiciones. Tales entalpías fueron medidas en función del tiempo bajo condiciones de interés clínico (NaCl-fenilefrina) y en agua pura. La Figura 5.4a muestra que en presencia

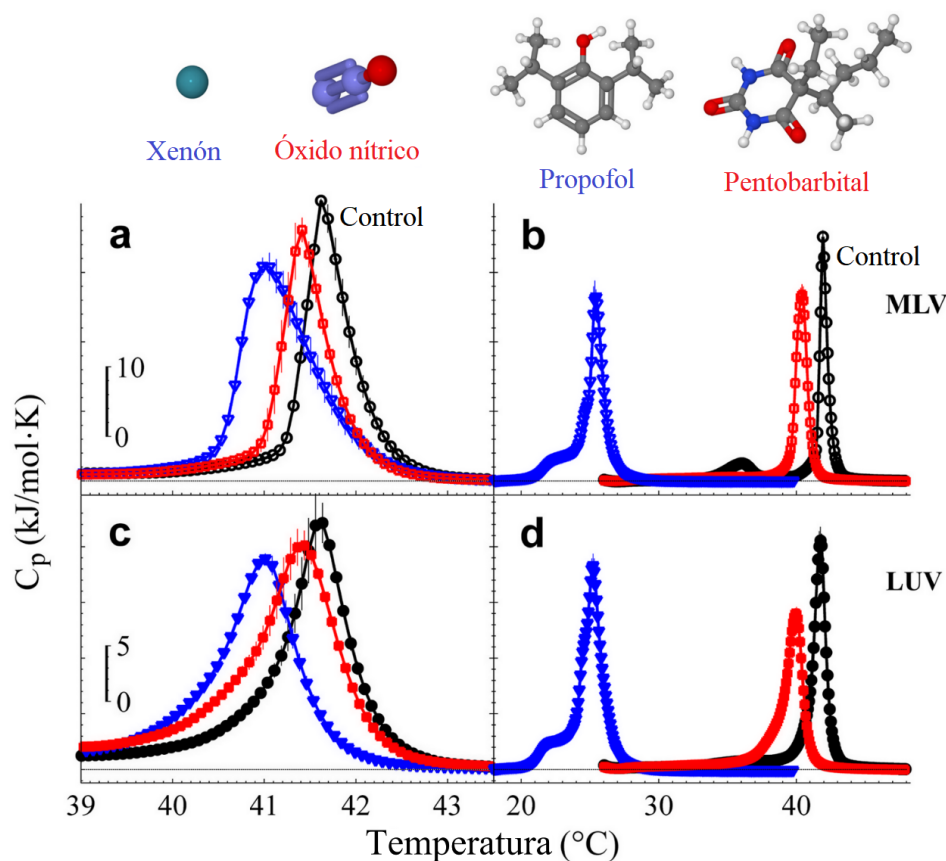


Figure 5.3: Perfiles calorimétricos de MLV y LUV de DPPC bajo la influencia de anestésicos generales. Los detalles de adición de los anestésicos al sistema liposomal se describen en el apartado de métodos. De los gráficos se puede observar que los anestésicos generales únicamente dan lugar a una transición de fase; que a diferencia de los locales que producen una doble transición.

de NaCl-fenilefrina la tetracaína recorre la T_m a más bajas temperaturas que en agua pura, quizá debido a un efecto de sinergia entre los componentes o quizá a una influencia de la fuerza iónica. Sin embargo, en ambas condiciones se presenta una cinética difusiva de la tetracaína a través de las membranas. Esta cinética consiste en que a medida que la entalpía del estado “anestesiado” aumenta, la entalpía del no “anestesiado” disminuye en la misma proporción, conservando la entalpía total ($\Delta H_{max} = \Delta H_1 + \Delta H_2$). En condiciones de NaCl-fenilefrina la ΔH_{max} alcanza un valor aproximado de 36.7 kJ/mol, mientras que en agua pura es 34.2 kJ/mol (ver Fig. 5.4b). La cinética experimental para el estado “anestesiado” (ΔH_1) fue ajustada al modelo 5.1 y la conservación de ΔH_{max} conduce a la ecuación 5.2 que

describe la cinética de ΔH_2 .

$$\Delta H_1(t) = \Delta H_{max} \left(1 - \exp^{-(\kappa t)^{1/4}} \right), \quad (5.1)$$

$$\Delta H_2(t) = \Delta H_{max} \exp^{-(\kappa t)^{1/4}}, \quad (5.2)$$

En la expresión 5.1, κ es un parámetro que está relacionado con la velocidad en la que la tetracaína se va internando a través de las capas de MLV, este parámetro puede interpretarse como un coeficiente de difusión. En condiciones de NaCl-fenilefrina, el mejor ajuste de 5.1 resulta en un valor de κ igual a $2.35s^{-1}$, mientras que en agua pura κ es mucho menor ($0.45s^{-1}$). Esto sugiere que la tetracaína difunde más rápido a condiciones clínicas (ver Fig. 5.4b). Además, con el objetivo de evaluar cómo cambia tal cinética difusiva dependiendo del estado en que se encuentre la membrana, se incubaron muestras (a condiciones de agua pura) por debajo de la temperatura de transición, en la transición y por arriba de ésta (ver Fig. 5.4c). Encontrando que la tetracaína difunde más lento en la fase gel ($\kappa = 0.28s^{-1}$) que en la fase fluída ($\kappa = 1.7s^{-1}$). Pero ésta a su vez difunde más rápido en la transición ($\kappa = 9.5s^{-1}$). Este resultado es de esperarse si se considera que en el régimen de la transición la entalpía es mayor, la contribución entrópica se maximiza impactando a la presión lateral, el volumen y el área de la membrana [46, 47].

5.4 El efecto de la tetracaína en membranas de DPPC es regulada por el pH

Previamente se mencionó que la tetracaína es una base débil. Todas las bases débiles en solución desarrollan una reacción de equilibrio fuertemente influenciadas por el pH, obedeciendo la ecuación de Henderson-Hasselbalch. Debido a ello, la tetracaína puede estar en diferentes estadios de protonación determinados por su dos valores de pKa ($pK_{a1}=3.4$ y $pK_{a2}= 8.4$, valores tomados de ChemAxon). La Figura 5.5a muestra las tres especies de tetracaína mayormente favorecidas: no protonada (1), monoprotionada (2) y diprotionada (3). Para evaluar cómo estas diferentes especies afectan la temperatura de transición de fase de

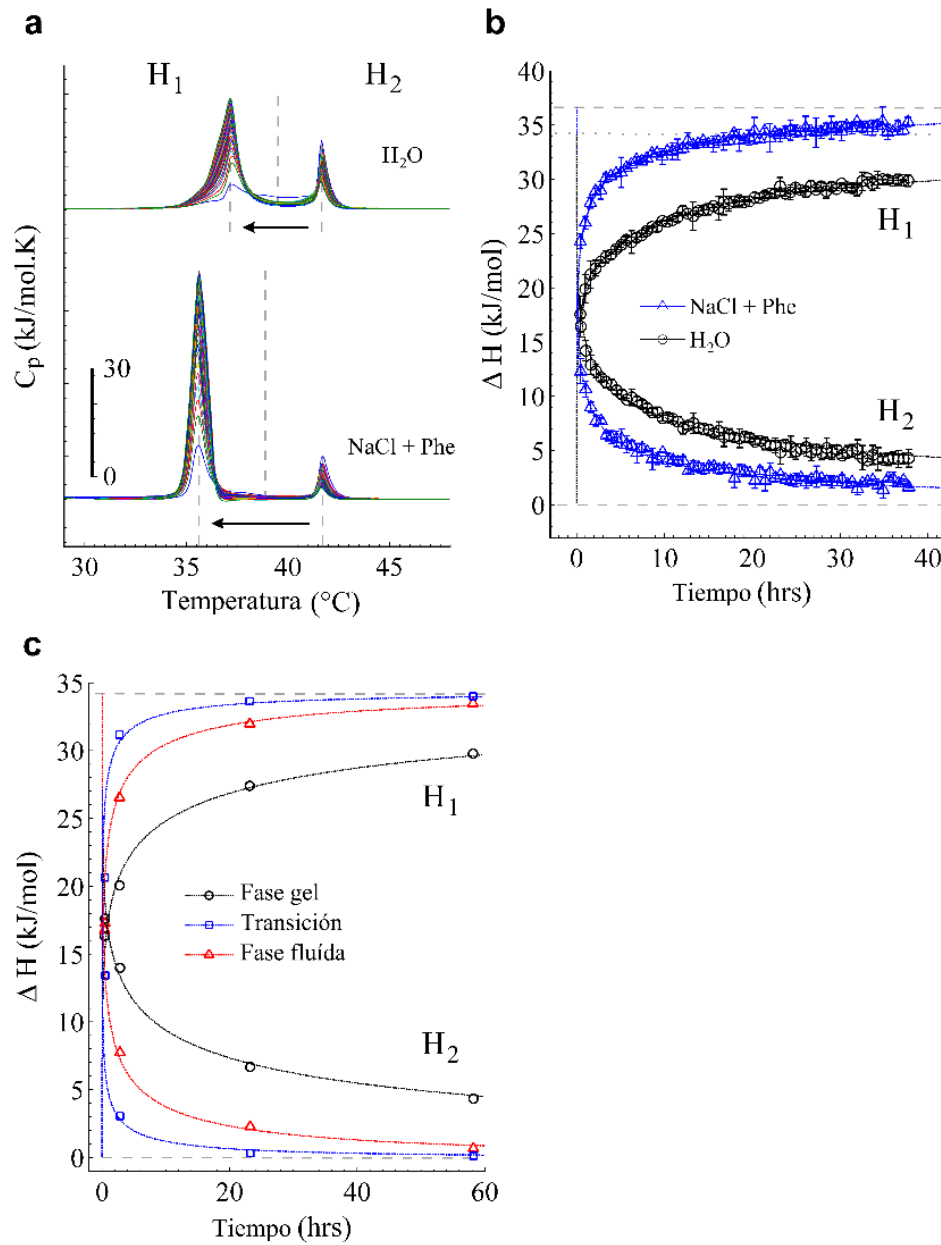


Figure 5.4: Cinética de difusión de tetracaína a través de multicapas de MLV de DPPC. Dos condiciones fueron exploradas: usando únicamente agua milliQ o solución de NaCl+fenilefrina. Para MLV + TC en agua milliQ se obtuvo la respuesta calorimétrica resaltando la importancia del estado de las membranas: gel, transición y fluido. La entalpía calorimétrica fue calculada para explorar la difusión de TC a través de la membrana. Las curvas fueron ajustadas a los modelos 5.1 y 5.2.

liposomas de DPPC, se realizaron ensayos calorimétricos en un amplio rango de pH (2-11) utilizando diferentes soluciones amortiguadoras dependiendo del rango de pH a controlar (ver Tabla 5.1).

La Figura 5.5b muestra los perfiles calorimétricos de MLV de DPPC con y sin tetracaína en función del pH. Como se puede ver, entre pH 3 y 10 las soluciones búffer no afectan a la temperatura de transición de fase del sistema. Pero a pH extremos (2 y 11) puede notarse un cambio. A pH 2 (sin tetracaína) se observa una disminución de la cooperatividad del sistema, observando en el perfil calorimétrico un pico más aplanado. Tal comportamiento, posiblemente, es debido a un efecto electrostático causada por la disminución de carga negativa de los grupos fosfatos que se van apantallando por el exceso de protones en el medio. O bien, porque un proceso de hidrólisis ácida está justo a iniciar, aunque trabajos previos han reportado que este evento cobra significancia hasta después de un día de incubación [48]. Por otro lado, a pH 11 la temperatura de transición disminuye, la morfología de la señal principal se conserva, pero la pretransición desaparece casi por completo. Este efecto podría estar relacionado con la alta concentración de iones OH en el sistema, produciendo una desestabilización de la membrana. Sin embargo, cuando hay presencia de tetracaína en el medio, la T_m principal se desplaza a temperaturas más bajas gradualmente de pH 2 a 10. La Figura 5.5c inferior, muestra que la disminución de la temperatura de transición (ΔT_m) del sistema es más pronunciado a medida que la hidrofobicidad de la tetracaína se incrementa desde su estructura más polar (**3**) a la más hidrófoba (**1**) (Fig. 5.5 c superior). Es importante resaltar que las dos transiciones de fases observadas en el sistema MLV a consecuencia de la tetracaína únicamente ocurre entre pH 4-6, lo cual coincide con la presencia de especies (**2**) y (**3**) en el medio. La presencia de estas dos especies sugiere que existe una variabilidad de los protones que se requieren en las reacciones de equilibrio que se llevan a cabo cada vez que la tetracaína difunde a la siguiente capa de lípidos.

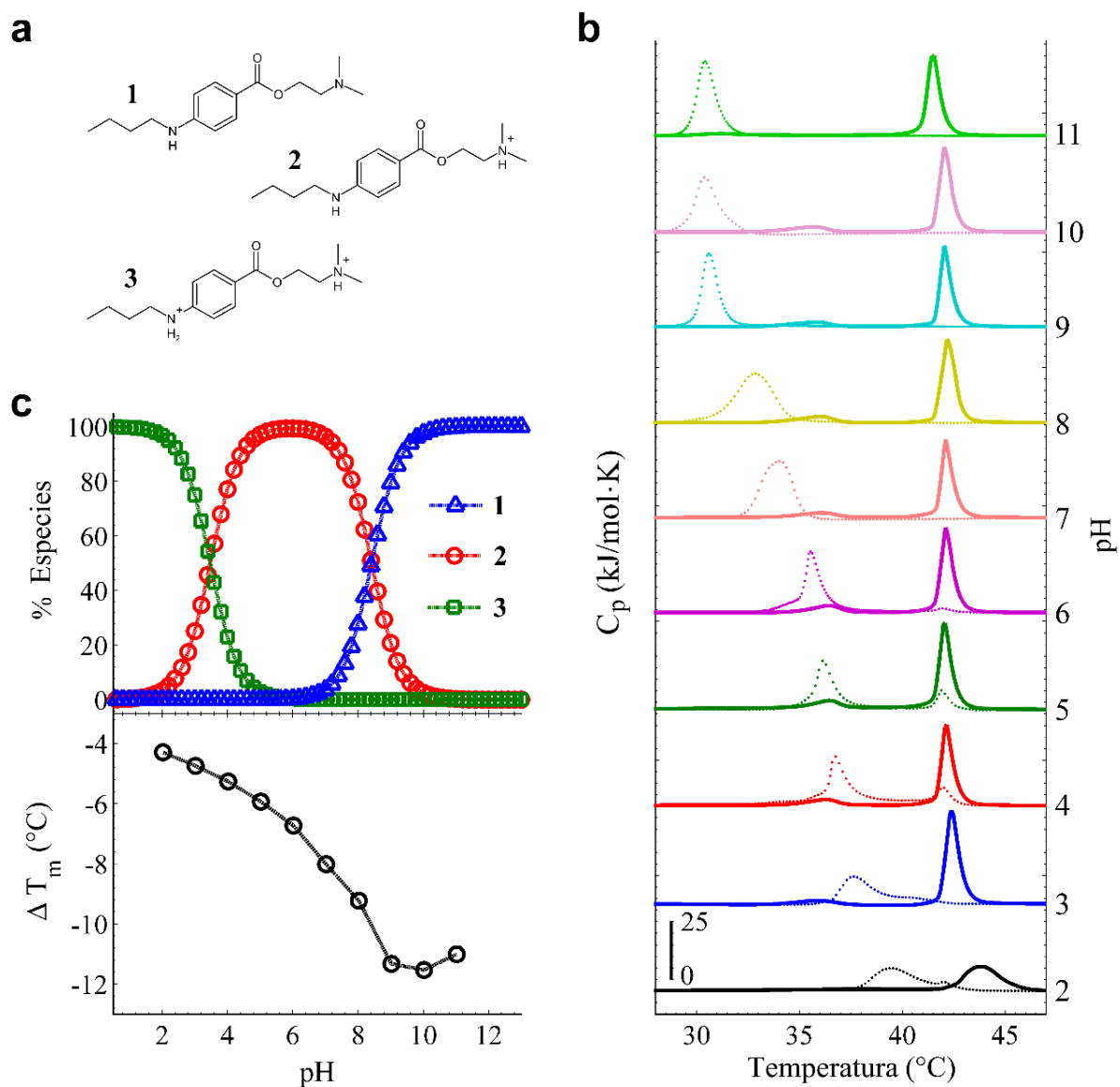


Figure 5.5: Influencia del pH en el efecto que la tetracaína produce en membranas de DPPC. (a) Muestra las tres posibles especies de TC dependiendo del pH. El carácter hidrófobo se incrementa de la especie **3-1**. Es importante mencionar que las dos transiciones de fases solamente se pueden observar entre un pH 4-6 (b); que es precisamente el pH al que coexisten la especie **2** y **3** (c).

5.5 La difusión de los anestésicos locales en liposomas multilamelares es mediada por su tasa de protonación

La transferencia de protones juega un papel esencial en diversos procesos biológicos [49, 50]. Se ha reportado que la tasa de transferencia de protones alcanza el orden de femtosegundos-microsegundos y depende fuertemente de dos aspectos: de la estructura química de las moléculas actuadoras y de las condiciones del medio [51, 52]; es decir, esta transferencia de protones depende de la tasa de protonación inducida por las interacciones intermoleculares de los componentes del sistema.

Para evaluar cómo estas interacciones intermoleculares modulan la difusión de los anestésicos locales en liposomas multilamelares, se realizaron experimentos con un agente en el medio capaz de determinar una tasa de protonación efectiva dada por la estructura química de dicho componente. Para ello se usaron separadamente cuatro ácidos carboxílicos AC (fórmico, glicólico, cítrico y málico). El grupo carboxílico de cada uno de estos ácidos está unido a un grupo radical con diferente ramificación responsable de polarizar inductivamente a la región carboxílica, determinando así, una tasa de protonación efectiva dada por las interacciones intermoleculares (IEPR, por sus siglas en inglés) en el sistema. La Figura 5.6a muestra el primer barrido calorimétrico de cada uno de los sistemas mencionados. Como se puede observar, el caso de H_2O representa el estadio más temprano del proceso de difusión de tetracaína; ya que la entalpía que representa el estado no “anestesiado” es mayor que el estado “anestesiado”. Este estadio está gobernado por dos reacciones de equilibrio acopladas, una dada por la autodisociación del agua y la otra dada por la reacción de equilibrio de la tetracaína. Debido a que el pH del sistema en su estado inicial es 5, se esperaría una mayor contribución del intercambio entre las especies **(2)** (97.06%) y **(3)** (2.9%) de la tetracaína que la especie **(1)** (0.04%) de acuerdo a la Fig. 5.5c superior. Los estadios subsecuentes de la Fig. 5.6a corresponden a los ácidos carboxílicos: málico (A), cítrico (B), fórmico (C) y glicólico (D). El estadio de difusión en que se encuentra la tetracaína, ahora es promovido por el efecto de tres reacciones de equilibrio acopladas ($H_2O-TC-CA$), en donde cada AC

promueve una tasa particular de transferencia de protones. La Figura 5.7 muestra que los AC no causan efecto sobre la membrana de DPPC.

Para explorar los subsecuentes estadios de difusión de la tetracaína promovido por cada uno de los ácidos carboxílicos, se graficaron los cambios de entalpías H_1 y H_2 como función del tiempo (Fig. 5.6b). Los resultados demuestran que el mismo modelo de difusión gobierna la dinámica temporal promovida por los CA. A mayor valor de κ la droga difunde más rápido y menos tiempo es requerido para alcanzar el estado final del sistema (estado “anestesiado”). En comparación con los anestésicos generales, en los cuales el estado “anestesiado” tiene lugar antes de realizar la medición, puede inferirse que estos anestésicos (pentobarbital, propofol, óxido nitroso y xenón) presentan una difusión más rápida a través de las membranas lipídicas que los anestésicos locales como la tetracaína, procaína y lidocaína (ver Fig. 5.6c).

Los resultados previamente descritos demuestran que la naturaleza química de los anestésicos locales y generales son la base molecular detrás de su comportamiento difusivo en membranas lipídicas. Siendo que las bases débiles como los anestésicos locales pueden tener uno o dos grupos protonables, los cuales dependen de las condiciones del medio para favorecer poblacionalmente una u otra especie. Por otro lado, los anestésicos generales son principalmente hidrófobos [53, 54]. Los anestésicos generales inhalatorios son gases, por lo que en este tipo de moléculas el pH no cobra relevancia. Así mismo, los intravenosos poseen sitios protonables, pero a pH muy extremos dando lugar a hidrólisis de la molécula. Las moléculas cargadas como las que se producen en las reacciones de equilibrio de los anestésicos locales dan lugar a interacciones coulombicas de largo alcance. Mientras que las moléculas o átomos hidrófobos como los anestésicos generales y las regiones hidrófobas de los anestésicos locales, están gobernadas por interacciones de corto alcance como las interacciones de van der Waals [55]. La Figura 5.8a muestra una representación de los potenciales coulombico y de van der waals a través de una bicapa de DPPC.

Las especies protonadas comúnmente se alojan a nivel de los grupos hidrófilos que están a nivel de la cabeza de las moléculas de fosfolípidos, con una orientación normal al plano de la bicapa, en donde el grupo de la amina terciaria, el agua y el grupo fosfato interaccionan principalmente vía fuerzas coulombicas [57]. Esta atracción electrostática compite con el

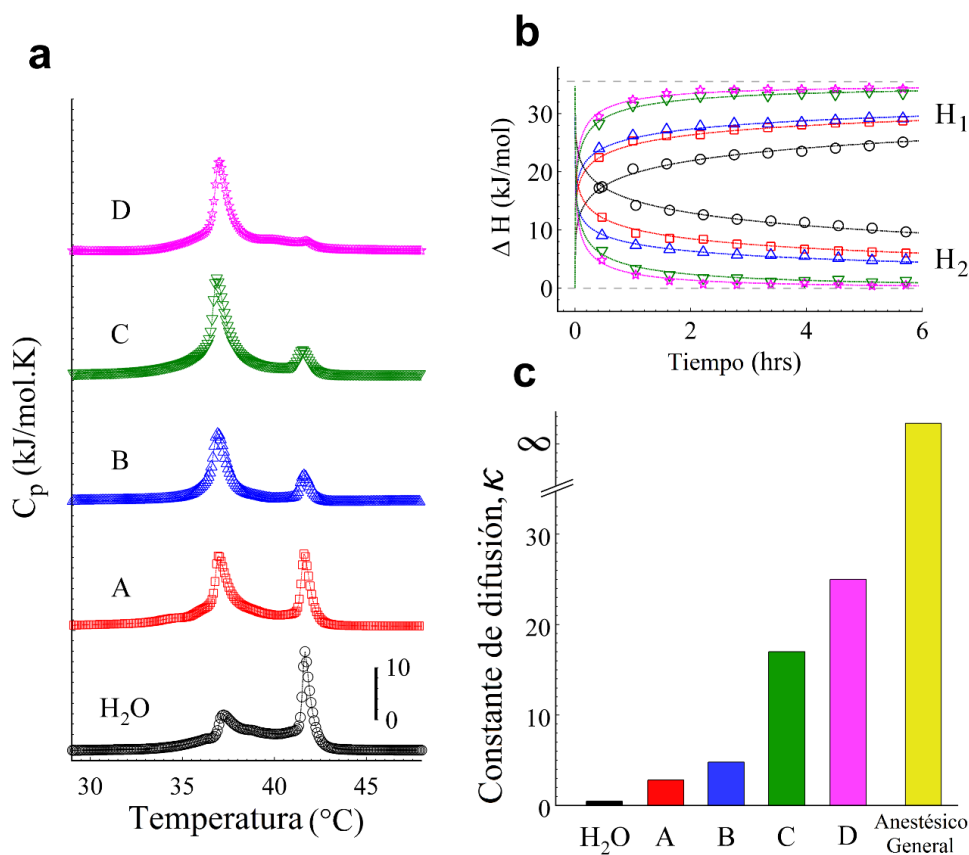


Figure 5.6: La cinética difusiva de TC a través de multicapas de DPPC es modulada por la influencia de ácidos carboxílicos. (a) Muestra el efecto producido en los perfiles calorimétricos de MLV+TC dada la influencia de agua, ácido málico (A), ácido cítrico (B), ácido fórmico (C) y ácido glicólico (D). (b) Muestra la respuesta cinética dada la entalpía y su respectivo ajuste de acuerdo a los modelos 5.1 y 5.2. (c) Muestra los valores de la constante κ obtenidos a partir de dicho modelo.

ruido térmico. Cálculos del potencial de fuerza promedio sugieren que la energía potencial de interacción entre la forma cargada de la tetracaína y la cabeza polar de la membrana es aproximadamente tres veces mayor que la energía térmica $k_B T$. Y esta diferencia es menor para la forma no cargada [57].

Contrariamente, la forma neutra de los anestésicos locales penetra más profundamente dentro de la bicapa lipídica, estando libre para difundirse lateralmente dentro de la misma o continuar su carrera hasta el otro extremo [57, 58]. Debido a que la energía potencial de van der Waals es negativo en el núcleo de las cadenas acílicas, los anestésicos locales en su

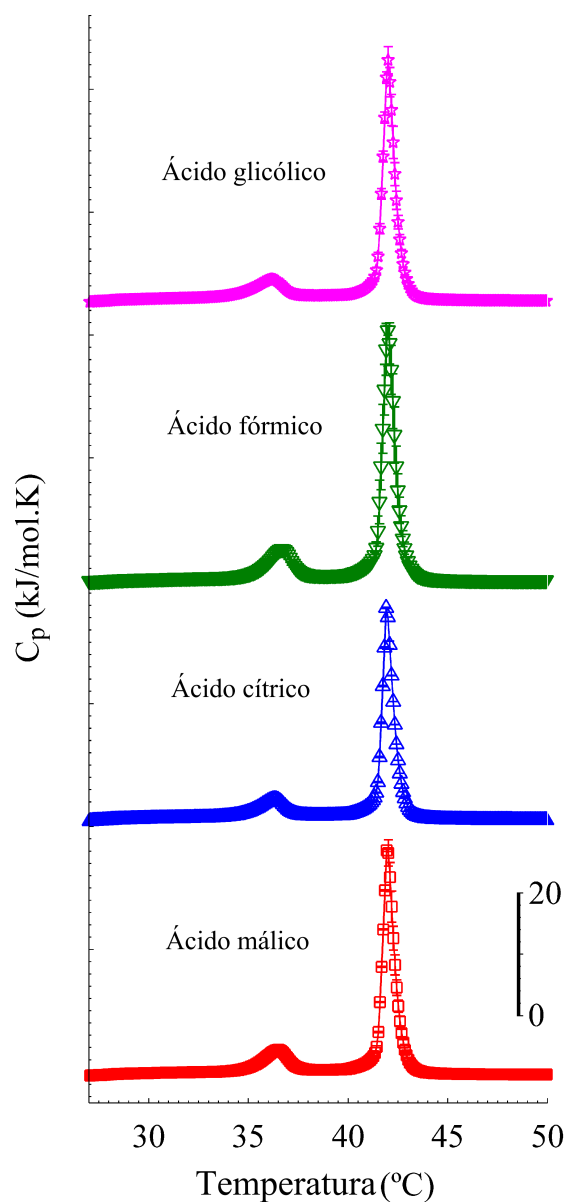


Figure 5.7: Experimentos usados como controles para verificar el efecto que los ácidos carboxílicos producen en membranas de DPPC sin la presencia de tetracaína.

forma no cargada están ubicados hacia abajo, perpendicular al plano de orientación de la cola alifática. Pero cambian su orientación cuando difunden a través de la membrana [57,58].

Para que las moléculas hidrófobas interactúen con la membrana y se internen dentro de ésta, se requiere que las moléculas se ubiquen muy cerca de la superficie de la membrana. Para llevar a cabo esta tarea y superar la barrera energética, el ruido térmico es el principal

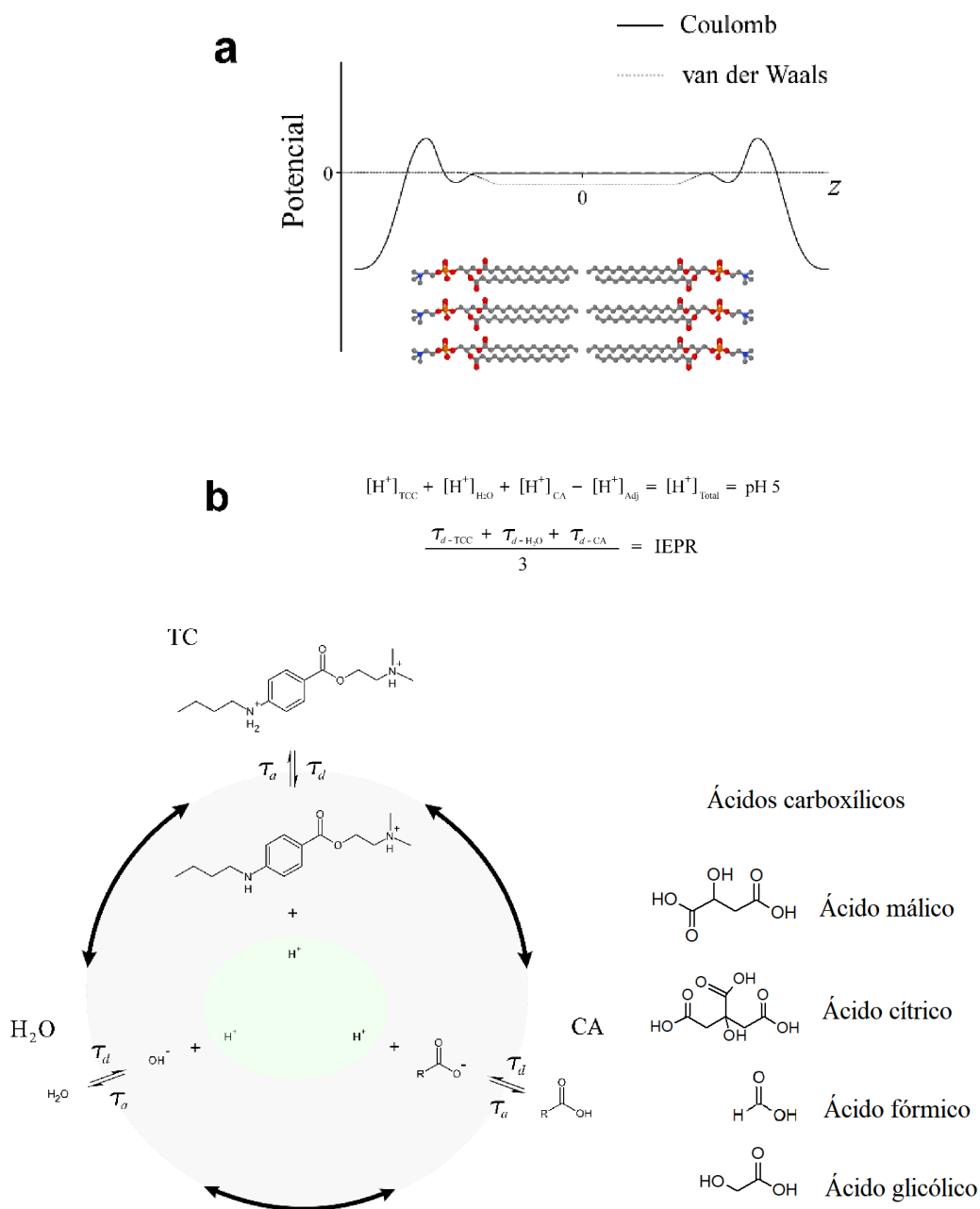


Figure 5.8: Mecanismo molecular propuesto para explicar cómo la tasa de protonación regula la difusión de los anestésicos locales a través de multicapas lipídicas. (a) Muestra la barrera de potencial coulombico y de van der Waals de una bicapa lipídica sujetos a vencer en el proceso difusivo [56]. (b) Propone que existe una tasa de protonación efectiva dada las condiciones del medio que influye directamente en las reacciones de equilibrio de las bases débiles, produciendo variabilidad de las posibles especies. Los AC dada su naturaleza química son útiles para influenciar directamente dicha tasa de protonación.

aliado en dicha tarea (ver Fig. 5.8). Permitiendo así que, moléculas hidrófobas, como la especie **(1)** de tetracaína o un anestésico general, puedan penetrar a través de múltiples capas de membrana lo suficientemente rápido para dar lugar a un nuevo sistema homogéneo, cuya respuesta térmica sea una sola transición de fase. Si durante su trayectoria difusiva, existen condiciones para que dicha molécula pueda intercambiarse entre las especies **(2)** y **(3)**, entonces la velocidad con que difunden éstas moléculas es atenuada, dando lugar a dos estados característicos, el estado “anestesiado” y el no “anestesiado”. La condición más importante que se propone en este trabajo, es que la concentración de protones en el medio que da lugar a que las reacciones de equilibrio de una base débil como la tetracaína se lleven a cabo cambia con respecto a una tasa de protonación efectiva dada por las condiciones del medio (ver Fig. 5.8b).

