



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD MONTERREY**

## Elasticidad de Liposomas en Presencia de Tetracaína

tesis que presenta

**Eric Oropeza Guzman**

para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias en Ingeniería y Física Biomédicas**

Director de la tesis:

**Dr. Jesús Carlos Ruiz Suárez**

Apodaca, Nuevo León

Agosto, 2015

## ***Agradecimientos***

Ninguno de los resultados obtenidos durante este trabajo hubiese sido posible sin el importante apoyo de las personas que estuvieron a mi lado durante este año de trabajo. Agradezco en particular a mi asesor por haberme ofrecido una gran cantidad de consejos, discusiones y sobretodo disposición para que la realización de experimentos nunca se viera truncada por falta de material, descomposturas de equipo o escases de ideas. No puedo dejar de lado la inmensurable ayuda que me ofrecieron todos mis compañeros de laboratorio y en general del CINVESTAV, así como del resto del profesorado; en especial al Dr. José Luis Cordero, ya que fue gracias a ellos que obtuve el entrenamiento necesario para realizar las diversas técnicas experimentales y teóricas que forman parte de este proyecto. Finalmente, pero no menos importante, agradezco al CONACYT por el apoyo económico del posgrado.

## Índice

Resumen.....	5
Abstract.....	6
<b>1. Introducción.....</b>	<b>7</b>
1.1 Generalidades .....	7
1.1.1 Las propiedades mecánicas de la membrana biológica.....	7
1.1.2 Interacción fármaco-membrana .....	7
1.2 Los modelos del efecto anestésico y el impulso nervioso .....	8
1.2.1 Especificidad de interacción.....	8
1.2.2 El impulso nervioso y su inhibición .....	9
1.2.3 Termodinámica de membranas y modelo del solitón .....	10
1.2.4 Detalles de la interacción anestésica .....	11
1.2.5 Anestesia y elasticidad .....	14
1.3 Los modelos de membrana biológica .....	15
1.3.1 Principios de la formación vesicular .....	15
1.3.2 El fosfolípido y los tipos de liposomas .....	18
1.3.3 Técnicas de preparación de liposomas .....	18
1.3.4 Las vesículas unilaminares gigantes (GUVs).....	21
1.3.5 Electroformación de GUVs.....	24
1.4 Estudios de elasticidad en membranas .....	29
1.4.1 Primeros reportes .....	29
1.4.2 Técnicas de medición .....	30
1.4.3 Teoría de cristales líquidos y energía elástica.....	31
1.5 La espectroscopía por fluctuación .....	36
<b>2. Justificación .....</b>	<b>40</b>
<b>3. Hipótesis y objetivos .....</b>	<b>41</b>
3.1 Hipótesis.....	41
3.2 Objetivos .....	41
3.2.1 Objetivo general.....	41
3.2.2 Objetivos específicos.....	41
<b>4. Metodología .....</b>	<b>42</b>
4.1 Preparación de las muestras.....	42

4.1.1 La cámara de electroformación .....	42
4.1.2 Fabricación del marco separador.....	43
4.1.3 Deposición de lípido.....	44
4.1.4 Hidratación de la cámara de electroformación .....	51
4.2 Administración de tetracaína.....	51
4.3 Adquisición de imágenes .....	52
4.4 Análisis de imágenes .....	52
<b>5. Resultados .....</b>	<b>56</b>
<b>6. Discusión.....</b>	<b>57</b>
<b>7. Trabajo a futuro .....</b>	<b>58</b>
<b>8. Referencias .....</b>	<b>59</b>

## Resumen

Se realizó un análisis del efecto de la tetracaína a una concentración de 5 mM sobre un sistema de liposomas gigantes unilaminares de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) suspendidos en agua Milli-Q®, mediante la técnica de espectroscopía de fluctuación por análisis de imágenes. Los liposomas fueron creados mediante la técnica de electroformación en portaobjetos con recubrimiento de óxido de indio y estaño (ITO) utilizando un separador de polidimetilsiloxano (PDMS). Los liposomas fueron fabricados en una matriz de hileras y columnas mediante la técnica de deposición de lípido a base de impresión por micro contacto y electroformados en un tiempo máximo de 45 minutos a un voltaje de 500 mV/mm. El análisis de imágenes para los contornos de una muestra de 10 liposomas demostró un incremento de la constante elástica de flexión  $k_c$  de un poco más del doble con respecto al control ( $74.615 k_B T \pm 21.860 k_B T$  vs  $36.123 k_B T \pm 7.799 k_B T$ ) tras la adición de tetracaína a una temperatura de 35 Celsius.

## Abstract

A fluctuation spectroscopy image analysis of a system of dimyristoylphosphatidylcholine DMPC vesicles in Milli-Q® water after the addition of tetracaine (5 mM) was performed. Liposomes were created with the electroformation technique in indium-tin oxide (ITO) coated glass slides using a polydimethylsiloxane (PDMS) spacer. Liposomes were formed in a row and column matrix using a lipid deposition method based on micro contact printing with a maximum electroformation time of 45 minutes at 500 mV/mm of alternate field strength. Image analysis of the contours within a 10 liposome sample showed an increment of over double the magnitude in the bending elastic constant with respect to control ( $74.615 k_B T \pm 21.860 k_B T$  vs  $36.123 k_B T \pm 7.799 k_B T$ ) after the addition of tetracaine at 35 Celsius.

# 1. Introducción

## 1.1 Generalidades

### 1.1.1 Las propiedades mecánicas de la membrana biológica

Las membranas biológicas son un ejemplo de materia blanda y constituyen un componente esencial de la célula. Estas membranas están constituidas por una o más bicapas lipídicas cuyas propiedades mecánicas guardan una estrecha relación con la función y estabilidad del sistema vivo. En el campo de la biofísica se han reportado diversos esfuerzos con el objetivo de estudiar estas propiedades. Se han investigado, por ejemplo, valores para el módulo de Young (Jadidi, Seyyed-Allaei, Tabar, & Mashaghi, 2014) y las constantes elásticas (Genova, 2013).

La elasticidad de la membrana biológica juega un papel protagónico en diversos procesos celulares que involucran algún tipo de deformación local o generalizada. Tales como la división celular, y los procesos de transporte (endocitosis y exocitosis) que ocurren mediante transiciones morfológicas en las membranas de los organelos (Dimova, 2014). A su vez, la elasticidad de la membrana le permite a la célula responder de forma dinámica a los esfuerzos mecánicos de su entorno; como es el caso de la deformación del eritrocito en su tránsito por los capilares del organismo; o la migración y adhesión celular (Méléard, y otros, 1997).

Finalmente, el impacto de esta propiedad mecánica se refleja en su influencia sobre la capacidad de la membrana para formar dominios (i.e. balsas) y alojar proteínas; muchas de ellas con función enzimática y otras proteínas que permiten el transporte iónico. Es por ello que una alteración en la elasticidad de la membrana puede tener consecuencias funcionales directamente relacionadas con las proteínas que están alojadas en la misma (Marsh, 2006).

### 1.1.2 Interacción fármaco-membrana

De forma tradicional, el interés en el campo del desarrollo farmacológico se ha centrado en estudiar la interacción entre las sustancias de interés, y sus receptores proteicos en el órgano blanco. Se asume por tanto que el entorno lipídico en el que están embebidos los receptores juega un papel secundario, sin afectar la función del fármaco. Sin embargo, la membrana biológica posee características químicas (e.g. grupos polares, quiralidad) que le permiten interactuar ampliamente con sustancias exógenas. Se pueden enlistar por tanto las siguientes consecuencias potenciales de esta interacción (Seydel, Coats, Cordes, & Wiese, 1994):

- La difusión del fármaco a través de la membrana puede ser el paso limitante en su función
- La membrana puede prevenir la difusión completa al sitio activo del fármaco
- El fármaco puede acumularse en la membrana

- La partición del fármaco en la membrana puede modificar su estructura conformacional
- El fármaco puede alterar la conformación de las colas acílicas en los fosfolípidos de la membrana
- El fármaco puede incrementar la superficie de membrana o modificar su grosor
- El fármaco puede alterar las propiedades termodinámicas de la membrana
- El fármaco puede cambiar el potencial de membrana y la hidratación de grupos polares

A pesar de que el sitio de acción de muchos fármacos se encuentra en la región apical de la proteína receptora (evitando así la interacción con la membrana lipídica), este no siempre es el caso, y existen ligandos (e.g. tetracaína) cuyo sitio de acción se encuentra incluso en la región intracelular del receptor proteico. Por ello, una interacción favorable del fármaco con la membrana se vuelve indispensable (Seydel, Coats, Cordes, & Wiese, 1994).

Finalmente, es necesario tomar en cuenta que el efecto del fármaco sobre las propiedades estructurales de la membrana puede alterar la interacción que tiene el fármaco con su receptor proteico, ya que muchas de las proteínas transmembranales son estabilizadas por una confirmación específica de la fase lipídica (e.g. balsas).

Dentro de las técnicas que se han utilizado para estudiar la interacción fármaco membrana se pueden enlistar las siguientes:

- NMR: resonancia magnética nuclear
- DSC: calorimetría diferencial de barrido
- FTIR: espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
- Fluorescencia
- Cristalografía de rayos X
- Resonancia paramagnética electrónica
- Modelado molecular

Las técnicas varían en especificidad, sensibilidad y resolución espaciotemporal, por lo que suelen utilizarse de forma complementaria como se verá en nuestra revisión bibliográfica.

## **1.2 Los modelos del efecto anestésico y el impulso nervioso**

### **1.2.1 Especificidad de interacción**

De acuerdo al modelo de Meyer-Overton, existe una relación directa entre el efecto de los anestésicos generales y su coeficiente de partición entre el agua y el aceite de oliva. El modelo sugiere que la acción de los anestésicos es de carácter inespecífico, dependiendo únicamente de su solubilidad y no de la estructura molecular del anestésico en cuestión (Heimburg & Jackson, 2007). Este panorama va en contradicción directa con el modelo generalmente aceptado sobre la acción farmacológica de los



anestésicos, en el que ejercen su función inhibitoria debido a una interacción específica con proteínas de membrana (Butterworth IV & Strichartz, 1990).

Un argumento particularmente convincente a favor de un modelo de interacción inespecífica es la observación de que, a dosis crítica, la concentración en membrana de todos los anestésicos es idéntica (Græsbøll, Sasse-Middelhoff, & Heimburg, 2014). Aceptar el modelo de interacción específica implicaría que la constante de disociación para todos los anestésicos fuera exactamente la misma. Teniendo en cuenta que incluso un gas noble (i.e. xenón) presenta propiedades anestésicas a la misma concentración en membrana, es bastante improbable que este sea el caso. Un estudio al respecto del efecto del xenón sobre modelos de membrana y espermatozoides de ratón fue llevado a cabo previamente en nuestro laboratorio (Sierra-Valdez & Ruiz-Suárez, 2013)

Se ha propuesto también un modelo mixto en el que las interacciones inespecíficas de los anestésicos con la membrana lipídica generan alteraciones en el perfil de presión lateral de la misma, ocasionando así una modificación indirecta de la estructura y función proteica de los canales que están embebidos en ella.

Existe evidencia experimental de que la alteración en los parámetros físicos de la membrana puede modificar la función de proteínas directamente relacionadas con el impulso nervioso, tal como ocurre con el canal de sodio (Lundbaek, y otros, 2004).

## **1.2.2 El impulso nervioso y su inhibición**

Tradicionalmente, se tiene entendido que la conducción del impulso nervioso es posible gracias a un desequilibrio iónico transmembranal presente en todas las células excitables. En las neuronas, el desequilibrio más importante es el de los iones sodio y potasio, con un potencial de membrana en reposo de -70 mV con respecto al exterior de la célula.

Durante un potencial de acción (impulso nervioso), los canales de sodio activados por voltaje se abren brevemente, con lo que se genera una corriente despolarizadora de iones de sodio hacia el interior de la célula. Una vez terminada esta fase ocurre una expulsión lenta de iones potasio que repolarizan la membrana para restablecer su potencial.

De acuerdo al modelo original de Hodgkin y Huxley, la propagación de pulsos de voltaje a lo largo del nervio ocurre en consecuencia de estos flujos iónicos a través de la membrana plasmática. Sin embargo, un flujo iónico a través de la membrana traería como consecuencia la liberación local de calor y los datos experimentales reflejan que el potencial de acción es un fenómeno prácticamente adiabático (Heimburg & Jackson, 2007).

Dentro del modelo tradicional de interacción anestésica se entiende que los anestésicos locales bloquean el impulso nervioso al inhibir específicamente a los canales de sodio en la membrana, con lo que se impide así la despolarización celular y el potencial de acción. Esta inhibición se lleva a cabo cuando la molécula anestésica se une selectivamente al canal de sodio, uniéndose con mayor afinidad cuando el canal se encuentra en su conformación inactiva. De acuerdo a la literatura, el mecanismo consiste en 1) difusión de la forma neutral del anestésico a través del epineuro, perineuro y endoneuro, 2) reequilibrio entre la forma catiónica y la forma neutral del anestésico a nivel de la superficie axoplásmica de la membrana nerviosa y 3) penetra-

ción y unión de la molécula a su sitio de acción en el canal de sodio (Castro, y otros, 2008).

### **1.2.3 Termodinámica de membranas y modelo del solitón**

De forma general se conoce que las membranas lipídicas presentan una transición de fase desde una fase sólida-ordenada (fase gel o fase  $L_{\beta}$ ) a bajas temperaturas hasta una fase líquida-desordenada (fase fluida o fase  $L_{\alpha}$ ) a temperaturas mayores (Janiak, Small, & Shipley, 1979). Esta transición se acompaña de una modificación del 4% en el volumen de la membrana y del 25% en su área (Heimburg & Jackson, 2005).

Diversos autores han especulado a cerca de la propagación de perturbaciones mecánicas a lo largo de los axones en el nervio. Existe evidencia experimental de fuerzas mecánicas y dislocaciones, así como respuestas de temperatura (liberación y reabsorción de calor) que ocurren de forma simultánea al potencial de acción. Estos cambios se acompañan de modificaciones en mediciones de fluorescencia, turbidez y birrefringencia (Heimburg & Jackson, 2005). De esta forma se tiene la hipótesis alternativa de que el potencial de acción es similar a un pulso piezoeléctrico o solitón, que se propaga de forma estable en la membrana biológica (Heimburg & Jackson, 2007).

La generación del solitón (i.e. excitación localizada de densidad) requiere un incremento en la compresibilidad de la membrana al pasar de la fase fluida a la fase gel, lo cual se ha observado experimentalmente.

En un trabajo por difracción de rayos X en capas completamente hidratadas de DMPC se redujo la temperatura desde 27 C hasta 24 C (hacia la temperatura de transición de este lípido), observando un “ensanchamiento anómalo” en el grosor del bulto de capas. Este ensanchamiento fue atribuido a un incremento en las fuerzas de ondulación entre cada capa (fluctuaciones repulsivas mediadas por entropía), debido a la reducción del módulo elástico de flexión que se observa al acercarse a la temperatura de transición del lípido.

Simulaciones de Monte Carlo realizadas en el mismo estudio mostraron resultados consistentes que atribuyen este ensanchamiento anómalo únicamente a la reducción en el módulo elástico, dejando de lado un posible cambio en las fuerzas de hidratación o en fuerzas de van der Waals entre las capas (Chu, Kučerka, Liu, Tristram-Nagle, & Nagle, 2005).

Aunque aún no se explica cómo es posible que la reducción en los grados de libertad conformacional de las moléculas de fosfolípido (i.e. la transición a la fase gel) es capaz de producir una reducción en el módulo elástico, es precisamente este comportamiento el que permitiría la propagación del solitón a través del nervio. Los autores mencionan que este comportamiento en las membranas lipídicas las haría análogas a un resorte que se vuelva más suave cuando es comprimido. Una modificación estructural mediada por anestésicos sobre los parámetros elásticos de la membrana pudiera inhibir la generación del solitón y ser la responsable del fenómeno anestésico (Heimburg & Jackson, 2005).

## 1.2.4 Detalles de la interacción anestésica

La observación de diversos autores que han utilizado calorimetría diferencial de barrido, turbidimetría y otras técnicas coincide en el hecho de que los anestésicos inducen una depresión del punto de fusión de las membranas (i.e. desplazamiento en la temperatura de transición de fase). La explicación putativa utiliza el modelo de van't Hoff, el cual asume que existe una mayor solubilidad del anestésico en la fase fluida de la membrana, considerando que las moléculas del anestésico son prácticamente insolubles en la fase gel (Kaminoh, Kamaya, & Ueda, 1989). De esta forma, se genera una diferencia en la entropía de mezclado entre las dos fases por lo que se favorece el estado fluido (mayor entropía) deprimiendo así el punto de fusión (Græsbøll, Sasse-Middelhoff, & Heimburg, 2014). Una modificación del punto de fusión en el nervio, comprometería entonces la reducción concomitante en el módulo elástico y por ende la generación y propagación del solitón.

Otros trabajos han indagado a fondo sobre las consecuencias de la interacción molecular entre la membrana lipídica y los anestésicos. Al analizar el espectro de resonancia magnética nuclear para fosfatidilcolina etiquetada con deuterio, se observó un decremento en el parámetro de orden de las colas de fosfolípido dependiente de la concentración de anestésico (1-10 mM). Este hallazgo ha sido denominado “efecto fluidizante” por algunos autores (Paiva, Paradiso, Serro, Fernandez, & Saramago, 2012). Cabe mencionar que a nivel del grupo colina, el efecto de ordenamiento fue opuesto (incremento en el parámetro de orden). Y ambos efectos mostraron dependencia con el pH al que el anestésico fue aplicado. En base a estos resultados, los autores concluyen que para la tetracaína la posición preferencial en la membrana es intercalarse entre las moléculas de fosfolípido, siendo la forma neutral de la molécula ( $pK_a \approx 6.8$ ) la que tiende a colocarse más profundamente en el lípido (Smith, Auger, & Jarrell, 1991). A su vez, la forma catiónica de la molécula de tetracaína se orienta de forma cercana a la región polar del fosfolípido, y se ha especulado que esta forma molecular sea la responsable del efecto anestésico.

Simulaciones de dinámica molecular realizadas en nuestro laboratorio (Sierra-Valdez, Forero-Quintero, Zapata-Morin, Costas, Chavez-Reyes, & Ruiz-Suárez, 2013) han arrojado resultados consistentes con estos hallazgos experimentales y con trabajos de espectroscopía de resonancia con rotación en ángulo mágico (Weizenmann, Huster, & Scheidt, 2012). Las simulaciones se llevaron a cabo utilizando 200 moléculas de DPPC, 15 mil moléculas de agua y 10 moléculas de tetracaína en un medio fisiológico a 37 grados Celsius, durante 30 ns, con un paso de 2 fs, utilizando el programa GROMACS. En estos trabajos, el efecto de la tetracaína sobre el parámetro de orden de membrana lipídica fue atribuido a su elevada polarizabilidad eléctrica (lo que le confiere una elevada hidrofobicidad y coeficiente de partición), siendo la consecuencia final, la reducción de la temperatura de transición gel-fluido de la membrana. La continuación de este trabajo reveló además un incremento cuantificable en la entropía de Schlitter de la membrana de DPPC en presencia de lidocaína, tetracaína y procaína (Zapata-Morin, Sierra-Valdez, & Ruiz-Suárez, 2014)

El mismo efecto anestésico se ha observado en la serie de alcanos desde el metanol hasta el 1-dodecanol y se ha sugerido que el mecanismo subyacente sea similar, siendo tres fuerzas las que gobiernan esta interacción: 1) la repulsión hidrofoba

entre el alcohol y el agua, 2) la atracción débil entre las regiones polares del alcohol y el fosfolípido, y 3) una repulsión débil debido al intercalado del grupo acilo del alcohol en la bicapa lipídica.

Alcoholes con mayor cantidad de átomos de carbono en su molécula que el 1-dodecanol comienzan a presentar un ordenamiento preferencial de forma paralela a las moléculas de lípido perdiendo entonces su efecto anestésico. (Frangopol & Mihăilescu, 2001). Este fenómeno de corte en el efecto anestésico ha sido objeto de extensos estudios y continúa en controversia (Castro, y otros, 2008). Algunos han argumentado que se debe simplemente a la incapacidad del alcohol de llegar a su sitio de acción en la membrana debido a su baja solubilidad en los compartimentos acuosos del sistema in vivo (Goldstein, 1984).

Por otra parte, es criticado el hecho de que la fluidización en la membrana es comparable en magnitud a lo observado como consecuencia de un mero incremento de uno o dos grados centígrados en la temperatura del sistema (Castro, y otros, 2008). Entiéndase por “efecto fluidizante” la presencia de distintos tipos de movilidad en los componentes de la membrana lipídica, entre ellos: flexibilidad de las cadenas acílicas, difusión lateral de fosfolípidos en el plano de la membrana, difusión transversa entre monocapas y transiciones de fase que conduzcan a la formación de dominios laterales. Todos ellos son movimientos anisotrópicos que no pueden catalogarse como medidas de viscosidad, la cual es una característica de la resistencia isotrópica al flujo (Goldstein, 1984).

A su vez, se ha observado que el coeficiente de partición de las moléculas de anestésico en membranas biológicas suele ser solamente una fracción de su coeficiente medido en solventes orgánicos, reduciendo así su capacidad de internalizarse en la bicapa. Por último, se ha observado un efecto anestésico general a dosis anestésicas que equivalen a la presencia de una molécula de fármaco por cada 200 de lípido. A esta concentración los efectos sobre la membrana serían a lo mucho marginales (Goldstein, 1984).

Trabajos que utilizan difracción de rayos x han mostrado un incremento en la distancia promedio entre las cadenas hidrocarbonadas de la membrana incluso a concentraciones nanomolares de anestésico. En contraparte y añadiendo más controversia a los datos, se encuentra el hecho de que estudios realizados en membranas de eritrocito revelan una reducción en la fluidización de la membrana tras la exposición a moléculas de anestésico (Castro, y otros, 2008).

Al parecer, los hallazgos más consistentes han sido en base al etanol, reportando datos compatibles con desorden de membrana tanto en técnicas de resonancia paramagnética electrónica como polarización (anisotropía) de fluorescencia. A su vez, se ha reportado una correlación entre el desorden de membrana y la intoxicación por etanol que parece sugerir relaciones causales. Entre estos hallazgos se puede enlistar el trabajo que reporta sobre dos líneas de ratones que fueron seleccionadas en base a su sensibilidad diferencial a los efectos hipnóticos del etanol, en las cuales se observó una resistencia diferencial a los efectos del etanol sobre el desorden de las membranas biológicas extraídas para el análisis in vitro (Goldstein, 1984). Otro hallazgo de carácter similar es el que reporta cómo el grado en el que los anestésicos locales alteran la temperatura de transición de fase es consistente con su potencia anestésica in vivo (Kaminoh, Kamaya, & Ueda, 1989).

Es evidente que en membranas biológicas, el efecto de fluidización o rigidización sea más complejo de describir ya que interviene la interacción de una mayor cantidad de moléculas, modificando lo que previamente era una interacción molecular más sencilla entre grupos cargados o entre grupos apolares aislados. En un estudio realizado en vesículas de membrana plasmática sinaptosomal de corteza cerebral bovina y liposomas de lípidos totales de estas membranas, se observó un efecto diferencial en la anisotropía de fluorescencia ante la presencia de anestésicos locales. Los anestésicos (a concentraciones de 0.1-1 mM) produjeron un desorden en las colas lipídicas (reducción de la anisotropía), pero incrementaron el orden a nivel de la interfase de la membrana y el medio acuoso (Yun, y otros, 2002).

Además del efecto de fluidización y la modificación de la temperatura de transición de fase, se han observado otros efectos estructurales en la membrana biológica en presencia de anestésicos. Los estudios demuestran la existencia de una fase gel interdigitada (confirmada por FT-IR y P-NMR), inducida mediante concentraciones elevadas de alcoholes, anestésicos locales y presiones elevadas. Para el uso de tetracaína hidroclicada, la concentración crítica para la aparición de la forma interdigitada de membranas de DPPC se encuentra en el orden de 20 mmol kg<sup>-1</sup> (Hata, Matsuki, & Kaneshina, 2000). El mismo efecto de interdigitación se observó con dibucaína a concentraciones de 11 mmol kg<sup>-1</sup> y no fue observado con el uso de lidocaína ni procaína. Se ha especulado que el hecho de que las moléculas anfifílicas de anestésico son más cortas que las cadenas acílicas de los fosfolípidos produce vacíos energéticamente desfavorables en el interior de la bicapa lipídica, lo que conlleva a la interdigitación de las colas en las moléculas de fosfolípido (Yun, y otros, 2002). En el mismo trabajo, se hizo hincapié en el hecho de que la tetracaína es capaz de formar micelas por sí misma a una concentración >128 mmol kg<sup>-1</sup>, lo que la hace capaz de disolver (transición vesícula-micela) las membranas de lípido y formar micelas mixtas, desapareciendo así el pico de entalpía de la transición principal de fase en el termograma calorimétrico (Yun, y otros, 2002).

El fenómeno de interdigitación explica también el efecto bifásico que tienen los alcoholes sobre el desplazamiento de la temperatura de transición de fase de membranas lipídicas de fosfatidilcolina. Existe una concentración para cada alcohol de cadena corta a partir de la cual el punto de fusión se desplaza a temperaturas mayores (lo opuesto a lo que ocurre a menor concentración de alcohol). La concentración que delimita la dirección de desplazamiento del pico en el termograma es precisamente la concentración crítica para inducir la fase de interdigitación sobre la membrana (Takeda, Okuno, Hata, Nishimoto, Matsuki, & Kaneshina, 2009).

Mediante el análisis espectral de emisión de fluorescencia ha sido posible indagar en los detalles específicos de la interacción entre las moléculas de anestesia y las de fosfolípido. Los resultados para tetracaína muestran que el coeficiente de partición es mayor en la fase fluida que en la fase gel, independientemente de si la fase fue inducida por temperatura o por composición lipídica, siendo la forma neutra la de mayor coeficiente en comparación a la forma protonada. Al determinar la posición de la molécula se concluyó que la amina terciaria del anestésico se coloca cerca del grupo fosfato del fosfolípido. A su vez, existe una aproximación del momento dipolar y el grupo aromático de la tetracaína con los carbonos 2-5 de las cadenas acílicas del fosfolípido, lo que tiende a alinear los enlaces éster de ambos tipos moleculares. Se recalca en el trabajo que esta posición es independiente de la presencia de colesterol y

es la misma tanto en la forma neutral como en la forma protonada de la molécula. Se observó que el pKa efectivo de la tetracaína se reduce en 0.3-0.4 unidades de pH una vez que el anestésico se adsorbe en las bicapas neutras. Finalmente, se concluyó que la unión de tetracaína en la fase gel es protagonizada por interacciones electrostáticas mientras que en la fase fluida son las interacciones hidrófobas las principales contribuyentes (Zhang, Hadlock, Gent, & Strichartz, 2007).

Los autores de este último trabajo argumentan que los fenómenos de fluidización y corrimiento de la temperatura de transición de la membrana en presencia de anestésicos sólo serían observables a concentraciones muy por arriba de las utilizadas clínicamente. Por otro lado, trabajos con distintos modelos de membrana han demostrado que el efecto de la tetracaína depende incluso del modelo utilizado. En un trabajo llevado a cabo con las técnicas de QCM-D, P-NMR, DSC y monocapas de Langmuir se observó que el efecto de desordenamiento inducido por tetracaína es mayor en estas últimas, siendo de menor magnitud tanto en liposomas en solución como en membranas soportadas en superficie. Los autores estipulan que esta observación puede explicarse en base al número de moléculas de lípido que quedan expuestas al anestésico en cada caso (Serro, y otros, 2014). En este trabajo se observó también que el efecto de desordenamiento es mucho más pronunciado cuando la tetracaína se añade a membranas de DMPC en fase gel que en fase fluida. Por otro lado se obtuvo el dato de que el efecto de interdigitación en liposomas de DMPC ocurre a partir de una concentración de 5 mM de tetracaína.

### **1.2.5 Anestesia y elasticidad**

En base a esta literatura cabe esperar que las moléculas de anestésico sean capaces de modificar considerablemente los parámetros mecánicos en la membrana biológica, como es el caso del módulo elástico. En efecto, mediciones de tensión dinámica de superficie y elasticidad de dilatación reportan una curva de elasticidad en función de la concentración de dibucaína en bicapas de DMPC. En esta curva se observa un máximo que coincide con la concentración en la que los autores observaron disrupción de las capas de lípido fijadas en mica mediante microscopía de fuerza atómica (Lorite, Nobre, Zaniquelli, Paula, & Cotta, 2009). Los autores concluyen que el anestésico interactúa con los grupos polares de los fosfolípidos alterando su empaquetamiento en la monocapa, con lo que se modifica el parámetro de elasticidad de superficie (i.e. módulo de compresibilidad lateral).

Estudios realizados en monocapas de Langmuir han demostrado la adsorción y penetración de anestésicos en la membrana lipídica, produciendo así un incremento en la compresibilidad de la misma. Por otro lado, trabajos que miden la constricción de la membrana en consecuencia de la aplicación de un voltaje de entre 10-100 mV (trabajos realizados en BLMs), se ha observado que la adición de anestésicos locales induce un decremento en el módulo elástico acompañado de un incremento en su compresibilidad (Castro, y otros, 2008).

Un trabajo en el que se utilizó eco de espín de neutrón reporta la alteración de la constante elástica de flexión de membrana en base a la exposición a distintas concentraciones de lidocaína en su forma cargada. El estudio reporta que la presencia de lidocaína en liposomas unilaminares de DMPC/DMPG reduce la tasa a la que se mo-

difica la constante elástica al variar la temperatura del sistema (Yi, Nagao, & Bossev, 2012).

Esta dependencia térmica de la constante se conoce desde el trabajo en el que se analizó su modificación utilizando modelos bien definidos de fosfatidilcolinas de distinto número de carbonos (Fernandez-Puente, Bivas, Mitov, & Méléard, 1994). Como es de esperarse, el valor de la constante es mayor en la fase fluida de la membrana que en la fase gel, y es por lo general prácticamente invariante con respecto a la temperatura. Sin embargo, en el estudio se reporta una fuerte variación del valor de la constante en la fase fluida una vez que la diferencia entre la temperatura del sistema y la temperatura de transición del lípido en cuestión alcanza los 6 grados centígrados.

De acuerdo a las predicciones teóricas en las que la constante elástica se incrementa de forma proporcional al cuadrado del grosor de la membrana, era de esperarse que al reducir la temperatura en la fase fluida se encontrara un incremento en la constante elástica en lugar de un decremento (al reducir los grados de libertad en las colas acílicas del fosfolípido se incrementa la altura total de la molécula). En efecto, el estudio reporta una elevación de la constante cuando la temperatura se encuentra entre 3 y 6 grados por arriba de la transición, pero al acercarse más aún a la transición se observa el decremento antes mencionado (Fernandez-Puente, Bivas, Mitov, & Méléard, 1994). Este comportamiento anómalo coincide con el del ensanchamiento anómalo observado en las capas apiladas de lípido que comentamos previamente y es la base racional para estipular la posibilidad de la propagación del solitón durante el impulso nervioso y su inhibición mediante la anestesia.

## **1.3 Los modelos de membrana biológica**

### **1.3.1 Principios de la formación vesicular**

La formación de vesículas de lípido (i.e. liposomas) puede verse como un proceso de auto-ensamblaje que ocurre en dos etapas en la que inicialmente se forma la bicapa molecular que posteriormente se cierra para formar la vesícula.

De forma general, al disolver cualquier soluto, existe una ganancia de entropía debido a la dispersión del soluto y a la par un incremento en la energía de interacción debido a que las moléculas de soluto usualmente prefieren interactuar con moléculas de su misma especie. La competencia entre entropía y energía de interacción es lo que determinará si el soluto se disuelve o se separa en una fase termodinámica en el solvente (Guida, 2010).

Al mezclar fosfolípidos en una fase acuosa, la ganancia entrópica no es suficiente para compensar el incremento en la energía de interacción del agua con la región hidrofóbica del fosfolípido, por lo que estos tenderán a auto-ensamblarse en distintos tipos de estructuras. Esta agregación inicial ocurre en escalas de tiempo en el orden de microsegundos (Guida, 2010). El factor determinante en la morfología de estas estructuras auto-ensambladas es la relación entre el tamaño de las regiones hidrofoba e hidrofílica de la molécula de surfactante. Esta relación determina la curvatura de la interfase hidrofóbica-hidrofílica descritas por su curvatura media  $H$  y su curvatura Gaussiana  $K$  (ambas dependientes de los dos radios de curvatura  $R_1$  y  $R_2$ ).

La curvatura de la interfase se relaciona al parámetro de empaquetamiento del surfactante de la siguiente manera (Antonietti & Förster, 2003):

$$\frac{v}{al} = 1 + Hl + \frac{Kl^2}{3}$$

En donde  $v$  es el volumen de la región hidrofóbica,  $a$  es el área de la interfase y  $l$  es la longitud de la cadena normal a la interfase. Es en base a variaciones en el valor del parámetro de empaquetamiento  $v/(al)$  que las moléculas anfifílicas forman bicapas, cilindros o esferas. Al observar la descripción matemática del parámetro se puede deducir que para formar bicapas es necesario que la fracción se aproxime a la unidad (i.e. área por altura igual a volumen), ya que de esta forma las curvaturas se reducirán a cero en el ensamble molecular. Conociendo la estructura molecular de la región polar de los fosfolípidos, se puede entender que su parámetro de empaquetamiento tenderá a aproximarse a la unidad, y que en este caso el volumen de la región hidrofóbica está ocupado por dos cadenas hidrocarbonadas (i.e. colas acílicas).

La forma geométrica en la que se agrega el surfactante se utiliza como condición de frontera para cálculos termodinámicos de energía libre. Las dos contribuciones a estos cálculos en moléculas anfifílicas están dadas por la energía de la interfase hidrofóbica-hidrofílica y la reducción en la entropía que ocurre con el ordenamiento molecular de la mesofase. Usualmente la energía de la interfase es lo suficientemente alta como para dominar la pequeña reducción entrópica que ocurre en el autoensamblaje del surfactante (las moléculas prefieren ordenarse que exponer su región hidrofóbica a la fase acuosa).

Cuando la región hidrofóbica del surfactante presenta una tendencia de ordenamiento por sí misma cuando se encuentra en el ensamble, es mucho más probable que las moléculas de surfactante adquieran la forma de bicapa. Esta tendencia puede estar dada por interacciones de Coulomb o de van der Waals y es este último el caso de las colas acílicas en los fosfolípidos. Es por ello que la mesofase esméctica abarca una amplia región del diagrama de fases en este tipo de surfactantes.

El hecho de que las moléculas anfifílicas con las características antes expuestas se ordenen en bicapas no explica el por qué deberían cerrarse para formar vesículas. Es necesario primero que el disco bimolecular de surfactante alcance una dimensión suficiente, teniendo en cuenta la energía de flexión de su superficie y la tensión de línea en su contorno. El balance entre estas energías define un tamaño vesicular mínimo, dado por (Antonietti & Förster, 2003):

$$R_V = \frac{2\kappa}{\gamma}$$

En donde  $R_V$  es el radio vesicular,  $\kappa$  es el módulo elástico de flexión y  $\gamma$  es la tensión de línea en el contorno del disco.

Si bien estos parámetros pueden determinar la forma y el tamaño de vesículas de surfactante en forma general, su aplicación a liposomas está limitada por el hecho de la elevada insolubilidad que tienen los fosfolípidos lo que genera tensiones de línea elevadas. Es por ello que la forma y el tamaño de los liposomas está más determinado por el proceso de su fabricación que por su equilibrio termodinámico.



Es en el proceso de fabricación del liposoma en el que se establece indirectamente la cantidad de moléculas de surfactante que poblará cada una de las monocapas de su membrana. Esta distribución se mantiene prácticamente constante durante la vida del liposoma y también lo hace la relación entre el volumen vesicular y su superficie ya que se ha calculado un coeficiente osmótico de permeabilidad al agua de  $0.8\text{-}16\ \mu\text{m}\cdot\text{seg}^{-1}$  para fosfatidilcolina de huevo (Bangham, Grier, & Greville, 1967). Es por ello que estos parámetros pueden determinar la forma y tamaño final de estas estructuras, creando variaciones muy distantes de la forma esférica que aplica para los surfactantes en general. Debido a estas consideraciones es que los liposomas han sido denominados vesículas fuera del equilibrio, que están “atrapadas” en trampas cinéticas creadas mediante las condiciones de su fabricación. La forma final del liposoma será entonces la que minimice su energía de flexión para un número dado de moléculas en cada una de las monocapas. De esta forma se obtienen figuras esféricas, tubulares, elipsoidales o mielínicas.

Además de estas consideraciones geométricas, la forma del liposoma también se verá afectada en base a la composición del fosfolípido, interacciones electrostáticas, concentraciones iónicas en el medio y la posible adsorción o interacción de otras especies moleculares en el sistema.

Las vesículas de lípido pueden formar estructuras unilaminares o multilaminares, dependiendo el número de bicapas en su pared. De forma experimental, se ha observado que las formas multilaminares se ven favorecidas a concentraciones mayores de surfactante (Guida, 2010). Otro factor importante es la fuerza de repulsión entre las bicapas, que puede generarse en base a dos mecanismos diferentes: a) las fuerzas de van der Waals y ondulaciones térmicas de la bicapa y b) la repulsión electrostática entre bicapas. Aunque otros autores han deducido que estas últimas tienen a lo mucho un impacto despreciable sobre el espaciado entre bicapas cuando el espacio entre ellas es relativamente pequeño (Harbich & Helfrich, 1984).

En la práctica es posible crear estructuras unilaminares con el uso de técnicas que aportan energía al proceso de formación de vesículas, lo que lo hace análogo a la emulsificación. Estos métodos suelen consistir en: a) fuerzas de corte, b) filtrado, c) sonificado.

Estudios realizados con la aplicación de fuerzas de corte a sistemas laminares de surfactante han observado la transición a partir de bicapas planas hacia una fase de vesículas multilaminares (al incrementar el estrés de corte), acompañada de una posterior transición a vesículas de mayor tamaño y menor laminaridad conforme el estrés siguió incrementándose.

De acuerdo a algunos autores, las características principales que han hecho de las vesículas de lípido una herramienta importante en investigación es: a) su morfología característica, en la que una bicapa lipídica relativamente impermeable encierra totalmente un núcleo acuoso y b) su habilidad para encapsular diversos solutos presentes en la fase acuosa durante su fabricación (Francis Szoka & Papahadjopoulos, 1980). Es debido a esta segunda característica que los liposomas han sido trabajados principalmente como sistemas de distribución farmacológica, y para este fin se ha reportado la internalización de partículas superparamagnéticas con el fin de controlar el movimiento de los liposomas una vez internalizados en el organismo que será tratado con ellos (Eleršič, Pavlič, Igljč, Vesel, & Mozetič, 2012). Sin embargo, el uso de

los liposomas que nos interesa en este trabajo es el del modelado de membranas biológicas.