Se ha reportado que la tasa de transferencia de protones en agua está en el orden de femtosegundos [59], mientras que para el ácido fórmico, ésta se encuentra en el orden de nanosegundos [60]. Para los otros ácidos carboxílicos usados en este trabajo no se encontraron referencias al respecto de esta variable. La influencia sobre la tasa de protonación efectiva que dicta cada uno de los ácidos carboxílicos esté en función de la fuerza inducida por los radicales unidos al grupo carboxílico (efecto inductivo). A mayor fuerza inducida por los grupos sustituyentes al grupo carboxílico, aumenta la facilidad con la que se puede desprender el proton del mismo -COOH, es decir, el valor de su pKa tiende a disminuir. En este trabajo se observó que a menor acidez del ácido carboxílico, mayor es la tasa de protonación y más lenta es la difusión de los anestésicos locales a través de la membrana.

La Figura 5.8b esquematiza las reacciones de equilibrio, dadas por cada uno de los componentes moleculares en el sistema (ácidos carboxílicos, agua y anestésicos locales), que dan lugar a una tasa de protonación efectiva (IEPR) que regula la difusión de los anestésicos locales a través de las multicapas de membranas de lípidos. A condiciones de $\text{pH} \approx 5$, las especies **(2)** y **(3)** son las que predominan en el proceso difusivo.

Las interacciones intermoleculares entre los componentes del sistema que dan lugar a la IEPR está determinado por los agentes capaz de cambiar la variabilidad de protones en el medio. Por lo tanto, en un primer escenario, si en el sistema la concentración del AC

aumenta, la velocidad de difusión del anestésico puede cambiar. La Figura 5.9 demuestra que la difusión del anestésico aumenta en función de la concentración de ácido málico. En un segundo escenario, si la concentración del anestésico aumenta en relación a la concentración de lípidos que forman la membrana, la difusión también sería más rápida. La Figura 5.10 demuestra esta posibilidad.

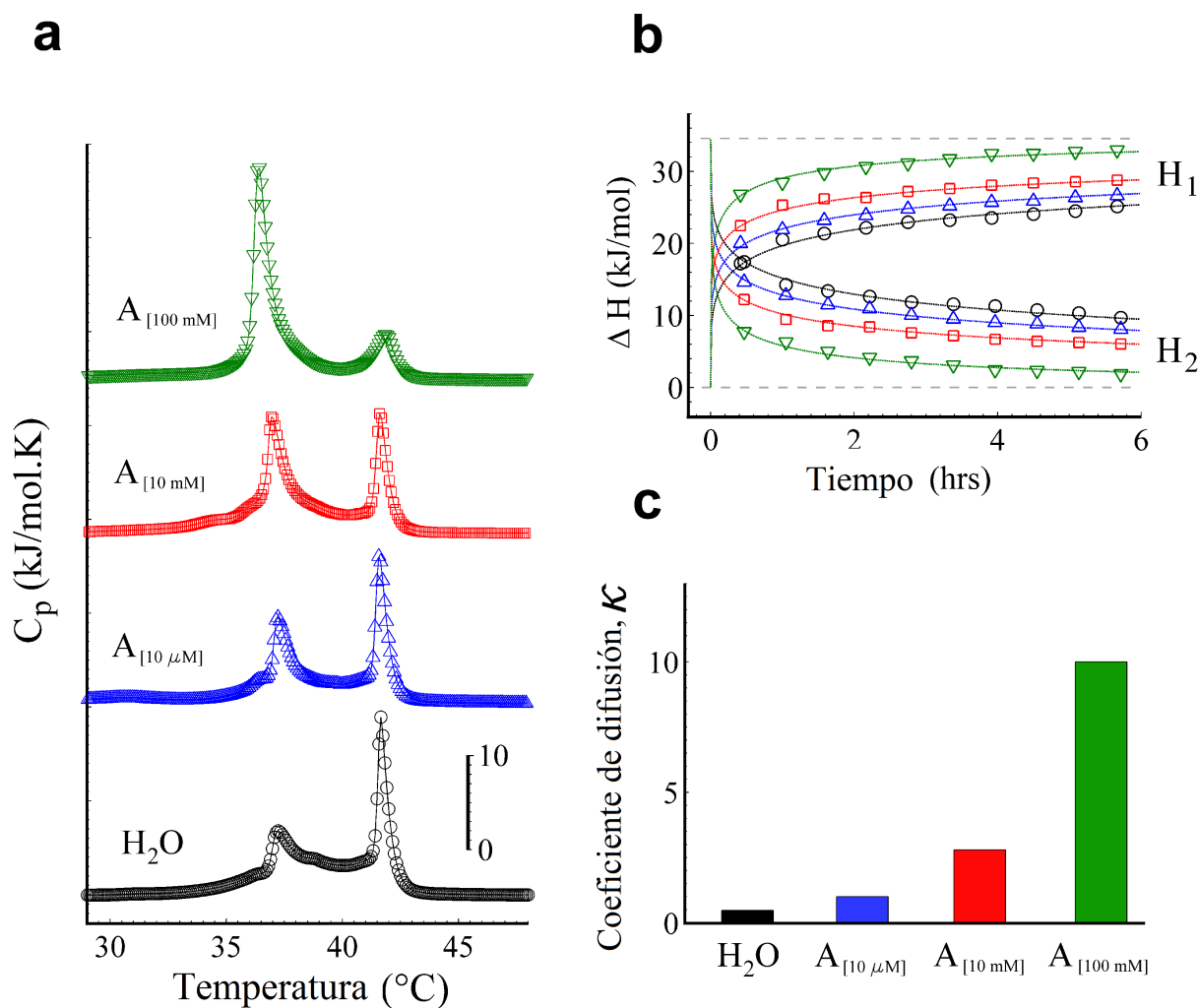


Figure 5.9: Difusión de tetracaína a través de MLV de DPPC regulado por la acción de diferentes concentraciones de ácido málico. (a) Muestra los perfiles calorimétricos, (b) La respuesta en entalpía calorimétrica con sus respectivos ajustes y (c) las constantes de difusión obtenidas.

En resumen, estos experimentos demuestran que la tasa de protonación efectiva inducida

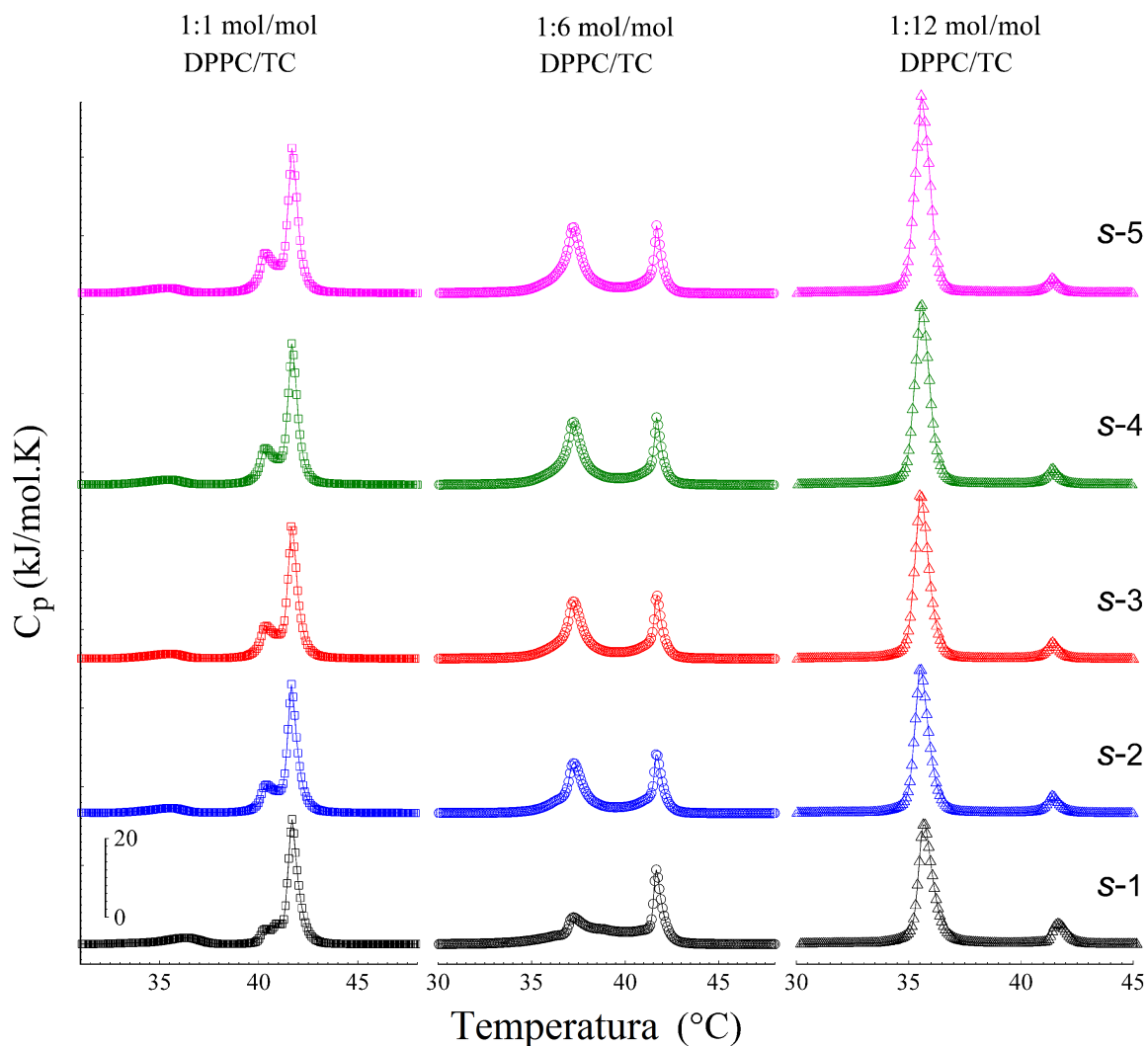


Figure 5.10: Perfiles calorimétricos que ilustran la difusión de la TC a diferentes concentraciones: 4 mM, cuadros; 25 mM, círculos; y 50 mM, triángulos.

por las interacciones intermoleculares entre los componentes del sistema (membrana lipídica, anestésico, CA), juega un rol preponderante en la cinética difusiva de los anestésicos locales a través de multicapas lipídicas. El cual, en comparación con los anestésicos generales, podría evidenciar la naturaleza de ser un anestésico local o general. Este trabajo contribuye en el proceso de elucidación del tan intrincado mecanismo de la anestesia. Y podría ser referencia para la preparación de mezclas anestésicas más eficaces.

Detalles experimentales

Reactivos. DPPC fue adquirido de Avanti Polar Lipids. NaCl, fenilefrina.HCl, procaína.HCl, tetracaína.HCl, propofol, ácido cítrico, citrato de sodio, ácido málico, ácido glicólico, ácido fórmico, ácido 2-(N-morfolin)etanosulfónico, tris(hidroximetil)aminoetano, 2-amino-2-metil-1,3-propanodiol, 2-amino-2-metil-1-propanol y ácido 4-(cyclohexilamino)-1-butanosulfónico fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. Pentobarbital sódico fue comprado a Cheminova. Todos los reactivos fueron usados sin purificación adicional.

Preparación de MLV y LUV. La preparación de los liposomas fue realizado usando el procedimiento estándar descrito en la sección general de métodos. La hidratación fue llevada a cabo a 55°C usando ya sea agua MilliQ (MV.cm, pH 4-6) o búffer de interés, agitando a 600 rpm durante 40 min; en un Degassing Station (TA Instruments). Para obtener LUV, se extrujeron MLV con una membrana de policarbonato de 100 nm (tamaño de poro), usando un Mini-Extruder (Avanti Polar Lipids).

Análisis calorimétrico. Los perfiles de capacidad calorífica fueron obtenidos a una tasa de 1°C/min a una presión constante de 3 atm. Las muestras fueron degasificadas antes de ser depositadas en la celda del calorímetro. Las muestras fueron equilibradas por 5 min a 25°C. Y para todos los casos la medición calorimétrica se realizó 10 min después de la preparación de la muestra. Las mediciones fueron realizadas en modo calentamiento. La captura y análisis de los datos fueron realizados usando los programas propios del instrumento. Debido a la alta sensibilidad del equipo y a la alta reproducibilidad de los experimentos, estos últimos únicamente se midieron por duplicados.

Experimentos con anestésicos locales. Las muestras de MLV y LUV de DPPC con alguno de los anestésicos locales fueron preparadas a una concentración final de 73 mM de procaína, 69 mM de lidocaína o 25 mM de tetracaína. Para las condiciones de relevancia clínica se añadió 0.97 μ M de fenilefrina y 100 mM de NaCl; la fenilefrina es usada como un vasopresor para contrarrestar el efecto hipotensivo de los anestésicos locales en sistemas vivos.

El pH en todos los casos fue llevado a ≈ 5 con NaOH/HCl. Los experimentos controles no contienen anestésicos.

Experimentos con anestésicos inhalatorios. Para disolver los gases de xenón y óxido nitroso en suspensión liposomal, se expusieron las muestras de liposomas a cada uno de los gases a alta presión (40 atm) a temperatura controlada (70°C) por 2 hrs. Los experimentos calorimétricos fueron llevados a cabo justo después de dicha exposición. Con ayuda de la Ley de Henry se puede conocer aproximadamente la concentración de gas incorporada en la suspensión liposomal, la cual dicta que a temperatura constante la solubilidad de ciertos gases en un medio acuoso es directamente proporcional a la presión que se somete el líquido.

Experimentos con anestésicos intravenosos. La concentración final de propofol y pentobarbital en las muestras de liposomas fue de 56 mM y 25 mM, respectivamente. De igual manera el pH de todas las muestras fue llevada a ≈ 5 . Los barridos calorimétricos fueron realizados de 15-45°C para propofol y de 25-50°C para pentobarbital.

Cinética de difusión de tetracaína en MLV. A liposomas MLV de DPPC en medio acuoso se le añadió una concentración final de 25 mM de tetracaína. El pH fue llevado a ≈ 5 . Las muestras fueron incubadas a tres condiciones de temperatura dependiendo de la fase de interés: 25°C (fase gel), 41.8°C (temperatura de transición) y 55°C (fase fluida). Se analizaron cuatro tiempos representativos de la cinética de difusión: 0, 3, 24 y 60 hrs.

Experimentos a pH controlado. La hidratación de los lípidos fue realizada con solución búffer de pH deseado de acuerdo a la Tabla 5.1. Los experimentos controles fueron realizados sin tetracaína.

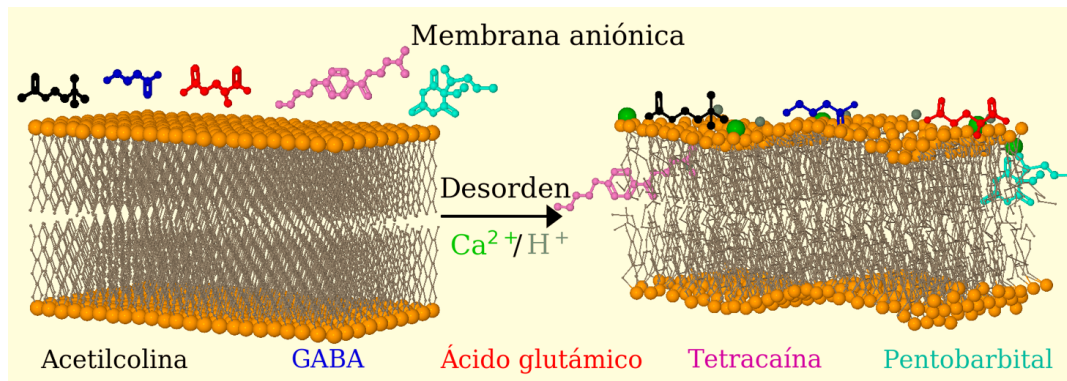
Experimentos con ácidos carboxílicos. La hidratación de los lípidos fue realizada con solución de 10 mM de cada uno de los siguientes ácidos carboxílicos: málico, cítrico, glicólico y fórmico. El pH fue ajustado a ≈ 5 para todos los casos.

Tabla 5.1: Soluciones búffer usadas para regulación del pH y favorecer la abundancia de alguna de las tres especies químicas de tetracaína (ver Fig. 5.5a)

pH	Búffer
2	HCl-glicina
3	Citrato-cítrico
4	Citrato-cítrico
5	Citrato-cítrico
6	MES (ácido 2-(N-morfolin) etanosulfónico)
7	Trizma (Tris(hidroximetil)aminometano)
8	AMPD (2-amino-2-metil-1,3-propanodiol)
9	AMPD (2-amino-2-metil-1,3-propanodiol)
10	AMP (2-amino-2-metil-1-propanol)
11	CABS (ácido 4-(ciclohexilamino)-1-butanosulfónico)

6

Interacciones de AT y NT con membranas aniónicas



En este capítulo discutiremos cómo sistemas compuestos únicamente de membranas lipídicas son aptas para responder a moléculas conocidas por su actividad en las transmisiones nerviosas: los neurotransmisores. Y a su vez aprovecharemos para compararlos con el efecto que los anestésicos producen sobre el mismo tipo de sistemas bajo las mismas condiciones experimentales.

Es bien conocido que la comunicación interneuronal a través de la sinapsis química, puede interrumpirse por la acción de algunos anestésicos. Esto es posible porque tanto la sinapsis química como la anestesia comparten algunos principios del mecanismo molecular propuesto: Una señal nerviosa puede verse aumentada, atenuada o interrumpida debido a un cambio conformacional de los receptores neuronales causada por un estímulo químico o eléctrico [45, 61, 62].

Los neurotransmisores son las moléculas que se encargan de transmitir la información de una neurona a otra para mantener la comunicación neuronal. Sin embargo, ésta puede ser afectada por la acción de los anestésicos. Tanto neurotransmisores como anestésicos son molecularmente diversos. Entre los neurotransmisores más importantes se encuentran pequeñas moléculas como la acetilcolina y adenosina; ácidos grasos como la anandamida; monoaminas como la dopamina, norepinefrina, epinefrina, serotonina y melatonina; aminoácidos que incluyen al glutamato, aspartato, serina, ácido γ -aminobutírico; y algunos péptidos de cadena corta como el neuropéptido Y (NPY) [63, 64]. De la misma forma, una gran diversidad de estructuras moleculares tienen capacidad de producir efecto anestésico. Así se tiene que, alcanos, alcoholes, éteres, ésteres, amidas, fenoles, diacepinas, barbitúricos, hasta incluso gases nobles como el xenón son anestésicos [65].

El mecanismo aceptado de la transmisión sináptica dicta lo siguiente: las terminales nerviosas de las neuronas presináptica y postsináptica se encuentran separadas por un pequeño espacio conocido como hendidura sináptica. Este espacio interneuronal desarrolla una gran actividad química, la cual es mediada por los neurotransmisores, que son las moléculas encargadas de transmitir, bloquear o retardar la conexión eléctrica. Los NT se encuentran encapsulados en vesículas lipídicas en la terminal del axón de la célula presináptica y son expulsados a la hendidura sináptica cuando se recibe una variación de potencial

eléctrico. Ésta a su vez es mediada por un aumento en la concentración de calcio, promoviendo la fusión de dichos contenedores lipídicos con la membrana del axón, para dar lugar a la liberación de los NT. La célula postsináptica recibe a los NT por un sistema de reconocimiento molecular llevado a cabo por proteínas receptoras, las cuales en muchas ocasiones están asociadas con otras denominadas proteínas G. Los neurotransmisores que quedaron como excedente son degradados por otras proteínas, como la enzima monoaminooxidasa (MAO), que a través de un proceso redox, oxida al grupo amino de los neurotransmisores. Sin embargo, aún persisten muchas interrogantes sin contestar, por ejemplo, ¿cuál es el rol de protones y calcio en el medio? [66–72].

Se ha reportado que durante el proceso de sinapsis, el calcio juega diferentes tipos de roles. La concentración de calcio extracelular se modifica cuando hay procesos de fusión por exocitosis promoviendo la liberación de neurotransmisores. El calcio puede disparar cascadas de señalización. Incluso, este ion puede actuar como un metabolito secundario y ser sentido por proteínas [73–76]. Los estudios por descifrar cómo un simple catión divalente toma partido y decide en la neurotransmisión son diversos. Es bien conocido que un importante rol del calcio en dicho proceso es la liberación y recaptura de los neurotransmisores. Se ha descrito que actúa sincronizadamente con SNARES (soluble N-etilmaleimida unida a receptor proteico) y sinaptotagminas. Sin embargo, un mecanismo claro de este orquestado proceso de sentido, unión específica, liberación, recaptura y reciclado de moléculas, está aún en proceso de ser entendido [69–71, 76].

De la misma manera, el rol de los protones en el proceso de la sinapsis no es muy claro. Recientemente se ha reportado que pueden actuar como neurotransmisores, pero la variabilidad en su concentración durante la sinapsis conlleva a efectos electrostáticos no completamente conocidos [72].

Por otro lado, la anestesia puede dar lugar a la interrupción de la comunicación entre neuronas, induciendo un cambio progresivo en los niveles de consciencia de un individuo. Este efecto puede progresar desde un estado de insensibilidad sensorial hasta la muerte. El fenómeno de la anestesia ha sido tema de estudio por más de 100 años, sin embargo, el mecanismo de cómo funciona no está elucidado. Para tratar de explicarlo se han

propuesto dos teorías. La primera es basada en las interacciones no específicas entre lípidos y anestésicos; y la segunda, está basada en las interacciones específicas de tipo ligando-receptor entre receptores proteicos y anestésicos [10, 11, 32, 33, 45]. La propuesta basada en interacciones con proteínas ha acaparado la mayoría de los estudios realizados, sin embargo, otros estudios proponen que los anestésicos cambian entrópicamente las propiedades de las balsas lipídicas, en donde se encuentran anclados los receptores proteicos [77]. Por lo tanto, bajo este contexto, es importante entender el rol que los lípidos juegan en los procesos de comunicación neuronal [78].

Heimburg et al. han propuesto una teoría termodinámica sobre la anestesia local y general. Ellos consideran que el impulso nervioso tiene su origen en los cambios de las propiedades elásticas de la membrana [9, 10, 79, 80]. Adicionalmente, Cantor sugiere que los cambios en la presión lateral de las membranas en donde se anclan los receptores proteicos puede desencadenar desensibilización de tales receptores [13]. Cantor también ha discutido que los neurotransmisores pueden ser los anestésico endógenos de los sistemas vivos, ya que difunden hacia la membrana postsináptica y producen cambios conformacionales de los receptores en membrana [14]. Esta hipótesis fue comprobada por Jerabek et al. a través del uso de rayos X y dinámica molecular [81].

Las interacciones electrostáticas intermoleculares presentes en la membrana plasmática, regulan diversos procesos fisiológicos y mantienen la homeostasis celular. Se ha observado que estas interacciones involucran a lípidos con grupos cargados negativamente [82, 83, 83–90], entre los cuales el ácido fosfatídico juega un importante papel en los procesos de señalización [91].

El uso de las membranas lipídicas para simular y comprender diversos procesos de comunicación celular, han demostrado que son modelos bastante robustos e ideales. Éstas han sido utilizadas para estudiar propiedades mecánicas, termodinámicas y electrostáticas relacionadas con las membranas biológicas [46, 92, 93]. Por ejemplo, la temperatura de transición de fase del estado gel al fluido es una propiedad de las membranas lipídicas ampliamente estudiada y relacionada con diversos procesos fisiológicos [5].

Recientemente, se han reportado interesantes estudios relacionados con las interacciones

entre lípidos y neurotransmisores. Orłowski et al. realizaron un estudio con dinámica molecular en donde observaron que la dopamina y la L-dopa se unen fuertemente a bicapas aniónicas construídas de fosfatidilserina, esfingomiélinea y colesterol. Ellos concluyeron que las interacciones entre lípidos y neurotransmisores dependen de enlaces de tipo puente de hidrógeno y pares de electrones entre grupos polares de los lípidos. Sus conclusiones también fueron sustentadas por la medición de los cambios de presión en la superficie de monocapas de mezcla de lípidos [63]. Otro estudio, fue realizado por Piorecka et al., quienes reportaron la primera evidencia experimental de interacción de dopamina con membranas aniónicas que contienen 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilglicerol (DMPG). Ellos observaron que membranas con dominios negativos son las responsables de tales interacciones y concluyeron que en estos sistemas las fuerzas hidrófobas son 10 veces más débiles que las electrostáticas [17]. Más estudios han demostrado el interés por elucidar el papel de los lípidos en la neurotransmisión. Drolle y colaboradores, usando técnicas de dispersión y difracción de luz, y dinámica molecular, reportaron que el neurotransmisor melatonina, fluidiza bicapas de DPPC y DOPC, produciendo una disminución del espesor de la membrana y un aumento en el área de la cabeza de los lípidos [94]. El grupo de Choi confirmó experimental y teóricamente que, efectivamente, la melatonina causa desorden en la membrana. Ellos demostraron que la melatonina puede interactuar con colesterol y fosfolípidos por medio de interacciones hidrófobas [95]. Otro estudio realizado por dinámica molecular reportó interesantes hallazgos sobre la interacción de los neurotransmisores con membranas lipídicas. En dicho trabajo se demostró que los neurotransmisores no permean a través de la membrana, más bien se adhieren reversiblemente a la superficie de ésta. También sugieren que si un receptor transmembranal con su sitio activo en la bicapa lipídica, debe ser alcanzado por su ligando a través de un proceso que esté mediado por una interacción primaria que posiblemente sea llevada a cabo por los lípidos. Ellos proponen que la acetilcolina sigue este mecanismo [96].

Por otro lado, el papel que desempeñan los iones en la interfaz de la comunicación nerviosa ha sido abordada por diferentes autores. Cationes divalentes como Ca^{2+} , Mg^{2+} , se unen fuertemente tanto a lípidos zwitteriónicos como a aniónicos [97, 98]. Sin embargo, la interacción entre lípidos aniónicos resulta ser más remarcable, porque produce cambios

estructurales en las membranas, formando arreglos membranosos conocidos como cocleatos, que son el producto de procesos de deshidratación y quelación entre los grupos cargados de los fosfolípidos y los iones divalentes [97, 99]. Iones monovalentes como Na^+ , penetran al interior de la membrana a la altura de los grupos fosfatos, sin embargo, producen poco efecto en las propiedades físicas de la membrana [100].

En este contexto y tomando como base esta diversidad de trabajos, intentamos entender cómo los neurotransmisores y anestésicos interactúan con membranas aniónicas y zwitteriónicas influenciadas por iones divalentes como Ca^{2+} y a diferentes condiciones de pH.

6.1 Ca^{2+} , pH y neurotransmisores cambian las propiedades calorimétricas de membranas aniónicas

Debido a que las fluctuaciones en la concentración de Ca^{2+} y H^+ en la hendidura sináptica son desconocidas, el rol que estos iones desempeñan en la neurotransmisión no está completamente interpretado. Por ejemplo, poco se ha estudiado sobre el impacto de tales fluctuaciones en las cantidades termodinámicas. Para explorar tales aspectos, se realizaron experimentos con modelos liposomales bajo el efecto de tres importantes neurotransmisores (NT): acetilcolina (ACh), ácido γ -aminobutírico (GABA) y ácido glutámico (LGlu). Además, para considerar los aspectos electrostáticos de las membranas reales, se usaron combinaciones de lípidos zwitteriónicos (DPPC y N-octadecanoil-D-eritro-esfingosilfosforilcolina de cerebro de cerdo (SM)) y lípidos aniónicos (1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfato sódico (DPPA), 1,2-dihexadecanoil-*sn*-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) sódico (DPPG), 1,2-ditetradecanoil-*sn*-glicero-3-fosfo-L-serina sódico (DMPS)). Se exploraron las siguientes combinaciones equimolares: DPPC:SM, DPPC:DPPA, DPPC:DPPG y DPPC:DMPS. Para todos los casos, se usó una concentración de neurotransmisor de 25 mM. Es importante comentar que, aunque tal concentración de NT pudiera ser considerado demasiado alta, el hecho es que no; porque dentro de las vesículas sinápticas se ha calculado que hay alrededor de 250 mM [14], lo que garantiza una alta concentración de neurotransmisores en la hendidura sináptica cuando éstos

son liberados [101].

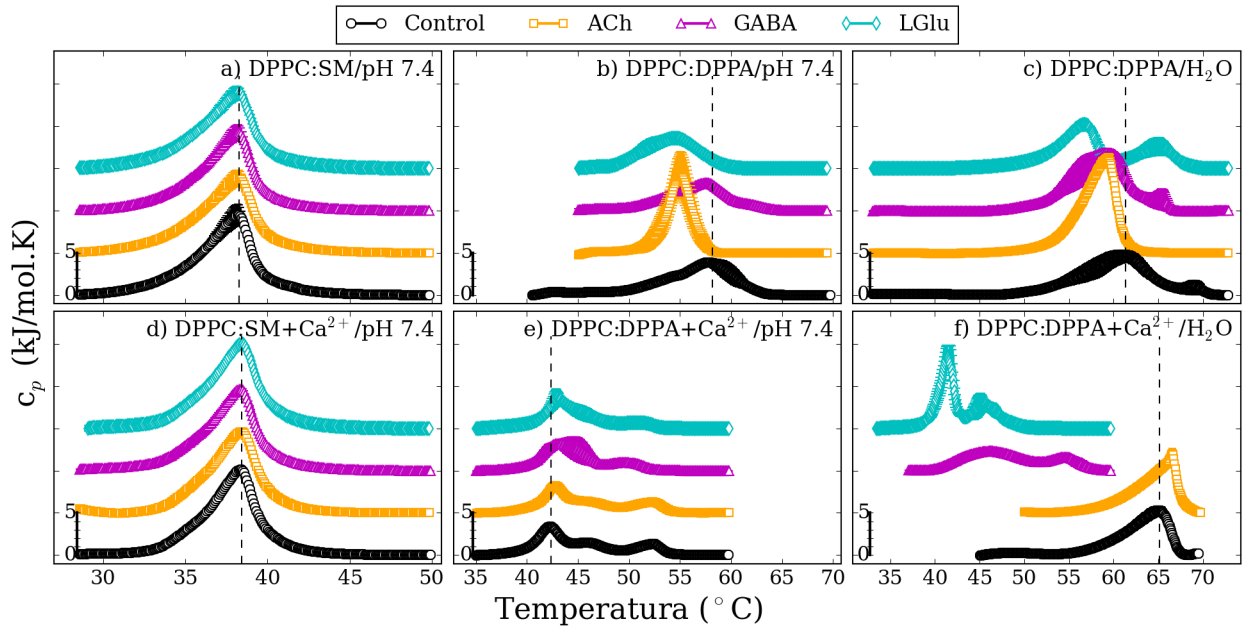


Figure 6.1: Perfiles calorimétricos de liposomas (SUV) de DPPC:SM (1:1) y liposomas de DPPC:DPPA (1:1), en su interacción con ACh (25 mM), GABA (25 mM) y LGlu (25 mM), bajo dos condiciones: con y sin Ca^{2+} (10 mM). Los experimentos realizados con DPPC:DPPA fueron evaluados bajo dos condiciones de pH: controlado a 7.4 (10 mM HEPES) y a pH no controlado, 4-6 (H_2O milliQ). Los resultados de estos sistemas fueron comparados con liposomas sin neurotransmisores usados como control. La línea vertical entrecortada representa la transición principal del control.

Las Figuras 6.1 y 6.2 muestran los perfiles calorimétricos y los cambios de entalpía de transición, respectivamente, de liposomas multilamelares de DPPC:SM y DPPC:DPPA bajo el efecto de ACh, LGlu y GABA. Los dos primeros NT están descritos como excitatorios, mientras que GABA es un NT inhibitorio.

El sistema de DPPC:SM (zwitteriónico) fue evaluado con y sin Ca^{2+} , manteniendo un pH de 7.4. Mientras que los liposomas de DPPC:DPPA (aniónico) fueron explorados con y sin Ca^{2+} bajo dos condiciones: a pH 7.4 y bajo fluctuaciones de H^+ (pH 4-6, H_2O milliQ), que mimetiza las fluctuaciones de protones durante la sinapsis [72].

Los perfiles calorimétricos demuestran que ACh, LGlu y GABA no afectan a las membranas zwitteriónicas. En todos los casos, incluyendo al control, la T_m de estos sistemas está en $38.3^\circ C$ (ver Fig. 6.1) y el cambio en la entalpía de transición es 40 kJ/mol (ver

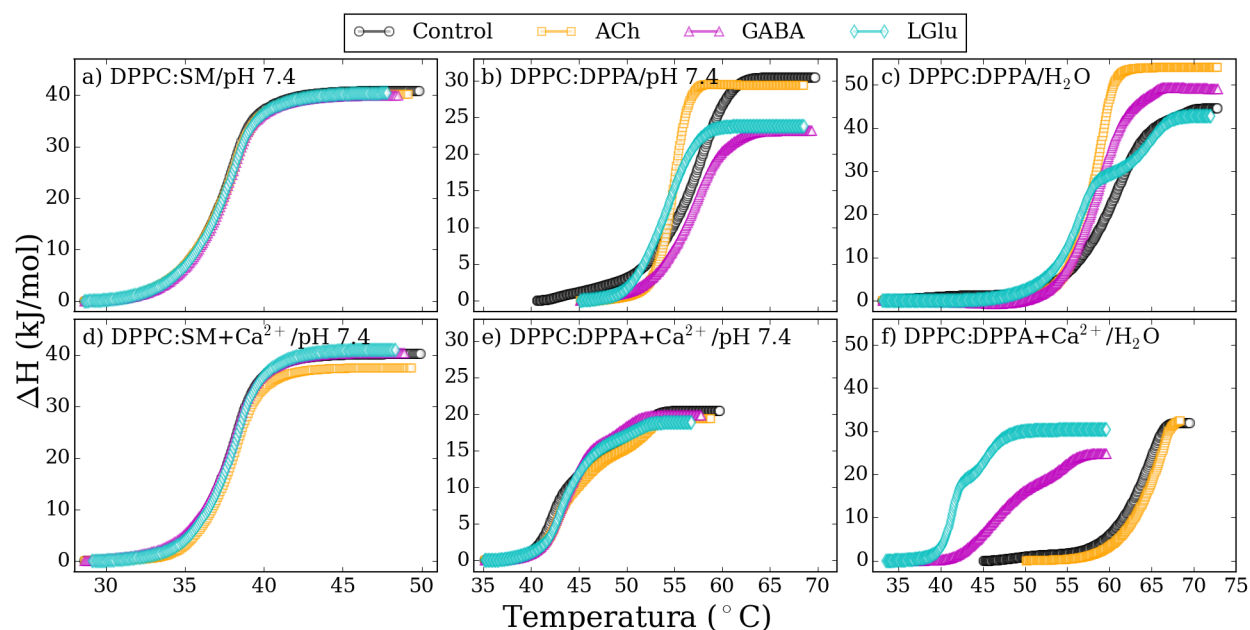


Figure 6.2: Cambios en la entalpía calorimétrica de liposomas (SUV) de DPPC:SM (1:1) y liposomas de DPPC:DPPA (1:1), en su interacción con ACh (25 mM), GABA (25 mM) y LGlu (25 mM), con y sin Ca^{2+} (10 mM). Solución de HEPES (10 mM) fue usado para controlar el pH a 7.4. Los resultados fueron comparados con un sistema al cual no se le controló el pH (4-6 H_2O milliQ). Como controles se usaron liposomas sin neurotransmisor.

Fig. 6.2). Además, se puede observar que el Ca^{2+} tampoco afecta a estas membranas. Es importante remarcar que resultados de espectroscopía infrarroja han revelado que el calcio se une a membranas zwitteriónicas de fosfolípidos a través de los grupos carbonilos y fosfodiéster [98]. Sin embargo, cuando se usan dos o más lípidos con baja cooperatividad dicha unión se minimiza o anula [102].

Contrariamente al sistema zwitteriónico, las membranas aniónicas a pH 7.4 fueron sustancialmente afectadas por ACh y LGlu. Membranas controles tienen una T_m alrededor de 58.1°C , y un cambio en entalpía calorimétrica cercano a 30.4 kJ/mol . Con la adición de ACh, la T_m se reduce a 54.9° y el cambio de entalpía a 29.4 kJ/mol . Similarmente, con LGlu la temperatura de transición también se reduce a 54.5°C y el cambio de entalpía a 23.7 kJ/mol (ver Figs. 6.1 y 6.2). Por otro lado, la presencia de GABA no altera la T_m de las membranas aniónicas, pero si reduce el ΔH a 23.1 kJ/mol .

El efecto que el Ca^{2+} produce en las membranas negativas es sorprendente, puesto

que reduce la cohesión de las membranas, reduciendo la T_m . También impacta en la cooperatividad de los lípidos, permitiendo observar 3 máximos de C_p , lo que sugiere la coexistencia de tres dominios de membranas producidos por la separación y agregación de vesículas. Este efecto que el Ca^{2+} produce en membranas aniónicas ha sido reportado con anterioridad [97]. De acuerdo a los perfiles calorimétricos obtenidos, un primer dominio estaría formado, en su mayoría, por membranas de DPPC ($T_m = 43^\circ\text{C}$); el segundo formado por mezcla de DPPC y DPPA con tendencia equimolar ($T_m = 46^\circ\text{C}$); y el tercero construido mayormente por membranas de DPPA ($T_m = 52^\circ\text{C}$). En todos los casos el ΔH se encuentra alrededor de 20 kJ/mol. Es importante hacer notar que la presencia de GABA y LGlu debilitan tales dominios (ver Fig. 6.1e). Este efecto que el Ca^{2+} produce en las membranas aniónicas es debido al apantallamiento electrostático de las cabezas polares de los fosfolípidos. El cual es modificado cuando el pH no está controlado y se permite la variabilidad de protones (ver Fig. 6.1f). Más interesante aún es el hecho de que bajo estas condiciones cada NT interacciona de manera particular con dichas membranas, evidenciando que tanto el Ca^{2+} como el H^+ juegan un papel importante en la interacción de los neurotransmisores con membranas aniónicas. Resultando que ACh promueva membranas más rígidas, mientras que LGlu y GABA disminuyen la cooperatividad de los fosfolípidos haciendo membranas más fluidas. Este hecho hace que el Ca^{2+} y el H^+ modifiquen la presión superficial, la curvatura y el espesor de las membranas. Estos resultados sugieren que los NT interaccionan con membranas aniónicas a través de un mecanismo electrostático mediado por calcio y protones [103, 104]. ACh libre de calcio disminuye la cohesión de las membranas, pero este efecto se ve disminuido cuando el Ca^{2+} y el H^+ están en el medio. Probablemente, sea debido a un mecanismo competitivo entre el Ca^{2+} y el catión trimetilamonio de la ACh o debido a repulsión electrostática entre complejos de DPPA-Ca y ACh. Contrariamente, GABA en presencia de calcio disminuye la cohesión de la membrana debido a interacciones entre iones y contraiones como en un modelo electrostático de doble capa, donde el Ca^{2+} actúa como un centro de coordinación entre la superficie negativa de la membrana y el grupo carboxilato de GABA (el cual es una molécula zwitteriónica) [105]. Este mismo mecanismo podría aplicar con LGlu, pero debido a que este NT posee dos grupos carboxilatos, su efecto puede ser

mucho mayor que GABA. Estos resultados tienen una importante relevancia porque podrían estar relacionados con los efectos excitatorio de ACh e inhibitorio de GABA en el sistema nervioso central.

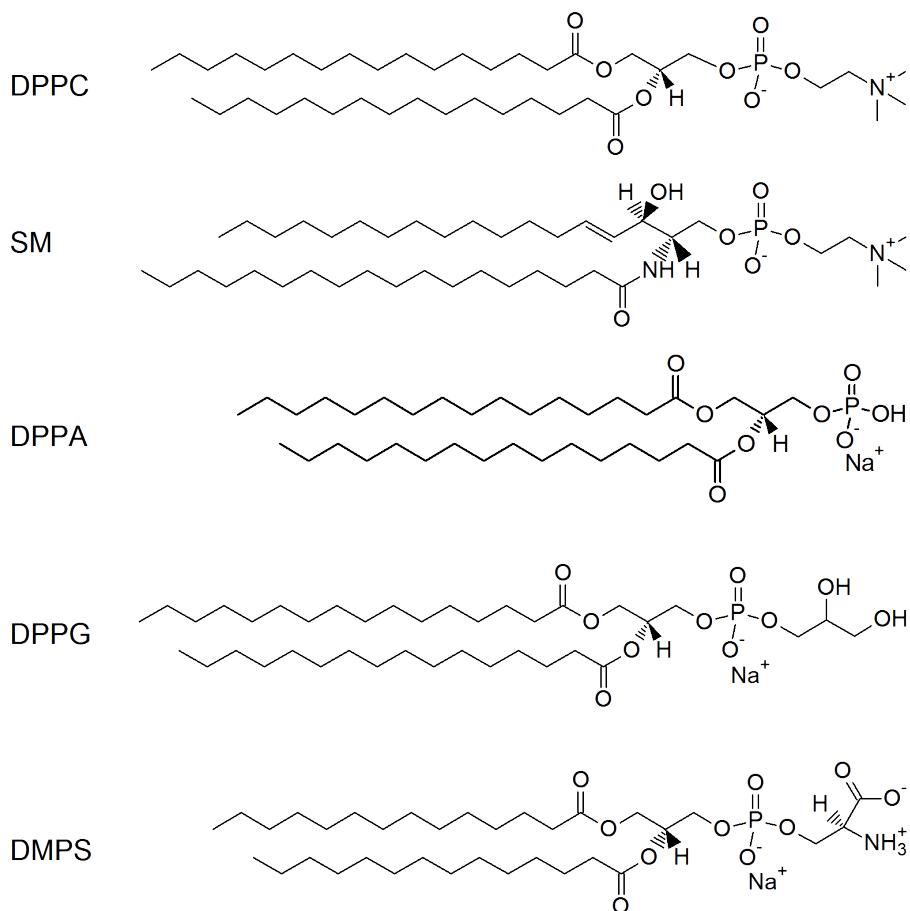


Figure 6.3: Estructura molecular de DPPC, SM, DPPA, DPPG y DMPS. Note que DPPC y SM son zwitteriónicos debido al grupo colina y fosfato, en cambio, el carácter aniónico de DPPA, DPPG y DMPS son debido a diferentes grupos negativos unidos al glicerol principal.

Para evaluar la influencia de Ca^{2+} y H^+ a concentraciones fisiológicas y tomando en cuenta la naturaleza química de las cargas que caracterizan a las membranas biológicas, se realizaron experimentos calorimétricos de tres sistemas aniónicos en su interacción con ACh, GABA y LGlu; mediados por la acción de Ca^{2+} y H^+ . No obstante, siendo que estos lípidos son anfífilicos, los grupos polares que forman la cabeza lipídica tienen diferente composición que les confieren características particulares a las membranas. Por citar los casos

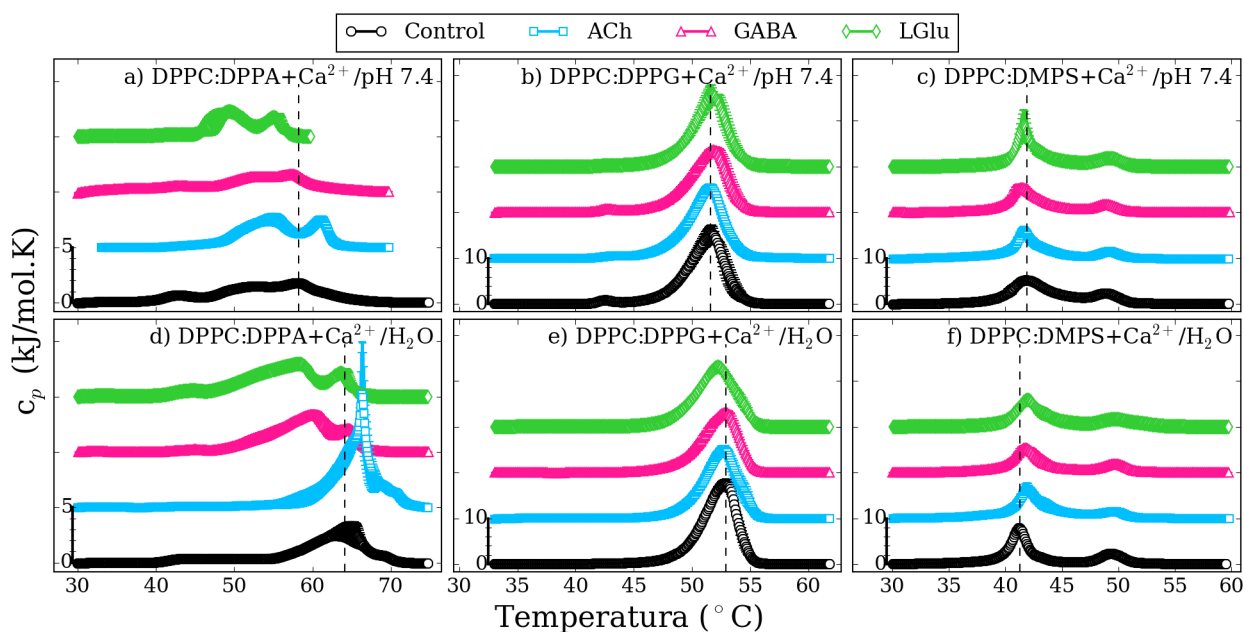


Figure 6.4: Perfiles calorimétricos de liposomas sonicados (SUV) de DPPC:DPPA (1:1), DPPC:DPPG (1:1) y DPPC:DMPS (1:1), bajo el efecto de ACh (25 mM), GABA (25 mM) y LGlu (25 mM) influenciados por Ca^{2+} (10 mM). Los experimentos fueron realizados a pH 7.4 (10 mM HEPES) y a pH no controlado, 4-6 (H_2O milliQ). Liposomas sin neurotransmisores fueron usados como controles. La línea vertical entrecortada representa la transición principal del control.

aquí explorados, el DPPC y SM tiene un grupo colina unido a un fosfato que le confieren el carácter zwitteriónico; el DPPA tiene un grupo fosfatídico que hace negativa a la cabeza; en el DPPG, un segundo grupo glicerol se concatena al fosfato cargado negativamente; y por último, el DMPS posee un grupo serina enlazado al fosfato que juntos proporcionan propiedades aniónicas a la cabeza del lípido (ver Fig. 6.3).

La Figura 6.4 compara los resultados del análisis DSC de los sistemas aniónicos ya mencionados. Las curvas de DPPC:DPPA con 2 mM de calcio a pH 7.4, indican la tendencia hacia la formación de los dominios, similarmente a los resultados obtenidos a concentraciones más altas de calcio (10 mM). Sin embargo, a 2 mM el efecto de ACh, GABA y LGlu son menos apreciables. A estas condiciones, el control muestra tres máximos de C_p . GABA presenta un perfil muy parecido al control, pero ACh y LGlu únicamente muestran dos máximos de C_p . Las transiciones del sistema DPPC:DPPA con LGlu se encuentran más desplazadas a bajas temperaturas, alcanzando un ΔH calorimétrico menor comparado con los otros sistemas (ver

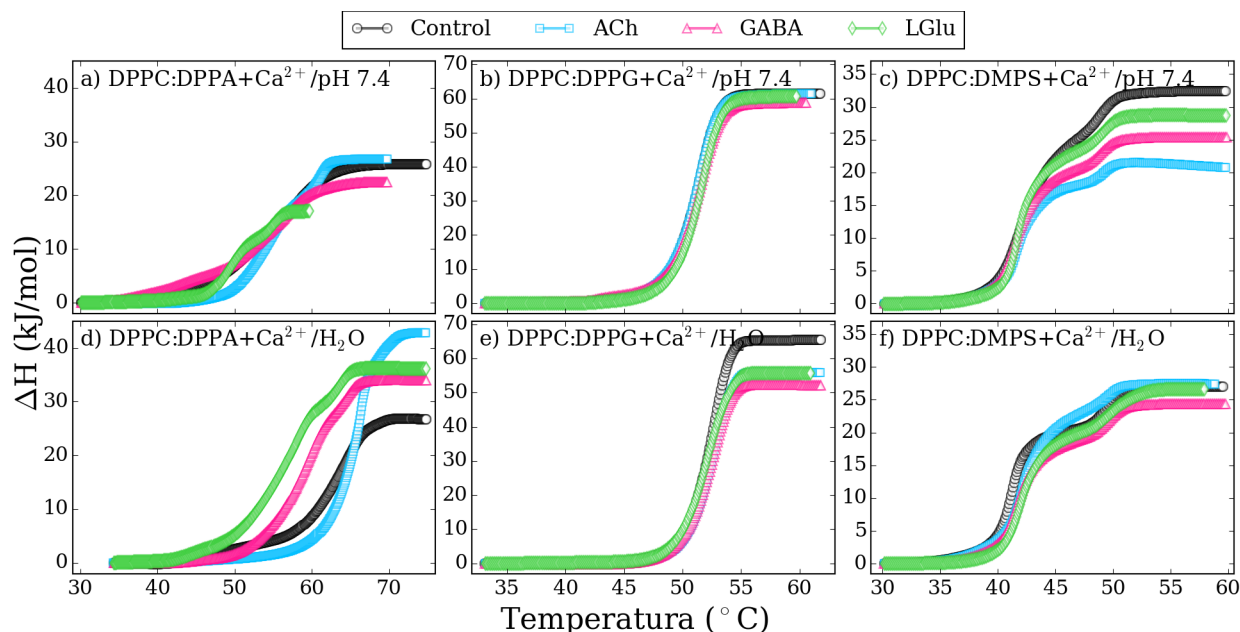


Figure 6.5: Cambios en la entalpía calorimétrica de liposomas sonicados (SUV) de DPPC:DPPA (1:1), DPPC:DPPG (1:1) y DPPC:DMPS (1:1), en su interacción con ACh (25 mM), GABA (25 mM) y LGlu (25 mM) y mediados por Ca^{2+} (10 mM). Los experimentos fueron realizados a pH 7.4 (10 mM HEPES) y a pH no controlado, 4-6 (H_2O milliQ). Liposomas sin neurotransmisores fueron usados como controles.

Figs. 6.4a y 6.5a). En contraste, cuando hay fluctuaciones de protones las T_m de los sistemas DPPC:DPPA/Ca/NT se desplazan a temperaturas más altas y aumentan el ΔH . Se puede observar que bajo estas condiciones GABA y LGlu también muestran dos transiciones (ver Figs. 6.4d y 6.5d).

Los sistemas DPPC:DPPG/Ca/NT muestran una cooperatividad mayor que el sistema DPPC:DPPA/Ca/NT tanto a pH 7.4 como a pH 4-6 (agua milliQ). Sin embargo, dichas transiciones se desplazan a temperaturas más altas cuando hay fluctuaciones de pH en el medio (ver Figs. 6.4b, e y 6.5b, e).

El comportamiento calorimétrico que presenta el tercer sistema aniónico (DPPC:DMPS/-Ca/NT) es muy similar en todas las combinaciones exploradas, presentando dos transiciones, una de estas más pronunciada a menor temperatura. Sin embargo, el cambio de entalpía varía un poco a pH 7.4 (ver Figs. 6.4c, f y 6.5c, f).

El mecanismo clásico que explica la sinapsis química afirma que los NT alcanzan sus

sitios de unión en los receptores por medio de una difusión aleatoria cuando son liberados en el medio acuoso sin unirse a membranas lipídicas. Sin embargo, bajo estas condiciones todos los componentes están sujetos a interacciones de tipo no específicas. En este sentido, Wang et al. analizaron la afinidad que neurotransmisores tienen por modelos de membranas compuestas únicamente por lípidos [15]. Ellos, usando diálisis en equilibrio, encontraron que los NT interactúan con membranas aniónicas electrostáticamente. También en este aspecto, Peters et al. haciendo uso de simulaciones por dinámica molecular, reportaron que la serotonina se une a los grupos fosfatos de membranas lipídicas [16]. Adicionalmente, Postila et al. reportaron que los NT pueden agregarse en la superficie de las membranas antes de llegar a su respectivo sitio activo proteico [96]. En estos trabajos el papel de los lípidos aniónicos es preponderante, puesto que son los promotores de que los NT se unan a la membrana. Bajo este panorama, los resultados experimentales aquí mostrados están en concordancia con resultados previos en su mayoría teóricos, sustentando que las membranas aniónicas juegan un papel importante en la interacción con NT, pero además desvela que la presencia de calcio y protones es crucial.

6.2 Ca^{2+} y pH modifican el efecto que la tetracaína y el pentobarbital producen en membranas lipídicas

La Figura 6.6 muestra los barridos calorimétricos de SUVs de DPPC:SM y DPPC:DPPA en interacción con tetracaína (anestésico local) y pentobarbital (anestésico general) bajo la influencia de Ca^{2+} y H^+ . El sistema DPPC:SM únicamente fue explorado a pH 7.4, mientras que el sistema DPPC:DPPA fue medido a pH 7.4 y bajo cambios de concentración de H^+ (pH 4-6, agua milliQ). Claramente se puede observar que la presencia de calcio y protones en el medio influencia mayormente a las interacciones de anestésicos-membranas aniónicas que a las interacciones de anestésicos-membranas zwitteriónicas, modificando su respuesta termotrópica (ver Figs. 6.6 y 6.7). Previamente, se comentó que los NT han sido propuestos como los anestésicos endógenos en los sistemas vivos [14]. Además, es ampliamente conocido que los anestésicos desplazan a temperaturas menores la transición de

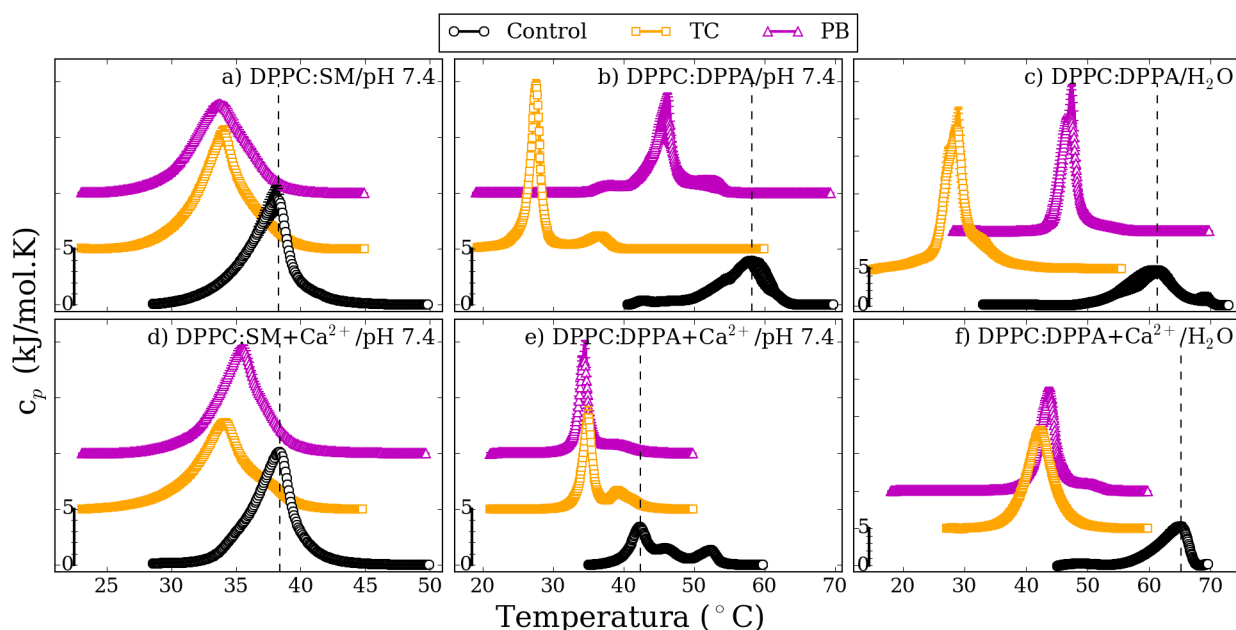


Figure 6.6: Termogramas de liposomas de DPPC:SM (1:1) y DPPC:DPPA (1:1) en interacción con un anestésico local, TC (25 mM) y uno general, PB (25 mM); bajo dos condiciones: con y sin Ca^{2+} (10 mM). Los experimentos realizados con DPPC:DPPA fueron evaluados bajo dos condiciones de pH: controlado a 7.4 (10 mM HEPES) y a pH no controlado, 4-6 (H_2O milliQ). Liposomas sin neurotransmisores fueron usados como controles. La línea vertical entrecortada representa la transición principal del control.

las membranas lipídicas [36,37,106–109]. Por lo tanto, los resultados previamente mostrados sustentan dicha similitud entre neurotransmisores y anestésicos, puesto que si en el medio hay calcio y protones los NT producen el mismo efecto que los AT en las membranas lipídicas.

De manera similar a los experimentos realizados con NT y membranas aniónicas de DPPC:DPPA, DPPC:DPPG y DPPC:DMPS (ver Figs. 6.4 y 6.5), se presenta el efecto que Ca^{2+} (2 mM) y fluctuaciones de H^+ promueven en tales sistemas (ver Figs. 6.8 y 6.9). En primer instancia, se puede observar una clara tendencia: TC y PB desplazan la T_m a menores temperaturas. A diferencia de PB, la TC produce un mayor efecto en membranas de DPPC:DPPG tanto a pH 7.4 como a pH no controlado. Esto es debido a que siendo la TC una base débil puede interactuar con la superficie de la membrana y debido a su hidrofobicidad se puede internar en la zona acíclica interaccionando con las colas alifáticas, esto da como resultado un mayor efecto en la disminución de la temperatura de transición comparado con moléculas con un mayor carácter hidrófobo como el PB.

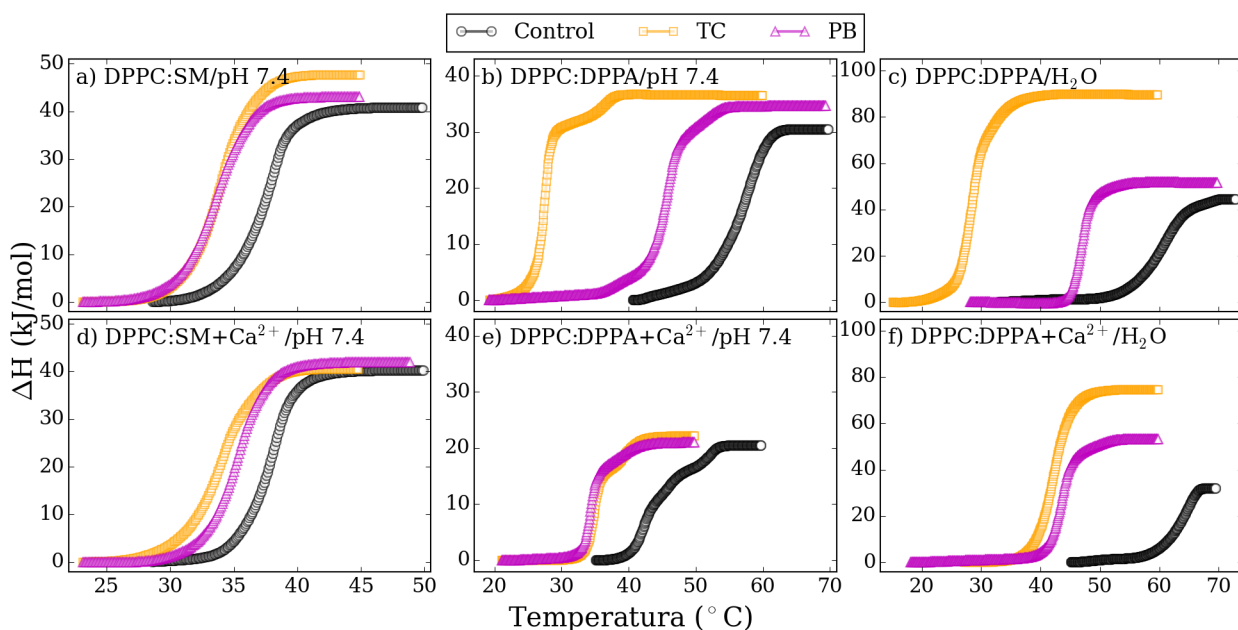


Figure 6.7: Cambios en la entalpía calorimétrica de liposomas de DPPC:SM (1:1) y DPPC:DPPA (1:1) en interacción con TC (25 mM) y PB (25 mM); bajo dos condiciones: con y sin Ca^{2+} (10 mM). Los experimentos realizados con DPPC:DPPA fueron evaluados a pH 7.4 (10 mM HEPES) y a pH no controlado, 4-6 (H_2O milliQ). Liposomas sin neurotransmisores fueron usados como controles.

6.3 La electrostática detrás de la interacción de fosfolípidos, NT, AT, Ca^{2+} y H^+

Los resultados anteriormente presentados demuestran que el calcio y los protones moderan las interacciones de membranas aniónicas con neurotransmisores y anestésicos. Lo anterior parte del hecho de que todas las moléculas anfotéricas tienen uno o más valores de pK_a , determinando el rango del pH en el que se encuentra en equilibrio (en donde especies desprotonadas y protonadas existen en igual medida). Dicho equilibrio juega un papel crucial en los eventos que ocurren en los sistemas que se han explorado. Con el objetivo de dar mayor soporte a estos hallazgos, se realizaron experimentos calorimétricos a pH mayor y menor a 7.4. La Figura 6.10 demuestra que a condiciones amortiguadoras los perfiles calorimétricos muestran diferencias. A pH 5 las membranas son más rígidas debido al efecto de calcio, y no sufren cambio cuando se añade ACh. A pH 9, el calcio disminuye la cooperatividad de los

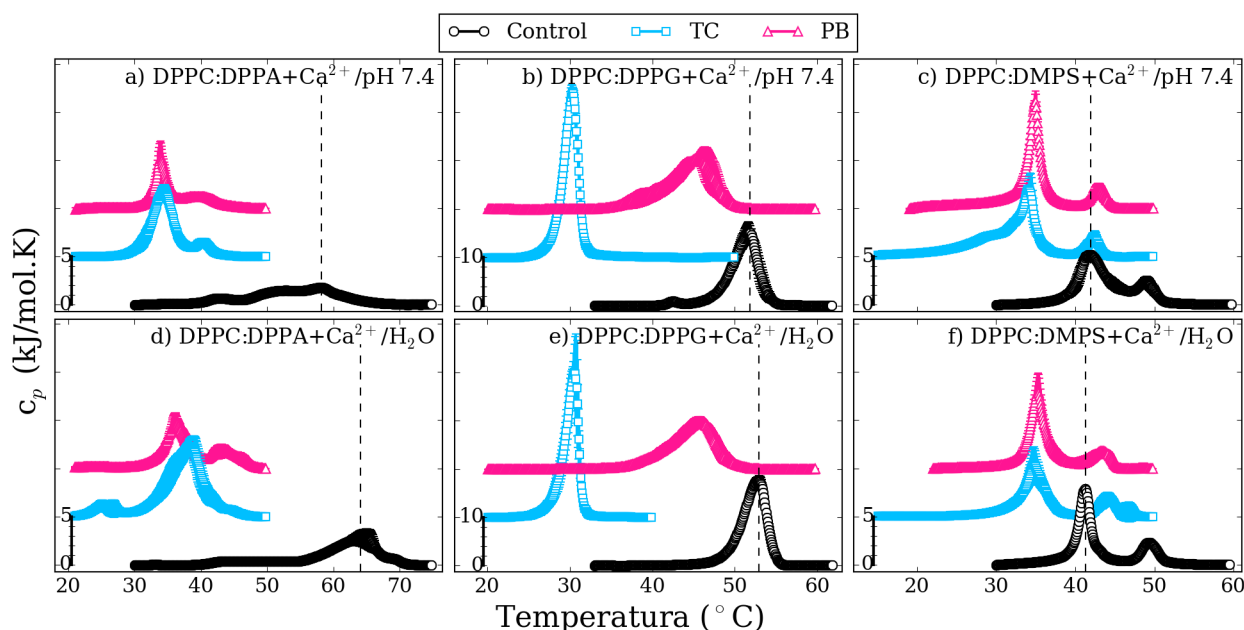


Figure 6.8: Efecto de TC y PB en la respuesta termotrópica de membranas aniónicas de DPPC:DPPA (1:1), DPPC:DPPG (1:1) y DPPC:DMPS (1:1) bajo la influencia de Ca²⁺ (2 mM). Los experimentos fueron realizados a pH 7.4 (10 mM HEPES) y a pH no controlado 4-6 (H₂O milliQ). SUVs sin AT fueron usados como controles (T_m principal se muestra con línea vertical entrecortada).

lípidos presentando un perfil calorimétrico ancho y aplanado. Bajo estas condiciones de pH, si se adiciona ACh o TC la cooperatividad de la membrana se recupera. ACh promueve un aumento en la cooperatividad, posiblemente, debido a un mecanismo de interacción competitiva entre cargas positivas de ACh y Ca²⁺ y su afinidad por los dominios negativos de la superficie de la membrana. En cambio TC, lo hace a través de interacciones hidrófobas que aumentan la cohesión de la zona alifática, ya que a este pH la TC es completamente hidrófoba (ver reacciones de equilibrio en Fig. 6.10).