### **1.3.2 El fosfolípido y los tipos de liposomas**

Antes de ahondar sobre las técnicas de fabricación de liposomas, parece importante describir someramente la unidad molecular de la que están compuestos, i.e. el fosfolípido. La estructura química general de los fosfolípidos consiste en un esqueleto de glicerol el cual se esterifica con un grupo fosfato en su carbono 3, mientras que las posiciones 1 y 2 se esterifican con cadenas de ácidos grasos. Son estas cadenas de ácidos grasos las que conforman la región hidrófoba del fosfolípido. En el extremo opuesto del grupo fosfato puede esterificarse una variedad de moléculas orgánicas que incluyen a la colina, etanolamina, glicerol, serina e inositol. La combinación del grupo fosfato y la otra molécula orgánica conforma la región polar de la molécula. El fosfolípido más abundante en plantas y animales son la fosfatidilcolina (también conocida como lecitina) y la fosfatidiletanolamina. Entre los dos constituyen la mayoría de la masa lipídica en las membranas biológicas. Las variaciones en las cadenas de ácidos grasos (i.e. cadenas acílicas) confieren gran parte de las propiedades mecánicas y estructurales del surfactante, y su variación puede originarse en base al número de carbonos en su cadena, o a la cantidad de insaturaciones en sus enlaces (Vemuri & Rhodes, 1995). Si bien son estas cadenas las que en su mayoría determinan la temperatura de transición del fosfolípido (cadenas más largas y saturadas tienen puntos de fusión más altos que las cadenas cortas o con insaturaciones), el grupo polar puede tener también una influencia considerable (Francis Szoka & Papahadjopoulos, 1980).

Los liposomas pueden clasificarse en base a su tamaño y número de bicapas en su pared, para los cuales se utiliza una nomenclatura distinta. Cuando se describe el número de bicapas se denominan vesículas unilaminares (ULV) o multilaminares (MLV). La clasificación por tamaños distingue entre vesículas unilaminares pequeñas (SUV), grandes (LUV) o gigantes (GUV). Las vesículas pequeñas se encuentran entre el diámetro teórico mínimo 10-20 nm hasta los cientos de nanómetros. Las vesículas grandes abarcan los diámetros de las centenas de nanómetros hasta alcanzar el tamaño micrométrico en el que se tornan visibles bajo microscopía óptica. Las vesículas gigantes pueden variar en las pocas micras hasta cientos de ellas (Francis Szoka & Papahadjopoulos, 1980). Los liposomas pueden prepararse con fosfolípidos puros o en base a mezclas con otros lípidos o colesterol. La composición lipídica incluyendo la proporción de la mezcla se describe en paréntesis después del acrónimo que describe al liposoma, e.g. SUV (DPPC/Chol, 1:1).

### **1.3.3 Técnicas de preparación de liposomas**

Los métodos de fabricación pueden dividirse en: a) métodos en bulto, en donde los liposomas son obtenidos mediante la transferencia de fosfolípidos desde una fase orgánica hacia una fase acuosa y en b) métodos de capa, en los que los lípidos se depositan inicialmente en un sustrato y posteriormente se hidratan para formar liposomas (Patil & Jadhav, 2014).

La hidratación de una capa de fosfolípido bajo flujo hidrodinámico es la técnica básica para la formación de liposomas multilaminares (MLVs). El lípido se disuelve inicialmente en una fase orgánica para depositarse posteriormente sobre un recipiente al evaporar el solvente en el vacío. Una vez que está totalmente evaporado se procede a la hidratación con la que se obtienen vesículas heterogéneas en tamaño y laminaridad.

Existe un método alternativo para estrechar la distribución de tamaños en las MLVs. El método consiste en agitar vigorosamente la solución orgánica de lípidos en una fase acuosa hasta formar una emulsión que contenga pequeñas esférulas de solvente con lípido dispersas en el agua. Al evaporar posteriormente el solvente se obtienen las MLVs.

Un método similar al anterior denominado evaporación de fase reversa, sólo que en este caso se añade una pequeña cantidad de agua a la fase orgánica que contiene los fosfolípidos, con lo que en vez de obtener MLVs se obtienen LUVs en su mayoría, sobre todo si la concentración de fosfolípido es baja.

Si se procede a la inyección directa del solvente orgánico con los fosfolípidos disueltos en una fase acuosa puede observarse la formación de SUVs de manera espontánea. Para esta técnica se utiliza sobre todo éter como fase orgánica, ya que su rápida evaporación permite la formación de las SUVs en la fase acuosa.

Otro método consiste en disolver el fosfolípido en micelas de detergente en una fase acuosa, con la posterior remoción del detergente a base de diálisis, con lo que las micelas de fosfolípido se agregan rápidamente para formar LUVs. Una alternativa a la diálisis la ofrecen las técnicas cromatográficas.

En nuestro laboratorio se ha trabajado previamente tanto con MLVs, como con LUVs y SUVs. La forma en la que hemos preparado estas dos últimas son los métodos de extrusión y sonicado respectivamente.

En la extrusión se utiliza una membrana porosa de policarbonato con orificios de 100 o 200 nanómetros a través de la cual se hace pasar la suspensión de MLVs disuelta en la fase acuosa. Tras múltiples pasos a través de la membrana es como se obtienen las LUVs. También se puede extruir a partir de GUVs en lugar de MLVs, con lo que se reduce drásticamente el número de pasos a través del poro que son necesarios para obtener las LUVs.

En el sonicado se utilizan ondas ultrasónicas que producen cavitación en el medio acuoso en el que están dispersas las MLVs, reduciendo drásticamente su tamaño y laminaridad para formar SUVs. Existe aún controversia sobre si es la propia cavitación o los altos esfuerzos de corte que se producen en consecuencia los que producen la formación de SUVs.

La implementación de dispositivos microfluídicos en el campo de la fabricación de liposomas ha hecho posible la aparición de nuevas técnicas mejorando la homogeneidad y calidad de las muestras. Estos dispositivos involucran flujos laminares en canales de tamaño micrométrico. Un ejemplo es el uso de la técnica de enfoque microhidrodinámico y permite un elevado control sobre el tamaño de fabricación de SUVs y LUVs. La técnica consiste en hacer fluir un buffer acuoso desde extremos opuestos de un canal rectangular mientras se hace fluir la solución de fosfolípidos en alcohol entre las dos afluentes del buffer acuoso. La interfase entre el agua y el alcohol produce regiones en donde los fosfolípidos son forzados a agregarse en bicapas lipídicas que posteriormente se ensamblan en liposomas al continuar en el canal de

flujo. El radio medio de los liposomas fabricados de esta manera va de los 140 nm a los 40 nm, dependiendo de la proporción entre los flujos de la fase acuosa y la fase orgánica (entre más rápido se haga fluir la fase acuosa, más pequeños resultan los liposomas).

Otra técnica involucra el uso de microtubos de 200-530 micras de diámetro dentro de los cuales se depositan los lípidos previamente disueltos en la fase orgánica y se secan totalmente antes de ser rehidratados al perfundir la fase acuosa a través del tubo. Esta técnica produce LUVs de pequeño tamaño y muy estrecha dispersión de diámetros.

Una alternativa reciente para el uso de solventes orgánicos es el uso de fluidos supercríticos ya que permiten una separación y purificación más eficiente. El más utilizado es el dióxido de carbono y la técnica se basa en la descompresión de la muestra una vez que el fosfolípido, el fluido supercrítico, la fase acuosa y un co-solvente han sido mezclados.

Finalmente, se ha reportado la producción de SUVs al realizar saltos de pH en suspensiones acuosas de MLVs. El intervalo de tiempo para el salto de pH, el tiempo de equilibrio, la temperatura y el tipo de lípido fueron los parámetros clave para el tamaño y distribución de diámetros de los liposomas.

Hasta este trabajo no se habían fabricado GUVs en nuestro laboratorio, y la estandarización de un método para su producción es uno de los objetivos de esta tesis. Dentro de los métodos para fabricarlas se enlista la hidratación de una capa de lípido cuidando reducir al mínimo el flujo hidrodinámico que tiende a generar MLVs. Cabe señalar que este método produce bastante contaminación de la muestra de GUVs por múltiples MLVs, aunque en un reporte se logró mantener la baja laminaridad de las GUVs al dopar la mezcla de lípido con monosacáridos que permitieron la separación entre las bicapas al momento de la hidratación (Tsumoto, Matsuo, Tomita, & Yoshimura, 2009).

Una alternativa para la producción de GUVs consiste en la fusión de LUVs mediante ciclos de congelado y derretimiento en soluciones concentradas de electrolitos, el uso de polietilenglicol o de péptidos fusogénicos. Sin embargo, el método usado comúnmente para la producción de GUVs es el método de electroformación, y es el que hemos elegido para este trabajo. De forma general consiste en hidratar la capa de lípido en presencia de un campo eléctrico. Esta técnica produce un elevado porcentaje de vesículas unilaminares con muy baja contaminación por MLVs sobre todo si la deposición inicial de la capa de lípido es uniforme y delgada.

Se ha demostrado también que al mezclar dos fases inmiscibles dentro de un canal microfluídico pueden generarse pequeñas gotas de un volumen uniforme de una de las fases. De esta forma es en la que se han presentado dispositivos microfluídicos capaces de generar emulsiones de agua en aceite, con la subsecuente remoción de la fase oleosa y la transferencia de GUVs hacia la fase acuosa (Matosevic & Paegel, 2011).

Existen también métodos de emulsión mixta agua en aceite en agua (w/o/w) que permiten la formación de GUVs una vez que se ha evaporado la fase orgánica y otros en las que se utiliza diálisis de tricloroacetato de sodio (Oku & MacDonald, 1983). Como en todos los métodos de fabricación en los que se utilizan solventes, la desventaja suele ser la presencia de residuos traza del solvente en la muestra (Swaay & deMello, 2013).

Una técnica microfluídica más prometedora para la formación de GUVs consiste en el flujo pulsado en jet de una solución acuosa a través de un microcapilar dirigido hacia una bicapa de fosfolípido (Stachowiak, Richmond, Li, Liu, Parekh, & Fletcher, 2008). La bicapa se produce al unir dos gotas de fase acuosa en una fase orgánica que contenga fosfolípido de forma que al reducirse la capa de fase orgánica se forma la bicapa de forma espontánea (el mismo principio utilizado en la fabricación de BLMs). Estos dispositivos son capaces de formar GUVs en cantidades numerosas manteniendo la monodispersión de tamaños (Ota, Yoshizawa, & Takeuchi, 2009).

### **1.3.4 Las vesículas unilaminares gigantes (GUVs)**

Las GUVs constituyen la categoría de liposomas más grandes (orden micrométrico) y se han convertido en un sistema bastante conveniente para el estudio de las membranas biológicas. Debido a su tamaño son fácilmente visibles en el microscopio óptico, permitiendo así su manipulación directa. La micromanipulación de vesículas gigantes permite el control individual de las mismas, obteniendo datos experimentales al exponer la vesícula a perturbaciones mecánicas, térmicas, químicas o bioquímicas (Menger & Keiper, 1998). Por el contrario, el trabajo tradicional con modelos vesiculares submicroscópicos (i.e. LUVs y SUVs) requiere el uso de técnicas de exploración indirecta como ya hemos observado en la revisión de la literatura.

Las vesículas gigantes, pueden mostrar modificaciones estructurales semejantes a las que presentan las células vivas tales como la agregación, fusión y fisión. Este comportamiento ha sido denominado como 'química citomimética' por algunos autores (Menger & Gabrielson, 1995). La fusión de liposomas ha sido mediada por diversas moléculas, entre ellas algunos metales como el lantano (Tanaka & Yamazaki, 2004), o con el uso de iones divalentes (Estes, Lopez, Fuller, & Mayer, 2006), aunque depende también de las cargas electroestáticas en los lípidos de cada liposoma (Bailey & Cullis, 1997). Estas observaciones tratan de contrastarse con los mecanismos de fusión mediados por proteínas que se han descrito en células vivas (Marsden, Tomatsu, & Kros, 2011).

En un trabajo particularmente interesante, se observó la endocitosis espontánea de pequeños trozos de ADN al inyectarlos cerca de una región de la membrana de liposomas con esfingosina en su pared (Angelova, Hristova, & Tsoneva, 1999). Debido a su tamaño, las GUVs pueden ser expuestas de forma local a diversos estímulos químicos con lo que sólo una parte de su membrana es expuesta al reactivo, a diferencia de los modelos más pequeños en donde esto no es posible (Menger & Angelova, 1998). Con la exposición a diversos reactivos es como se han observado diferentes comportamientos en las GUVs aisladas, o en GUVs interconectadas por los cordones que se generan durante su fabricación (Menger & Lee, 1995). Por otro lado, la curvatura de la membrana en las GUVs es similar a la que los fosfolípidos tienen en las células y tiene relevancia directa sobre las propiedades mecánicas de la membrana ya que curvaturas mayores como las que se observan en los modelos submicroscópicos alteran el empaquetamiento de fosfolípidos, modificando así sus propiedades físicas. Si el objetivo es acercarse más al comportamiento que las membranas tienen en los seres vivos, entonces las GUVs son el modelo de membrana de elección y es el que hemos elegido en este trabajo de tesis.

Una de las aplicaciones más interesantes de las GUVs es el trabajo de investigación enfocado a preparar sistemas que presenten algunas de las funciones básicas de las células vivas. La primera demostración de una proteína funcional expresada dentro de vesículas gigantes fue reportada en el 2003 por Nomura y colaboradores. También se ha reportado la realización de una cascada genética de dos pasos y la replicación de ARN y ADN (Kurihara, Tamura, Shohda, Toyota, Suzuki, & Sugawara, 2011) dentro de una GUV. Otros autores han podido fabricar GUVs capaces de sintetizar proteína verde fluorescente durante aproximadamente cuatro días a la vez de expresar  $\alpha$ -hemolisina para permeabilizar la membrana del liposoma. Además de estos esfuerzos también se han reportado GUVs con proteínas de membrana y proteínas de citoesqueleto. En un estudio se llegó incluso a observar la translocación de proteínas de membrana desde el interior de la GUV hasta su membrana por medio de SUVs acarreadoras, en analogía al proceso celular del aparato de Golgi (Richmond, M.Schmid, Martens, Stachowiak, Liska, & Fletcher, 2011). El objetivo final de este fascinante campo de estudio es el de sintetizar una célula viva completamente funcional a partir de sus constituyentes moleculares (Walde, Cosentino, Engel, & Stano, 2010).

El trabajo con estructuras de surfactante visibles al microscopio se remonta desde 1911 cuando Otto Lehmann describió micrografías de túbulos proyectándose en las orillas de capas de fosfolípido que habían sido hidratadas. Lehmann describió a su vez estructuras vesiculares en sus muestras a las que denominó “*kunstliche Zellen*” (células artificiales). El trabajo en este campo permaneció prácticamente silente hasta que fue revitalizado en los años 60 por Alec Bangham y es por ello que los liposomas fueron denominados inicialmente como “*bangosomas*”. Fue Bangham el primero en reconocer que estas vesículas separaban un compartimento acuoso interno de la fase acuosa en bulto, por medio de una barrera semipermeable (i.e. la bicapa lipídica) (Menger & Gabrielson, 1995). Es por ello que el interés científico en las moléculas de lípido no yace en su estructura molecular individual, sino en su forma agregada. Es esta forma organizada la que es omnipresente en los sistemas vivos y que presenta valores definidos de capacitancia, resistencia y permeabilidad (Mueller, Chien, & Rudy, 1983).

Existen ligeras variaciones dependiendo del lípido utilizado, pero en general una GUV de 40 micras de diámetro tiene un volumen interno de 34 picolitros y aproximadamente  $1.4 \cdot 10^{10}$  moléculas de fosfolípido en su bicapa (Menger & Angelova, 1998). Es por su capacidad volumétrica que se ha propuesto utilizarlas como: a) microreactores, b) modelos de estudio de microcompartimentación y amontonamiento celular, c) microrecipientes de cristalización proteica. El interior puede modificarse fácilmente mediante técnicas de microinyección (Bucher, Fischer, Luisi, Oberholzer, & Walde, 1998) y es por ello que al igual que sus contrapartes submicroscópicas, las GUVs han sido propuestas como medio de distribución farmacológica. Sin embargo, su aplicación principal continúa siendo el estudio de las propiedades mecánicas y reológicas de modelos de membrana de lípido puro o membranas mixtas al igual que la investigación de interacciones entre bicapas (Dimova, Aranda, Bezlyepkina, Nikolov, Riske, & Lipowsky, 2006).

Al considerar vesículas para estudios biofísicos debe distinguirse entre dos tipos de propiedades: a) propiedades colectivas características para cada vesícula en la muestra que dependen en la composición lipídica y el estado termodinámico de la

membrana como lo son la elasticidad de flexión, la elasticidad de expansión lateral y la viscosidad, b) propiedades individuales que se refieren por ejemplo a los parámetros geométricos o de forma y curvatura espontánea en las bicapas de surfactante.

Es en base a la observación de vesículas gigantes y su respuesta a distintos tipos de perturbación como se han deducido las propiedades mecánicas y reológicas de sus membranas. Estas pueden deformarse por flexión, compresión, dilatación o estrés de corte. Los módulos que gobiernan estas deformaciones son la elasticidad de flexión, el módulo de curvatura Gaussiana, el módulo de compresibilidad y el módulo de estrés tangencial (por definición, este último se iguala a cero en el caso de membranas en fase fluida).

El estado fluido de la membrana permite la difusión de inclusiones en ella a través de su superficie. La resistencia a este movimiento se caracteriza por la viscosidad tangencial, que puede ser descrita en base a la dilatación y compresión lateral de la membrana. Para describir totalmente a la bicapa es necesario considerar a su vez la fricción intermonocapa que existe al deslizarse una sobre la otra. El trabajo de tesis al que nos hemos enfocado se centrará en el estudio de uno de estos módulos, i.e. el de la constante elástica de flexión.

En el caso en el que exista asimetría en la composición de las monocapas se observará la presencia de una curvatura espontánea que marcará la dirección preferencial en la que la flexión de la membrana es energéticamente favorable. Esta asimetría en la composición puede ser una mera diferencia en el número de moléculas o la presencia de especies químicamente diferentes de fosfolípidos. La asimetría produce un gradiente en el perfil de presión lateral a través de la bicapa, que es homogeneizado con el movimiento de flexión. Esta homogeneización puede ocurrir también mediante el intercambio de moléculas entre las monocapas, pero este movimiento ocurre a escalas de tiempo mayores.

Cuando existe un exceso en el área total de la vesícula con respecto al que le correspondería para una esfera del mismo radio, se puede observar en el liposoma la aparición de fluctuaciones de su membrana que la desvían de la esfericidad. Las fluctuaciones son generadas por la energía térmica del medio en el que está suspendido el liposoma y son el objeto central de estudio para la técnica que utilizaremos en este trabajo.

Distintos trabajos con liposomas gigantes han intentado caracterizar los cambios morfológicos que se presentan con las transiciones de fase de los lípidos que forman la membrana de estas vesículas usando microscopía de fluorescencia confocal (Metso, Zhao, Tuunainen, & Kinnunen, 2005) o fluorescencia por dos fotones (Bagatolli & Gratton, 1999).

Las técnicas de observación de liposomas gigantes más utilizadas son la microscopía de contraste por interferencia diferencial y la microscopía por contraste de fases. A pesar de que el grosor de la bicapa lipídica (i.e.  $\approx 4$  nm) se encuentra por debajo del límite de resolución en microscopía óptica, es posible visualizar las vesículas gigantes debido a la diferencia entre los índices de refracción de la membrana y la fase acuosa, o en base a un cambio de fase en la luz difractada. Este último es el principio utilizado en la observación por contraste de fases.

Es común leer reportes en la literatura en los que se los liposomas son formados en soluciones de sacarosa para luego resuspenderse en soluciones de glucosa. El objetivo de esta diferencia en soluciones se debe a la asimetría en su índice de refrac-

ción, lo que conlleva al efecto de incrementar la diferencia entre el interior y el exterior del liposoma bajo el microscopio de contraste de fases.

Otra técnica de visualización incluye el uso de pequeñas cantidades (<1 mol%) de lípido fluorescente para la preparación de los liposomas de tal forma que su membrana pueda ser visualizada mediante técnicas de microscopía con fluorescencia. También pueden utilizarse moléculas fluorescentes encapsuladas dentro del liposoma lo que permite la realización de estudios sobre compartimentación. A pesar de que estas técnicas pueden revelar un mayor detalle sobre posibles defectos en la pared de los liposomas no son apropiadas para la espectroscopía por fluctuación debido a los elevados tiempos que se requieren para la adquisición de las imágenes. Las técnicas de fluorescencia para la observación de GUVs ha tenido su relevancia en investigaciones interesadas en el comportamiento de mezclas lipídicas capaces de formar dominios en la bicapa (i.e. balsas lipídicas), siendo que cada tipo de lípido puede estar acompañado de su marcador fluorescente individual, produciendo así liposomas con paredes coloreadas en diversas formas y patrones (Morales-Pennington, y otros, 2010). A su vez, se ha estudiado la exocitosis selectiva de estas balsas mediada únicamente por fosfolipasa A<sub>2</sub> (Staneva, Angelova, & Koumanov, 2004).

### 1.3.5 Electroformación de GUVs

Como ya se mencionó, el trabajo con GUVs permite realizar estudios de observación microscópica con una sola entidad individual macromolecular (i.e. el liposomas gigante). La desventaja que se deriva inmediatamente es la variabilidad inherente entre cada liposoma, lo que tiene todo el potencial de poner en peligro la reproducibilidad de las mediciones (Luisi, 1999). Los métodos de hidratación simple para la creación de GUVs producen una amplia dispersión de diámetros en la muestra final y uno de los métodos que ha mejorado esta situación es la electroformación de GUVs. Con este método se ha observado una mejoría importante en la calidad de la muestra, que se ha cuantificado con métodos de fluorescencia en el que se comparan directamente ambos métodos (Rodríguez, Pincet, & Cribier, 2005).

La inventora del método refiere que la idea inicial consistió en que un campo eléctrico externo pudiese afectar los procesos de formación, separación y flexión de la bicapa lipídica, debido a que puede alterar la formación de estructuras supramoleculares, modificar las fuerzas entre membranas, inducir su deformación y afectar la tensión de línea en las fronteras de los dominios lipídicos. Por otro lado, se puede ejercer un control preciso sobre la intensidad y dirección del campo (Angelova, 1999).

El método de electroformación de liposomas fue originalmente desarrollado tanto para cámaras planas paralelas como para cámaras cilíndricas, usando campos de corriente alterna. Aunque también se ha utilizado corriente directa, en donde la electroformación de fosfatidilcolina de huevo tiene lugar en el electrodo negativo (Okumura & Iwata, 2011).

A lo largo de los años se estableció que la formación vesicular de una amplia variedad de lípidos zwitteriónicos y mezclas de lípidos cargados, puede inducirse y controlarse mediante campos eléctricos externos aplicados durante la hidratación de las capas de lípido sobre la superficie de los electrodos. El tamaño, laminaridad y la cantidad de vesículas puede controlarse mediante el grosor de la capa inicial de lípido y los parámetros del campo aplicado. Aunque el método de electroformación supone



la formación de una gran cantidad de vesículas unilaminares existen reportes que sugieren que en realidad las vesículas son oligolaminares, teniendo en su mayoría menos de diez capas (Niri, Flatt, Fakhraai, & Forrest, 2010).

El 'set-up' originalmente publicado consiste en el dispositivo de electroformación y la fuente externa de voltaje. La técnica de microscopía utilizada fue el contraste de fases, equipada con un equipo de videomicroscopía. La fuente de voltaje que utilizaron podría administrar hasta 7 V de 0.1-50 Hz y estos parámetros fueron monitoreados mediante un osciloscopio o multímetro. El dispositivo de electroformación (i.e. la cámara) pudo ser de dos geometrías distintas; ya sea con dos cables paralelos que servían como electrodos, o con dos portaobjetos paralelos cubiertos de ITO.

Algunos estudios (Dimitrov, Li, Angelova, & Jain, 1984) han analizado el efecto que la composición de la superficie del electrodo tiene sobre la electroformación de liposomas (Berre, Yamada, Reck, Chen, & Baigl, 2008). Otros investigadores se han enfocado en analizar los efectos de las variaciones geométricas de los electrodos, encontrando que la formación se ve afectada cuando no existe un buen cubrimiento del campo por parte del contraelectrodo (Okumura & Oana, 2011). Por otra parte, un estudio observó cómo el uso continuo de electrodos con recubrimiento de ITO puede alterar la formación de liposomas, este efecto puede revertirse fácilmente mediante el calentado del electrodo a 150 C por 20 min, con lo que se recupera su capacidad para la electroformación (Herold, Chwastek, Schwille, & Petrov, 2012).

El protocolo original creado por la autora del método consiste en: a) depositar una capa de lípido sobre la superficie de uno de los electrodos, b) aplicar un campo eléctrico externo y llenar la cámara con la solución acuosa, c) guiar el crecimiento vesicular mediante el ajuste de los parámetros del campo.

El protocolo más utilizado ha sido el de campo eléctrico con corriente alterna y ha permitido la formación de liposomas con distintas combinaciones de surfactantes (Méléard, Bagatolli, & Pott, 2009), e incluso membranas biológicas a partir de 'fantasmas de eritrocitos' (Mikelj, Praper, Demič, Hodnik, Turk, & Anderluh, 2013). Aunque originalmente se determinó que la electroformación estaba limitada a soluciones acuosas de baja carga iónica con < 10 mM NaCl (Angelova & Dimitrov, 1988), estudios más recientes demuestran su formación en condiciones fisiológicas al incrementar la frecuencia del campo (Montes, Alonso, Goñi, & Bagatolli, 2007) o modificando la composición lipídica (Akashi, Miyata, Itoh, & Kazuhiko Kinoshita, 1996). Una alternativa consiste en utilizar capas de agarosa (Horger, Estes, Capone, & Mayer, 2009) o dextran-PEG (Mora, y otros, 2014) para contener el lípido previo a su hidratación, con lo que ya no fue necesario utilizar el campo eléctrico. Otros autores han observado que la deposición de las capas de lípido directamente sobre la superficie del electrodo no es realmente necesaria (Okumura, Zhang, Sugiyama, & Iwata, 2007) y han utilizado mallas entre los electrodos como alternativa para la deposición (Okumura & Sugiyama, 2011).

La elección del solvente orgánico que se utiliza para la deposición inicial de lípido puede afectar la calidad de las GUVs ya que tiene un fuerte impacto sobre la estructura de las capas del lípido que quedan sobre el sustrato (Seul & Sammon, 1990). Originalmente se reportó la utilización de cloroformo, o alguna de sus mezclas con metanol y dietil éter. La autora del método refiere que la mezcla de dos solventes es eficiente cuando se utilizan lípidos neutros o zwitteriónicos, mientras que al usar lípidos cargados es mejor utilizar mezclas de tres solventes. Las concentraciones de

lípidos finales van de 0.2-1.6 mg ml<sup>-1</sup>. Sin embargo, refiere que depende del experimentador establecer la mejor mezcla de solvente a utilizar, así como la concentración total de lípido para cada caso particular, a lo que la temperatura ambiente también puede alterar los parámetros.

Un estudio posterior demostró que el uso de solventes orgánicos para la deposición inicial del lípido puede evitarse, utilizando en su lugar soluciones acuosas de SUVs o LUVs, lo que resultó conveniente en el caso de la formación de proteoliposomas, y es el método que utilizamos en nuestro trabajo con el fin de garantizar la ausencia de contaminación por parte del solvente. En este trabajo se observa incluso que la formación de GUVs a partir de soluciones acuosas mejora la generación de liposomas debido a un preordenamiento de las bicapas de lípido al evaporarse la solución (Pott, Bouvrais, & Méléard, 2008). A su vez, se ha demostrado que es conveniente mantener cierta hidratación de la capa lipídica, sobre todo cuando se utiliza colesterol en la mezcla, lo que evita la formación de cristales (Baykal-Caglar, Hassan-Zadeh, Saremi, & Huang, 2012).

En su protocolo la inventora de la electroformación reporta la deposición de 1 µl de solución de lípido en cada uno de los dos cables de platino (800 micras de diámetro, con 3 - 5 mm de separación entre ellos), que posteriormente se deja secar bajo nitrógeno o en el vacío por 30 minutos. Para el modelo de placas paralelas se depositan gotas de 2.5 - 5 µl en el portaobjetos cubierto de ITO, en donde la separación entre placas va de 0.3 - 3 mm. Posteriormente se aplica un campo de 10 Hz y 200 mV, añadiendo la solución acuosa a la cámara cuidando que no exista agitación o perturbación de la muestra. Posteriormente se incrementa el voltaje hasta 1-7 V durante 15 min con lo que se obtienen las GUVs después de aproximadamente 120 minutos. Una vez obtenidas las GUVs se procede a reducir la frecuencia a 500 mHz durante 1 minuto, lo que permite madurar las vesículas y separarlas de los electrodos. Finalmente se reduce paulatinamente el voltaje hasta llevarlo a cero. La ventaja de utilizar dispositivos de electroformación es que el proceso puede llevarse a cabo bajo la supervisión del experimentador bajo el microscopio.

Debido a que el protocolo de electroformación involucra el secado inicial de una deposición de lípido, inicialmente se trabajó con membranas puras de lípido. Trabajos posteriores han demostrado la reconstrucción de proteínas de membrana utilizando capas de lípido parcialmente deshidratadas en lugar de secarlas totalmente, con lo que es posible formar GUVs con estas proteínas en su pared (Girard, Pécéréau, Lenoir, Falson, Rigaud, & Bassereau, 2004). Otros trabajos exponen la fusión de LUVs o SUVs que lleven la proteína de interés con las GUVs de lípido puro como alternativa para formar proteoliposomas (Tsumoto, Kamiya, & Yoshimura, 2006).

En nuestra experiencia con la electroformación, encontramos que casi todos los parámetros del protocolo pueden variarse libremente sin alterar demasiado la formación de los liposomas. Algunos trabajos se han dedicado en estandarizar los parámetros para diversos tipos de lípidos (Fischer, Luisi, Oberholzer, & Walde, 1999). En ellos, se reportan límites superiores de 10 V/mm para la fuerza del campo y de 10 kHz para su frecuencia, con la observación de que la distribución de tamaños se vuelve más angosta con diámetros vesiculares menores conforme se incrementa la frecuencia del campo (Politano, Froude, Jing, & Zhu, 2010). También existen trabajos con electrodos interdigitados en los que se reporta el ajuste de parámetros apropiado para estas geometrías (Bi, Yang, Wang, Cao, & Han, 2013).

En nuestra opinión el parámetro más importante para obtener una mayor calidad en la muestra (i.e. baja dispersión de tamaños, unilaminaridad de liposomas, etc.), es el control preciso de la deposición inicial de lípido, y es por ello que hemos dedicado la mayoría del esfuerzo en el trabajo experimental de esta tesis a controlar ese parámetro. Aunque en la literatura se reportan distintas técnicas para alcanzar este objetivo (Diguët, Berre, Chen, & Baigl, 2009), elegimos utilizar técnicas reportadas de impresión por micro contacto (L. Wilbur, Kumar, Biebuyck, Kim, & Whitesides, 1996), haciendo uso de sellos de PDMS (Taylor, Xu, Fletcher, & Paunov, 2003) fabricados mediante litografía suave (Xia & Whitesides, 1998). Con este método fue posible crear arreglos ordenados de vesículas gigantes con una mejor uniformidad de tamaños como los que han fabricado diversos autores (Kang, Wostein, & Majd, 2013) y con los que se han producido también bicapas de lípido con proteínas (Majd & Mayer, 2008). A pesar de que algunos reportes referían el uso de sellos de hidrogel (Majd, Estes, & Mayer, 2006) argumentando que tienen la capacidad de alojar el lípido entre sus poros (Pernodet, Maaloum, & Tinland, 1997), el PDMS nos brindó mucha mejor estabilidad mecánica (Taylor, Xu, Fletcher, & Paunov, 2003).

Otros autores han reportado buenos resultados utilizando una deposición mediante dispositivos giratorios que permiten un mayor control sobre el grosor final de la bicapa de lípido. Sin embargo, los liposomas crecen de cualquier forma en posiciones aleatorias sobre el portaobjetos (Estes & Mayer, 2005). Una alternativa más para la deposición de lípido en forma de arreglos ordenados fue reportada con el uso de una técnica de deposición mediante una máscara de poliparaxilileno (Parylene), en donde se evidenció el proceso de fusión vesicular que el campo eléctrico es capaz de llevar a cabo (Kuribayashi, Utada, & Takeuchi, 2008).

La inventora de la electroformación reporta que los liposomas formados con su método, suelen tener tamaños que van de 5 a 200 micras de diámetro, aunque en nuestra experiencia con DMPC los liposomas se tornan bastante inestables al superar las 130 micras de diámetro. Inicialmente los liposomas se encuentran adheridos a la superficie sobre la que se hizo la deposición inicial de lípido mediante un filamento o cordón de lípido, que es continuo con la bicapa del liposoma y que puede observarse bajo microscopía de contraste de fases. Estudios posteriores han demostrado que el interior del liposoma tiene continuidad con la solución acuosa en bulto a través de este cordón de lípido (Estes & Mayer, 2005) y que el empaquetamiento de fosfolípidos en estos cordones es similar al de la membrana de las vesículas (Bagatolli, Parasassi, & Gratton, 2000).

La tensión de la membrana de la GUV depende de la cinética de su formación. Puede controlarse hasta cierto punto mediante los parámetros del campo. Altas amplitudes de oscilación electro-osmótica pueden producir un exceso de área en la bicapa, con lo que se obtienen liposomas fluctuantes o ‘flácidos’, aunque otros autores han utilizado cambios de soluciones con el fin de ejercer un estrés osmótico en los liposomas para dejarlos flácidos (Peterlin & Arrigler, 2008). Si no se sigue ningún régimen particular de electroformación, las vesículas nacen tensas, y en un lapso de horas se relajan para comenzar a fluctuar (Mathivet, Cribier, & Devaux, 1996). Si es necesario obtener GUVs bien aisladas la suspensión debe retirarse de la cámara de formación. También pueden extraerse de forma individual mediante el uso de una micropipeta o llevando la muestra de GUVs a la fase gel, con lo que suelen romperse los cordones que las sujetan de la superficie.

La inventora de la electroformación describe por lo menos siete posibles mecanismos para el efecto del campo sobre la hidratación del lípido y formación de liposomas gigantes:

- 1) Interacciones electroestáticas directas entre los electrodos y las bicapas de lípido
- 2) Esfuerzos mecánicos inducidos electro-osmóticamente
- 3) Redistribución de la doble capa de contraiones entre las bicapas
- 4) Reducción de la tensión de superficie y tensión de línea de la membrana
- 5) Reacciones electro-químicas
- 6) Inyección de carga desde los electrodos
- 7) Reorientación y redistribución lateral de moléculas de lípido, efecto flexoeléctrico inverso

Al analizar la lista sólo puede concluirse que el mecanismo de electroformación no se entiende del todo. Sin embargo, diversos estudios apuntan a que el paso más importante es una repulsión inicial entre las capas, que permita la rápida hidratación y consecuente formación de las vesículas (Akashi, Miyata, Itoh, & Kazuhiko Kinoshita, 1998). Otro componente vital es que la hidratación se lleve a cabo por arriba de la temperatura de transición del lípido o la mezcla de lípidos utilizada (Angelova & Dimitrov, 1987), este componente se encuentra directamente relacionado con la separación entre capas, ya que las fuerzas de ondulación ocurren únicamente en la fase fluida (Shimanouchi, Umakoshi, & Kuboi, 2009).

De forma personal consideramos que el mecanismo más probable consiste en que el efecto inicial del campo eléctrico sea el de redistribuir la doble capa de contraiones que apantalla las cargas entre las capas y que elimina la repulsión intrínseca entre sus grupos polares (Angelova & Dimitrov, 1986). Esta deducción se puede derivar en base a observaciones en donde se ha experimentado con fosfolípidos cargados y campos de corriente directa (Dimitrov & Angelova, 1987), en diferentes combinaciones con respecto a la deposición de lípido en el cátodo o en el ánodo (Dimitrov & Angelova, 1988). Sin embargo, un reporte parece presentar información contradictoria ya que se llevó a cabo la formación de GUVs de SOPC en PBS únicamente mediante vibraciones mecánicas de la muestra sin observar formación en el control negativo sin vibración (Pavlič, Genova, Popkirov, Kralj-Iglič, Iglič, & Mitov, 2011).

Dentro del esquema general de formación se entiende que son movimientos periódicos electro-osmóticos dirigidos de forma perpendicular a la superficie del electrodo los que hacen vibrar las bicapas de lípido separándolas de sus vecinas con lo que se obtienen las primeras vesículas de entre 10-20 micras de diámetro. Posteriormente, estas vesículas comienzan a hacer contacto con otras similares y la presencia del campo alternante induce inestabilidades en la zona de contacto entre sus membranas, lo que promueve la fusión de estas pequeñas vesículas hasta obtener los tamaños de GUVs que se observan en las muestras (Angelova M. I., Soléau, Méléard, Faucon, & Bothorel, 1992). Trabajos de electrofusión con otros modelos de membranas han permitido especular que estas inestabilidades en la zona de contacto sean poros de fusión a través de los cuales se genera la unión de las membranas (Riske, Bezlyepkina, Lipowsky, & Dimova, 2006).

Reportes anteriores a la invención de la técnica de electroformación ya han habido hablado sobre la fusión de vesículas observables al microscopio mediante el uso de campos eléctricos aunque utilizando intensidades y frecuencias mucho mayores (Büschl, Ringsdorf, & Zimmermann, 1982). Otros han presentado incluso dispositivos en los que se puede realizar la electrofusión controlada de las vesículas con diferentes composiciones (Strömberg, Karlsson, Ryttsén, Davidson, Chiu, & Orwar, 2001).

Otros reportes que han hablado acerca del efecto de campos eléctricos sobre liposomas gigantes refieren que a altas frecuencias las vesículas se deforman en esferoides oblatos con su eje de simetría paralelo al campo, mientras que a bajas frecuencias se deforman en esferoides prolato, siendo la conductividad del medio la que determina la frecuencia de transición entre ambas deformaciones (Mitov, Méléard, Winterhalter, Angelova, & Bothorel, 1993).

El uso de técnicas de microfluídica también se ha aplicado al método de electroformación, con lo que en general se han obtenido mejores resultados y control sobre las muestras (Wang, y otros, 2013). Aunque los parámetros deben ajustarse para adaptarse a las dimensiones que se utilizan en estos dispositivos (Kuribayashi, Tresset, Coquet, Fujita, & Takeuchi, 2006).

## 1.4 Estudios de elasticidad en membranas

### 1.4.1 Primeros reportes

La elasticidad de flexión es la propiedad mecánica que caracteriza la habilidad de la membrana para deformarse en presencia de esfuerzos mecánicos que actúan sobre ella (Méléard & Pott, 2013). El primer reporte de la determinación del módulo elástico de curvatura (elasticidad de flexión) en membranas lipídicas (lecitina de huevo), fue reportado hace casi 40 años. En esta primer aproximación se obtuvo un valor de  $2.3 \pm 0.3 \cdot 10^{-18}$  J utilizando vesículas tubulares de lípido (Servuss, Harbich, & Helfrich, 1976).