La Figura 6.11 muestra un resumen de las interacciones entre DPPC:DPPA y neurotransmisores. En la parte inferior se muestran los perfiles calorimétricos de esta membrana en presencia de ACh, GABA y LGlu a diferentes condiciones de pH y calcio. En la parte superior se muestra el posible mecanismo molecular involucrado: interacciones electrostáticas entre el ácido fosfatídico, calcio, protones y neurotransmisores. Cabe mencionar que de acuerdo a resultados reportados previamente, cuando la concentración de

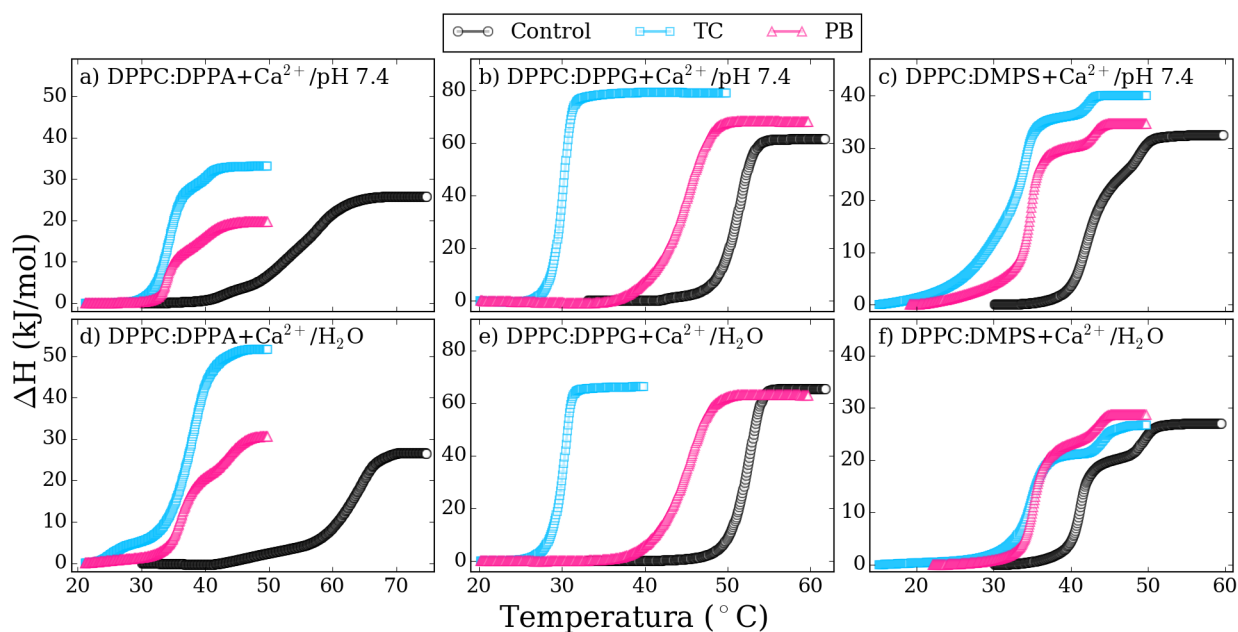


Figure 6.9: Efecto de TC y PB en los cambios de entalpía calorimétrica de membranas aniónicas de DPPC:DPPA (1:1), DPPC:DPPG (1:1) y DPPC:DMPS (1:1) bajo la influencia de Ca^{2+} (2 mM), a pH 7.4 (10 mM HEPES) y a pH no controlado 4-6 (H_2O milliQ). SUVs sin AT fueron usados como controles (T_m principal se muestra con línea vertical entrecortada).

calcio está en desequilibrio entre el lado interno y el externo de los liposomas puede inducir agregación de membranas aniónicas hasta el grado de cambiar las estructuras esféricas de las vesículas a una especie de rollos en forma de bastones [97]. Sin embargo, cuando ambos lados contienen la misma concentración de calcio dicho efecto no ocurre. Entonces, los residuos aniónicos en la superficie de la membrana llevan a cabo otro tipo de interacciones que son los responsables de modificar los perfiles calorimétricos. Por ello, se propone que los protones interaccionan con el ácido fosfatídico competitivamente con las interacciones entre DPPA-Ca, lo cual hace posible que los neurotransmisores interaccionen con el sistema de manera particular. Cuando no hay un búffer que controle el pH, un oxígeno del DPPA es protonado, entonces el calcio se coordina con el grupo hidroxil desprotonado, con GABA y LGlu. Esto produce un desplazamiento de la T_m a bajas temperaturas. Para el caso de la ACh (positivamente cargada), la interacción de calcio con ácido fosfatídico apantalla la interacción del NT con el grupo hidroxil y hace que ACh interaccione repulsivamente con

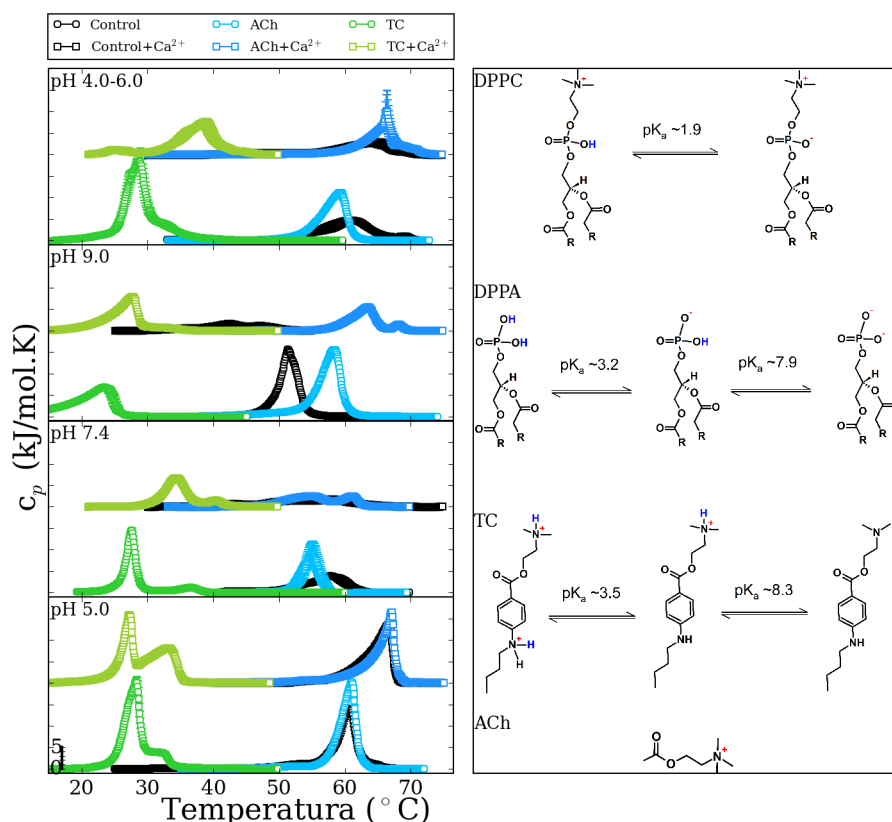


Figure 6.10: Cambios en los perfiles calorimétricos de membranas de DPPC:DPPA con ACh y TC debido a la influencia de Ca²⁺ y H⁺. Reacciones de equilibrio de DPPC, DPPA y TC. ACh no es afectada por el pH.

el calcio; produciendo un desplazamiento de la T_m a altas temperaturas. Estos mecanismos han sido discutidos previamente para interpretar las interacciones entre fosfolípidos aniónicos, calcio y protones [17, 103, 104, 110].

A manera de conclusión de la interacción entre membranas aniónicas, neurotransmisores y anestésicos; este estudio revela que los NT interactúan fuertemente con los lípidos aniónicos. Este escenario puede ser comparado con las características electrostáticas de la membrana neuronal, que a pesar de que el mecanismo clásico de la transmisión a nivel de la sinapsis química afirma que los NT interactúan con receptores específicos que se encuentran en la membrana plasmática, interacciones electrostáticas entre NT y lípidos aniónicos pueden llevarse a cabo tal como sucede en membranas modelos. Tales interacciones inducen cambios mecánicos y termodinámicos muy parecidos a los producidos

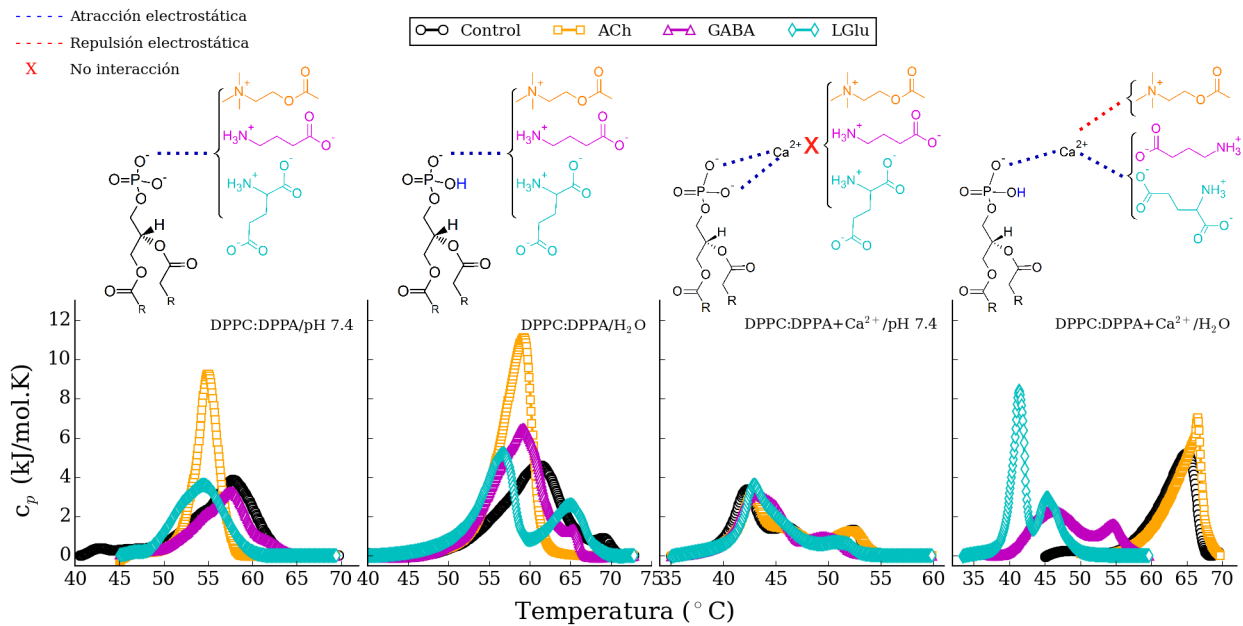


Figure 6.11: Termogramas de DPPC:DPPA en interacción con ACh, GABA y LGlu bajo diferentes condiciones de pH y calcio (panel inferior). La naturaleza de estos perfiles son atracciones y repulsiones electrostáticas entre el ácido fosfatídico, Ca^{2+} , H^+ y neurotransmisores (panel superior).

por los anestésicos. Este efecto puede estar modulado por la presencia de Ca^{2+} y H^+ en el medio. Los protones pueden dar lugar a especies protonadas o desprotonadas de acuerdo a sus reacciones de equilibrio y dependiendo de esto el calcio puede coordinarse con dichas especies interactuando con los NT. Los resultados calorimétricos entre los diferentes NT (excitatorios e inhibitorios) demuestran que, dependiendo de las condiciones, algunos NT (como ACh) puede inducir que la T_m se desplace a mayor temperatura y otros (como GABA y LGlu) lo desplacen a menores temperaturas. Estos cambios termodinámicos y mecánicos producidos en membranas modelos son aspectos importantes para ser considerados en ciertos procesos biológicos, como en el mecanismo de transmisión neuronal, por lo que abre la posibilidad de explorar sistemas biológicos considerando esta particularidad.

Detalles experimentales

Reactivos. 1,2-Dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina, 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfato sódico, 1,2-dihexadecanoil-*sn*-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) sódico, 1,2-ditetradecanoil-*sn*-glicero-3-fosfo-L-serina sódico y N-octadecanoil-D-eritro-esfingosilfosforilcolina (de cerebro de cerdo) fueron adquiridos de Avanti Polar Lipids, Birmingham, AL. Cloruro de calcio, ácido 4-(2-hidroxiethyl)piperazin-1-etanosulfónico, 2-amino-2-metil-1, 3-propanodiol, ácido cítrico, citrato trisódico dihidratado, acetilcolina.HCl, ácido γ -aminobutírico, L-ácido glutámico (sal sódica monohidratada) y tetracaína.HCl fueron comprados a Sigma-Aldrich. Pentobarbital sódico fue adquirido de Cheminova. Todos los reactivos fueron usados sin purificación adicional.

Fabricación de liposomas y preparación de la muestra. Las vesículas MLVs fueron generadas usando las siguientes mezclas lipídicas (1:1, 5 mM): DPPC:SM, DPPC:DPPA, DPPC:DPPG o DPPC:DMPS. La primera mezcla se disolvió en cloroformo y todas las demás en cloroformo:metanol (1:1 v/v). La hidratación de la película lipídica fue usando los búffer de hidratación de la Tabla 6.1, agitando a 1000 rpm por 60 min por arriba de la T_m . Para los experimentos con calcio, la solución búffer fue preparada con 2 y 10 mM de CaCl_2 .

Para preparar los SUVs, 0.820 ml de MLVs fueron sonicados for 30 min a 50°C en un baño con ultrasonido (60 W). Posteriormente, se añadió solución de neurotransmisores o anestésicos hasta una concentración final de 25 mM; y se homogenizó completamente.

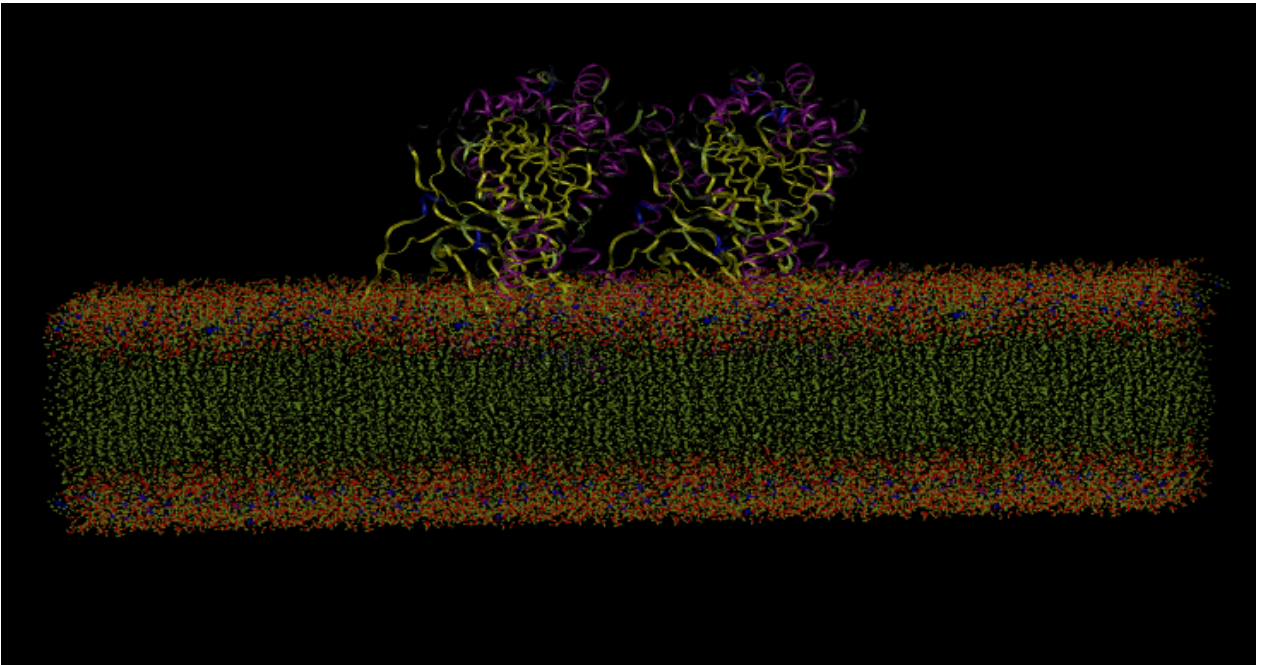
Tabla 6.1: Búfferes de hidratación usados para la formación de MLVs de mezclas lipídicas.

pH	Búffer
5	Citrato-cítrico, 10 mM
7.4	HEPES (ácido 4-(2-hidroxiethyl)piperazin-1-etanosulfónico), 10 mM
9	AMPD (2-amino-2-metil-1,3-propanodiol), 10 mM
4-6	Agua MilliQ

Análisis calorimétrico. Las mediciones calorimétricas fueron obtenidas en modo calentamiento a 1°C/min a 3 atm de presión. Todas las muestras fueron equilibradas 5 min. Tres barridos calorimétricos de cada muestra fueron obtenidas; cada una de ellas fue repetida por dos ocasiones a partir de preparaciones diferentes.

7

Interacciones lípidos-proteínas y su respuesta ante AT y NT



En los capítulos anteriores se ha comentado cómo membranas compuestas únicamente por lípidos interactúan con moléculas de interés biológico; por ejemplo, anestésicos y neurotransmisores. Pero es bien conocido que las membranas celulares y en particular la membrana plasmática se encuentran compuestas por dos grandes grupos de biomoléculas: lípidos y proteínas [111, 112]. En este capítulo se abordará un nuevo modelo de membrana compuesto por lípidos y proteínas. Con enfoque en las interacciones no específicas, se analizará si proteínas globulares que no se encuentran habitualmente en la membrana plasmática interactúan con liposomas. En primer lugar, se caracterizarán termométricamente los sistemas lipídicos y proteicos por separados. Posteriormente, se explorará cómo las interacciones no específicas inducen que lípidos y proteínas entretejan un nuevo sistema lipoproteico con nuevas propiedades fisicoquímicas. Finalmente, se explorará la respuesta de este sistema ante el efecto que anestésicos y neurotransmisores producen.

Los lípidos y las proteínas son la base estructural de todas las membranas biológicas. Ambos grupos de moléculas juegan importantes roles en la orquestada danza de la comunicación celular. Lípidos y proteínas ensamblan unidades que pueden responder a diferentes estímulos externos e internos. Aunque al inicio se pensó que los lípidos únicamente cumplían el papel de disolvente en donde las proteínas habitan, más recientemente, con el auge de la biofísica, se ha encontrado que los lípidos también cumplen diversas funciones más allá de un simple medio [112–114]. Así, los lípidos y las proteínas son el par molecular que entretejen a los organismos vivos. Por ello, las interacciones entre tales moléculas son importantes temas de estudio. El conocimiento de la información fisicoquímica de las interacciones entre lípidos y proteínas es esencial para entender cómo ocurren diversos procesos celulares.

7.1 Respuesta termotrópica de DMPC, OVA y AGP

Con el objetivo de caracterizar la respuesta térmica de lípidos y proteínas, se realizó una serie de experimentos calorimétricos de tres sistemas por separado: Un sistema lipídico, MLV de 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DMPC); y dos sistemas proteicos, ovoalbúmina

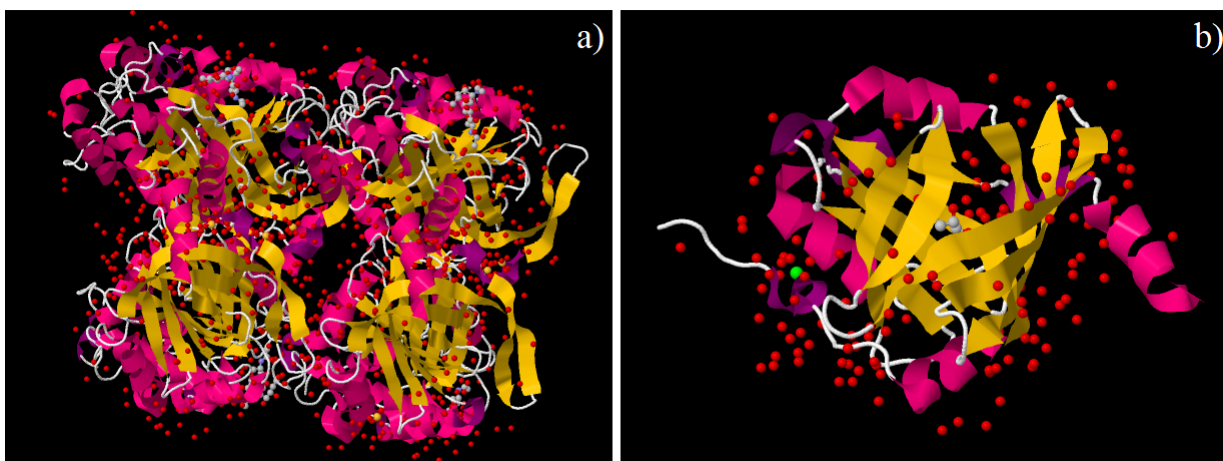


Figure 7.1: Estructura cristalográfica de OVA (a) y AGP (b). Fuente PDB Protein Data Bank, claves 1OVA y 3KQ0 para OVA y AGP, respectivamente.

(OVA) y α -glicoproteína ácida (AGP).

Las glicoproteínas como OVA y AGP son proteínas solubles asociadas a múltiples funciones, tales como, acarreadoras de metabolitos, hormonas, vitaminas y relacionadas a respuesta inmune. Estas proteínas comparten la estructura de barril β altamente conservada que puede unirse con diferentes entidades hidrófobas (ver Fig. 7.1) [115–117]. Dada su característica estructural, incluyendo centros hidrófobos y dominios hidrófilos, son factibles para el enfoque de estudio que aquí se aborda. Basados en interacciones intermoleculares no específicas, el modelo de estudio a considerar debe cumplir la siguiente característica: que pueda interactuar con moléculas o dominios hidrófobos e hidrófilos.

La Figura 7.2 muestra el comportamiento térmico de DMPC (a), OVA (b) y AGP (c) durante un serie de 10 barridos calorimétricos. Como se puede observar, el sistema lipídico presenta una temperatura de transición alrededor de 24°C que se mantiene durante la serie de barridos y una entalpía calorimétrica alrededor de 33 kJ/mol que se estabiliza a partir del tercer scan. Este comportamiento coincide con lo esperado de un sistema lipídico. Contrariamente, la ovoalbúmina se desnatura en el primer barrido (ver Fig. 7.2b), el cual es un comportamiento esperado para una proteína. Sin embargo, la α -glicoproteína ácida no se desnatura por completo en un primer barrido de calentamiento, mostrando una resistencia a la desnaturalización por calor en los barridos posteriores, tal como se puede

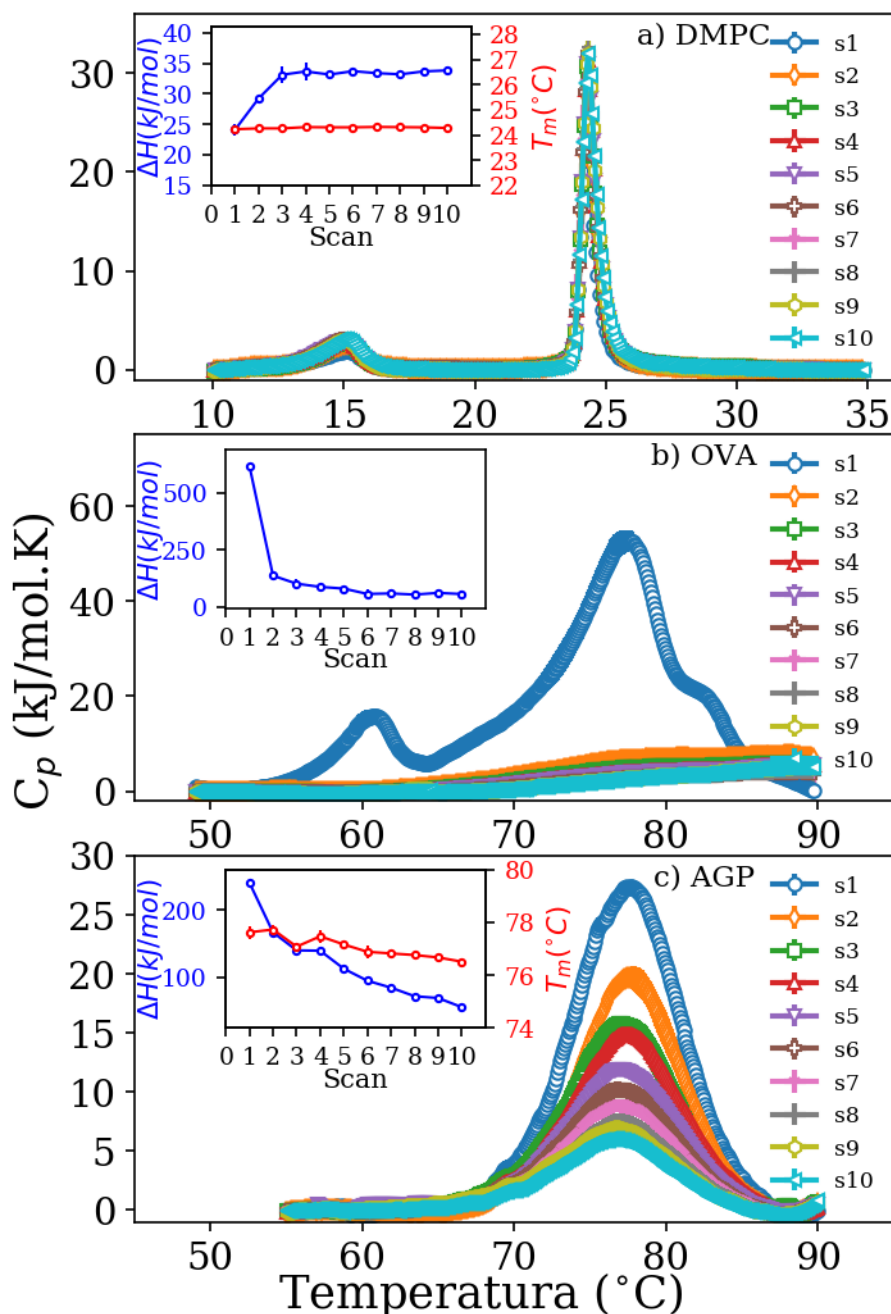


Figure 7.2: Caracterización termotrópica de MLV de DMPC (a), ovoalbúmina (b) y α glicoproteína ácida (c) durante un proceso de 10 barridos calorimétricos consecutivos. El inset muestra la evolución de la temperatura de transición de fase y el cambio de la entalpía de transición. Debido a que OVA se desnaturaliza en el primer barrido, no se muestra la evolución de la T_m .

apreciar en la Fig. 7.2c. Este comportamiento de la AGP es interesante, ya que podría estar relacionado con su resistencia a la degradación y con procesos de fibrilación [118].

7.2 Respuesta termotrópica de sistemas lipidoproteicos

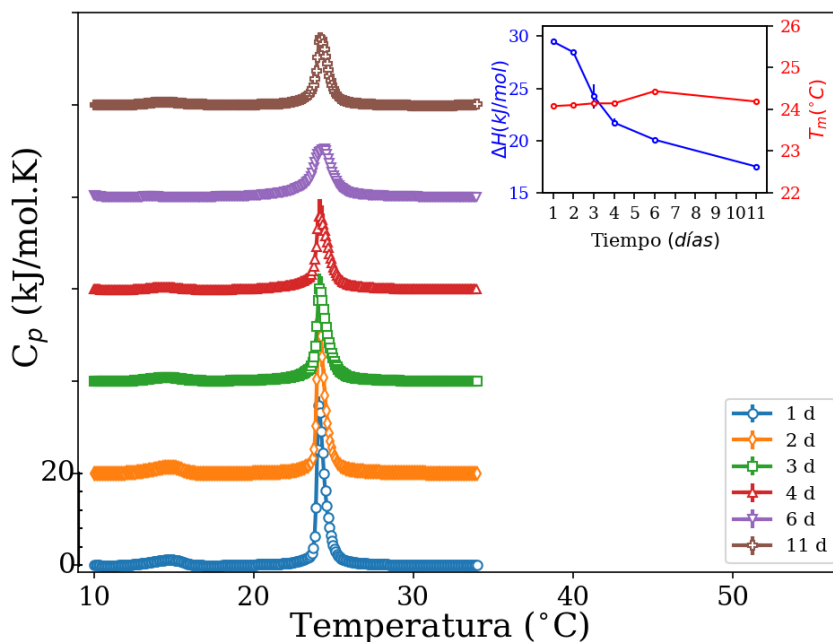


Figure 7.3: Caracterización termotrópica-temporal de MLV de DMPC, bajo el efecto de α glicoproteína ácida. El inset muestra la evolución temporal de la temperatura de transición de fase y la entalpía calorimétrica.

La Figura 7.3 muestra que cuando liposomas de DMPC son incubados por tiempos largos (días) en presencia de AGP se aprecia una variación en la entalpía calorimétrica sin que se altere la temperatura de transición de fase. Por lo que se puede decir que esta proteína interacciona a nivel de la superficie de la membrana y no se internaliza en ella. Pero en cambio, cuando liposomas de DMPC son incubados con OVA, el perfil calorimétrico asociado al DMPC se ve modificado en función del tiempo, tal como se aprecia en la Fig. 7.4a. La temperatura de transición de fase se recorre a temperaturas más altas y la entalpía en un primer momento disminuye y posteriormente aumenta (ver Fig. 7.4b-c). Si estas dos variables cambian, se sospecha que el lípido y la proteína forman un nuevo sistema lipidoproteico con nuevas propiedades fisicoquímicas. Para verificar si este efecto es debido a la inserción de proteína en la membrana lipídica se procedió a cuantificarla. Para ello, se basó en una reacción de reducción de cobre II por la acción del enlace peptídico. En presencia de ácido bicinónico, el cobre reducido forma un compuesto de coordinación que absorbe a 562 nm, el cual es directamente proporcional a la concentración de proteínas (ver Fig. 7.5). Para obtener

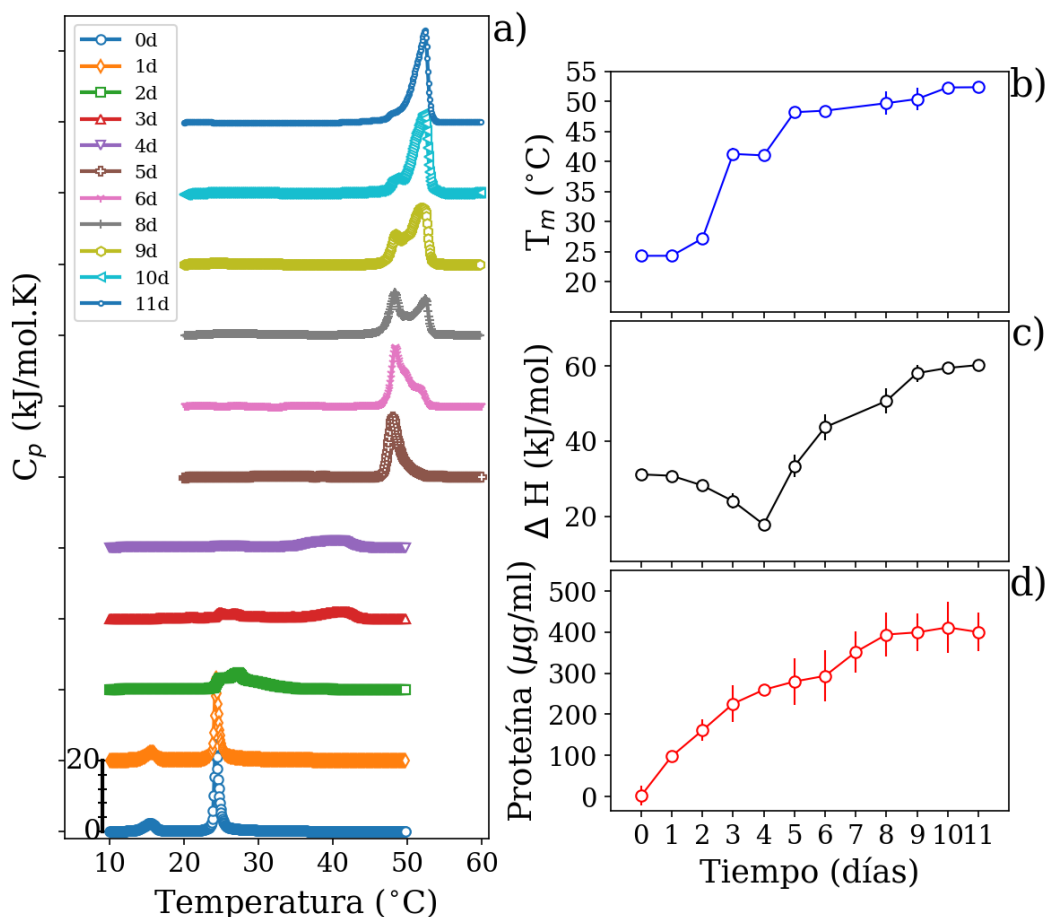


Figure 7.4: Caracterización termotrópica-temporal de MLV de DMPC, bajo el efecto de ovoalbúmina. Perfiles calorimétricos (a), temperatura de transición de fase (b), entalpía (c) y proteína absorbida en la membrana cuantificada en pellet liposomales resuspendidos (d).

muestras libres de proteínas disueltas en la solución de incubación, se separaron liposomas de dicha solución por medio de centrifugación. El pellet de liposomas fue lavado con búffer hasta encontrar negativo la reacción de proteína en la solución de lavado. Posteriormente el pellet de liposomas fue resuspendido y se llevó a cabo la reacción descrita anteriormente (ver detalles del protocolo en la sección de detalles experimentales correspondiente a este capítulo). Se tomó lectura de la absorbancia de las muestras. De este análisis se encontró que, efectivamente los cambios en las cantidades calorimétricas de la membrana están en función de la concentración de ovoalbúmina presente en muestras de pellet de liposomas (ver Fig.7.4d).