Desde entonces se han emitido diversos reportes que han variado en la magnitud de la constante aunque siempre se han mantenido en el orden de diez veces  $k_B T$  (Dimova, Aranda, Bezlyepkina, Nikolov, Riske, & Lipowsky, 2006). Su pequeña magnitud es entendible al conocer que la membrana está compuesta únicamente por una bicapa molecular de fosfolípido, por lo que su grosor se encuentra en el orden nanométrico. A pesar de que este fue el primer trabajo en reportar un valor para la constante, la investigación sobre la elasticidad en membranas comenzó realmente con el trabajo que analizó los patrones de fluctuación de luz transmitida a través de la región central del eritrocito (Brochard & Lennon, 1975).

Otros autores han reportado la modificación de la constante en base a la incubación de las vesículas sobre las que fue medida, tentativamente debido a la degradación lipídica que es capaz de generar lisolípidos. También se ha reportado su modificación al adicionar distintas sustancias, entre ellas colesterol (Angelova, Soléau, Méléard, Faucon, & Bothorel, 1992).

## 1.4.2 Técnicas de medición

El trabajo a lo largo de los años ha llegado al consenso de que las membranas biológicas poseen una elevada elasticidad de flexión pero a su vez muy baja compresibilidad lateral. Diversos métodos se han desarrollado para cuantificar con precisión estos parámetros. En general se pueden clasificar en cuatro grupos (Dimova, 2014):

- Métodos basados en el análisis de fluctuaciones térmicas en la membrana de vesículas gigantes
- Métodos que miden la fuerza para deformar la membrana directamente con el uso de micropipetas, pinzas ópticas, campos eléctricos o magnéticos y luz
- Métodos basados en técnicas de difracción
- Métodos de simulación de dinámica molecular

El método más popular es precisamente el que fue utilizado para realizar las primeras mediciones de esta constante. A la fecha se considera el método de elección y también se le conoce como espectroscopía de fluctuación. El método se basa en coleccionar imágenes secuenciales de las fluctuaciones de la membrana observadas en vesículas mediante microscopía óptica. Estas desviaciones morfológicas son determinadas mediante análisis de imágenes, lo que permite la estimación del parámetro elástico de interés.

Una clara ventaja de este método es que no requiere de moléculas reporteras (e, g, deuterio, sondas fluorescentes) por lo que se mantiene un control sobre la homogeneidad en la composición del sistema. Teniendo en cuenta que las vesículas se encuentran en fase fluida y que su tensión de membrana es baja, todas ellas exhibirán estas fluctuaciones en su pared como consecuencia de la perturbación térmica del medio.

Este método ha sido trabajado de forma extensa a través de los años, refinando cada vez más los parámetros experimentales y teóricos que conllevan a mejorar su precisión y darle robustez. Los detalles completos del método serán descritos más adelante ya que es el que hemos seleccionado para este trabajo.

La categoría de métodos que utilizan deformación mecánica directa es por mucho la más amplia de todas. El uso de tensión mecánica vía succión con micropipeta de vidrio permite la estimación de la tensión de membrana a la vez que la constante elástica de flexión. Esta última puede ser calculada en base a la pendiente en la curva de dilatación de área en función del logaritmo de la tensión de membrana en el régimen de baja tensión de membrana (también conocido como régimen de tensión entrópica). Esta técnica permite el cálculo de la constante elástica de flexión porque en este régimen, la presión de succión con la micropipeta únicamente “aplana” las ondulaciones de la membrana y es este exceso de superficie el que se proyecta hacia su interior. Una dilatación real en la superficie de la membrana ocurre únicamente en niveles de tensión mayor a  $\approx 0.1 \text{ dyn cm}^{-1}$ . El uso de fluorescencia le da una mayor precisión a esta técnica ya que es necesario medir la longitud de la vesícula que queda aspirada dentro de la pipeta.

Otro método en esta categoría hace uso de un campo eléctrico alternante aplicado sobre la vesícula de lípido, y su deformación es registrada para estimar el módu-

lo elástico. De forma tradicional, se eligen condiciones de conductividad que permitan una elongación de la vesícula de forma paralela a la dirección del campo por lo que no ha sido utilizado en vesículas de especies cargadas de lípido.

Estos dos métodos de deformación directa suelen generar subestimaciones de la constante elástica (con respecto a las obtenidas con espectroscopía de fluctuación). Se cree que el origen de la discrepancia se debe a que si bien la membrana se considera incompresible, existe cierto grado de estiramiento lateral en su superficie que altera las mediciones con estos métodos. En base a esta asunción se han implementado factores de corrección en los cálculos para compensar las discrepancias. Otro factor a tomar en cuenta es la solución en la que están suspendidas las vesículas ya que se sabe que el uso de sacáridos puede reducir el valor de la constante elástica (Dimova, 2014).

Otra forma de modificar a la vesícula directamente consiste en extraer de ella cordones de lípido que se desprenden fácilmente de su pared, y que consisten en secciones cilíndricas de la bicapa que son continuas con la vesícula. Este cordón puede extraerse con el uso de microesferas ancladas a la pared de la vesícula, con el uso de pinzas ópticas o mediante manipulación electromagnética. El radio del cordón puede ser estimado teniendo en cuenta la invariabilidad en el área total de superficie de la vesícula y en su volumen. La constante elástica se calcula entonces en base a la relación entre la longitud del cordón y la fuerza axial aplicada para generarlo.

Entre los métodos que se han desarrollado para calcular la constante elástica en vesículas que se encuentran en fase gel se puede enlistar la dinamometría óptica que se basa en deformar la membrana lipídica al desplazar dos microesferas ancladas a su pared con el uso de pinzas ópticas. Las microesferas son desplazadas de forma tal que la membrana presenta una deformación fuera de su plano original ya que las microesferas hacen contacto con la membrana únicamente en un punto cada una. Otro método consiste en medir la deformación de la vesícula mediante microscopía confocal, una vez que se aplica una fuerza óptica con el uso de dos haces de luz láser (microscopía confocal diferencial).

Para los métodos basados en difracción se han utilizado las técnicas de difracción difusa de raios X en bicapas múltiples de lípido; eco de spin de neutrón y dispersión dinámica de luz en vesículas unilaminares y reflexión de rayos X y de neutrones en bicapas flotantes. La autora de la revisión en la que se clasifican estos métodos hace hincapié en que no se ha determinado el efecto que tenga el uso de deuterio en estas mediciones (Dimova, 2014).

Finalmente, el uso de simulaciones de dinámica molecular ha hecho uso tanto de modelos atómicos como de modelos de grano grueso. El método más común se basa en muestrear la altura del espectro de fluctuaciones en una bicapa sin tensión, simulada en base a las trayectorias de dinámica molecular. Otros métodos incluyen simular la respuesta a una fuerza aplicada para deformar la membrana o para sostener un cordón tubular de membrana lipídica (tratando de imitar el método experimental análogo).

### **1.4.3 Teoría de cristales líquidos y energía elástica**

Como puede observarse en la literatura, el trabajo en elasticidad se ha basado en el uso de modelos artificiales de membranas biológicas (membranas de lípido puro),

teniendo de esta forma un mejor control sobre las variables a analizar. Dentro de estos modelos el favorito ha sido por mucho el de la vesícula unilaminar gigante ya que poseen diversas características favorables y será el modelo de elección para nuestro trabajo.

Las membranas biológicas y sus modelos están compuestos fundamentalmente por moléculas de surfactante denominadas fosfolípidos. Estas moléculas se ordenan de forma espontánea cuando están inmersas en una fase acuosa. Los fosfolípidos se ordenan en forma de membranas bimoleculares (i.e. bicapas lipídicas), que separan compartimentos acuosos del agua en bulto. Cada molécula de fosfolípido presenta una región hidrofóbica en un extremo, y una región hidrofílica en el otro. Es esta estructura anfifílica del surfactante la responsable de su ordenamiento espontáneo y es por ello que se han estudiado en el campo de los cristales líquidos.

Los fosfolípidos muestran mesomorfismos termotrópicos fundamentalmente determinados por la saturación de las cadenas hidrocarbonadas en su región hidrofóbica (i.e. colas acílicas). Moléculas con insaturaciones en sus colas presentan puntos de fusión a menor temperatura que la de sus contrapartes saturadas. Es en base a la relación que guardan estos mesomorfismos (fase fluida y fase gel) con las moléculas anestésicas, en la que se asienta el argumento central de esta tesis.

Las moléculas protagónicas de nuestro trabajo presentan a su vez mesomorfismos liotrópicos, sin embargo, una vez superada la concentración micelar crítica (que suele encontrarse en el orden micromolar para fosfatidilcolinas) las moléculas se organizan en la mesofase esméctica aquí estudiada (i.e. bicapas lipídicas), la cual mantiene su estabilidad a pesar de un elevado incremento en la concentración del fosfolípido. Es hasta los límites superiores de molaridad lipídica en el que se presentan los mesomorfismos hexagonales y otros que no son de nuestro interés.

Un parámetro de interés en el estudio de la fase esméctica es el espaciado intermembranoso. Sabiendo que el grupo hidrofílico de los fosfolípidos puede presentar carga neta es de esperarse que esto modifique el espaciado entre las bicapas. Si existen sales iónicas disueltas en la fase acuosa sobre la que está disperso el fosfolípido, entonces es posible observar el apantallamiento de estas cargas y por lo tanto reducir el espaciado entre las membranas. De esta forma nos acercáramos cada vez más al estado observado en fosfolípidos zwitteriónicos sin carga neta. La relevancia de este parámetro se aprecia con claridad en el contexto de la electroformación de liposomas gigantes (Bangham, 1968).

Considerando a la membrana lipídica como una capa infinitamente delgada tal como ha sido descrita en la literatura (Safran, 1999), se tiene que el estado mecánico de un elemento de membrana puede caracterizarse completamente conociendo su área y curvaturas principales (Genova, 2013).

La ecuación para la densidad energética elástica por unidad de área  $F_c$ , fue descrita previamente (Helfrich, 1973):

$$F_c = \frac{k_c}{2} (c_1 + c_2 - c_0)^2 + \bar{k}_c c_1 c_2$$

En esta descripción se hace uso de la constante elástica de flexión cilíndrica  $k_c$ , y la constante elástica de flexión Gaussiana  $\bar{k}_c$ , para describir la dependencia de esta densidad energética con respecto a las curvaturas principales  $c_1$  y  $c_2$ . Cada una definida



como el inverso del radio en direcciones ortogonales. La variable  $c_0$  se refiere a la curvatura espontánea de la membrana que presentan las membranas compuestas de distintos tipos de lípido en sus monocapas, debido a la geometría disímil de sus componentes. Al integrar la ecuación para obtener la energía elástica de la membrana cabe notar que el segundo término se vuelve constante para superficies cerradas.

Cada punto en el liposoma puede describirse en coordenadas esféricas  $(r, \theta, \varphi)$  de la siguiente forma (Genova, 2013):

$$x = R[1 + u(\theta, \varphi, t)] \sin(\theta) \cos(\varphi)$$

$$y = R[1 + u(\theta, \varphi, t)] \sin(\theta) \sin(\varphi)$$

$$z = R[1 + u(\theta, \varphi, t)] \cos(\theta)$$

Llamado  $x$ ,  $y$ , y  $z$  a las coordenadas Cartesianas del punto. Las funciones  $x_0(t)$ ,  $y_0(t)$  y  $z_0(t)$  describen el movimiento Browniano del centro de masa del liposoma y tienen dependencia temporal  $t$ . La variable  $R$  es el radio de una esfera perfecta que tiene el mismo volumen que el liposoma y la función  $u(\theta, \varphi, t)$  representa las desviaciones de la esfericidad en el tiempo (i.e.  $\langle u(\theta, \varphi, t) \rangle = 0$ ) tomando a  $\theta$  y  $\varphi$  como ángulo polar y azimutal respectivamente y asumiendo que  $|u(\theta, \varphi, t)| \ll 1$ .

El volumen  $V\{u\}$  del liposoma se obtiene como la integral de la función de densidad volumétrica a lo largo de los ángulos ( $0 \leq \theta \leq \pi, 0 \leq \varphi \leq 2\pi$ ):

$$V\{u\} = \oint V(u) d\theta d\varphi$$

$$V(u) = R^3 \left( \frac{1}{3} + u + u^2 \right) \sin\theta$$

De igual forma se calcula el área  $S\{u\}$  de la vesícula como la integral de la función de densidad superficial a lo largo de todos los ángulos:

$$S\{u\} = \oint S(u, u_\theta, u_\varphi) d\theta d\varphi$$

en donde  $u_\theta$  y  $u_\varphi$  son derivadas parciales y  $S(u, u_\theta, u_\varphi) = R^2 \left[ 1 + 2u + u^2 + \frac{1}{2} \left( u_\theta^2 + \frac{u_\varphi^2}{\sin^2\theta} \right) \right] \sin\theta$ .

Teniendo en cuenta que el liposoma es prácticamente impermeable al agua y los iones disueltos en ella, además de que el agua es incompresible, tenemos que podemos considerar que el volumen del liposoma como constante en el tiempo, por lo que:

$$\oint V(u) d\theta d\varphi = V_0$$

$$V_0 = \left( \frac{4\pi}{3} \right) R^3$$

A su vez, se considera que el área de la membrana del liposoma es constante ya que el módulo de expansión lateral es bastante elevado:

$$\oint S(u, u_\theta, u_\varphi) d\theta d\varphi = S_0$$

$$S_0 = 4\pi R^2(1 + s)$$

en donde  $s$  se refiere al exceso de superficie con respecto a una esfera del mismo volumen que el liposoma.

Cuando el liposoma se encuentra suspendido en una fase acuosa, presenta fluctuaciones morfológicas como resultado de las perturbaciones térmicas en el medio (Genova, 2013). Estas fluctuaciones son desviaciones alrededor del estado de equilibrio. Para determinar la forma del liposoma en cada momento, es necesario descomponer la función  $u(\theta, \varphi, t)$  en una parte estática de equilibrio en el tiempo  $u_0(\theta, \varphi)$  y una parte dinámica  $\delta u(\theta, \varphi, t)$  de forma que:

$$\langle u(\theta, \varphi, t) \rangle = u_0(\theta, \varphi) \Rightarrow \langle \delta u(\theta, \varphi, t) \rangle = 0$$

Al minimizar la función de energía elástica obtendremos entonces la forma de equilibrio y para lograrlo, se transforma el funcional  $F_c\{u\}$  que tiene las condiciones de volumen y área constantes a un nuevo funcional  $F\{u\}$  sin condiciones, utilizando  $\sigma$  (tensión superficial) y  $\Delta p$  (diferencia de presión hidrostática dentro y fuera del liposoma) como multiplicadores de Lagrange:

$$F\{u\} = F_c\{u\} + \sigma S\{u\} - \Delta p V\{u\}$$

Si la función  $u_0$  minimiza el funcional  $F\{u\}$ , entonces su primera variación  $\delta F\{u_0, \delta u\}$  será igual a cero para todas las pequeñas perturbaciones  $\delta u$  alrededor de la forma de equilibrio dada por  $u_0$ . De tal forma que la ecuación que describe la forma de equilibrio en la forma de la membrana sería:

$$\delta F\{u_0, \delta u\} = \delta F_c\{u_0, \delta u\} + \sigma \delta S\{u_0, \delta u\} - \Delta p \delta V\{u_0, \delta u\} = 0$$

Si la función  $u_0$  cumple la ecuación anterior entonces es una solución para la ecuación de Euler-Lagrange para el funcional correspondiente, aunque también lo serán las funciones que describan un máximo en la energía elástica. Por lo tanto se procede a analizar la segunda variación del funcional  $F\{u\}$  para identificar solamente el mínimo de energía:

$$\delta^2 F\{u_0, \delta u\} = \delta^2 F_c\{u_0, \delta u\} + \sigma \delta^2 S\{u_0, \delta u\} - \Delta p \delta^2 V\{u_0, \delta u\} \geq 0$$

Debido a que la segunda variación del funcional es en realidad una forma cuadrática de las perturbaciones  $\delta u$  y sus derivadas ( $\delta u_\theta, \delta u_\varphi, \delta u_{\theta\theta}, \delta u_{\varphi\varphi}$ ) con coeficientes que dependen de  $u_0$ , se presenta de la siguiente forma:

$$\delta^2 F\{u_0, \delta u\} = \frac{k_c}{2} \int \delta u [\hat{L}\{u_0\} \delta u] d\theta d\varphi$$

en donde  $\hat{L}\{u_0\}$  es un operador lineal diferencial que actúa sobre las perturbaciones  $\delta u(\theta, \varphi, t)$  con coeficientes que dependen de la función  $u_0(\theta, \varphi)$ .

Resulta conveniente expandir la perturbación en una serie de eigenfunciones del operador  $\hat{L}\{u_0\}$ , resolviendo la ecuación  $\hat{L}\{u_0\}\delta u = \lambda\delta u$ . En la aproximación cuadrática, la dependencia del operador con respecto a  $u_0$  se desvanece, y la ecuación para los eigenvalores que se obtiene es:

$$\nabla^2(\nabla^2\delta u) + (2 - \bar{\sigma})\nabla^2\delta u + 2(\bar{\sigma} - \bar{p})\delta u = \lambda\delta u$$

usando  $\bar{\sigma}$  y  $\bar{p}$  como los valores efectivos de tensión superficial y presión de la membrana respectivamente. Las eigenfunciones de esta ecuación son los armónicos esféricos  $Y_n^m(\theta, \varphi)$ :

$$Y_n^m(\theta, \varphi) = (-1)^m \sqrt{\frac{2n+1(n-m)!}{4\pi(n+m)!}} P_n^m(\cos\theta) e^{im\varphi}$$

en donde  $P_n^m$  se refiere a los polinomios de Legendre del primer tipo con orden  $m$  y grado  $n$ . Los eigenvalores correspondientes son:

$$\lambda_n(\bar{\sigma}, \bar{p}) = n^2(n+1)^2 - (2 - \bar{\sigma})n(n+1) + 2(\bar{\sigma} - \bar{p})$$

Para calcular  $\delta u$  lo expandimos en una serie de armónicos esféricos  $Y_n^m(\theta, \varphi)$ . En la sumatoria sólo se incluyen los modos con grado menor que  $n_{max} = \sqrt{N}$  ( $N$  es el número de moléculas de fosfolípido en la membrana) para la expansión, debido a la estructura discreta del liposoma. El valor  $n_{max}$  se elige de forma que el número de amplitudes independientes es igual al número de moléculas de lípido (el orden  $m$  varía desde  $-n$  hasta  $n$ ). Aunque su valor exacto no es tan importante ya que los parámetros físicos dependen de su logaritmo.

Usando las eigenfunciones tenemos que:

$$\delta u(\theta, \varphi, t) = \sum_n \sum_m U_n^m(t) Y_n^m(\theta, \varphi)$$

en donde  $U_n^m(t)$  son los coeficientes dependientes del tiempo en la expansión en esféricos armónicos.