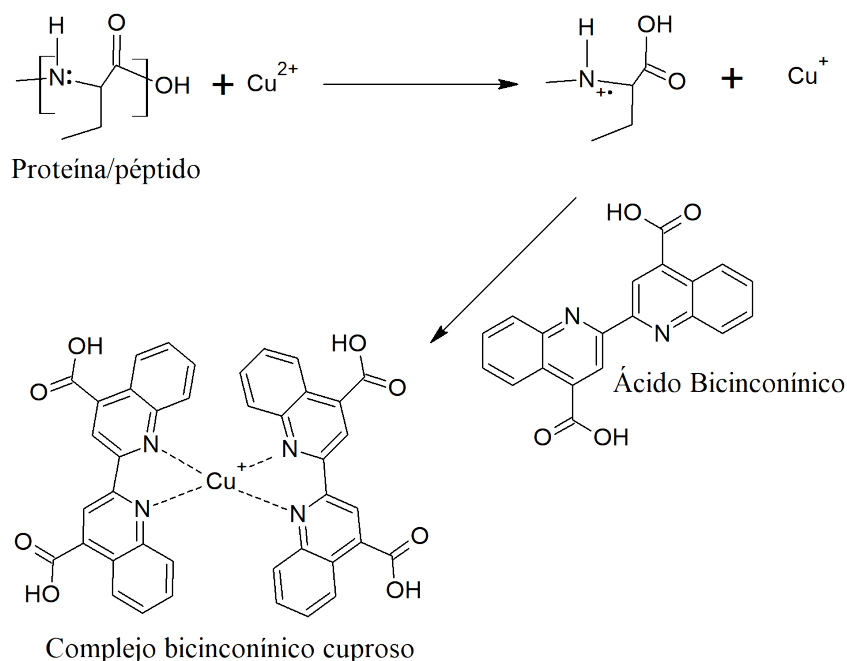


Figure 7.5: Reacción de ácido bicinónico con cobre reducido por la acción del enlace peptídico presente en las proteínas.

7.3 El efecto de la inserción de OVA en membranas de DMPC no involucra desnaturalización de proteína

Con el objetivo de explorar si las interacciones entre lípidos y proteínas que dan lugar al sistema lípido-proteico están relacionadas con la posible desnaturalización de proteínas; primeramente se analizó si proteína previamente desnaturalizada induce cambios similares a la no desnaturalizada durante el mismo tiempo de incubación. La Figura 7.6 muestra que, tanto el DMPC como la OVA no sufren efectos durante 11 días de incubación (círculos azules y rombos naranjas, respectivamente), preservando sus propiedades termotrópicas. Además, liposomas de DMPC incubados con proteína desnaturalizada (cuadros en verde) no mostraron cambios en la temperatura de transición de fase, solamente la entalpía calorimétrica se vio ligeramente modificada, indicando que las posibles cadenas peptídicas llevan a cabo una especie de apantallamiento sobre la superficie de la membrana. Sin embargo, como ya se describió, las membranas de DMPC incubadas con OVA modifican sustancialmente su respuesta calorimétrica (triángulos rojos).

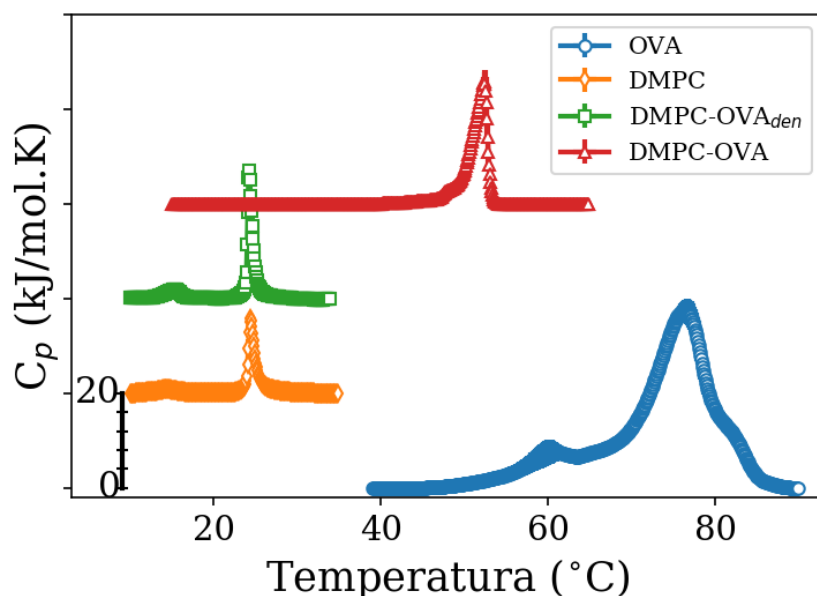


Figure 7.6: Perfiles calorimétricos de DMPC-OVA bajo el efecto de ova desnaturalizada previamente e incubada por 11 días. OVA y DMPC (incubadas por 11 días) fueron usadas para verificar si ambos componentes son afectados en este periodo de incubación. DMPC-OVA sin desnaturalizar fue usado para comparar el efecto.

Además, para verificar la posible desnaturalización de la proteína que se encuentra disuelta y no contenida en las membranas, se realizó un análisis espectrofotométrico y un análisis de distribución de tamaños (llevado a cabo mediante dispersión dinámica de luz, DLS) del remanente de proteína disuelta de las muestras incubadas.

Del análisis espectrofotométrico que se muestra en la Fig. 7.7a se comprobó que la absorbancia relacionada al enlace peptídico (señal alrededor de 225 nm) se mantiene durante el tiempo de incubación y la señal asociada con la posible externación de los aminoácidos aromáticos del núcleo hidrófobo (señal alrededor de 280 nm) refleja que estos aminoácidos no se desprenden de su sitio hidrófobo, puesto que la intensidad de la señal casi es la misma durante el mismo periodo de incubación. Complementariamente, el análisis por DLS demuestra que el tamaño de la ovoalbúmina (± 9 nm) en solución no cambia en dicho periodo (ver Fig. 7.7b). De esta manera se concluye que la inserción de ovoalbúmina en membranas de DMPC no involucra procesos de desnaturalización proteica y además para que el proceso se lleve a cabo se requiere de proteína no desnaturalizada.

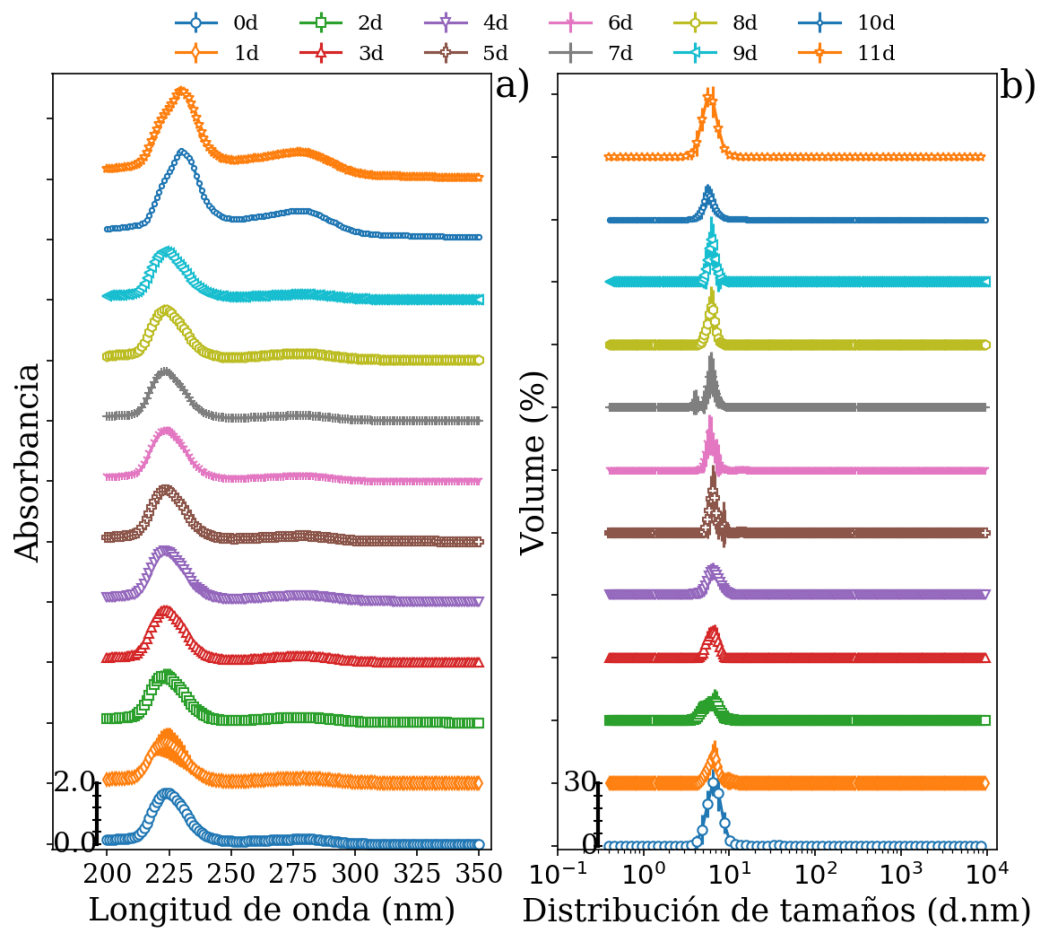


Figure 7.7: (a) Absorbancia de ovoalbúmina remanente soluble (solución madre) de la suspensión de DMPC-OVA en función del tiempo de incubación. La región de 225 nm y 280 nm corresponden a la absorbancia debido al enlace peptídico y a los aminoácidos aromáticos respectivamente. (b) Distribución de tamaños de ovoalbúmina remanente en la suspensión de DMPC-OVA en función del tiempo.

7.4 Las membranas lipido-proteicas son más sensibles a NT y AT que membranas puramente lipídicas

Para verificar la influencia que ejercen las proteínas sobre el efecto que neurotransmisores y anestésicos producen en las membranas lipídicas, se llevaron a cabo experimentos calorimétricos usando el modelo DMPC-OVA en presencia de acetilcolina (un NT excitatorio), GABA (un NT inhibitorio), tetracaína (un AT local) y pentobarbital (un AT general). La Figura 7.8 muestra que membranas construídas únicamente por DMPC, no son afectadas por los neurotransmisores, pero membranas que contienen proteínas sí son sensibles a acetilcolina

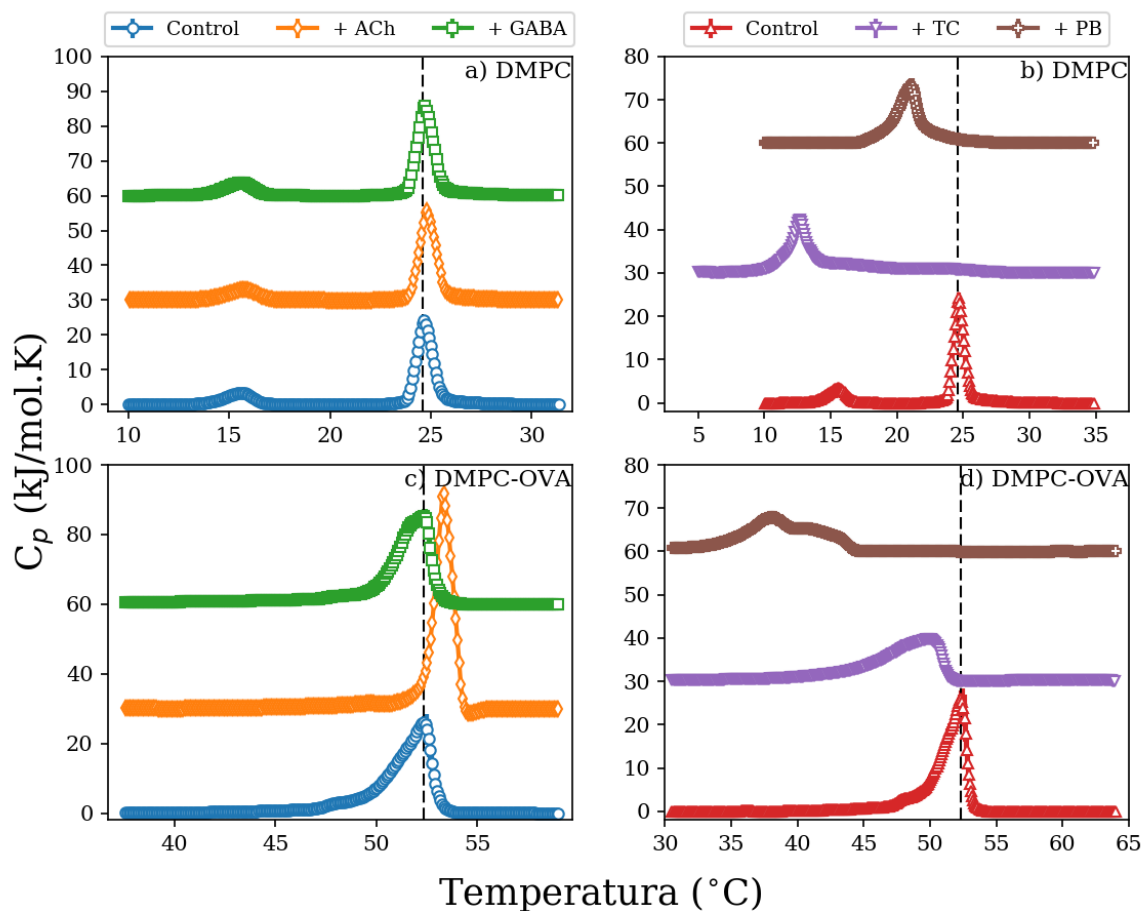


Figure 7.8: Perfiles calorimétricos de DMPC (a-b) y DMPC-OVA (c-d) bajo el efecto de neurotransmisores (acetilcolina y gaba) y anestésicos (tetracaína y pentobarbital).

(ver Fig. 7.8 a y c). Para el caso de anestésicos, observamos que membranas de DMPC puro son más sensibles a tetracaína que a pentobarbital; pero membranas con proteínas son más sensibles a pentobarbital que a tetracaína (ver Fig. 7.8 b y d). Este comportamiento ocurre en un modelo de membrana que ahora contiene lípidos y proteínas. Aunque es un modelo muy simple comparado con los sistemas biológicos, refleja que las interacciones entre lípidos y proteínas cambian la respuesta ante los efectos de moléculas hidrofóbicas.

Detalles experimentales

Reactivos. 1,2-Dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfolina, fue adquirido en Avanti Polar Lipids, Birmingham. Acetilcolina.HCl, ácido γ -aminobutírico, tetracaína.HCl, ovoalbúmina y α glicoproteína ácida fueron comprados a Sigma-Aldrich. Pentobarbital sódico fue adquirido de Cheminova. Todos los reactivos fueron usados sin purificación adicional.

Caracterización calorimétrica de DMPC, OVA y AGP. Para DMPC y OVA se utilizó una concentración de 3.0 mg/ml y para AGP 1.0 mg/ml. Tanto proteínas como lípido fueron suspendidas en búffer de KCl/HEPES (150 mM/10 mM). Los MLV de DMPC fueron preparados siguiendo el protocolo estándar. Todas las muestras fueron degasificadas por 10 min, equilibradas por 5 min en el DSC y escaneadas 10 veces consecutivas en modo calentamiento a 1°C/min a 3.0 atm. Dos repeticiones por cada muestra fueron realizadas.

Inserción de proteína en membranas de DMPC. Vesículas MLV de DMPC (3.0 mg/ml) fueron preparadas siguiendo el protocolo estándar (ver apartado métodos generales) usando solución de KCl 150 mM y agitando a 1000 rpm, por 60 min a 37°C.

Proteína en polvo fue hidratada con suspensión liposomal hasta alcanzar una relación en concentración de proteína:lípidos 1:1 (w/w); agregando solución liposomal poco a poco en agitación (300 rpm), a 25°C. Con este procedimiento se asegura que la proteína queda en el exterior de los liposomas y no encapsulado en éstos. Posteriormente, la suspensión de liposomas con proteína se incuban de 1-11 días a 25°C, agitando a 300 rpm en atmósfera inerte de nitrógeno.

Cada 24 hrs de incubación, las muestras de DMPC-proteína (1 ml) fueron centrifugadas a 10000 rpm, 60 min, a 4°C. Posteriormente se separó el pellet y éste fue lavado con KCl/HEPES pH 7.4 por 5 veces. El pellet de liposomas fue resuspendido en 1000 KCl/HEPES pH 7.4, homogenizado suavemente y se le realizó los siguientes análisis: caracterización calorimétrica, medición de tamaños por DLS y cuantificación de proteínas. En la solución madre se caracterizó la evolución de tamaño de la proteína remanente no insertada en las

membranas y se caracterizó la respuesta en absorbancia en el UV asociada a la absorción de aminoácidos aromáticos (280 nm) y al enlace peptídico (225 nm).

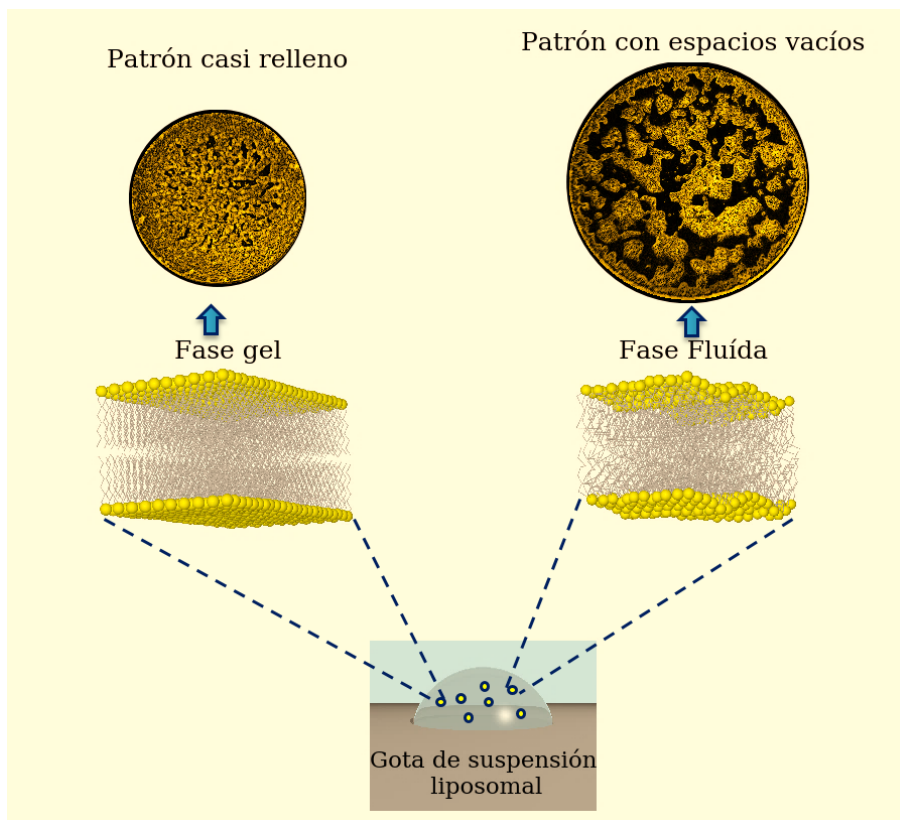
Cuantificación de proteína. Muestras de 100 μ l de pellet reconstituído fueron sonicados por 15 min a 25°C. Posteriormente, se hicieron reaccionar con 800 μ l de ácido bicinonínico/Cu II (50/1 v/v) por 15 min a 60°C. En esta reacción se reduce Cu II a Cu por la acción del enlace peptídico, el Cu reducido forma un complejo de coordinación con el ácido bicinonínico de color púrpura con un máximo de absorbancia a 562 nm. Las muestras coloridas fueron enfriadas a temperatura ambiente y medidas a 562 nm con un espectrofotómetro Thermo Scientific Multiskan FC.

Análisis de tamaño y absorbancia de OVA en solución madre. A partir de la solución madre (solución de incubación DMPC-OVA), se examinó el cambio en el tamaño de ovoalbúmina usando un Zetasizer Nano ZSP (Malvern Instruments). Adicionalmente, se midieron los perfiles de absorbancia en la región de UV (200-350 nm) de la proteína por medio de un espectrofotómetro Thermo Scientific Multiskan FC. Ambos análisis fueron desarrollados cada 24 hrs durante los 11 días de incubación.

Interacción de neurotransmisores y anestésicos con proteoliposomas. Proteoliposomas formados por la incubación de MLV de DMPC con OVA durante 11 días fueron centrifugados y separados de la solución madre. El pellet fue lavado y resuspendido en solución de KCl/HEPES pH 7.4. Posteriormente se añadió una concentración final de 25 mM de acetilcolina, GABA, tetracaína o pentobarbital. Finalmente se realizó un análisis calorimétrico para cada caso.

8

Evaporación y patrones de gotas de MLV de DPPC



Diversos fenómenos a nivel macroscópico tienen su origen en las interacciones intermoleculares. En este sentido, en el presente capítulo y en el siguiente veremos cómo tales interacciones son las responsables del autoensamblaje y la formación de estructuras durante un proceso de evaporación de pequeñas gotas de suspensión de liposomas. La comprensión de cómo las gotas que contienen partículas coloidales interactúan en un proceso de evaporación es un tema de importancia en áreas relacionadas con la medicina y la biología [119–123].

La evaporación de gotas formadas por fluidos complejos es un fenómeno que involucra procesos fuera de equilibrio conducidos por la competencia entre flujos de capilaridad y flujos de Marangoni y por la competencia entre las interacciones partícula-partícula y partícula-substrato [124–128].

En este capítulo se estudia la formación de patrones a partir de gotas de suspensión de liposomas formados por DPPC y mezcla de DPPC/DPPG a diferentes temperaturas. También se estudia la influencia que la tetracaína ejerce en los patrones de gotas liposomales en función de la concentración. Los reminiscentes finales de las gotas evaporadas demuestran una transición de fase en cuanto a la morfología se refiere, el cual coincide con la transición de fase gel-fluido de liposomas analizados por calorimetría diferencial de barrido. Por debajo de la transición de fase los patrones son casi rellenos y de menor tamaño, en comparación con los patrones de gotas evaporadas a temperaturas por arriba de la transición de fase, las cuales son de mayor tamaño y contienen espacios vacíos.

8.1 Morfología de gotas evaporadas en función de la temperatura

La Figura 8.1a muestra los reminiscentes finales después de un proceso de evaporación de gotas que contienen liposomas MLV de DPPC. Como se puede observar, la morfología y el tamaño de los reminiscentes presentan una transición (T_m) a una temperatura entre 42 y 43°C. Los patrones de las gotas evaporadas por debajo de T_m son muy similares. Del mismo modo, los patrones de gotas evaporadas por arriba de la T_m son muy parecidas. Pero éstas a su vez son distintas dependiendo si las gotas han sido evaporadas por debajo o por

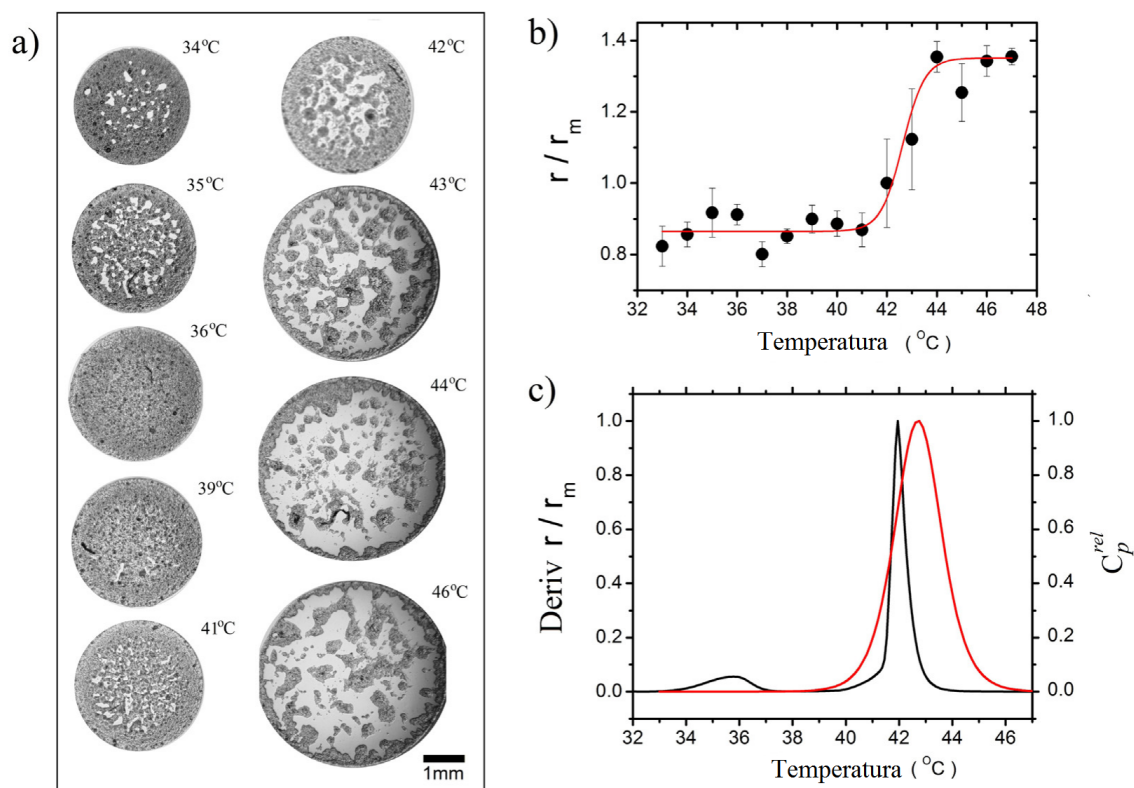


Figure 8.1: Efecto de la temperatura en un proceso de evaporación de gotas de liposomas de DPPC. (a) Reminiscentes de gotas de MLV de DPPC (4 mM) en función de la temperatura del substrato. (b) Radio relativo ($R = r/r_m$) de los patrones en función de la temperatura, r_m es el radio de los reminiscentes evaporados a la T_m . Los datos fueron ajustados a una función sigmoide, $R(T) = \frac{R_{min} - R_{max}}{1 + \exp(T_1 - T_0)dT} + R_{max}$. (c) Derivada de la función sigmoide del radio relativo en función de la temperatura (en rojo) y perfil calorimétrico de MLV de DPPC normalizado con respecto al valor máximo de capacidad calorífica (en negro).

arriba de T_m . Por lo tanto el parámetro de orden que puede asociarse a esta transición es el radio r de los patrones. Así, la Fig. 8.1b muestra el radio relativo $R = r/r_m$ en función de la temperatura; donde r_m es el radio a la T_m . Como se puede apreciar, los datos siguen una curva sigmoidea y su derivada proporciona información más precisa sobre dicha transición de fase. Interesantemente, esta transición de fase morfológica se encuentra a la misma temperatura de la transición de fase calorimétrica (transición gel-fluido) que resulta de un análisis calorimétrico de suspensión liposomal 8.1c. Esto implica que las propiedades termotrópicas de las vesículas suspendidas en una gota se conservan durante el proceso de

evaporación y determinan la morfología de los reminiscentes finales.

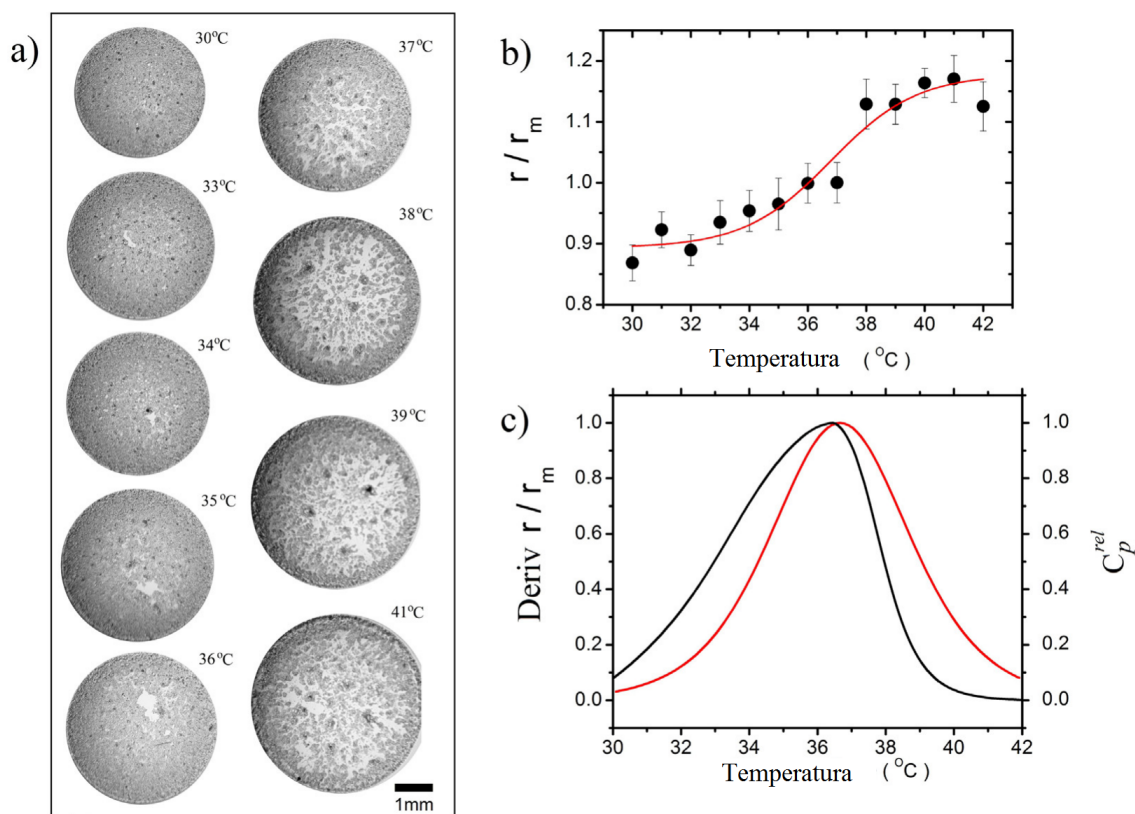


Figure 8.2: Efecto de la temperatura en un proceso de evaporación de gotas de liposomas de DPPC/DPPG. (a) Reminiscentes de gotas de MLV de DPPC/DPPG (4 mM, 2:1) en función de la temperatura del sustrato. (b) Radio relativo de los patrones en función de la temperatura con ajuste sigmoideo. (c) Derivada de la función sigmoide del radio relativo en función de la temperatura (en rojo) y perfil calorimétrico de MLV de DPPC/DPPG normalizado con respecto al valor máximo de capacidad calorífica (en negro).

Para corroborar que lo anteriormente observado es válido para otros sistemas aún más complejos, se hizo un análisis similar para gotas construídas por una mezcla binaria de lípidos: DPPC y DPPG (2:1). La Figura 8.2 muestra los resultado obtenidos de dicha combinación lipídica. De nuevo, el radio relativo incrementa en función de la temperatura de transición de fase siguiendo un perfil sigmoideo cuya derivada corresponde con el perfil calorimétrico obtenido por DSC. Cabe mencionar que ambas curvas están ensanchadas, reflejando que cuando se combinan lípidos para formar liposomas, dependiendo de las características de los lípidos en juego, la cooperatividad disminuye. De acuerdo a la relación entre la entalpía

calorimétrica y la entalpía de van't Hoff, el ancho de la traza calorimétrica puede ser interpretada como el grado de cooperatividad intermolecular entre las moléculas de lípidos que dan lugar al cambio de fase termotrópico. [21].