Tomando en cuenta la ortogonalidad de los armónicos esféricos y el hecho de que  $\langle \delta u \rangle = 0$ , se concluye que  $\langle U_n^m(t) \rangle = 0$ , lo que nos permite calcular la segunda variación de la energía:

$$\frac{1}{2} \delta^2 F = \frac{k_c}{2} \sum_{n=2}^{n_{max}} \lambda_n(\bar{\sigma}, \bar{p}) \sum_{m=-n}^n |U_n^m(t)|^2$$

en donde se observa que la segunda variación de la energía es una suma de osciladores armónicos independientes, con energía media igual a  $k_B T/2$  ( $k_B$  es la constante de Boltzmann y  $T$  la temperatura absoluta), de acuerdo al teorema de equipartición de

energía. Al usar la ecuación anterior obtenemos el valor cuadrático medio para cada amplitud de cada modo de oscilación:

$$\langle |U_n^m(t)|^2 \rangle = \frac{k_B T}{k_c \lambda_n(\bar{\sigma}, \bar{\rho}), \quad n \geq 2}$$

Debido a la simetría esférica, el valor cuadrático medio no depende del orden del armónico. Conociendo ya los eigenvalores  $\lambda_n(\bar{\sigma}, \bar{\rho})$ , tenemos que la forma explícita del valor es (Miliner & Safran, 1987):

$$\langle |U_n^m(t)|^2 \rangle = \frac{k_B T}{k_c (n-1)(n+2)[\bar{\sigma} + n(n+1)], \quad n \geq 2}$$

Por lo tanto, el módulo elástico de flexión  $k_c$  puede calcularse al medir las amplitudes cuadráticas medias de los esféricos armónicos  $\langle |U_n^m(t)|^2 \rangle$ . El parámetro desconocido  $\bar{\sigma}$  (tensión superficial) debe elegirse de forma que la ecuación anterior sea independiente del grado  $n$ , y puede determinarse al medir experimentalmente dos o más modos de oscilación.

## 1.5 La espectroscopía por fluctuación

El método más directo para aplicar el modelo físico descrito en la sección anterior consiste en realizar un gran número de mediciones de las fluctuaciones morfológicas del liposoma  $U_n^m(t)$  a través del tiempo. Estas amplitudes describen la forma instantánea del liposoma utilizando los esféricos armónicos como funciones base adaptadas al estado cuasiesférico, y su determinación requeriría de una micrografía tridimensional instantánea; sin embargo, la microscopía confocal es incapaz de producir reconstrucciones tridimensionales con la rapidez suficiente como para ser aplicables en este contexto.

Es por ello que en su lugar, se utilizan imágenes videomicroscópicas de la sección ecuatorial de los liposomas gigantes. Esta porción del liposoma es suficiente tomando en cuenta que se adquiere el número suficiente de imágenes obteniendo así una visión estadísticamente relevante de las fluctuaciones del liposoma.

Aunque la espectroscopía de fluctuación se ha llevado a cabo utilizando microscopía por interferencia diferencial (Bivas, Hanusse, Bothorel, Lalanne, & Aguerre-Chariol, 1987), la técnica más común utilizada en la literatura es la microscopía por contraste de fases de Zernicke, en la que el contorno del liposoma se observa como una línea oscura delgada (4-8 píxeles de ancho) sobre un fondo gris. Este contorno es caracterizado mediante análisis de imágenes para determinar la posición de la membrana con la mayor precisión posible. El número de imágenes obtenidas de forma experimental se ha ido incrementando debido a las mejoras en la tecnología de videograbación, pasando de cientos de imágenes cuando se inició con la implementación del método a más de 10 mil imágenes en la literatura más reciente (Méléard P., Pott, Bouvrais, & Ipsen, 2011).

Al observar la sección ecuatorial ( $\theta = \frac{\pi}{2}$ ) de los liposomas gigantes con respecto al plano focal del microscopio tenemos que:

$$r(\theta, \varphi, t) = R \left[ 1 + u_0(\theta, \varphi) + \delta u \left( \frac{\pi}{2}, \varphi, t \right) \right]$$

Y usando los armónicos esféricos como funciones base:

$$r(\theta, \varphi, t) = R \left[ 1 + (A_0^0 U_0^0(t)) Y_0^0 + \sum_n \sum_m U_n^m(t) Y_n^m \left( \frac{\pi}{2}, \varphi \right) \right]$$

en donde la única contribución a  $u_0$  es un término constante  $A_0^0 Y_0^0$ , teniendo en cuenta que se trata de una forma cuasiesférica.

Posteriormente se hace uso de la función de autocorrelación angular  $\zeta(\gamma, t)$ , la cual se define como:

$$\zeta(\gamma, t) = \frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} u \left( \frac{\pi}{2}, \varphi, t \right) \check{u} \left( \frac{\pi}{2}, \varphi + \gamma, t \right) d\varphi$$

en donde la equis indica el complejo conjugado. Al utilizar la expansión con armónicos esféricos obtenemos:

$$\zeta(\gamma, t) = \frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} \sum_k \sum_l U_k^l(t) Y_k^l \left( \frac{\pi}{2}, \varphi \right) \sum_n \sum_m U_n^m(t) Y_n^m \left( \frac{\pi}{2}, \varphi + \gamma \right) d\varphi$$

que puede reordenarse como:

$$\zeta(\gamma, t) = \frac{1}{2\pi} \sum_k \sum_l \sum_n \sum_m U_k^l(t) U_n^m(t) \int_0^{2\pi} Y_k^l \left( \frac{\pi}{2}, \varphi \right) Y_n^m \left( \frac{\pi}{2}, \varphi + \gamma \right) d\varphi$$

Al integrar los armónicos esféricos tenemos:

$$\zeta(\gamma, t) = \sum_k \sum_n \sum_m U_k^m(t) U_n^m(t) Y_k^m \left( \frac{\pi}{2}, 0 \right) Y_n^m \left( \frac{\pi}{2}, \gamma \right)$$

Y al promediar la función de autocorrelación en el tiempo se obtiene:

$$\zeta(\gamma) = \langle \zeta(\gamma, t) \rangle = \sum_k \sum_n \sum_m \langle U_k^m(t) U_n^m(t) \rangle Y_k^m \left( \frac{\pi}{2}, 0 \right) Y_n^m \left( \frac{\pi}{2}, \gamma \right)$$

Debido a la independencia de los diferentes modos, tenemos que:

$$\langle U_k^m(t) \check{U}_n^m(t) \rangle = \langle U_n^m(t) \check{U}_n^m(t) \rangle \delta_{kn} = \langle |U_n^m(t)|^2 \rangle \delta_{kn}$$

Y al realizar la suma sobre  $k$  obtenemos:

$$\zeta(\gamma) = \sum_n \sum_m \langle |U_n^m(t)|^2 \rangle Y_n^m \left( \frac{\pi}{2}, 0 \right) Y_n^m \left( \frac{\pi}{2}, \gamma \right)$$

Aplicando el teorema de la suma para los armónicos esféricos

$$\sum_m Y_n^m\left(\frac{\pi}{2}, 0\right) Y_n^m\left(\frac{\pi}{2}, \gamma\right) = \frac{2n+1}{4\pi} P_n(\cos\gamma)$$

se obtiene la autocorrelación angular promediada en el tiempo:

$$\zeta(\gamma) = \sum_n \frac{2n+1}{4\pi} \langle |U_n^m(t)|^2 \rangle P_n(\cos\gamma) = \sum_n B_n P_n(\cos\gamma)$$

$$B_n = \frac{(2n+1)k_B T}{4\pi k_c (n-1)(n+2)[\bar{\sigma} + n(n+1)]}$$

Para determinar las constantes  $k_c$  y  $\bar{\sigma}$ , se hace uso del hecho de que los valores del módulo elástico no dependen del modo  $n$  del armónico en cuestión. Al incrementarse el modo, el valor de  $B_n$  disminuye y su error se incrementa; por lo que su valor y el error se vuelven comparables en magnitud. Esto impone una limitación experimental en el número posible de modos que pueden medirse con la suficiente precisión por lo que la sumatoria se trunca muy por debajo del teórico  $n_{max} = \sqrt{N}$  comentado previamente.

Cuando se utiliza el software de análisis de imágenes para medir el radio del liposoma  $\rho(\varphi)$  en una dirección  $\varphi$  dada, el resultado se compone del radio per se y su error de medición:

$$\rho(\varphi) = r(\varphi) + \varepsilon(\varphi)$$

Sin embargo, de acuerdo a las consideraciones expuestas en la literatura (Mitov, Faucon, Méléard, & Bothorel, 1992), los errores en la medición de las fluctuaciones del radio utilizando la función de autocorrelación y la expansión en polinomios de Legendre se vuelve cero y no tiene efecto sobre las amplitudes cuadráticas medias de los armónicos esféricos.

Algunos autores (Mutz & Helfrich, 1990) prefieren considerar la función de autocorrelación angular promediada en el tiempo como una serie de Fourier  $\zeta(\gamma) = \sum_m A_m e^{im\gamma}$ , pero los coeficientes  $A_m$  de la serie se ven afectados por los errores experimentales en la determinación del radio ecuatorial a diferencia de los coeficientes  $B_n$  en la expansión con polinomios de Legendre.

Otro factor a tomar en cuenta es el tiempo que toma la cámara que se utiliza durante el experimento para formar cada imagen (tiempo de integración), el cual es típicamente de 40 ms de acuerdo a los estándares de video Europeos. Cualquier deformación del liposoma que sea lo suficientemente lenta, digamos un cambio de posición de la membrana de un pixel por segundo, puede identificarse fácilmente ya que requiere de casi 25 imágenes para identificar un movimiento significativo de la membrana (Méléard & Pott, 2013). Por el contrario, un movimiento de mayor velocidad producirá una imagen borrosa del contorno en la imagen, incrementando su grosor aparente y reduciendo su contraste. Este efecto es especialmente notable en liposomas pequeños. Para limitar este error se ha hecho uso de diferentes técnicas en la literatura que incluyen el uso de un factor de corrección (Méléard, Mitov, Faucon, & Bothorel, 1990), reducción del tiempo de exposición (Bouvrais, Méléard, Pott, Jensen, Brask,

& H., 2008) o el uso de iluminación estroboscópica (Genova & Pavlič, 2012), la cual elimina la necesidad de utilizar las otras técnicas ya que permite producir pulsos de iluminación mucho más rápidos que los tiempos de relajación de los modos de oscilación mayores del liposoma (Méléard P. , Pott, Bouvrais, & Ipsen, 2011). En nuestro trabajo utilizamos las primeras dos técnicas de forma simultánea.

Otra mejora implementada al análisis, consiste en el manejo estadístico de los datos sobre las fluctuaciones del contorno del liposoma. Esta mejora permite tanto incrementar la precisión en la determinación de la constante elástica, como establecer criterios cuantitativos claros para aceptar o rechazar a un liposoma dado con respecto a la forma en la que se ajusta al modelo de vesícula cuasiesférica propuesto originalmente por Milner y Safran en 1987. La mejora se basa en las distribuciones estadísticas de las fluctuaciones y produce un incremento en la reproducibilidad de las mediciones de la constante con errores estándar menores al 1% (Méléard P. , Pott, Bouvrais, & Ipsen, 2011).

A través de los años ha sido posible la determinación de las constantes elásticas para distintos tipos de lípido y su combinación con diversas moléculas (Marsh, 2006). Las mejoras al método han ido acumulándose de forma continua tanto en la parte experimental como en el análisis teórico.

Un abordaje particularmente interesante consiste en realizar la electroformación de los liposomas en una solución de sacarosa para luego resuspenderlas en una solución de glucosa (i. e. menor densidad). Además de producir un mayor contraste entre el interior y exterior de los liposomas, este método permite que los mismos se precipiten, con lo que la captura de video se facilita enormemente. Para compensar por el efecto que produce la gravedad sobre el liposoma y su espectro de fluctuaciones se hace uso de un factor de corrección específico (Henriksen, Rowat, & Ipsen, 2004).

## 2. Justificación

En el laboratorio estamos interesados en investigar a fondo la interacción fármaco-membrana que ocurre entre las moléculas de anestésicos locales y generales y distintas clases de fosfolípidos. Esta línea de investigación se ha abordado en el contexto de las discrepancias que pueden evidenciarse en las teorías clásicas del impulso nervioso. A su vez, el mecanismo de acción preciso del fenómeno anestésico está lejos de ser elucidado.

Como puede observarse en la revisión antes expuesta, el efecto de las moléculas anestésicas sobre la constante elástica de flexión de los modelos de membrana biológica es complejo y dependiente de diversas variables (e. g. temperatura). Si bien la literatura citada previamente reporta valores alterados de la constante al adicionar tetracaína al sistema, no se ha abordado directamente el efecto que tiene la aplicación de tetracaína sobre la constante elástica de flexión utilizando la técnica de elección para el cálculo de la misma (i. e. espectroscopía de fluctuación). Es por ello que hemos decidido realizar este trabajo, como una contribución a los datos acumulados a la fecha.



## **3. Hipótesis y objetivos**

### **3.1 Hipótesis**

La adición de tetracaína a un sistema de liposomas gigantes se asocia a una modificación significativa de su constante elástica de curvatura.

### **3.2 Objetivos**

#### **3.2.1 Objetivo general**

Calcular la constante elástica de curvatura de un sistema de liposomas gigantes mediante la técnica de espectroscopía de fluctuación, y medir su modificación al adicionar tetracaína en el sistema.

#### **3.2.2 Objetivos específicos**

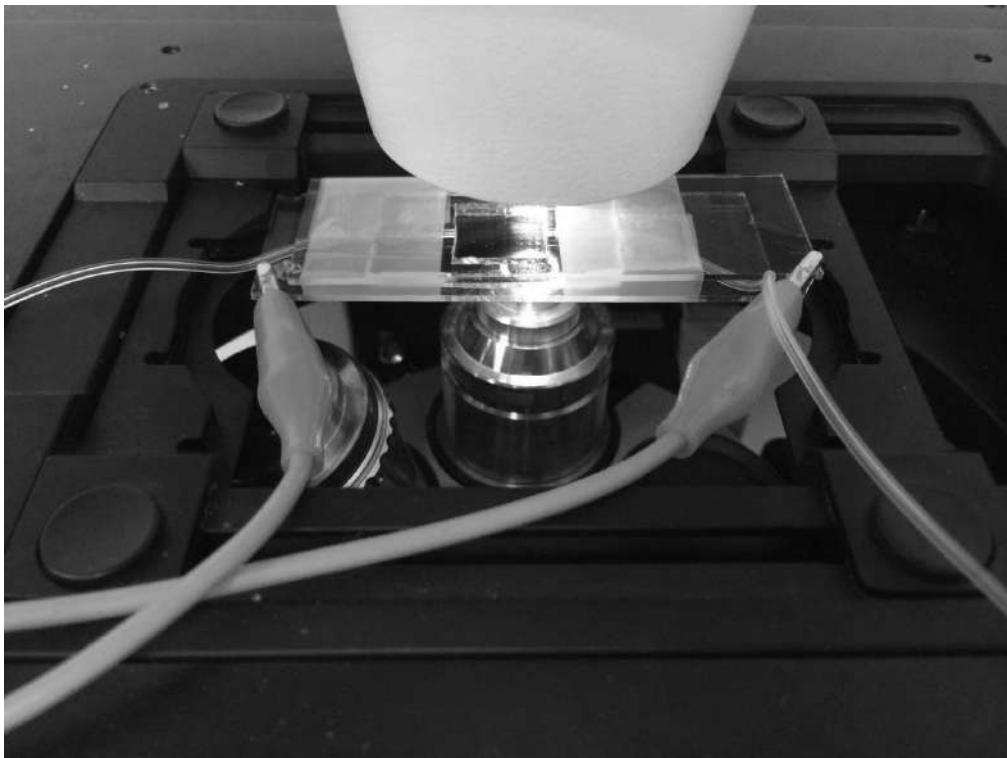
1. Reproducir la técnica de electroformación de liposomas gigantes.
2. Escribir el código que permita el cálculo de la constante elástica de flexión a partir de un set apropiado de imágenes de cada liposoma.
3. Adquirir y procesar el set de imágenes mediante microscopía de contraste de fases en un sistema libre de tetracaína y en un sistema con tetracaína.

## 4. Metodología

### 4.1 Preparación de las muestras

#### 4.1.1 La cámara de electroformación

La técnica de electroformación de liposomas se llevó a cabo en la cámara que fabricamos para dicho propósito:



**Figura 4.1** Cámara de electroformación en posición en el microscopio invertido

La cámara consiste en un marco separador de polidimetilsiloxano (SYLGARD® 184 Dow Corning Corporation), encerrado entre dos portaobjetos recubiertos de una película de óxido de indio y estaño (ITO) (Aldrich 576352, resistividad 70-10  $\Omega$ /sq) que se aseguran con cinta adhesiva (Cinta Mágica Scotch® 3M), formando así una cámara rectangular con dimensiones aproximadas de 15x12x20 milímetros (i. e. volumen de  $\approx$  3.6 mililitros).

El marco separador tiene en sus extremos una entrada y una salida a través de las cuales se puede fluir líquido al interior y al exterior de la cámara usando mangueras con un diámetro interno de 0.02 pulgadas y diámetro externo de 0.06 pulgadas (TYGON® ND 100-80 Saint-Gobain Performance Plastics Corporation).

Los portaobjetos funcionan como electrodos encontrados de placas paralelas, y en un extremo de cada uno se coloca una pinza tipo caimán conectándolos de esta forma al generador de funciones y ondas arbitrarias (Hewlett Packard 33120A, 15 MHz).

#### 4.1.2 Fabricación del marco separador

El marco fue fabricado siguiendo las indicaciones publicadas por Estes & Mayer en 2005 aplicando algunas modificaciones.

Con el objetivo de que el separador hiciera un contacto plano e impermeable con los portaobjetos, se utilizó una oblea de silicio de 100 mm de diámetro (Desert Silicon, Inc.) como base del molde de fabricación del separador. El molde consiste en un anillo de resina de polilactida (MakerBot PLA Filament) cubierto con papel aluminio (H-E-B Though & Easy ®) y colocado dentro de una caja de Petri de vidrio. En la base del molde se coloca la oblea de silicio después de haber expuesta a un flujo de nitrógeno durante 5 segundos para retirar de ella el mayor número posible de partículas que se hayan posado en su superficie.

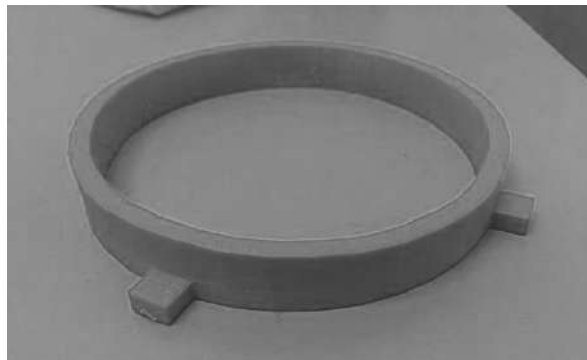


Figura 4.2 Anillo de PLA

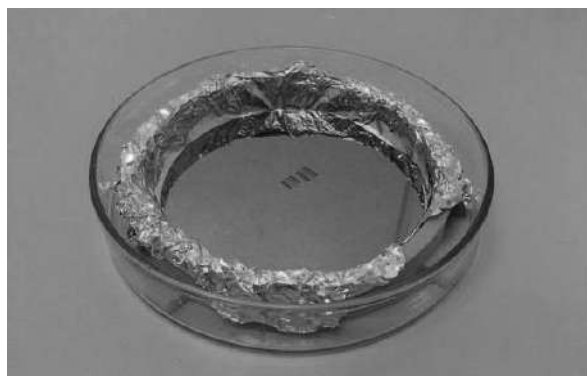
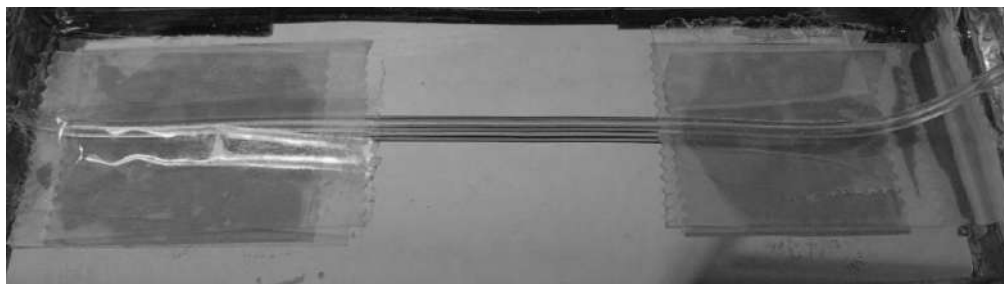


Figura 4.3 Anillo de PLA cubierto de aluminio y colocado en la caja de Petri con la oblea de silicio adentro en el fondo

Sobre la oblea se colocan dos bloques de cinta, cada uno con un total de 8 trozos apilados (con lo que se obtiene una elevación de 500 micrómetros sobre la superficie), en polos opuestos del molde. Estos bloques sirven como soporte sobre los cuales coloca un trozo de 100 centímetros de manguera de silicón y se adhiere con cinta (Cinta Transparente Scotch ® 3M) sobre cada bloque.



**Figura 4.4** Manguera de silicón sobre los bloques de cinta mágica en los extremos de la oblea

Posteriormente se vierte sobre el molde una mezcla de elastómero base y agente curador de polidimetilsiloxano (PDMS) en proporción 10:1, la cual fue previamente preparada en el mezclador (THINKY, AR-100 Conditioning Mixer). La masa total de la mezcla se calcula para obtener una altura total de  $\approx 20$  milímetros sobre la superficie de la oblea. Una vez vertida la mezcla sobre el molde se procede a colocarlo dentro de una cámara de vacío (Nalgene ®) a 74.26 Torr durante 30 minutos y finalmente se procede a la curación durante 60 minutos a 60 C (Memmert GmbH + Co. KG Universal Oven UF55).

Después del proceso de curación, la manguera queda fijamente adherida al PDMS y se procede a cortar un recuadro de  $\approx 15 \times 12$  milímetros en el centro de la oblea con una hoja de bisturí (Hergom No. 10). El resto de la cámara se recorta con dimensiones arbitrarias pero menores a las de los portaobjetos entre los cuales será encerrada. Todo el proceso se realiza dentro de un cuarto limpio clase 1000 con iluminación con luz amarilla.

### **4.1.3 Deposición de lípido**

De acuerdo al protocolo de electroformación originalmente publicado por Angelova & Dimitrov en 1986 y descrito previamente en la introducción de este trabajo, el lípido que formará los liposomas es colocado sobre uno de los portaobjetos de forma previa a la hidratación de la cámara de electroformación.

Inicialmente se trabajó con el método original de 1986; sin embargo, la necesidad de reducir la dispersión de tamaños en los liposomas resultantes así como de ejercer un mayor control sobre la técnica de electroformación pensando en su utilidad para futuros trabajos en el grupo, nos llevó a reproducir otro método de deposición. El método elegido fue el de la impresión por micro contacto publicado por Taylor y colaboradores en 2003. Con este método, es posible generar una matriz bidimensional de impresiones de lípido que posteriormente darán origen a un set de liposomas con una dispersión de tamaños considerablemente menor a la obtenida mediante el método tradicional.

El método consiste en utilizar sellos de PDMS para transferir la solución de lípido a la superficie del portaobjetos de manera controlada. De esta forma se obtiene una deposición que preserva el patrón del sello. El artículo de Taylor refiere que la calidad de la deposición y la resolución de las figuras impresas depende de la concentración del lípido en solución, la técnica de estampado y la condición química de la superficie del portaobjetos; sin embargo, durante nuestros experimentos observamos que otros factores de suma relevancia incluyen la temperatura y la humedad relativa de la habitación, por lo que fue necesario realizar ajustes al protocolo originalmente publicado que a fin de cuentas terminaron por generar un mejor resultado que el que publicaron los autores originales de la técnica.

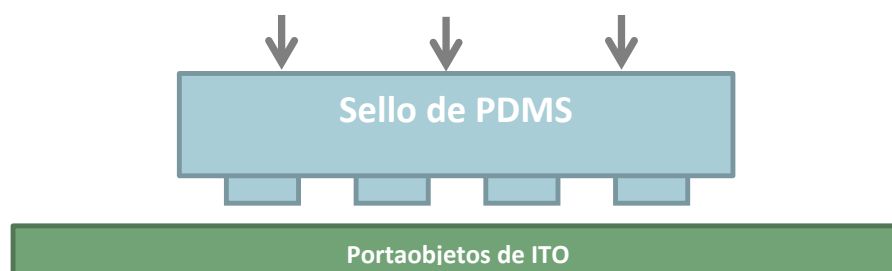
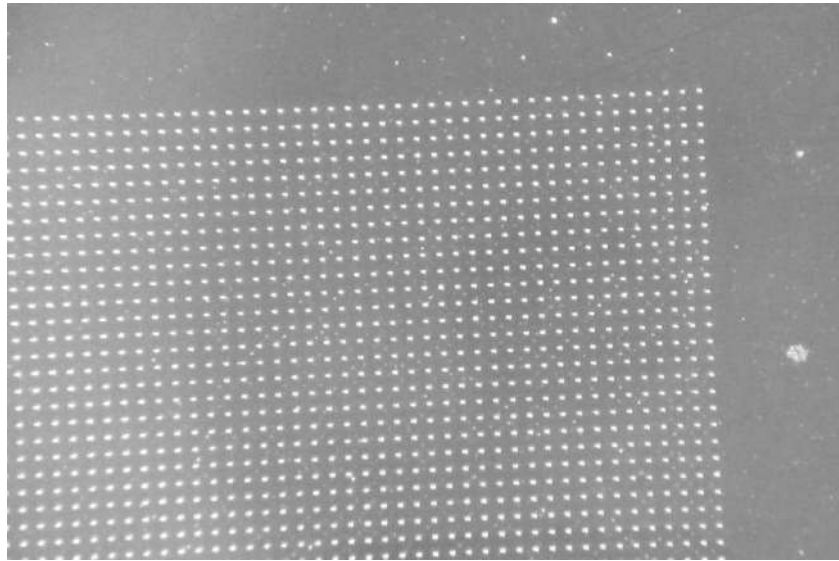


Figura 4.4bis Diagrama esquemático del proceso de sellado por micro contacto

#### 4.1.3.1 Fabricación del sello de PDMS

El proceso comienza al depositar una capa de fotoresina negativa SU-8 (MicroChem SU-8 2050) sobre una oblea de silicio que fue previamente tratada con promotor de adhesión (Gersteltec Sarl ADP125). Tanto el promotor como la fotoresina se depositan utilizando un sistema de recubrimiento por rotación (Specialty Coating Systems™ 6800 SCS) a 4000 revoluciones por minuto durante 30 segundos con lo que se obtiene un grosor de  $\approx 25$  micrómetros. Después de realizar el precocido de la resina sobre una plancha (Corning PC-420D) durante 3 minutos a 65 C y 6 minutos a 95 C, se procede a exponerla en una máquina de fotolitografía a una potencia láser de 70 mW (Heidelberg Instruments  $\mu$ PG 101). Tras la exposición se coloca de nueva cuenta en la plancha por 1 minuto a 65 C y 6 minutos a 95 C antes de ser revelada con polipropilenglicol monometil éter acetato (Sigma-Aldrich 484431) y lavada con alcohol isopropílico (Vetec V000139).

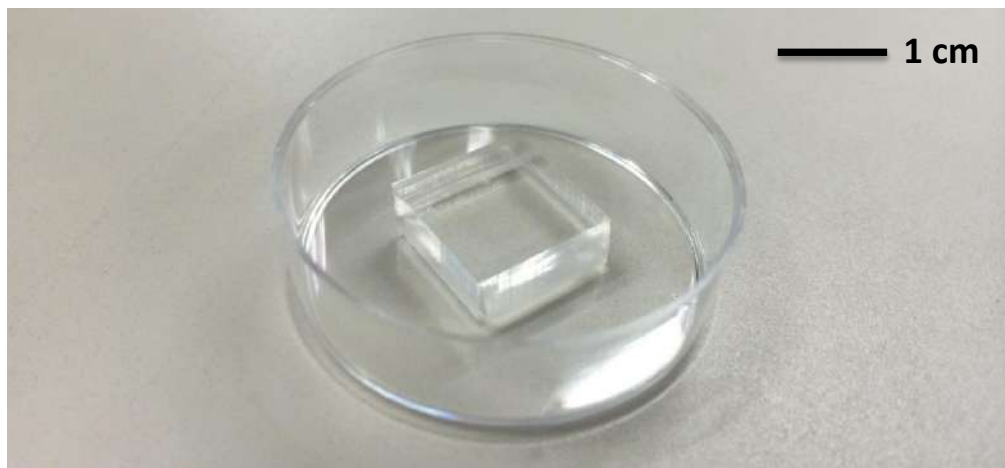
De esta forma se obtiene un patrón de fotoresina sobre la oblea de silicio que servirá como molde para la fabricación del sello de PDMS



**Figura 4.5** Micrografía estereoscópica de la capa de resina SU-8 revelada sobre la oblea de silicio

Los puntos blancos en la imagen son “pozos” de 15 micrómetros de diámetro y 30 micrómetros de profundidad que se ordenan en una matriz de hileras y columnas y dentro de los cuales entrará el PDMS para formar los “postes” del sello.

Antes de verter la mezcla de PDMS en este molde, la oblea de silicio con las estructuras de fotoresina se someten a un proceso de cocido a 120 C durante 60 minutos, para después ser cubierta por una capa de clorotrimetilsilano (Aldrich 386529) mediante evaporación a temperatura ambiente. El resto del proceso es igual que el de la fabricación del separador de la cámara de electroformación.



**Figura 4.6** Vista mesoscópica del sello de PDMS

En la imagen anterior se observa el sello de PDMS ya recortado del molde y colocado sobre una caja de Petri. La superficie superior del sello tiene los postes micrométricos que servirán para la impresión del lípido

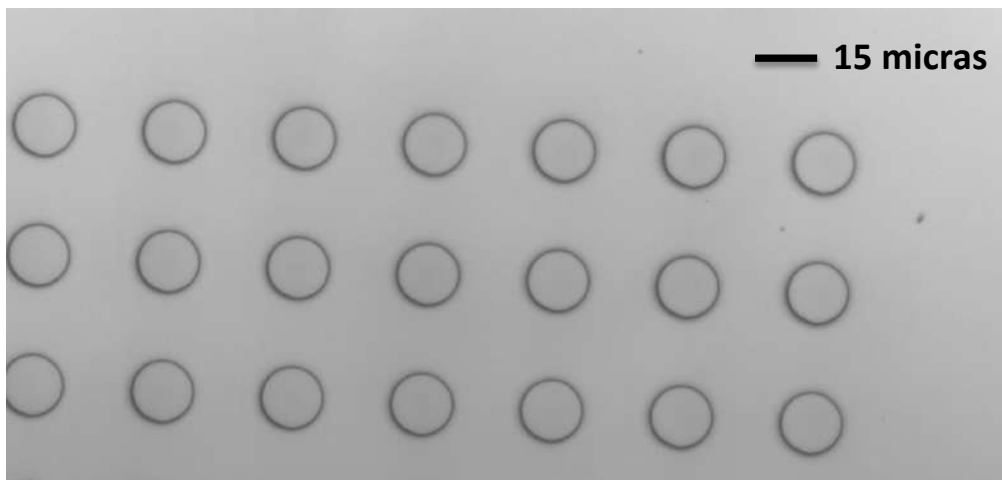


Figura 4.7 Micrografía en campo claro de la superficie del sello (vista superior)

En un corte lateral se observa una hilera de los postes sobre la superficie de PDMS desde la cual protruyen

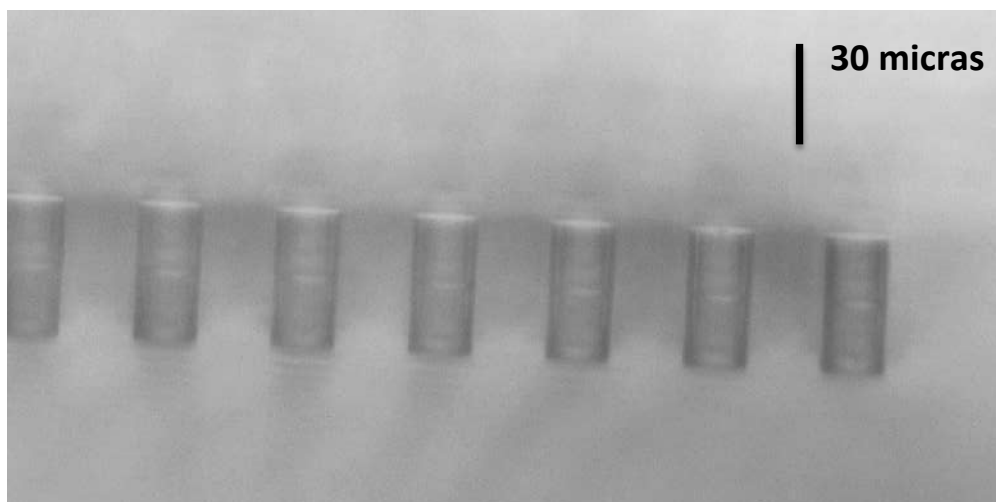


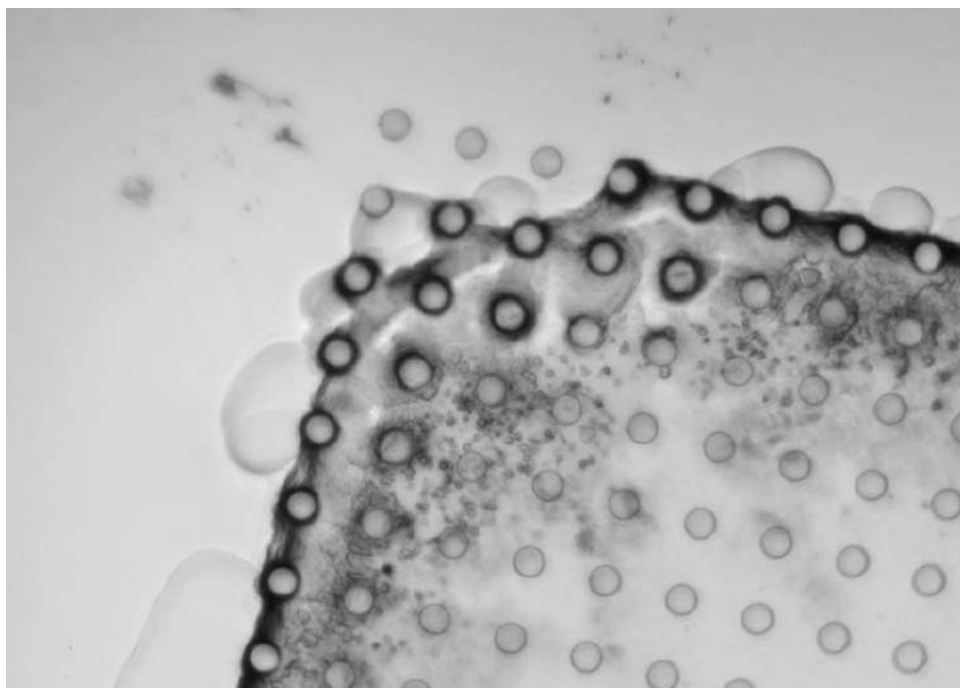
Figura 4.8 Micrografía en campo claro de la superficie del sello (vista lateral)

#### **4.1.3.2 Impresión por micro contacto**

La técnica original de Taylor para la impresión del lípido refiere el uso de una solución de lípido en etanol que se deposita sobre el sello después de que este fue hidrofiliado utilizando una solución de peróxido de hidrógeno y ácido sulfúrico (solución piraña), seguida de un tratamiento con 3-aminopropiltriétoxisisilano por 2 horas a 50 C. En su lugar, utilizamos un generador de plasma de oxígeno (ZEPTO, Diener Electronics Plasma Surface Technology) dentro del cual se coloca el sello de PDMS y es expuesto durante 90 segundos obteniendo una excelente hidrofiliación de la superficie de los postes.

A diferencia de la forma en la que el lípido es depositado sobre el sello en el artículo de Taylor, nuestro protocolo final se condujo de la siguiente manera:

1. Colocamos una muestra de 10 microlitros de una solución de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) (850345P Avanti Polar Lipids, Inc.) en etanol (144531 CTR Scientific) a una concentración de 30 mg/mL.
2. La muestra se deja evaporar a una temperatura ambiente de 27.7 C con 49-50% de humedad relativa hasta que no se observa líquido sobre el sello a simple vista.
3. El sello con la muestra evaporada se coloca en una plancha a 80 C durante 10 minutos con el fin de completar la evaporación del etanol.

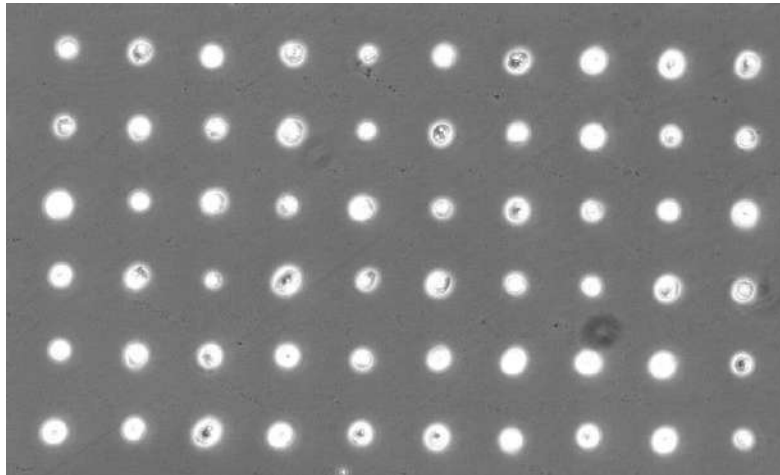


**Figura 4.9** Micrografía en campo claro de la superficie del sello posterior a la aplicación de la solución de lípido

4. El portaobjetos es expuesto a un jet de vapor que se produce al hervir agua (Milli-Q® Biocel® Millipore) dentro de un matraz de tipo Erlenmeyer. De esta forma el portaobjetos queda cubierto de una fina capa de microgotas de agua.
5. El sello con la muestra de lípido ya seca se aproxima al portaobjetos con el vapor en su superficie y sin ejercer presión se establece contacto entre los dos retirando inmediatamente el sello después del contacto.

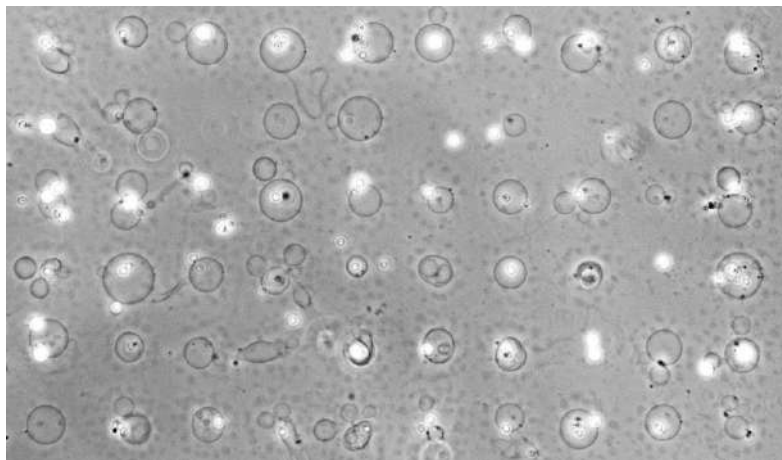
Este protocolo genera un patrón de manchas circulares sobre el portaobjetos que es bastante similar al reportado por Taylor y colaboradores, en donde se observa la deposición heterogénea de lípido en cada uno de los círculos





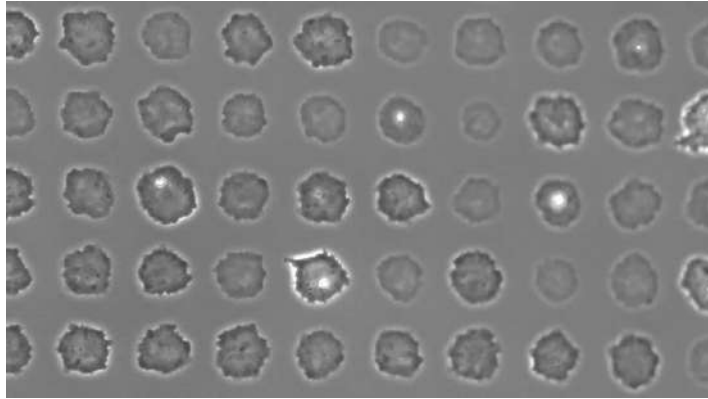
**Figura 4.10** Micrografía por contraste de fases del patrón de manchas de lípido impreso sobre el portaobjetos de ITO con el uso del sello de PDMS.