8.2 Clasificación de patrones

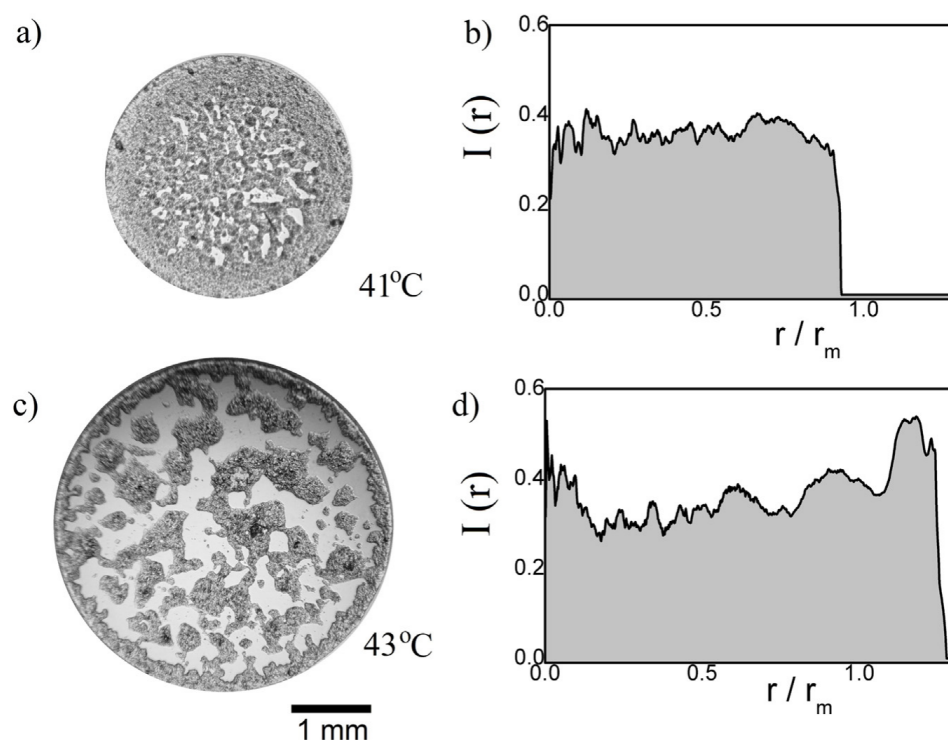


Figure 8.3: Clasificación de patrones de gotas liposomales evaporadas por arriba y por debajo de la temperatura de transición de liposomas de DPPC. Los valores del r están normalizados en función del radio de gotas liposomales evaporadas en la temperatura de transición (r_m) con el objetivo de apreciar las diferencias dadas las propiedades termodinámicas de la suspensión liposomal. (a) Patron uniforme formado por la evaporación de gota de MLV de DPPC a 41°C. (b) Perfil de densidad radial de gota evaporada a 41°C. (c) Patrones con espacios vacíos y de mayor tamaño que a) proveniente de una gota de MLV de DPPC evaporada a 43°C. (d) Perfil de densidad radial de gota evaporada a 43°C.

Los patrones previamente descritos, pueden ser clasificados morfológicamente en dos grupos: patrones rellenos uniformemente y patrones con espacios vacíos; dependiendo si provienen de gotas evaporadas por debajo o por arriba de la transición de fase, respectivamente (ver Fig.

8.3a y c). Los perfiles de densidad radial confirman dichas morfologías de las deposiciones finales (ver Fig. 8.3b y d), en donde los cambios en $I(r)$ corresponden a espacios vacíos distribuidos aleatoriamente. Como puede observarse los patrones de gotas evaporadas por arriba de la T_m son de mayor tamaño que los evaporados por debajo de ésta.

8.3 Cambios en la morfología de los patrones debido a un agente hidrófobo

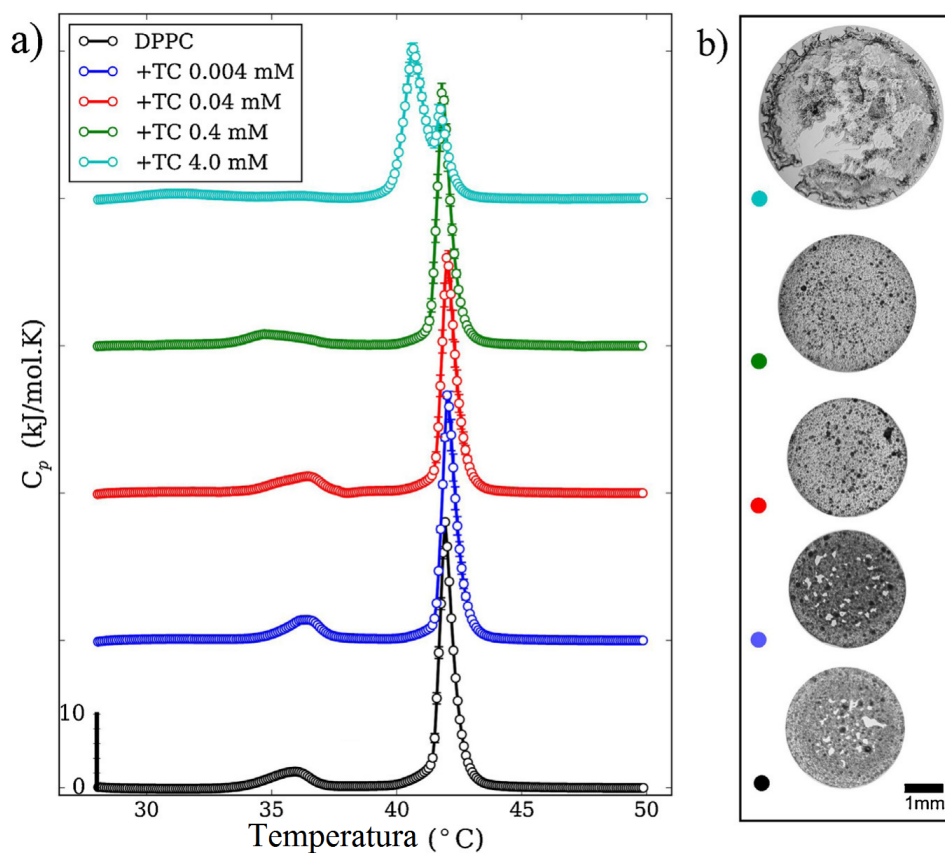


Figure 8.4: Efecto de un agente hidrófobo. (a) Perfiles calorimétricos de liposomas de DPPC con diferentes dosis de tetracaína: 0.004, 0.04, 0.4 y 4.0 mM. (b) Patrones de gotas de DPPC con tetracaína a las concentraciones mencionadas y evaporadas a 37°C. Nótese que la formación de patrones es muy sensible a dosis pequeñas de tetracaína.

Un agente hidrófobo puede cambiar las propiedades calorimétricas de las membranas lipídicas,

desplazando la pre-transición y la transición de fase a temperaturas más bajas. Comparando los perfiles calorimétricos con los patrones generados a partir de gotas de DPPC a diferentes concentraciones de tetracaína se observó que el incremento en el radio de los patrones correlacionan con los cambios observados en la pre-transición de los perfiles calorimétricos obtenidos por DSC. La Figura 8.4 muestra que a partir de 0.4 mM de tetracaína el radio aumenta y la pre-transición se ensancha (círculos verdes).

A manera de resumen, se encontró que las propiedades calorimétricas de las vesículas lipídicas juegan un papel muy importante en la formación de patrones durante un proceso de evaporación de gotas, ya sea que sean evaporadas por arriba o por debajo de la transición de fase gel-fluída de las membranas liposomales, las propiedades termotrópicas de estos sistemas determinan la morfología de los reminiscentes finales de las gotas evaporadas, obteniendo así, patrones casi rellenos con un diámetro menor si son evaporadas en fase gel; y patrones con espacios vacíos y de mayor diámetro si las gotas son evaporadas en fase fluída. Entonces, si un análisis que involucra evaporación de gotas puede ser sensible a las propiedades termotrópicas de un sistema, tanto como a las interacciones a nivel intermolecular entre lípidos y otros agentes hidrófobos como los anestésicos locales, hace factible el uso de este método para explorar y caracterizar interacciones intermoleculares en diversos sistemas de interés biológico.

Detalles experimentales

Preparación de liposomas. La preparación de los liposomas fue llevado a cabo siguiendo el protocolo estándar de preparación de MLV. DPPC y DPPG (Avanti Polar Lipids) fueron usados sin purificación adicional. La mezcla de DPPC:DPPG (4 mM, 2:1) fue realizada en cloroformo:metanol (1:1 v/v). La hidratación de los lípidos fue realizada usando agua deionizada MilliQ.

Evaporación de gota. Gotas de 2.5 μ l de suspensión de liposomas fueron depositadas sobre una superficie de PDMS y evaporadas a condiciones controladas de temperatura y

humedad (40%). Imágenes de los reminiscentes finales fueron capturadas con una cámara digital acoplada a un microscopio óptico. Las imágenes fueron guardadas para su posterior análisis.

Análisis de imágenes. Para caracterizar estructuralmente los patrones de las gotas evaporadas se midieron los perfiles de densidad radial $I(r)$. Esta cantidad describe cómo la integral de intensidad de pixeles de círculos concéntricos de una imagen cambian en función de la distancia radial. En 2D, $I(r)$ está dada por

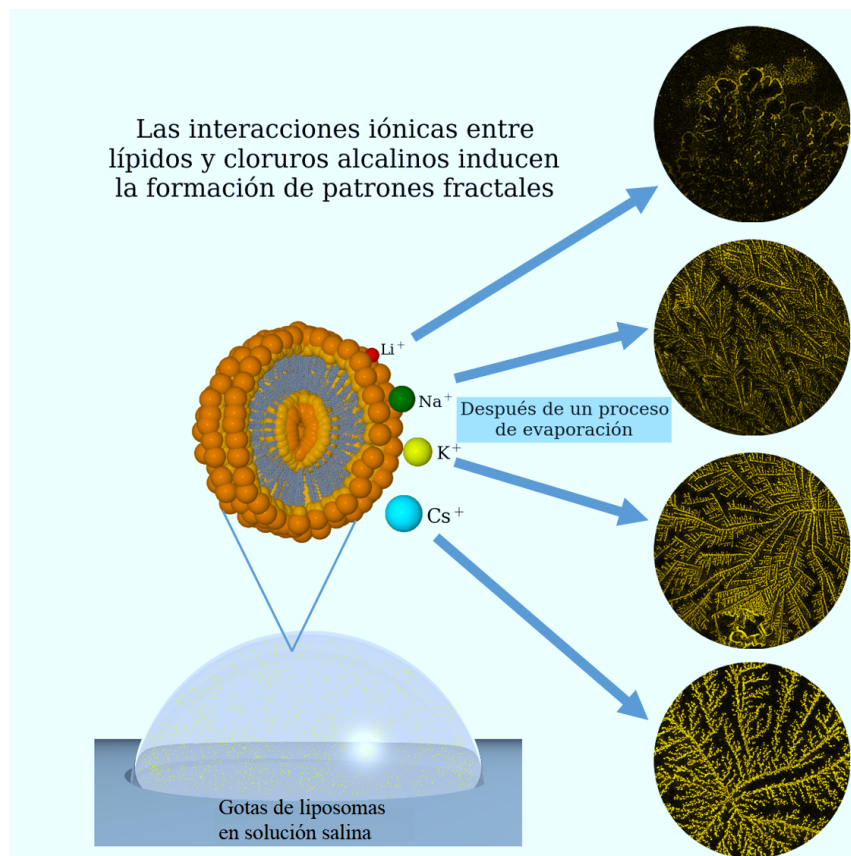
$$I(r) = \frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} i(r, \theta) d\theta, \quad (8.1)$$

donde $i(r, \theta)$ es la intensidad local contenida en un círculo de radio r .

Calorimetría. Todas las muestras fueron degasificadas por 10 min a 25°C, equilibradas por 5 min en el DSC y escaneadas 3 veces consecutivas en modo calentamiento a 1°C/min a 3.0 atm. Dos repeticiones por cada muestra fueron realizadas. La hidratación de las muestras con tetracaína fue realizada con solución de tetracaína con las siguientes concentraciones: 0.004, 0.04, 0.4 y 4.0 mM.

9

Fractales inducidos por las interacciones de cationes y DMPC



Las interacciones no específicas son el resultado de las interacciones electrostáticas intermoleculares de los componentes de un sistema. Aunque estas fuerzas son de carácter débil y las energías de unión son muy inferiores a las energías generadas en los enlaces covalentes, a escalas macroscópicas son superiores en número llegando a desempeñar un papel vital en las propiedades del sistema. Por ejemplo, el rol que juegan las interacciones de puente de hidrógeno en las propiedades anómalas del agua o las interacciones de Van der Waals presentes en todos los sistemas vivos. Las interacciones no específicas están cobrando una gran relevancia en áreas como la química supramolecular, la biología y las nanociencias, dando lugar al diseño de nuevas nanotecnologías [129]. Reportes recientes han puesto interés en la caracterización de la formación de patrones auto-ensamblados a partir de biopolímeros, péptidos y metales coordinados con el objetivo principal de aplicarlos en nanomedicina y otras áreas biológicas [130–133]. Wang et al., describieron fractales a partir de Fmoc-fenilalanina-tirosina-fosfato usando modelos de DLA (diffusion limited aggregation). Ellos reportaron que para obtener tales patrones fractales se requiere de nanotubos de dicho complejo formados en solución [134]. Zhao et al., reportaron estructuras fractales a partir de complejos de polímeros de cloruro de dimetilamonio y carboximetilcelulosa unidos por medio de interacciones iónicas; concluyendo que para que dichos fractales se formen, se requiere que el complejo polimérico cristalice, aún en solución [130]. Lee and Li construyeron estructuras de polietilenimina inducidas por pH y las caracterizaron por medio de microscopías electrónica y de fuerza atómica; concluyendo que es posible controlar la formación de dichas estructuras a partir de nanotubos de polietilenimina sensibles a pH, induciendo cambios en su densidad de carga superficial y su solubilidad en agua [135]. Kurland et al., exploraron con la polidispersidad de sericina (proteína de la seda) para lograr estructuras monofractales [136]. En este mismo sentido, Li y colaboradores, tomando en cuenta un mecanismo de DLA y resultados de espectroscopía infrarroja, demostraron que el autoensamblaje de polímeros carboxílicos coordinados con Fe^{3+} es mediado por enlaces de coordinación y la formación de micelas [137]. Más autores se suman al interés por el estudio de los patrones, Zohrabi y Habibi, recientemente, propusieron que la nucleación de nanotubos de difenilalanina extraídos de polipéptidos de β -amiloide de Alzheimer's crecen dendríticamente [131]. Han et al.,

demonstraron que es posible moldear estructuras autoensambladas de polímeros anfotéricos cambiando un estímulo externo, como el pH, la fuerza iónica y la solubilidad [132]. De manera similar, Koley y colaboradores observaron transiciones morfológicas de 2D a 3D de dipéptidos de fenilalanina-tirosina estimulados con corriente y temperatura [133].

La similitud química y la biocompatibilidad son de vital importancia para la aplicación de nuevas tecnologías en sistemas biológicos. Tal como ya se ha abordado en capítulos anteriores, los fosfolípidos son moléculas con alta relevancia biológica y biocompatibles. Modelos como los liposomas, no solo han sido ampliamente usados para estudiar cómo la membrana interacciona con diversos fármacos y cómo cambian sus propiedades físicas y químicas; sino también, han alcanzado otras áreas como las nanociencias, por ejemplo han sido propuestos como sistemas de liberación controlada de fármacos [138]. Además, cabe destacar que la formación de estructuras y patrones a través de la evaporación de gotas de diversos fluidos, está emergiendo como un método interesante para análisis y diagnóstico en diversas áreas. Este método ha sido usado en pruebas de interés biológico, detección de patologías relacionadas con la sangre, para medir la calidad de muestras en agricultura, para reconocimiento de DNA, para la construcción de nuevos diseños moleculares en nanotecnología, entre otras [139–143]. Muchos trabajos se han focalizado en el estudio del control de las condiciones físicas para ensamblar estructuras que puedan aplicarse en nanobiología [131–133, 135, 136, 144]. Así, se sabe que cuando se evapora una gota, existe un balance entre el flujo dinámico, los gradientes de tensión superficial y las fuerzas de adhesión al sustrato. Este balance determina la formación de los patrones finales, tal como, el bien conocido “coffee ring” o el autoensamblaje de los componentes de la gota [130, 136, 143, 145–148]. Sin embargo, los eventos detrás de la evaporación de gotas involucra tanto fenómenos físicos como químicos. Por ejemplo, se ha reportado que las interacciones $\pi - \pi$ de anillos aromáticos pueden inducir la formación de arreglos supramoleculares [148]. En este sentido, el estudio de las interacciones fundamentales en sistemas estructurados es de vital importancia. Motivados por el hecho de que detrás del ensamblaje de macroestructuras complejas se encuentran en gran medida las interacciones no específicas en este apartado se abordará y discutirá cómo las interacciones electrostáticas entre lípidos (DMPC) y cloruros

de metales alcalinos inducen la formación de patrones muy particulares después de un proceso de evaporación. A través de un análisis exhaustivo por medio de la combinación sistemática de técnicas que incluyen, microscopía óptica, dispersión dinámica de luz (DLS), calorimetría diferencial de barrido y dinámica molecular (MD) se estudia la naturaleza de dichos patrones.

9.1 Cristales y estructuras fractales

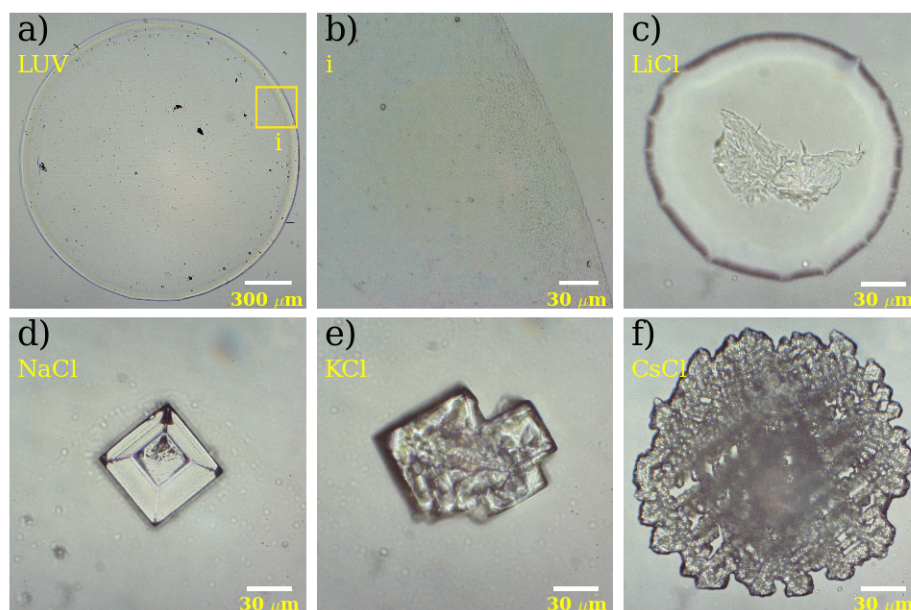


Figure 9.1: Patrones formados después de un proceso de evaporación de gota sobre una superficie de PDMS. (a-b) LUV de DMPC a 1.0 mM. (c-f) cristales de cloruros de litio, sodio, potasio y cesio (5.0 mM), respectivamente. La imagen (a) fue obtenida con un microscopio óptico a 4x. Todas las demás fueron tomadas a 40x.

La Figura 9.1 muestra patrones generados en una superficie de PDMS por medio de la evaporación de gotas. Sobre dicha superficie se depositaron microgotas ($0.5 \mu\text{l}$) de liposomas de DMPC puros (a y b) y gotas de solución salina de LiCl, NaCl, KCl y CsCl (c-f). En el reminiscente de lípidos se puede observar una distribución casi homogénea en el interior con una mayor acumulación en las orillas, con tendencia a formar un “coffee ring” (ver Fig. 9.1a y 9.1b). Los reminiscentes finales procedentes de soluciones alcalinas son microcristales con características particulares dependiendo del catión alcalino. El LiCl deja un pequeño cristal

rodeado por una zona acuosa debido a su alta higroscopicidad, que lo hace difícil de evaporar (ver Fig. 9.1c). NaCl produce un microcristal muy bien definido (Fig. 9.1d). En cambio, gotas de KCl dejan un cristal irregular (Fig. 9.1e). Por último, la Fig. 9.1f muestra un cristal extendido de CsCl.

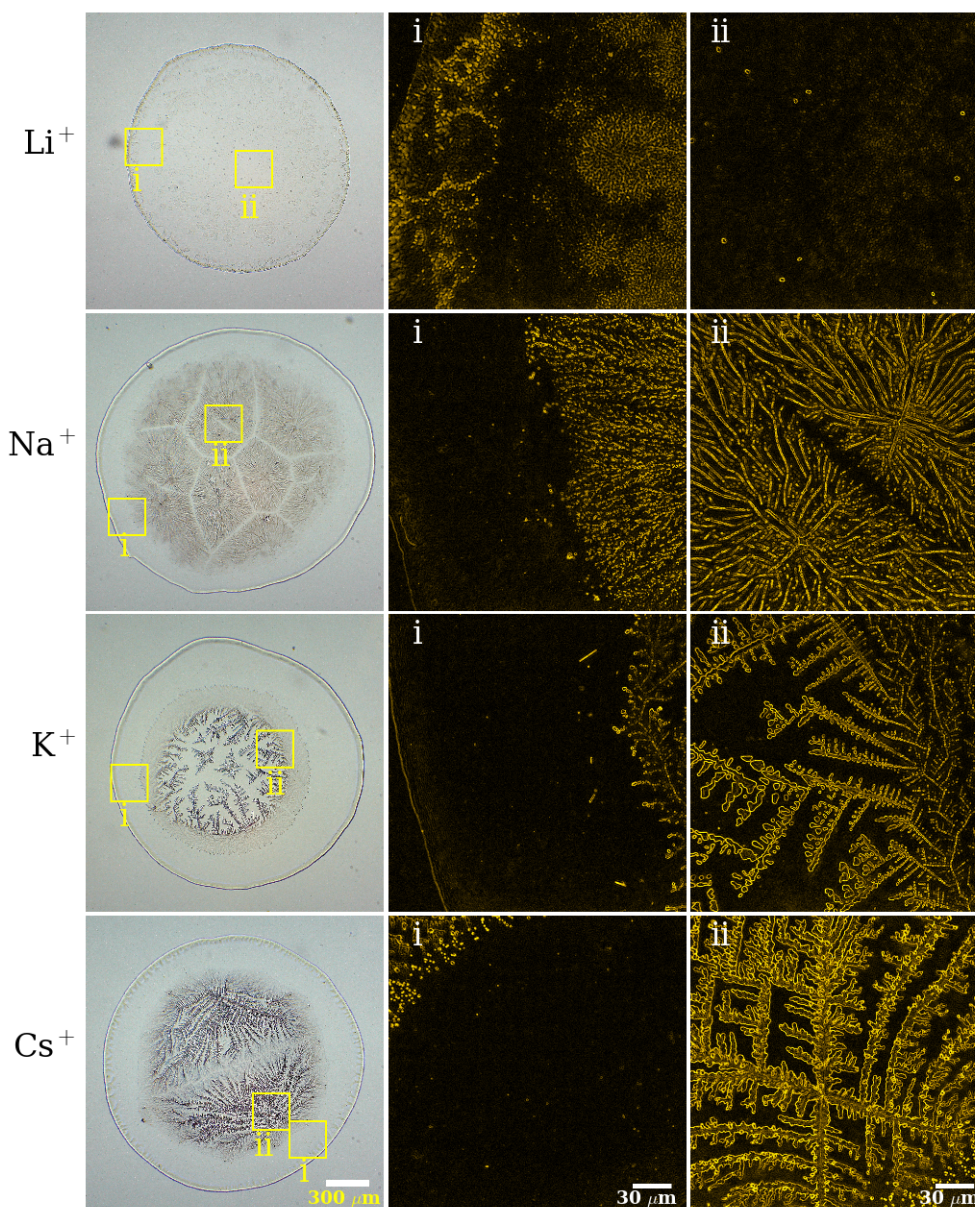


Figure 9.2: Patrones de microgotas de suspensión de liposomas (LUV de DMPC 1.0 mM) en combinación con cloruros de metales alcalinos (LiCl, NaCl, KCl y CsCl; 5.0 mM) evaporadas sobre una superficie de vidrio. El panel izquierdo muestra el reminiscente de gotas completas, las cuales fueron tomadas a 4x. Los otros dos paneles muestran dos secciones: i) interior y ii) “coffee ring”; las cuales fueron amplificadas a 40x.

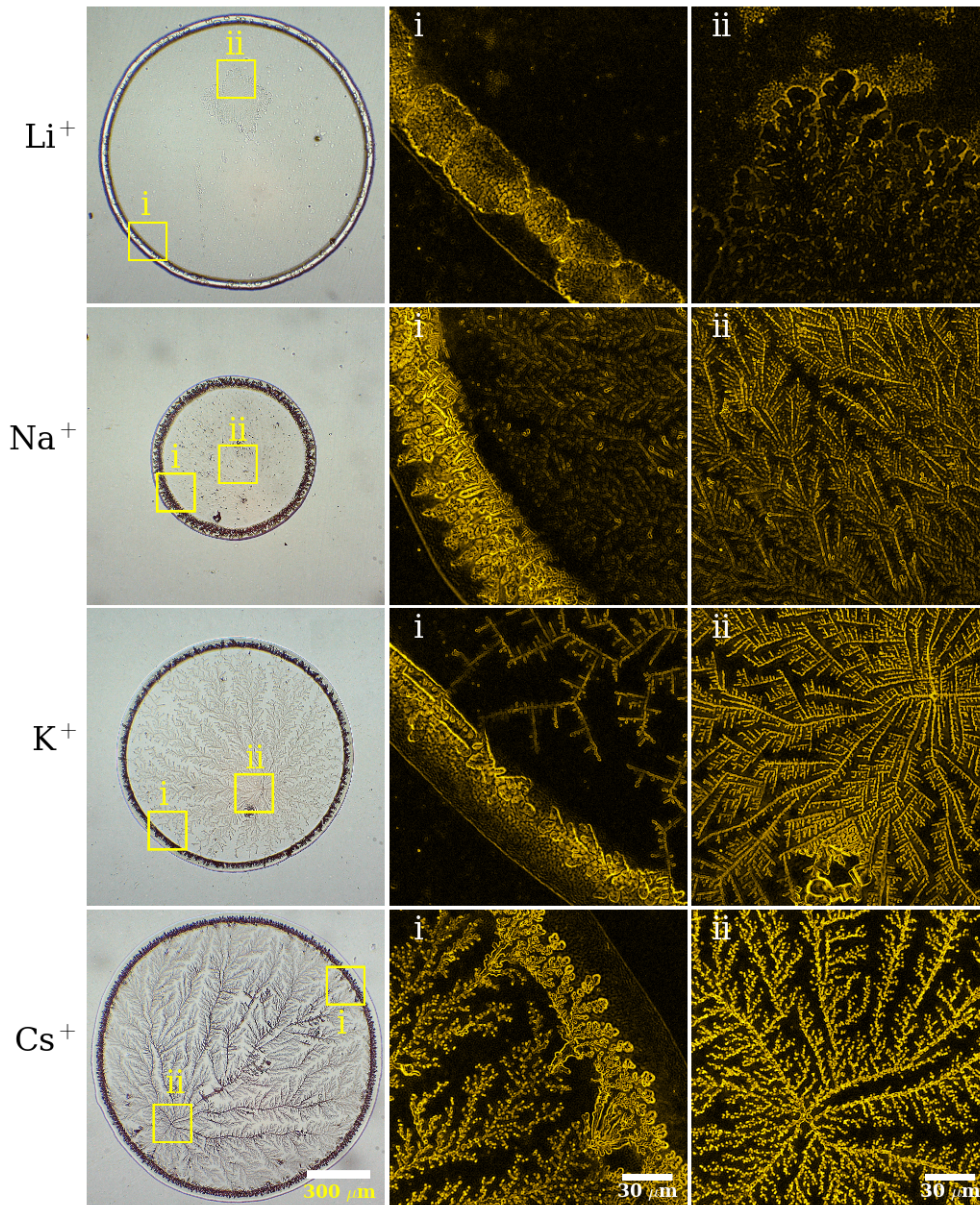


Figure 9.3: Patrones de microgotas de suspensión de liposomas (DMPC 1.0 mM) en combinación con cloruros de metales alcalinos (LiCl , NaCl , KCl y CsCl ; 5.0 mM) evaporadas sobre una superficie de PDMS. El panel izquierdo muestra el reminiscente de gotas completas, las cuales fueron tomadas a 4x. Los otros dos paneles muestran dos secciones: i) interior y ii) “coffee ring”; las cuales fueron amplificadas a 40x.

La Figura 9.1 muestra que los patrones generados por liposomas o soluciones salinas por separado son estructuras simples. Sin embargo, si a los liposomas de DMPC se le añade cloruro de metales alcalinos, y son evaporados conjuntamente, se obtienen interesantes patrones (ver Fig. 9.2 y Fig. 9.3). Para explorar y caracterizar tales patrones se evaporaron

gotas sobre dos superficies: vidrio (Fig. 9.2) y PDMS (Fig. 9.3). Se tomaron imágenes de los patrones con microscopio óptico. Las gotas completas fueron tomadas a 4x y dos secciones (interior, i y “coffee ring”, ii) fueron amplificadas a 40x. Las secciones amplificadas fueron procesadas con un filtro de color implementada en el software Fiji con el objetivo de resaltar las diferencias entre los patrones. Como se puede observar, en las dos superficies resultan patrones con ciertas diferencias. Por ejemplo, el “coffee ring” está más definido en PDMS y el interior tiene estructuras morfológicas que dependen de la superficie.

9.2 Análisis de la morfología de los patrones

9.2.1 Distribución radial de densidad

Para cuantificar cómo se distribuye radialmente la masa de las gotas evaporadas sobre la superficie, se calcularon los perfiles de densidad radial. La Figura 9.4 muestra los resultados obtenidos para ambas superficies: vidrio, la cual es una superficie hidrófila (ver Fig. 9.4a) y PDMS, catalogada como una superficie hidrófoba (ver Fig. 9.4b). Como se puede observar, la distribución de masa sobre ambas superficies es completamente diferente. La superficie hidrófoba induce patrones con radios más pequeños y con un “coffee ring” mucho más definido que la superficie hidrófila.

9.2.2 Análisis fractal

La Figura 9.5 muestra un análisis de la fractalidad para los patrones de liposomas/cloruros alcalinos en las superficies previamente descritas. El exponente de masa $\tau(Q)$ evalúa la intensidad de píxeles por cuadros en una imagen dada y es usada para calcular la dimensión fractal generalizada ($D(Q)$). Esta última es una medida que describe cómo la masa cambia en función de la resolución en una imagen. A partir de $D(Q)$ se pueden obtener tres medidas de la fractalidad para caracterizar estructuralmente una imagen tipo fractal: La dimensión fractal de capacidad o de conteo de cajas $D(0)$, la dimensión fractal de la información $D(1)$ y la dimensión fractal de correlación $D(2)$. Si el análisis fractal de una estructura resulta en un valor igual para las tres medidas, entonces se trata de un monofractal. Así, un monofractal

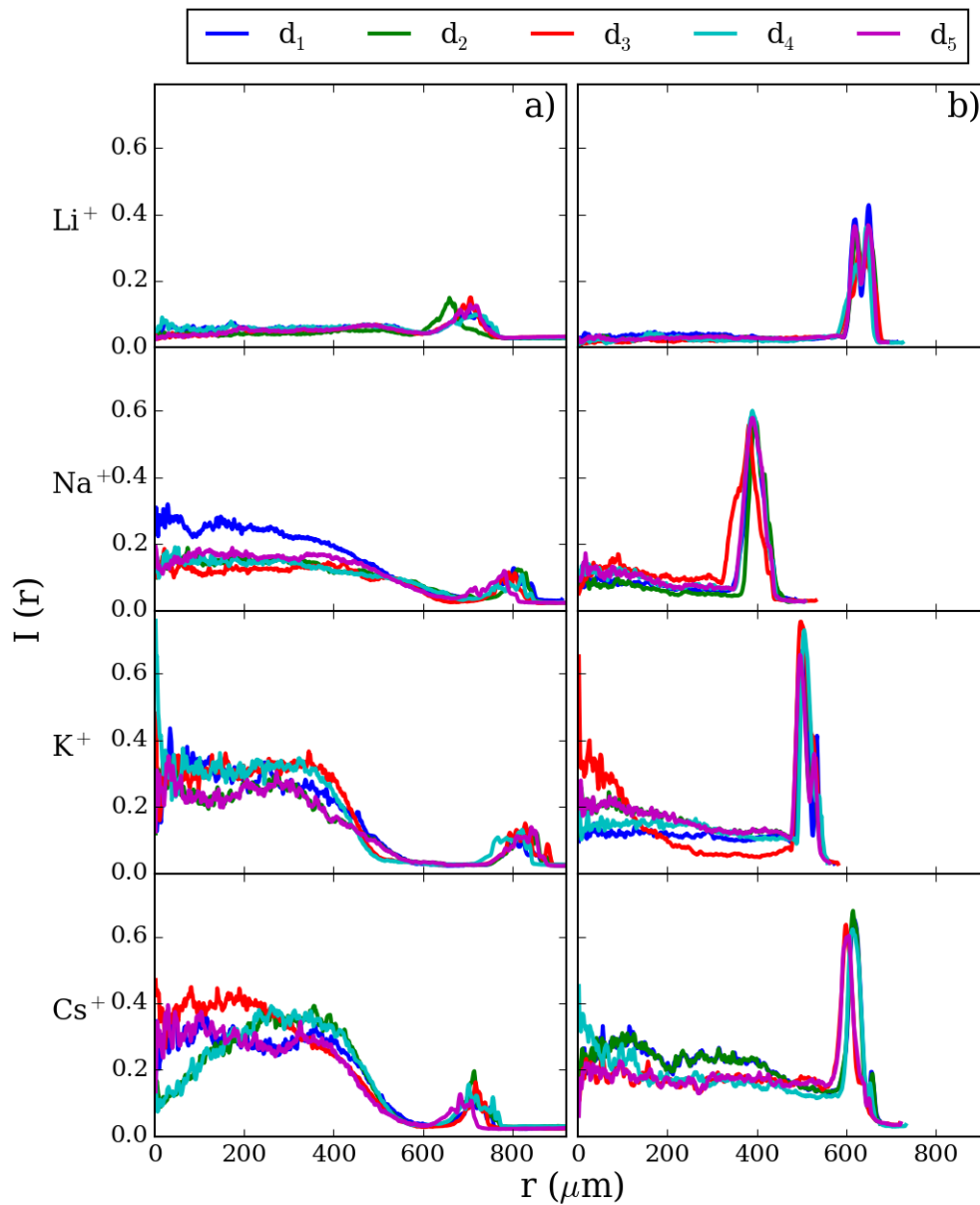


Figure 9.4: Perfiles de densidad radial de patrones obtenidos después de la evaporación de microgotas de suspensión de liposomas con cloruros de Li, Na, K y Cs. Vidrio (panel a) y PDMS (panel b). Cinco muestras (d_1 - d_5) fueron usados para verificar la reproducibilidad.

ideal bien conocido con un valor igual a 1.71, es el obtenido a través de un proceso de DLA (diffusion limited aggregation) (ver Fig. 9.5c).

En nuestro caso, aunque los valores de fractalidad obtenidos para los patrones en superficie de PDMS son muy cercanos al valor del DLA, es claro que el proceso de cristalización conserva

diferencias. Si bien es útil decir que el proceso por el cual cristalizan las sales alcalinas en combinación con liposomas podría seguir únicamente un mecanismo difusivo Browniano; el hecho es que un sólo número fractal no proporciona información acerca de cómo la masa se distribuye en la superficie. Así que se requiere de los otros dos números fractales para caracterizar los patrones y esbozar su naturaleza fisicoquímica, la cual incluye interacciones electrostáticas entre las vesículas, el agua y los iones alcalinos en competencia con las fuerzas de adhesión y mediada por la continuidad de flujos que se generan durante el proceso de evaporación [146,147]. Entonces la combinación de estos mecanismos resulta en los patrones multifractales observados, cuyos valores de fractalidad dice que D_1 y D_2 son menor que D_0 . El hecho de que D_1 y D_2 se alejen de D_0 indica mayor carácter multifractal (ver Fig. 9.5).

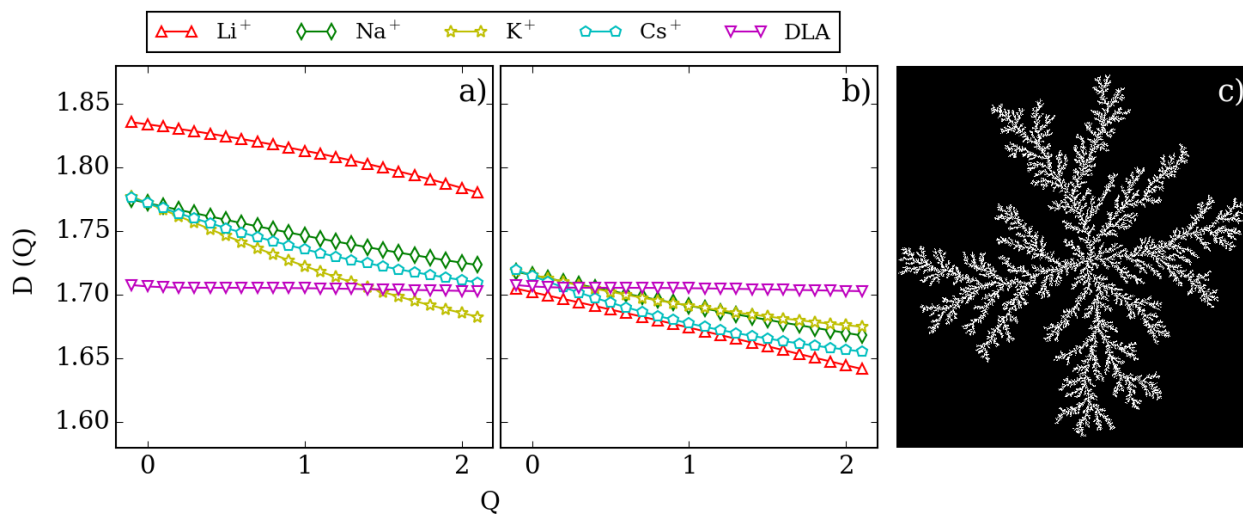


Figure 9.5: Análisis multifractal de la sección *ii* de los patrones obtenidos de gotas evaporadas de LUV/cloruros alcalinos en vidrio (a) y PDMS (b). Un patrón de DLA (c) fue usado como un medio para comparar con un monofractal ideal.

9.3 El rol de las interacciones iónicas

9.3.1 Potencial ζ

El proceso de evaporación de una gota es dinámico y complejo, en donde las interacciones iónicas juegan un papel importante. Como se puede observar en la Fig. 9.6 el potencial ζ

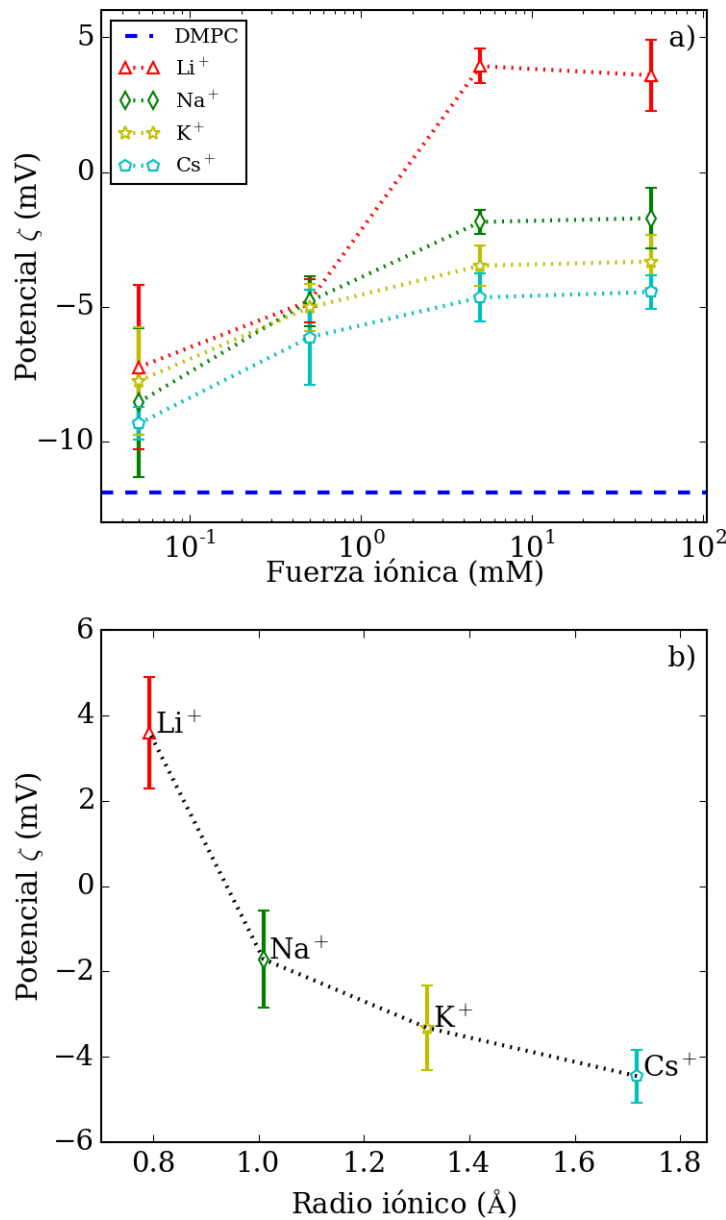


Figure 9.6: a) Potencial zeta de liposomas de DMPC en función de la fuerza iónica dada por Li^+ , Na^+ , K^+ y Cs^+ . Todas las muestras fueron equilibradas a 24.4°C por 120 s. Por lo menos 30 mediciones se realizaron a la misma muestra. Cada experimento fue repetido dos veces. b) Valores de potencial zeta como función del tamaño del catión. Note que en ambos casos la serie de Hofmeister se conserva.

de liposomas de DMPC es fuertemente modificado por los iones. El potencial ζ de DMPC en agua pura tiene un valor negativo de $-11.9 \pm 1.1 \text{ mV}$. Sin embargo, dicho valor cambia siguiendo la serie de Hofmeister: $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Cs}^+$ a pesar de que la fuerza iónica sea

la misma (ver Fig. 9.6a). La Figura 9.6b muestra que el valor del potencial ζ está en función del radio iónico. Previos reportes afirman que la afinidad de dichos iones por membranas similares sigue la misma serie [149].

9.4 Implicaciones mecánicas y termodinámicas

9.4.1 Reología

El conocimiento acerca de cómo cambian las propiedades reológicas de un fluido durante un proceso de evaporación es de vital importancia para entender cómo las características de un fluido complejo terminan en estructuras complejas como las observadas en la Fig. 9.2 y Fig. 9.3. En efecto, a medida que la evaporación progresa la concentración de los solutos se incrementa y las propiedades reológicas del fluido cambian.

La Figura 9.7 presenta la caracterización reológica de suspensión de liposomas en presencia de cloruros de metales alcalinos. Dos concentraciones fueron exploradas. DMPC: 1 mM/catión: 5 mM (Fig. 9.7a); y DMPC: 10 mM/catión: 50 mM (9.7b). Los cambios en la concentración intentan simular un incremento en la concentración de solutos a medida que la evaporación de la gota progresa. Interesantemente, el desplazamiento cuadrático medio de las partículas trazas presenta un comportamiento sub-difusivo a tiempos largos que cambia con respecto al tipo de catión y es más intenso a altas concentraciones de soluto. El módulo viscoelástico presenta un cruce que soporta el hecho de que el fluido presenta un comportamiento elástico por debajo de $10^3 rad/s$ (ver Fig. 9.7c y d).

9.4.2 Calorimetría

Finalmente, para explorar la influencia de las interacciones entre membrana lipídica y iones alcalinos se midieron las propiedades termotrópicas de vesículas de DMPC (LUV). La Figura 9.8 muestra que la temperatura de transición de fase de liposomas en agua ultrapura se encuentra en $24.4^\circ C$. Pero cuando están en medio salino dicha transición se desplaza ligeramente a temperaturas mayores. De la misma manera, la entalpía calorimétrica se incrementa. Este comportamiento claramente implica que las interacciones entre cationes y

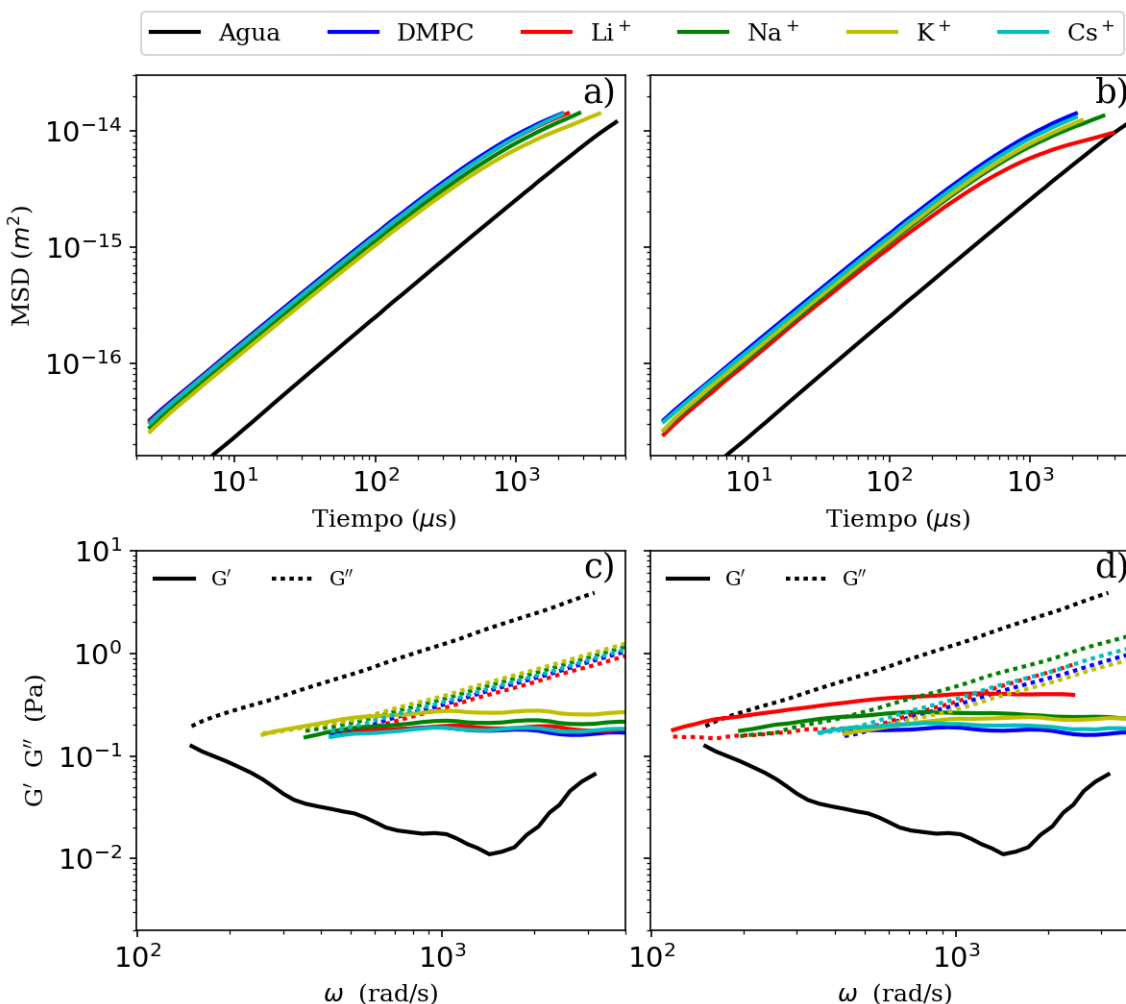


Figure 9.7: Caracterización microreológica de suspensión de LUV de DMPC a dos relaciones de concentración entre lípidos y sales. a) DMPC: 1 mM/catión: 5 mM; y b) DMPC: 10 mM/catión: 50 mM. Todas las mediciones fueron realizadas a 24.4°C. A partir del desplazamiento cuadrático medio (MDS) de partículas de poliestireno usadas como trazas en suspensión de liposomas alcalinizadas, se calculó el módulo viscoelástico los cuales se muestran en c) (DMPC:catión, 1 mM:5 mM) y d) (DMPC:catión, 10 mM:50 mM). Las curvas representan el promedio de dos muestras diferentes leídas por lo menos 15 veces. Mediciones de agua ultrapura fue usada como referencia.

los lípidos ocurre a nivel de la superficie membrana lipídica, confirmando así lo previamente discutido. Nuestros resultados calorimétricos están acorde a trabajos previos [150, 151].

A manera de resumen, motivados por los recientes reportes en áreas de las nanociencias en donde se discute que las interacciones electrostáticas dan lugar a diversos sistemas autoestructurados con alto potencial en áreas relacionadas con la biología; se ha desarrollado

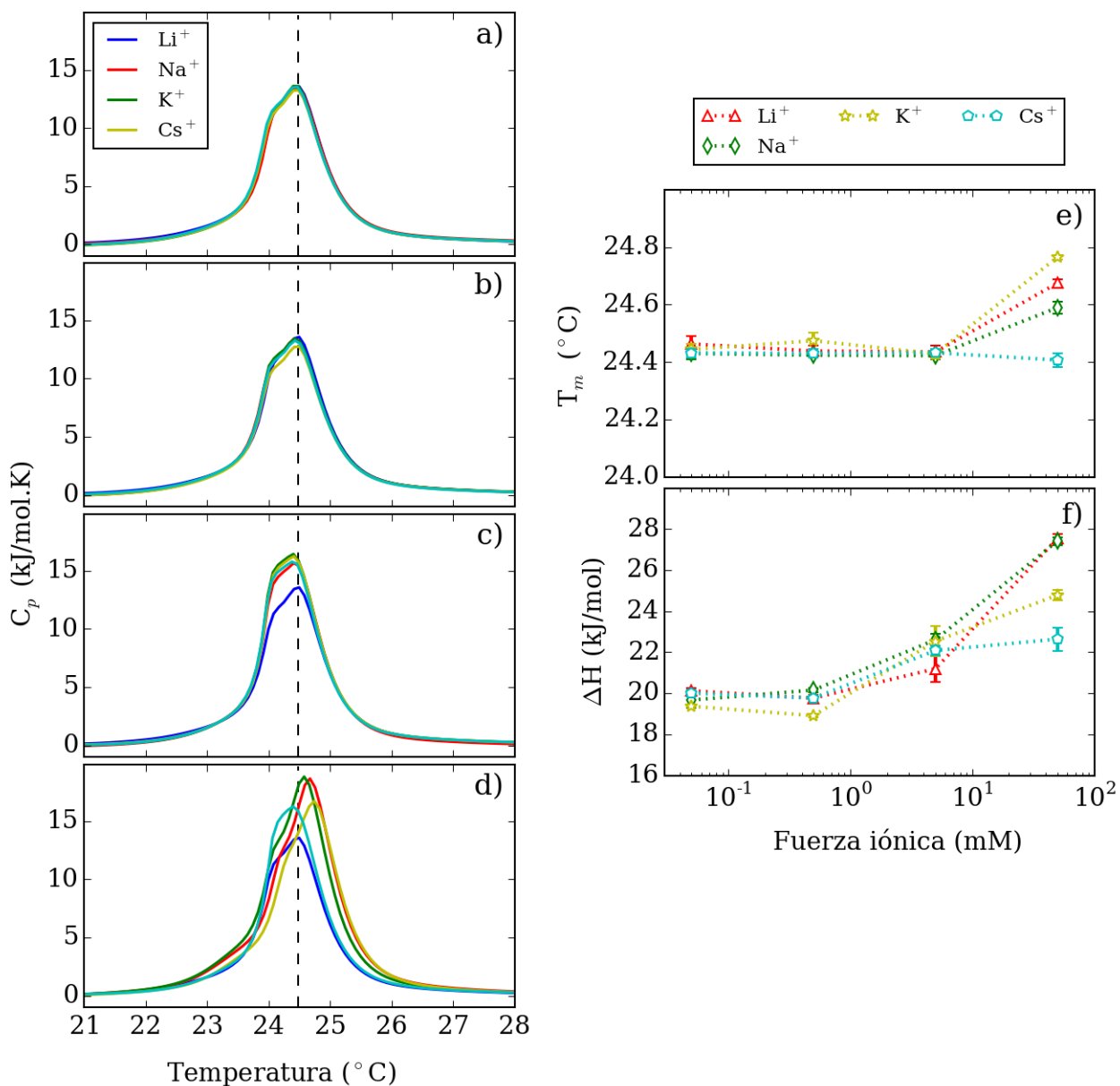


Figure 9.8: Perfiles calorimétricos de liposomas de DMPC bajo la influencia de Li⁺, Na⁺, K⁺ y Cs⁺. Se evaluaron cuatro concentraciones salinas: 0.05 mM (a), 0.5 mM (b), 5.0 mM (c) y 50.0 mM (d). La temperatura de transición de fase y la entalpía calorimétrica se muestran en (e) y (f). Los resultados son el promedio de dos muestras diferentes con 5 barridos cada una.

un trabajo sistemático para entender cómo gotas de liposomas y sales alcalinas producen patrones peculiares después de un proceso de evaporación. Se realizó un análisis de la complejidad de dichos patrones a partir de imágenes de microscopio óptico tomadas a los

patrones obtenidos sobre vidrio y PDMS. Del análisis fractal se concluyó que dichos patrones son multifractales, en donde el carácter multifractal depende del catión. Considerando que la dinámica del proceso de evaporación involucra aspectos relacionados con la naturaleza química de los componentes (lípidos y cationes), se realizó una caracterización de las propiedades reológicas del fluido liposomal. Además, se profundizó en el mecanismo molecular involucrado, llevando a cabo experimento de calorimetría y mediciones de potencial zeta. De lo cual se concluye que la interacción entre lípidos y cationes se lleva a cabo con los dominios ubicados en la cabeza de los fosfolípidos, que la afinidad de la membrana lipídica por los cationes alcalinos sigue la serie de Hofmeister, y el ensamble de los patrones observados se debe, precisamente, a las interacciones electrostáticas entre membrana lipídica y cationes, en donde a mayor afinidad de la membrana por el catión, existe una menor cantidad de cloruros alcalinos disponibles para cristalizar. Este fenómeno es un evento intrínsecamente relacionado con las interacciones no específicas de biomoléculas en un medio salino que, en un futuro, podría ser aplicado en un contexto biológico, por ejemplo, para caracterizar células en un estado patológico.

Detalles experimentales

Preparación de liposomas y muestras. LiCl, NaCl, KCl y CsCl ($\geq 99.0\%$) fueron comprados a Sigma-Aldrich; y 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfolina (DMPC) fue obtenido de Avanti Polar Lipids. Agua deionizada MilliQ ($18.2 M\Omega$ or 0.1 mS/cm) fue destilada en rotavapor para disminuir su resistividad a $<0.009 \text{ mS/cm}$ y fue usada inmediatamente para preparar las soluciones de sales y los liposomas. MLV y LUV fueron preparados mediante el protocolo estándar previamente descrito. Para los LUV se usó una membrana de policarbonato de 200 nm de tamaño de poro. Las muestras con sales fueron preparadas añadiendo solución alcalina a los LUV. Para todos los experimento se usó 1.0 mM de DMPC y 0.05, 0.5, 5.0 y 50.0 mM de sales de LiCl, NaCl, KCl y CsCl.

Evaporación de gotas. Gotas de ($0.5 \mu\text{l}$) fueron depositadas en dos diferentes superficies: vidrio (hidrófilo) y PDMS (hidrófobo). Las gotas fueron evaporadas a condiciones controladas de temperatura ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) y humedad (33%). La evaporación se llevó a cabo en un Degassing Station (TA Instruments). Después del proceso de secado, los reminiscentes finales fueron sometidos a vacío por 2 hrs en el mismo equipo. Posteriormente los patrones formados fueron mantenidos a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 hrs. Finalmente, se tomaron imágenes (a 4x y 40x) de los patrones de las gotas evaporadas usando una cámara digital acoplada a un microscopio óptico a través de la interfaz $\mu\text{Manager}$ software. Las imágenes fueron guardadas para su posterior análisis.

Análisis de imágenes. Se realizó un análisis topográfico de los patrones usando la distribución radial de densidad $I(r)$ y un análisis de la fractalidad (FracLac) implementados en Fiji. La $I(r)$ puede describir sistemas con una simetría polar y el análisis fractal puede revelar los detalles morfológicos de los patrones generados por la evaporación de gotas. En un análisis fractal el *exponente de masa* $\tau(Q)$ relaciona la intensidad de pixeles por cuadros en una imagen y es usada para calcular la *dimensión fractal generalizada* $D(Q)$, en donde Q es un exponente arbitrario usado para amplificar el promedio de los pixeles que representan la distribución másica [152, 153]. La dimensión fractal generalizada está dada por

$$\tau(Q) = (Q - 1)D(Q), \quad (9.1)$$

donde

$$D(Q) = \frac{1}{Q - 1} \lim_{\epsilon \rightarrow 0} \frac{\log_{10}[Z(Q)(\epsilon)]}{\log_{10}(\epsilon)}. \quad (9.2)$$

$D(Q)$ es una medida que describe cómo la masa cambia con respecto a la resolución (ϵ o tamaño de caja) en una imagen. Z representa el número de cajas necesarias para cubrir una región dada dependiendo del valor de Q . Usando $D(Q)$ se pueden obtener tres medidas de la fractalidad de una imagen: la dimensión fractal de capacidad $D(0)$ (conteo de cajas), la dimensión de información $D(1)$ (entropía de Shannon) y la dimensión de correlación $D(2)$.

Potencial zeta (ζ). Los valores de ζ fueron obtenidos midiendo la movilidad electroforética (μ) y usando el modelo de Smoluchovski ($\mu = \epsilon\zeta/\eta$, donde ϵ y η son la constante dieléctrica

y la viscosidad del medio, respectivamente) en un Zetasizer Nano ZSP. Todas las muestras fueron degasificadas for 30 min a 25 °C. Cada muestra fue equilibrada a 24.4 °C por 120 s. Se realizaron 30 mediciones 24.4 °C en modo automático. Cada experimento fue repetido dos veces.

Microreología. El análisis reológico fue realizado en un Zetasizer Nano ZSP (Malvern Instruments) usando dispersión dinámica de luz. Para asegurar que las mediciones son realizadas en el mismo régimen de dispersión el equipo cuenta con un arreglo de movimiento de lentes y un ángulo de dispersión de 173°. El desplazamiento cuadrático medio (MSD, $\langle \Delta r^2(\tau) \rangle$) de partículas trazas de poliestireno (900 nm de diámetro) disueltas en la suspensión liposomal, fue obtenido a partir de la función de autocorrelación, $g^1(\tau)$:

$$g^1(\tau) = g^1(0) \exp\left(-\frac{1}{6} q^2 \langle \Delta r^2(\tau) \rangle\right), \quad (9.3)$$

en donde $g^1(0)$ is el valor de correlación en el tiempo cero, q es la magnitud del vector de dispersión y está dado por $q = 4\pi n \sin(\frac{\theta}{2})/\lambda$; n , λ y θ son el índice de refracción del solvente, la longitud de onda y el ángulo de dispersión, respectivamente.

A partir del MSD se puede extraer la información reológica: G' , módulo elástico, G'' módulo viscoso y η^* , viscosidad compleja [154, 155].

Todas las muestras fueron degasificadas a baja presión (635 mmHg) por 30 min a 25°C en un Degassing Station (TA Instruments). Cada muestra fue medida a 24.4°C por 15 veces con dos repeticiones usando preparaciones independientes.

Microcalorimetría. Todas las muestras fueron preparadas siguiendo el protocolo estándar, degasificadas y equilibradas por 10 min. Cada muestra fue escaneada 5 veces en modo calentamiento. Las mediciones fueron repetidas dos veces usando muestras preparadas independientemente.

10

Conclusiones generales

En este trabajo se ha explorado el comportamiento fisicoquímico de sistemas complejos que tienen relevancia en el área de la biología. Esto incluye a sistemas que intentan mimetizar algunas de las propiedades que posee la membrana plasmática en una célula. Basados en las interacciones electrostáticas de tipo no específicas realizamos una serie de experimentos en modelos de membranas lipídicas, para explorar cómo estas interacciones cambian las propiedades mecánicas y termodinámicas de dichas membranas cuando éstas interactúan con iones, anestésicos, neurotransmisores y proteínas. Haciendo uso de técnicas como la calorimetría diferencial de barrido, la dispersión dinámica de luz, microscopía óptica, espectroscopía uv-visible, análisis de imágenes y del análisis químico, se logró interpretar fisicoquímicamente que los cambios en las propiedades de las membranas lipídicas en su interacción con iones, anestésicos, neurotransmisores y proteínas están intrínsecamente relacionados con mecanismos de atracción y repulsión electrostáticas en combinación con la transferencia de protones y con la transposición de cargas en moléculas polarmente inducidas. Además, dichas interacciones también gobiernan la morfología de patrones de gotas después de un proceso de evaporación. De los resultados obtenidos en este trabajo, se tienen las siguientes conclusiones generales:

- La difusión de anestésicos locales a través de multicapas lipídicas es regulada por la tasa de protonación en el sistema, influyendo directamente en las reacciones de equilibrio de los anestésicos locales.

- El calcio y los protones modifican las interacciones de membranas ensambladas a partir de lípidos aniónicos en interacción con neurotransmisores y anestésicos.
- La presencia de proteínas en membranas lipídicas modifican las propiedades calorimétricas de dichas membranas y promueven su interacción con neurotransmisores.
- Las propiedades calorimétricas de liposomas determinan la morfología de los reminiscentes de gotas de suspensión liposomal evaporadas.
- Las interacciones iónicas entre liposomas y cationes alcalinos determinan la morfología de patrones fractales de gotas liposomales evaporadas en presencia de dichos cationes.

Las conclusiones anteriores tienen implicaciones directas en la concepción de algunos procesos y mecanismos biológicos que se encuentran sustentados bajo el enfoque de interacciones específicas ligando-receptor. Considerando que la membrana plasmática de la célula comparte características similares al de los modelos aquí implementados, sugerimos que también ocurren cambios en sus propiedades mecánicas y termodinámicas, como resultado de la dinámica de sus componentes. Estos cambios podrían influir en diversos procesos relacionados con la comunicación celular, por ejemplo, en el fenómeno de la anestesia, la neurotransmisión y el reconocimiento de moléculas a nivel de la membrana. Además, el conocimiento de cómo estos modelos responden ante diferentes condiciones nos permitirá proponer el diseño de nuevos protocolos de caracterización de estos sistemas basados en los cambios de sus propiedades fisicoquímicas dadas las interacciones intermoleculares de las moléculas, iones y átomos que la conforman.

Anexos

Publicaciones generadas durante el desarrollo de esta tesis

- Pérez-Isidoro R. and Ruiz-Suárez J. C. “Nonspecific lipid-protein interactions enhance the action of anesthetics and neurotransmitter in biomembrane models”. To be submitted.
- Pérez-Isidoro R., Reyes-Figueroa A. D., and Ruiz-Suárez J. C. “Ionic interactions determine the morphology of dried alkali/liposome suspension droplets.” *Submitted to Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (in peer review). Presented at 7th International Colloids Conference, June 18-21, 2017. Spain.
- González-Gutiérrez J., Pérez-Isidoro R., and Ruiz-Suárez J. C. (2017). “A technique based on droplet evaporation to recognize alcoholic drinks.” *Review of Scientific Instruments*, 88.7: 074101.
- González-Gutiérrez J., Pérez-Isidoro R., Pérez-Camacho M. I., and Ruiz-Suárez J. C. (2017). “The calorimetric properties of liposomes determine the morphology of dried droplets.” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 155, 215-222.
- Pérez-Isidoro R., and Ruiz-Suárez J. C. (2016). “Calcium and protons affect the interaction of neurotransmitters and anesthetics with anionic lipid membranes.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1858(9), 2215-2222.
- Pérez-Isidoro R., Sierra-Valdez F. J., and Ruiz-Suárez J. C. (2014). “Anesthetic diffusion through lipid membranes depends on the protonation rate.” *Scientific reports*, 4, 7534.

Perspectivas

Los resultados de esta tesis han revelado que el uso de modelos de membranas lipídicas son una herramienta valiosa porque se pueden caracterizar sus propiedades termodinámicas. Dichos modelos comparten algunos de los principios básicos y propiedades fisicoquímicas de la membrana plasmática de una célula. Con el estudio de estos modelos se puede avanzar en el conocimiento de las funciones de la membrana plasmática. Y con ello se puede tener una mayor interpretación del funcionamiento de los organismos vivos, y además se podría esbozar los cambios en las propiedades fisicoquímicas de la célula ante diferentes cuadros patológicos. Como primer punto, basados en los resultados relacionados con la difusión de anestésicos a través de las membranas lipídicas, podrían desarrollarse soluciones anestésicas más eficaces en su uso clínico; además, considerando dicho mecanismo de difusión se podrían desarrollar nuevos fármacos más efectivos; así como avanzar en el desarrollo de acarreadores de fármacos. En segundo lugar, considerando que las membranas aniónicas responden a los neurotransmisores, y este hecho puede ser modificado por la influencia de calcio y protones en el medio, nuestros resultados pueden contribuir en la comprensión del funcionamiento del balance excitatorio-inhibitorio del sistema nervioso más allá de un enfoque bioquímico, lo cual puede dar pista para el planteamiento de nuevos enfoques experimentales para entender y contrarrestar enfermedades neurodegenerativas. Finalmente, basados en la sensibilidad analítica que se puede obtener en un proceso de evaporación de gotas, que contienen componentes de interés biológico, podrían desarrollarse nuevas técnicas analíticas con el objetivo de detectar estadios tempranos de algunas enfermedades como cáncer, en donde las células cambian las propiedades electrostáticas de su membrana.

Bibliografía

- [1] Marco Bresadola. Medicine and science in the life of luigi galvani (1737–1798). *Brain Research Bulletin*, 46(5):367–380, 1998.
- [2] Erwin Schrodinger. *What is Life?: The Physical Aspects of Living Cell with Mind and Matter and Autobiographical Sketches*. Cambridge University Press Cambridge, 1967.
- [3] Alan L Hodgkin and Andrew F Huxley. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.*, 117(4):500, 1952.
- [4] S. J. Singer and Garth L. Nicolson. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175(4023):720–731, 1972.
- [5] Thomas Heimburg. Membrane structure and the composition of biological membranes. In *Thermal biophysics of membranes*, pages 15–98. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2008.
- [6] Harvey Lodish. *Molecular cell biology*. Macmillan, 2008.
- [7] H. H. Meyer. Zur theorie der alkoholnarkose. erste mittheilung. welche eigenschaft der anästhetica bedingt ihre narkotische wirkung? *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, 425:109–118, 1899.
- [8] C. E. Overton. *Studien über die Narkose*. Verlag Gustav Fischer, Jena, Germany, english translation: studies of narcosis, chapman and hall, 1991, r. lipnick, ed. edition, 1901.

- [9] Thomas Heimburg and Andrew D Jackson. The thermodynamics of general anesthesia. *Biophysical journal*, 92(9):3159–3165, 2007.
- [10] Kaare Græsbøll, Henrike Sasse-Middelhoff, and Thomas Heimburg. The thermodynamics of general and local anesthesia. *Biophysical journal*, 106(10):2143–2156, 2014.
- [11] Cameron J Weir. The molecular mechanisms of general anaesthesia: dissecting the gabaa receptor. *Contin. Educ. Anaesth. Crit. Care Pain*, 6(2):49–53, 2006.
- [12] Paul S Garcia, Scott E Kolesky, and Andrew Jenkins. General anesthetic actions on gabaa receptors. *Current neuropharmacology*, 8(1):2, 2010.
- [13] Robert S Cantor. The lateral pressure profile in membranes: a physical mechanism of general anesthesia. *Biochemistry*, 36(9):2339–2344, 1997.
- [14] Robert S Cantor. Receptor desensitization by neurotransmitters in membranes: are neurotransmitters the endogenous anesthetics? *Biochemistry*, 42(41):11891–11897, 2003.
- [15] Chunhua Wang, Fengbin Ye, Gustavo F Velardez, Gunther H Peters, and Peter Westh. Affinity of four polar neurotransmitters for lipid bilayer membranes. *J. Phys. Chem. B*, 115(1):196–203, 2010.
- [16] Gunther H Peters, Chunhua Wang, Nicolaj Cruys-Bagger, Gustavo F Velardez, Jesper J Madsen, and Peter Westh. Binding of serotonin to lipid membranes. *J. Am. Chem. Soc.*, 135(6):2164–2171, 2013.
- [17] Katarzyna Jodko-Piorecka and Grzegorz Litwinienko. First experimental evidence of dopamine interactions with negatively charged model biomembranes. *ACS Chem. Neurosci.*, 4:1114–1122, 2013.
- [18] F. J. Sierra-Valdez, A. J. Cisneros-Mejorado, D. P. Sánchez Herrera, and J. C. Ruiz-Suárez. A thermal study of cellular motility by optical time-resolved correlation. *Rev. Sci. Instrum.*, 83:044302–4, 2012.

- [19] FJ Sierra-Valdez and JC Ruiz-Suárez. Noble gases in pure lipid membranes. *The Journal of Physical Chemistry B*, 117(11):3167–3172, 2013.
- [20] Francisco J Sierra-Valdez, Linda S Forero-Quintero, Patricio A Zapata-Morin, Miguel Costas, Arturo Chavez-Reyes, and Jesús C Ruiz-Suárez. The influence of non polar and polar molecules in mouse motile cells membranes and pure lipid bilayers. *PloS one*, 8(4):e59364, 2013.
- [21] Ruthven NAH Lewis, David A Mannock, and Ronald N McElhaney. Differential scanning calorimetry in the study of lipid phase transitions in model and biological membranes. In *Dopico, A. M., (Ed.) Methods in Membrane Lipids*, pages 171–195. Humana Press, 2007.
- [22] Peter L Privalov. Calorimetry. In *Microcalorimetry of Macromolecules: The Physical Basis of Biological Structures*, volume 16, pages 33–68. John Wiley & Soons, 2012.
- [23] Kam-Yee Y Pang, Leon M Braswell, Larry Chang, Toby J Sommer, and Keith W Miller. The perturbation of lipid bilayers by general anesthetics: a quantitative test of the disordered lipid hypothesis. *Molecular pharmacology*, 18(1):84–90, 1980.
- [24] Ross C Terrell, Louise Speers, Alex J Szur, John Treadwell, and Thomas R Ucciardi. General anesthetics. 1. halogenated methyl ethyl ethers as anesthetic agents. *Journal of medicinal chemistry*, 14(6):517–519, 1971.
- [25] Ross C Terrell, Louise Speers, Alex J Szur, Thomas Ucciardi, and James F Vitcha. General anesthetics. 3. fluorinated methyl ethyl ethers as anesthetic agents. *Journal of medicinal chemistry*, 15(6):604–606, 1972.
- [26] DA Haydon and BM Hendry. Nerve impulse blockage in squid axons by n-alkanes: the effect of axon diameter. *The Journal of physiology*, 333:393, 1982.
- [27] Shahram Taheri, Michael J Laster, Jin Liu, Edmond I Eger, Michael J Halsey, Donald D Koblin, et al. Anesthesia by n-alkanes not consistent with the meyer-overton hypothesis:

- determinations of the solubilities of alkanes in saline and various lipids. *Anesthesia & Analgesia*, 77(1):7–11, 1993.
- [28] Tim G Hales and Richard W Olsen. Basic pharmacology of intravenous induction agents. *The Pharmacological Basis of Anesthesiology: Basic Science and Practical Applications*, pages 295–306, 1994.
- [29] S John Mihic, Qing Ye, Marilee J Wick, Vladimir V Koltchine, Matthew D Krasowski, Suzanne E Finn, Maria Paola Mascia, C Fernando Valenzuela, Kirsten K Hanson, Eric P Greenblatt, et al. Sites of alcohol and volatile anaesthetic action on gabaa and glycine receptors. *Nature*, 389(6649):385–389, 1997.
- [30] Tomohiro Yamakura and R Adron Harris. Effects of gaseous anesthetics nitrous oxide and xenon on ligand-gated ion channelscomparison with isoflurane and ethanol. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, 93(4):1095–1101, 2000.
- [31] Daniel E Becker and Kenneth L Reed. Essentials of local anesthetic pharmacology. *Anesthesia progress*, 53(3):98–109, 2006.
- [32] MD Krasowski and NL Harrison. General anaesthetic actions on ligand-gated ion channels. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 55(10):1278–1303, 1999.
- [33] A Scholz. Mechanisms of (local) anaesthetics on voltage-gated sodium and other ion channels. *British journal of anaesthesia*, 89(1):52–61, 2002.
- [34] BW Urban. The site of anesthetic action. In *Modern Anesthetics*, pages 3–29. Springer, 2008.
- [35] Laurence L Brunton, Bruce Chabner, and Björn C Knollmann. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*, volume 12. McGraw-Hill Medical New York, 2011.
- [36] D Papahadjopoulos, K Jacobson, George Poste, and G Shepherd. Effects of local anesthetics on membrane properties i. changes in the fluidity of phospholipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 394(4):504–519, 1975.

- [37] Issaku Ueda, Chikara Tashiro, and Kasumi Arakawa. Depression of phase-transition temperature in a model cell membrane by local anesthetics. *Anesthesiology*, 46(5):327–332, 1977.
- [38] Gary R Strichartz, Virgil Sanchez, G Richard Arthur, Ross Chafetz, and Dean Martiny. Fundamental properties of local anesthetics. ii. measured octanol: buffer partition coefficients and pka values of clinically used drugs. *Anesthesia & Analgesia*, 71(2):158–170, 1990.
- [39] Daniel M Chernoff and GR Strichartz. Kinetics of local anesthetic inhibition of neuronal sodium currents. ph and hydrophobicity dependence. *Biophysical journal*, 58(1):69, 1990.
- [40] Federico Momo, Sabrina Fabris, Alberto Bindoli, Guido Scutari, and Roberto Stevanato. Different effects of propofol and nitrosopropofol on dmpe multilamellar liposomes. *Biophysical chemistry*, 95(2):145–155, 2002.
- [41] A Raudino and F Castelli. Modeling specific heat transient anomalies during permeation of liposomes by water-soluble substances. *Journal of colloid and interface science*, 200(1):52–58, 1998.
- [42] Francesco Castelli, Antonio Raudino, and Massimo Fresta. A mechanistic study of the permeation kinetics through biomembrane models: Gemcitabine–phospholipid bilayer interaction. *Journal of colloid and interface science*, 285(1):110–117, 2005.
- [43] Robert John Davies. Buffering the pain of local anaesthetics: a systematic review. *Emergency Medicine*, 15(1):81–88, 2003.
- [44] Hitoshi Matsuki, Kensaku Shimada, Shoji Kaneshina, Hiroshi Kamaya, and Issaku Ueda. Difference in surface activities between uncharged and charged local anesthetics: correlation with their anesthetic potencies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 11(6):287–295, 1998.

- [45] NP Franks, WR Lieb, et al. Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. *Nature*, 367(6464):607–614, 1994.
- [46] Thomas 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*, 1415(1):147–162, 1998.
- [47] S Halstenberg, T Heimburg, T Hianik, U Kaatz, and R Krivanek. Cholesterol-induced variations in the volume and enthalpy fluctuations of lipid bilayers. *Biophysical journal*, 75(1):264–271, 1998.
- [48] NJ Zuidam and DJA Crommelin. Differential scanning calorimetric analysis of dipalmitoylphosphatidylcholine-liposomes upon hydrolysis. *International journal of pharmaceutics*, 126(1-2):209–217, 1995.
- [49] Laren M Tolbert and Kyril M Solntsev. Excited-state proton transfer: from constrained systems to super photoacids to superfast proton transfer. *Accounts of chemical research*, 35(1):19–27, 2002.
- [50] Mikhail S Baranov, Konstantin A Lukyanov, Alexandra O Borissova, Jordan Shamir, Dmytro Kosenkov, Lyudmila V Slipchenko, Laren M Tolbert, Ilia V Yampolsky, and Kyril M Solntsev. Conformationally locked chromophores as models of excited-state proton transfer in fluorescent proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 134(13):6025–6032, 2012.
- [51] Alice Corani, Alessandro Pezzella, Torbjörn Pascher, Thomas Gustavsson, Dimitra Markovitsi, Annemarie Huijser, Marco d’Íschia, and Villy Sundström. Excited-state proton-transfer processes of dhica resolved: From sub-picoseconds to nanoseconds. *The journal of physical chemistry letters*, 4(9):1383–1388, 2013.
- [52] Michele Cerminara, Luis A Campos, Ravishankar Ramanathan, and Victor Muñoz. Slow proton transfer coupled to unfolding explains the puzzling results of single-molecule experiments on bbl, a paradigmatic downhill folding protein. *PloS one*, 8(10):e78044, 2013.

- [53] John E Tetzlaff. The pharmacology of local anesthetics. *Anesthesiology clinics of North America*, 18(2):217–233, 2000.
- [54] II E I Eger, J Liu, DD Koblin, MJ Laster, S Taheri, MJ Halsey, P Ionescu, BS Chortkoff, and T Hudlicky. Molecular properties of the “ideal” inhaled anesthetic: studies of fluorinated methanes, ethanes, propanes, and butanes. *Anesthesia & Analgesia*, 79(2):245–251, 1994.
- [55] BP Schoenborn and RM Featherstone. Advances in pharmacology. *Academic Press*, pages 1–16, 1967.
- [56] Carl-Johan Högberg and Alexander P Lyubartsev. Effect of local anesthetic lidocaine on electrostatic properties of a lipid bilayer. *Biophysical journal*, 94(2):525–531, 2008.
- [57] RC Bernardi, DEB Gomes, R Gobato, CA Taft, AT Ota, and PG Pascutti. Molecular dynamics study of biomembrane/local anesthetics interactions. *Molecular Physics*, 107(14):1437–1443, 2009.
- [58] Carl-Johan Högberg, Arnold Maliniak, and Alexander P Lyubartsev. Dynamical and structural properties of charged and uncharged lidocaine in a lipid bilayer. *Biophysical chemistry*, 125(2):416–424, 2007.
- [59] Matteo Rini, Ben-Zion Magnes, Ehud Pines, and Erik TJ Nibbering. Real-time observation of bimodal proton transfer in acid-base pairs in water. *Science*, 301(5631):349–352, 2003.
- [60] Thomas Loerting and Klaus R Liedl. Toward elimination of discrepancies between theory and experiment: Double proton transfer in dimers of carboxylic acids. *Journal of the American Chemical Society*, 120(48):12595–12600, 1998.
- [61] James M Sonner and Robert S Cantor. Molecular mechanisms of drug action: An emerging view. *Annu. Rev. Biophys.*, 42:143–167, 2013.
- [62] Alberto E Pereda. Electrical synapses and their functional interactions with chemical synapses. *Nat. Rev. Neurosci.*, 15:250–263, 2014.

- [63] Adam Orłowski, Michał Grzybek, Alex Bunker, Marta Pasenkiewicz-Gierula, Ilpo Vattulainen, Pekka T Männistö, and Tomasz Róg. Strong preferences of dopamine and l-dopa towards lipid head group: importance of lipid composition and implication for neurotransmitter metabolism. *Journal of neurochemistry*, 122(4):681–690, 2012.
- [64] A.C. Guyton and J.E. Hall. Organization of the nervous system, basic functions of synapses, and neurotransmitters. In *Textbook of Medical Physiology*, pages 543–558. Elsevier Saunders, 12 edition, 2011.
- [65] Rosendo Pérez-Isidoro, FJ Sierra-Valdez, and JC Ruiz-Suárez. Anesthetic diffusion through lipid membranes depends on the protonation rate. *Scientific reports*, 4:7534, 2014.
- [66] R Llinas, M Sugimori, and RB Silver. Microdomains of high calcium concentration in a presynaptic terminal. *Science*, 256(5057):677, 1992.
- [67] JGG Borst and B Sakmann. Calcium influx and transmitter release in a fast cns synapse. *Nature*, 383(6599):431–434, 1996.
- [68] Erwin Neher. Vesicle pools and ca²⁺ microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. *Neuron*, 20(3):389–399, 1998.
- [69] Richard C Lin and Richard H Scheller. Mechanisms of synaptic vesicle exocytosis. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 16(1):19–49, 2000.
- [70] Josep Rizo and Christian Rosenmund. Synaptic vesicle fusion. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 15(7):665–674, 2008.
- [71] Edwin R Chapman. How does synaptotagmin trigger neurotransmitter release? *Annu. Rev. Biochem.*, 77:615–641, 2008.
- [72] Jianyang Du, Leah R Reznikov, Margaret P Price, Xiang-ming Zha, Yuan Lu, Thomas O Moninger, John A Wemmie, and Michael J Welsh. Protons are a neurotransmitter that regulates synaptic plasticity in the lateral amygdala. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(24):8961–8966, 2014.

- [73] Bo Katz and Ri Miledi. Further study of the role of calcium in synaptic transmission. *J. Physiol.*, 207(3):789–801, 1970.
- [74] Ronald P Rubin. Historical and biological aspects of calcium action. In *Rubin, R. P., Weiss, G. B. and Putney, J. W., (Eds.) Calcium in Biological Systems*, pages 5–11. Plenum Press, New York, 1985.
- [75] Rami Rahamimoff. Calcium and transmitter release. In *Rahaminoff, R. and Katz, B., (Eds.) Calcium, Neuronal Function, and Transmitter Release*, pages 112–239. Martinus Nijhoff Publishing, Boston, MA, 1986.
- [76] Sumiko Mochida. Presynaptic terminal proteins orchestrate stepwise synaptic vesicle phases. In *Mochida, S., (Ed.) Presynaptic Terminals*, pages 3–44. Springer, Japan, 2015.
- [77] Michael Weinrich and David L Worcester. Xenon and other volatile anesthetics change domain structure in model lipid raft membranes. *J. Phys. Chem. B*, 117(50):16141–16147, 2013.
- [78] George A Mashour, Stuart A Forman, and Jason A Campagna. Mechanisms of general anesthesia: from molecules to mind. *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.*, 19(3):349–364, 2005.
- [79] Søren SL Andersen, Andrew D Jackson, and Thomas Heimburg. Towards a thermodynamic theory of nerve pulse propagation. *Prog. Neurobiol.*, 88(2):104–113, 2009.
- [80] Revathi Appali, Ursula van Rienen, and Thomas Heimburg. A comparison of the hodgkin-huxley model and the soliton theory for the action potential in nerves. *Adv. Planar Lipid Bilayers Liposomas*, 16:271–279, 2012.
- [81] Hansjörg Jerabek, Georg Pabst, Michael Rappolt, and Thomas Stockner. Membrane-mediated effect on ion channels induced by the anesthetic drug ketamine. *Journal of the American Chemical Society*, 132(23):7990–7997, 2010.

- [82] Stuart McLaughlin. The electrostatic properties of membranes. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, 18(1):113–136, 1989.
- [83] AJ Verkleij and JA Post. Membrane phospholipid asymmetry and signal transduction. *J. Membr. Biol.*, 178(1):1–10, 2000.
- [84] Won Do Heo, Takanari Inoue, Wei Sun Park, Man Lyang Kim, Byung Ouk Park, Thomas J Wandless, and Tobias Meyer. Pi (3, 4, 5) p3 and pi (4, 5) p2 lipids target proteins with polybasic clusters to the plasma membrane. *Science*, 314(5804):1458–1461, 2006.
- [85] Peter J Quinn. Plasma membrane phospholipid asymmetry. In *Phospholipid Metabolism in Apoptosis*, pages 39–60. Springer, 2004.
- [86] Stuart McLaughlin, Jiyao Wang, Alok Gambhir, and Diana Murray. Pip2 and proteins: interactions, organization, and information flow. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 31(1):151–175, 2002.
- [87] Stuart McLaughlin and Diana Murray. Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics. *Nature*, 438(7068):605–611, 2005.
- [88] Tony Yeung, Gary E Gilbert, Jialan Shi, John Silvius, Andras Kapus, and Sergio Grinstein. Membrane phosphatidylserine regulates surface charge and protein localization. *Science*, 319(5860):210, 2008.
- [89] Marco AO Magalhaes and Michael Glogauer. Pivotal advance: phospholipids determine net membrane surface charge resulting in differential localization of active rac1 and rac2. *J. Leukoc. Biol.*, 87(4):545–555, 2010.
- [90] Joost CM Holthuis and Anant K Menon. Lipid landscapes and pipelines in membrane homeostasis. *Nature*, 510(7503):48–57, 2014.
- [91] Denis English. Phosphatidic acid: a lipid messenger involved in intracellular and extracellular signalling. *Cellular signalling*, 8(5):341–347, 1996.

- [92] P Méléard, C Gerbeaud, P Bardusco, N Jeandaine, MD Mitov, and L Fernandez-Puente. Mechanical properties of model membranes studied from shape transformations of giant vesicles. *Biochimie*, 80(5):401–413, 1998.
- [93] Diana Murray, Anna Arbuzova, Gyöngyi Hangyás-Mihályné, Alok Gambhir, Nir Ben-Tal, Barry Honig, and Stuart McLaughlin. Electrostatic properties of membranes containing acidic lipids and adsorbed basic peptides: theory and experiment. *Biophys. J.*, 77(6):3176–3188, 1999.
- [94] E Drolle, N Kučerka, MI Hoopes, Y Choi, John Katsaras, M Karttunen, and Z Leonenko. Effect of melatonin and cholesterol on the structure of dopc and dppc membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1828(9):2247–2254, 2013.
- [95] Youngjik Choi, Simon J Attwood, Matthew I Hoopes, Elizabeth Drolle, Mikko Karttunen, and Zoya Leonenko. Melatonin directly interacts with cholesterol and alleviates cholesterol effects in dipalmitoylphosphatidylcholine monolayers. *Soft matter*, 10(1):206–213, 2014.
- [96] Pekka A Postila, Ilpo Vattulainen, and Tomasz Róg. Selective effect of cell membrane on synaptic neurotransmission. *Scientific Reports*, 6:19345, 2016.
- [97] D Papahadjopoulos, WJ Vail, C Newton, S Nir, K Jacobson, G Poste, and R Lazo. Studies on membrane fusion. iii. the role of calcium-induced phase changes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 465(3):579–598, 1977.
- [98] Hans Binder and Olaf Zschörnig. The effect of metal cations on the phase behavior and hydration characteristics of phospholipid membranes. *Chemistry and physics of lipids*, 115(1):39–61, 2002.
- [99] Amit Hollander and Dganit Danino. Cochleate characterization by cryogenic electron microscopy methods: Cryo-tem and cryo-sem. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 483:187–192, 2015.

- [100] Rainer A Böckmann, Agnieszka Hac, Thomas Heimbürg, and Helmut Grubmüller. Effect of sodium chloride on a lipid bilayer. *Biophysical Journal*, 85(3):1647–1655, 2003.
- [101] Annalisa Scimemi and Marco Beato. Determining the neurotransmitter concentration profile at active synapses. *Molecular neurobiology*, 40(3):289–306, 2009.
- [102] Madurai G Ganesan, David L Schwinke, and Norman Weiner. Effect of Ca^{2+} on thermotropic properties of saturated phosphatidylcholine liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 686(2):245–248, 1982.
- [103] Yu-Hsiu Wang, Agnieszka Collins, Lin Guo, Kathryn B Smith-Dupont, Feng Gai, Tatyana Svitkina, and Paul A Janmey. Divalent cation-induced cluster formation by polyphosphoinositides in model membranes. *J. Am. Chem. Soc.*, 134(7):3387–3395, 2012.
- [104] Wenjie Wang, Nathaniel A Anderson, Alex Travesset, and David Vaknin. Regulation of the electric charge in phosphatidic acid domains. *The Journal of Physical Chemistry B*, 116(24):7213–7220, 2012.
- [105] E Anibal Disalvo and Laura S Bakas. Influence of the surface charge distribution and water layers on the permeability properties of lipid bilayers. In *Blank, M. (Ed.) Electrical Double Layers in Biology*, pages 63–76. Plenum Press, New York, 1986.
- [106] DB Mountcastle, RL Biltonen, and MJ Halsey. Effect of anesthetics and pressure on the thermotropic behavior of multilamellar dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75(10):4906–4910, 1978.
- [107] Dora B Goldstein. The effects of drugs on membrane fluidity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 24(1):43–64, 1984.
- [108] M Böttner and R Winter. Influence of the local anesthetic tetracaine on the phase behavior and the thermodynamic properties of phospholipid bilayers. *Biophys. J.*, 65(5):2041–2046, 1993.

- [109] Anders Højgaard Hansen, Kristian Tølbøl Sørensen, Richard Mathieu, Alois Serer, Lars Duelund, Himanshu Khandelia, Per Lyngs Hansen, and Adam Cohen Simonsen. Propofol modulates the lipid phase transition and localizes near the headgroup of membranes. *Chem. Phys. Lipids*, 175:84–91, 2013.
- [110] Günther H Peters, Mikkel Werge, Maria Northved Elf-Lind, Jesper J Madsen, Gustavo F Velardez, and Peter Westh. Interaction of neurotransmitters with a phospholipid bilayer: A molecular dynamics study. *Chemistry and physics of lipids*, 184:7–17, 2014.
- [111] Paul Burn and Bruno H Dalle Carbonare. Lipid-protein interactions in biological membranes. *Principles of Medical Biology*, 7:39–66, 1997.
- [112] AG Lee. Lipid–protein interactions in biological membranes: a structural perspective. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1612(1):1–40, 2003.
- [113] Adam W Smith. Lipid–protein interactions in biological membranes: a dynamic perspective. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1818(2):172–177, 2012.
- [114] Thomas KM Nyholm. Lipid-protein interplay and lateral organization in biomembranes. *Chemistry and physics of lipids*, 189:48–55, 2015.
- [115] James A Huntington and Penelope E Stein. Structure and properties of ovalbumin. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 756(1):189–198, 2001.
- [116] James W Fairman, Nicholas Noinaj, and Susan K Buchanan. The structural biology of β -barrel membrane proteins: a summary of recent reports. *Current opinion in structural biology*, 21(4):523–531, 2011.
- [117] Thierry Fournier, Najet Medjoubi-N, and Dominique Porquet. Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1482(1):157–171, 2000.

- [118] Andrea Scirè, Maurizio Baldassarre, Roberta Galeazzi, and Fabio Tanfani. Fibrillation properties of human α 1-acid glycoprotein. *Biochimie*, 95(2):158–166, 2013.
- [119] Khellil Sefiane. Patterns from drying drops. *Advances in colloid and interface science*, 206:372–381, 2014.
- [120] Heather Meloy Gorr, Joshua M Zueger, Daniel R McAdams, and John A Barnard. Salt-induced pattern formation in evaporating droplets of lysozyme solutions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 103:59–66, 2013.
- [121] T Heim, S Preuss, B Gerstmayer, A Bosio, and R Blossey. Deposition from a drop: morphologies of unspecifically bound dna. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 17(9):S703, 2005.
- [122] Ralf Blossey and Andreas Bosio. Contact line deposits on cdna microarrays: a "twin-spot effect". *Langmuir*, 18(7):2952–2954, 2002.
- [123] Khellil Sefiane. On the formation of regular patterns from drying droplets and their potential use for bio-medical applications. *Journal of Bionic Engineering*, 7:S82–S93, 2010.
- [124] Hua Hu and Ronald G Larson. Marangoni effect reverses coffee-ring depositions. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110(14):7090–7094, 2006.
- [125] Tim Still, Peter J Yunker, and Arjun G Yodh. Surfactant-induced marangoni eddies alter the coffee-rings of evaporating colloidal drops. *Langmuir*, 28(11):4984–4988, 2012.
- [126] Hyungsoo Kim, François Boulogne, Eujin Um, Ian Jacobi, Ernie Button, and Howard A Stone. Controlled uniform coating from the interplay of marangoni flows and surface-adsorbed macromolecules. *Physical review letters*, 116(12):124501, 2016.
- [127] Peter J Yunker, Tim Still, Matthew A Lohr, and AG Yodh. Suppression of the coffee-ring effect by shape-dependent capillary interactions. *Nature*, 476(7360):308–311, 2011.

- [128] LV Andreeva, AV Koshkin, PV Lebedev-Stepanov, AN Petrov, and MV Alfimov. Driving forces of the solute self-organization in an evaporating liquid microdroplet. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 300(3):300–306, 2007.
- [129] Andre E Nel, Lutz Mädler, Darrell Velegol, Tian Xia, Eric MV Hoek, Ponisseril Somasundaran, Fred Klaessig, Vince Castranova, and Mike Thompson. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nature materials*, 8(7):543, 2009.
- [130] Qiang Zhao, Quanfu An, Jinwen Qian, Xuesan Wang, and Yang Zhou. Insight into fractal self-assembly of poly (diallyldimethylammonium chloride)/sodium carboxymethyl cellulose polyelectrolyte complex nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B*, 115(50):14901–14911, 2011.
- [131] Tayebe Zohrabi and Neda Habibi. Dendritic peptide nanostructures formed from self-assembly of di-l-phenylalanine extracted from alzheimer’s β -amyloid poly peptides: Insights into their assembly process. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 21(4):423–431, 2015.
- [132] Xia Han, Zhiying Xiong, Xuxia Zhang, and Honglai Liu. Multi-tunable self-assembled morphologies of stimuli-responsive diblock polyampholyte films on solid substrates. *Soft matter*, 11(11):2139–2146, 2015.
- [133] Pradyot Koley, Makoto Sakurai, and Masakazu Aono. Tunable morphology from 2d to 3d in the formation of hierarchical architectures from a self-assembling dipeptide: thermal-induced morphological transition to 1d nanostructures. *Journal of Materials Science*, 50(8):3139–3148, 2015.
- [134] Weiping Wang and Ying Chau. Self-assembled peptide nanorods as building blocks of fractal patterns. *Soft Matter*, 5(24):4893–4898, 2009.
- [135] Cheng Hao Lee and Pei Li. pH-induced formation of various hierarchical structures from amphiphilic core-shell nanotubes. *RSC Advances*, 2(4):1303–1306, 2012.

- [136] Nicholas E Kurland, Joydip Kundu, Shilpa Pal, Subhas C Kundu, and Vamsi K Yadavalli. Self-assembly mechanisms of silk protein nanostructures on two-dimensional surfaces. *Soft Matter*, 8(18):4952–4959, 2012.
- [137] Shunhai Li, Junna Li, Sufang Chen, Daohong Zhang, Tingcheng Li, Junheng Zhang, Shenghui Chen, and Aiqing Zhang. Hybrid self-assembly and fractal dimension dependence of a carboxyl-ended hyperbranched polyester/ferric complex. *Materials Chemistry and Physics*, 142(2):513–520, 2013.
- [138] Alex Bunker, Aniket Magarkar, and Tapani Viitala. Rational design of liposomal drug delivery systems, a review: Combined experimental and computational studies of lipid membranes, liposomes and their pegylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Biomembranes*, 1858(10):2334–2352, 2016.
- [139] Khellil Sefiane. Patterns from drying drops. *Advances in colloid and interface science*, 206:372–381, 2014.
- [140] David Brutin, Benjamin Sobac, Boris Loquet, and José Sampaol. Pattern formation in drying drops of blood. *Journal of fluid mechanics*, 667:85–95, 2011.
- [141] Maria Olga Kokornaczyk, Giovanni Dinelli, Ilaria Marotti, Stefano Benedettelli, Daniele Nani, and Lucietta Betti. Self-organized crystallization patterns from evaporating droplets of common wheat grain leakages as a potential tool for quality analysis. *The Scientific World Journal*, 11:1712–1725, 2011.
- [142] T Heim, S Preuss, B Gerstmayer, A Bosio, and R Blossey. Deposition from a drop: morphologies of unspecifically bound dna. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 17(9):S703, 2005.
- [143] Makoto Sakurai, Pradyot Koley, and Masakazu Aono. A new approach to molecular self-assembly through formation of dipeptide-based unique architectures by artificial supersaturation. *Chemical Communications*, 50(83):12556–12559, 2014.

- [144] George M Whitesides and Bartosz Grzybowski. Self-assembly at all scales. *Science*, 295(5564):2418–2421, 2002.
- [145] Hyoungsoo Kim, François Boulogne, Eujin Um, Ian Jacobi, Ernie Button, and Howard A Stone. Controlled uniform coating from the interplay of marangoni flows and surface-adsorbed macromolecules. *Physical review letters*, 116(12):124501, 2016.
- [146] Hua Hu and Ronald G Larson. Marangoni effect reverses coffee-ring depositions. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110(14):7090–7094, 2006.
- [147] Robert D Deegan, Olgica Bakajin, Todd F Dupont, Greb Huber, Sidney R Nagel, and Thomas A Witten. Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops. *Nature*, 389(6653):827–829, 1997.
- [148] Enric Mayans, Gema Ballano, Jordi Casanovas, Luis J del Valle, Maria M Pérez-Madrigal, Francesc Estrany, Ana I Jiménez, Jordi Puiggalí, Carlos Cativiela, and Carlos Alemán. Hierarchical self-assembly of di-, tri-and tetraphenylalanine peptides capped with two fluorenyl functionalities: from polymorphs to dendrites. *Soft matter*, 12(24):5475–5488, 2016.
- [149] Benjamin Klasczyk, Volker Knecht, Reinhard Lipowsky, and Rumiana Dimova. Interactions of alkali metal chlorides with phosphatidylcholine vesicles. *Langmuir*, 26(24):18951–18958, 2010.
- [150] Martin Caffrey and Jacqueline Hogan. Lipidat: A database of lipid phase transition temperatures and enthalpy changes. dmpe data subset analysis. *Chemistry and physics of lipids*, 61(1):1–109, 1992.
- [151] Rumiana Koynova and Martin Caffrey. Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, 1376(1):91–145, 1998.

- [152] HGE Hentschel and Itamar Procaccia. The infinite number of generalized dimensions of fractals and strange attractors. *Physica D: Nonlinear Phenomena*, 8(3):435–444, 1983.
- [153] Roberto Murcio, A Paolo Masucci, Elsa Arcaute, and Michael Batty. Multifractal to monofractal evolution of the london street network. *Physical Review E*, 92(6):062130, 2015.
- [154] Thomas G Mason and DA Weitz. Optical measurements of frequency-dependent linear viscoelastic moduli of complex fluids. *Physical review letters*, 74(7):1250, 1995.
- [155] Thomas G Mason. Estimating the viscoelastic moduli of complex fluids using the generalized stokes–einstein equation. *Rheologica Acta*, 39(4):371–378, 2000.