Si bien fue posible producir liposomas gigantes a partir de estas deposiciones, el resultado presentaba liposomas que no se habían fusionado correctamente y sobretodo la generación de partículas de lípido empaquetado que producían puntos negros y blancos sobre la imagen de microscopía por contraste de fases



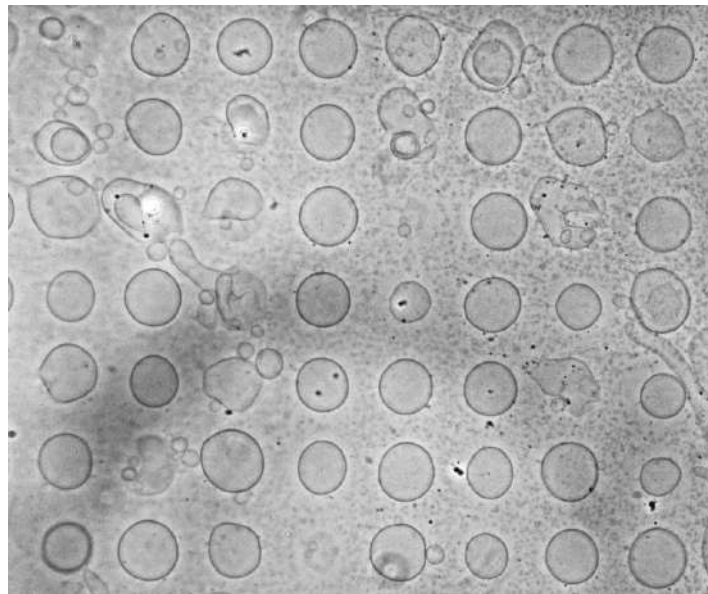
**Figura 4.11** Micrografía por contraste de fases de la matriz de liposomas creados a partir de la deposición de lípido de la Figura 6.10

Por tal motivo se procedió a homogeneizar la deposición de lípido en cada círculo al exponer el portaobjetos de nueva cuenta al jet de vapor durante múltiples ocasiones (10 - 20 veces). De esta forma, el lípido en el portaobjetos fue hidratado y secado de forma iterativa con lo que se obtenía la formación de monocapas con un mayor ordenamiento de las moléculas de lípido. De igual forma la altura de la masa en cada círculo se reducía al expandirse de forma lateral con las hidrataciones.



**Figura 4.12** Micrografía por contraste de fases de la deposición de lípido en el portaobjetos de ITO después de haber sido expuesta múltiples veces a vapor de agua

Con esto se obtuvo un mejor resultado y pudo generarse una matriz de liposomas de mejor calidad, reduciendo de forma importante la presencia de las partículas de lípido empaquetado.



**Figura 4.13** Micrografía por contraste de fases de la matriz de liposomas creados a partir de una deposición de lípido como la de la Figura 6.12

Una vez realizada la homogeneización de la deposición de lípido sobre el portaobjetos, el paso final consistió en dejarlo a secar durante 120 minutos en una cámara de vacío a 74.26 Torr. Este paso se tornó crucial ya que de no realizarse la hidratación del lípido se tornaba destructiva, y el frente de agua en la cámara de electroformación levantaba las deposiciones de lípido a su paso.

#### 4.1.4 Hidratación de la cámara de electroformación

Una vez que termina el periodo de secado del portaobjetos con la impresión del patrón de lípido en su superficie se procede a ensamblar la cámara de electroformación. El separador de PDMS previamente fabricado con las mangueras de entrada y salida se encierra entre este portaobjetos y otro en la parte superior, siendo fijados con cinta adhesiva como se comentó al inicio de esta sección.

Después de colocar la cámara en el microscopio invertido (ZEISS AxioObserver Z1) y conectarla al generador de funciones se procede a la hidratación de su interior con el uso de una bomba de flujo (KDS-100, Cole Parmer) a una velocidad de 10 mililitros por hora. En todos los experimentos la hidratación se llevó a cabo con agua Milli-Q®.

El protocolo de electroformación que ofreció los mejores resultados consistió en la aplicación de 25 mV/mm a 10 Hz desde el inicio de la hidratación y hasta que la cámara se encontrase llena de agua en su totalidad. Una vez llena se procede a incrementar el voltaje hasta 500 mV/mm y los liposomas se obtienen en su forma final a los 30-45 minutos de haber incrementado el voltaje. Para liberar a los liposomas de la superficie del portaobjetos basta con reducir la frecuencia de forma paulatina hasta los 100 miliHz sin necesidad de modificar el voltaje.

Este protocolo de deposición y electroformación genera un set de liposomas con una dispersión de tamaños mucho menor que la que se obtiene con el método clásico

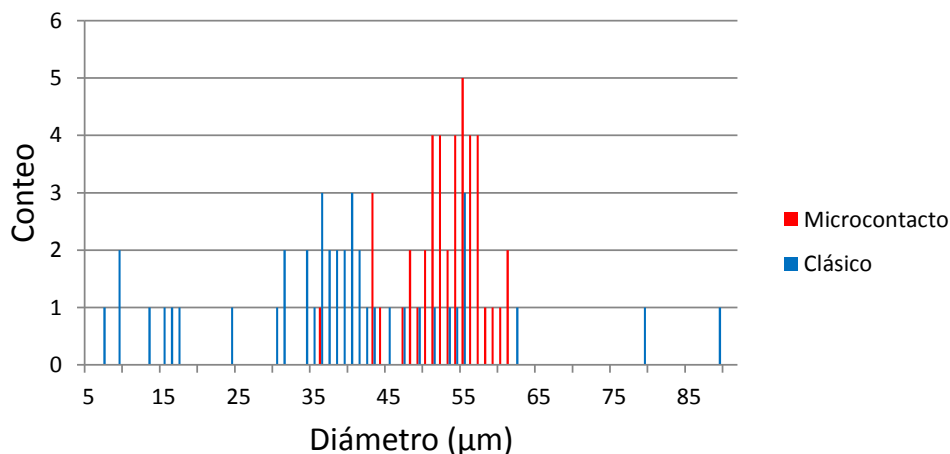


Figura 4.14 Gráfica de distribución de tamaños para una muestra aleatoria de liposomas obtenidos en cada método

## 4.2 Administración de tetracaína

Para los experimentos con tetracaína se utilizaron las mangueras de silicón de la cámara para hacer fluir una solución de tetracaína en agua Milli-Q® a una concentración de 5 mM a una velocidad de 5 ml/hora con el fin de ejercer el menor estrés de

corte posible en los liposomas de la muestra. La solución se hizo fluir hasta que el volumen interior de la cámara fue reemplazado un mínimo de cuatro veces por la solución ( $\approx 12$  mL). Para la medición control se hizo fluir agua Milli-Q® a la misma velocidad durante el mismo lapso de tiempo de forma previa al análisis de los liposomas. Todos los experimentos se realizaron a una temperatura de 36 C, muy por arriba de la temperatura de transición del lípido.

### 4.3 Adquisición de imágenes

Una vez seleccionados los liposomas que serán analizados con respecto a los criterios expuestos por Genova en 2013, se procede a la adquisición de los mismos, utilizando una cámara de 6 megapíxeles con un sensor Sony ICX 694, Exview HAD CCD II™ para microscopio (ZEISS AxioCam 506 mono). Debido al tiempo de exposición ajustable de la cámara fue posible obtener las imágenes a un tiempo estandarizado de 1 milisegundo de exposición.

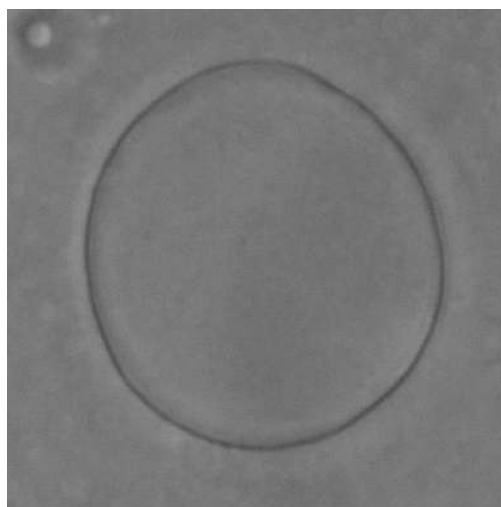
Para cada liposoma se adquirió un total de 4025 imágenes ya que este fue el límite que nuestro algoritmo pudo analizar de acuerdo a la memoria de asignación que se utiliza en la creación de la matriz de imágenes.

Una vez adquiridas las imágenes se exportaron en calidad máxima en formato bmp para ser posteriormente analizadas en la plataforma IDL Versión 6.1 Win32 (x86) (Research Systems, Inc.)

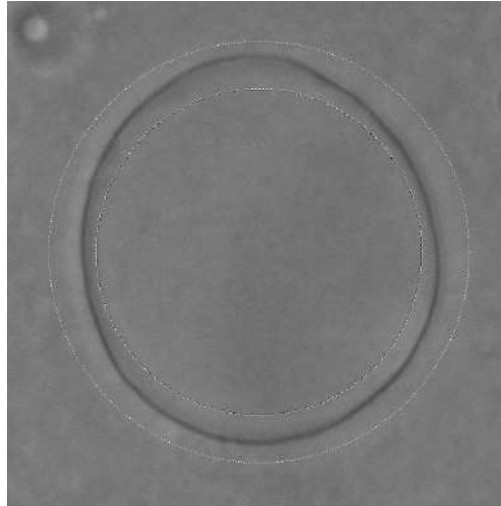
### 4.4 Análisis de imágenes

El código se escribió siguiendo el método reportado por Genova en 2013 y puede describirse de la siguiente manera:

1. El primer cuadro del set de imágenes se carga a la memoria del programa dentro de una matriz de tres canales de los cuales únicamente se toma el primero para el análisis

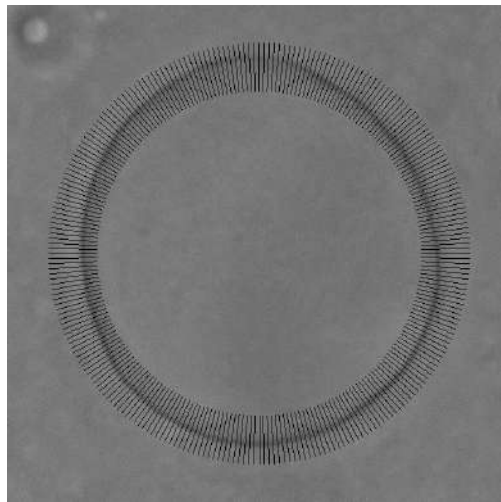


2. Se define una región de interés en forma de anillo que abarca entre 30-50 píxeles de forma radial dentro de la cual se localiza el contorno del liposoma

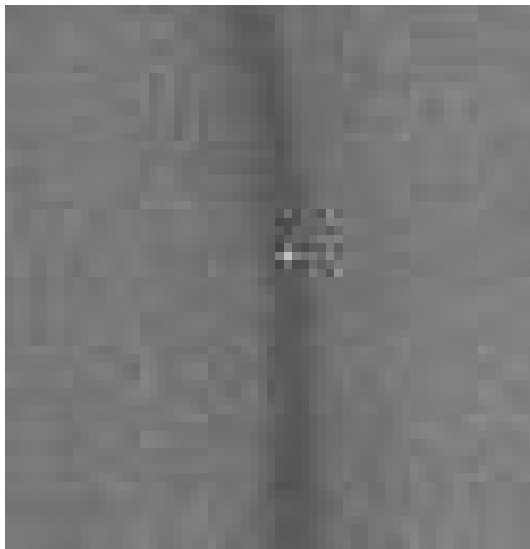


La posición precisa de esta zona de interés se define de forma manual para la primera imagen del set, cuidando que se encuentre lo más centrado posible.

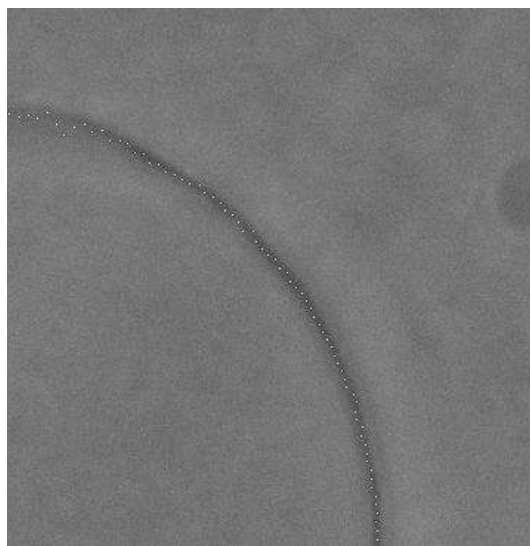
3. Posteriormente se traza un total de 256 rayos dentro de la región de interés con los que se iniciará el proceso de discretización del contorno.



4. Tomando en cuenta únicamente los píxeles de la imagen del liposoma que se encuentran en los índices bidimensionales de la matriz definidos por uno de estos rayos se identifica el píxel que contiene el mínimo de intensidad de gris para marcar el primer punto que formará parte de la forma discreta del contorno



5. Se repite el procedimiento para el resto de los rayos, estableciendo la condición de que el mínimo en intensidad de gris del rayo siguiente no se aleje del pixel anterior por más de 10 pixeles en forma radial hacia cualquier lado del liposoma.



6. Una vez obtenidos los 256 índices para cada punto que discretiza el contorno del liposoma se calcula su centro geométrico y su posición se define como el origen de un sistema coordenado que servirá para dos propósitos: a) calcular la magnitud de la distancia radial entre el origen y cada uno de los puntos, y b) establecer el centro de la región de interés en forma de anillo para la imagen siguiente en el set. Este método consigue identificar la posición del contorno del liposoma en todas las imágenes discretizándolo en un set de 256 puntos que fluctúan en su distancia radial con respecto al centro del liposoma. El método permite tomar en cuenta el movimiento de traslación que pueda sufrir el liposoma durante la adquisición de

las imágenes.

7. Con la lista completa de magnitudes radiales se procede a calcular la función de autocorrelación angular, utilizando la desviación relativa de los radios con respecto al radio medio temporal del set de imágenes.
8. Con la función de autocorrelación es posible calcular los coeficientes de la expansión en polinomios de Legendre tomando los modos del 2 al 20. Para el cálculo de coeficientes se toma en cuenta el factor de corrección correspondiente, tomando en cuenta el tiempo de exposición de 1 milisegundo en la adquisición de las imágenes y el valor de viscosidad del agua a 35 C (i. e. 0.7191 mPa·s) (Cooper & Dooley, 2008).
9. Los coeficientes permiten definir los parámetros de la constante elástica de flexión y la tensión de membrana con un ajuste no lineal por mínimos cuadrados mediante el algoritmo de expansión de gradiente definido en la función CURVE-FIT de la plataforma IDL.
10. El análisis completo se repite de nueva cuenta utilizando un filtro espacial de mediana con máscaras de 2 a 15 píxeles de tamaño. El filtro reduce la contribución del ruido blanco en las imágenes pero también disminuye la resolución, por lo que las constantes que se utilizan finalmente son las que produjeron el menor error cuadrático medio en el ajuste no lineal por mínimos cuadrados.

El código permite también seleccionar a los liposomas en base a los criterios definidos por Genova enlistados a continuación:

- Liposomas gigantes sin defectos visibles con un radio medio entre 10-50 micrómetros
- Liposomas fluctuantes con tensión de membrana adimensional entre -4 y 40
- Liposomas cuasiesféricos con radio medio temporal independiente del ángulo de medición
- Liposomas “estacionarios” durante el experimento en donde las amplitudes de las fluctuaciones del segundo modo son independientes del tiempo durante el experimento.

## 5. Resultados

En base a una muestra de 10 liposomas de DMPC en agua Milli-Q® que fueron analizados mediante el código para el cálculo de la constante elástica de flexión  $k_c$ , se obtuvo una media de  $36.123 k_B T$  con una desviación estándar de  $7.799 k_B T$  para los experimentos control y una media de  $74.615 k_B T$  con una desviación estándar de  $21.860 k_B T$  para los experimentos con tetracaína a 5 mM

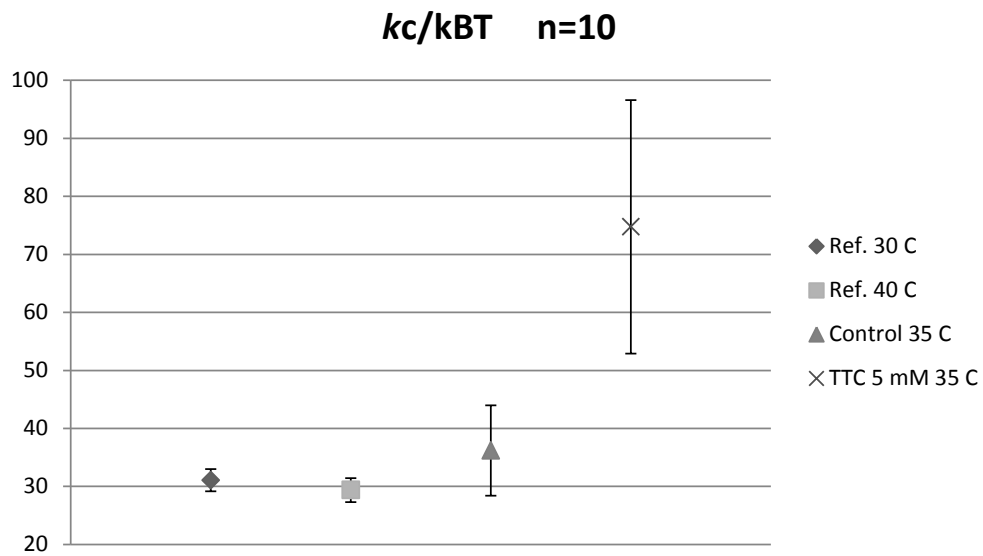


Figura 7.15 Gráfica de constante elástica de flexión  $k_c$  para los valores reportados en la referencia de Fernandez-Puente (1994) a dos temperaturas diferentes y los valores obtenidos en nuestro control y en la muestra expuesta a 5 mM de tetracaína.



## 6. Discusión

En la gráfica de resultados se presenta el valor de la constante calculado por Fernandez-Puente y colaboradores en 1994 para el sistema de DMPC en agua a dos temperaturas diferentes por arriba de la transición del lípido.

De acuerdo a lo reportado en la literatura (Yi, Nagao, & Bossev, 2012), en estas temperaturas se elimina la dependencia de la constante con respecto a la temperatura y es por ello que elegimos realizar los experimentos a 35 C.

Si bien los valores de nuestros experimentos control presentan una mayor dispersión que los reportados por la literatura, no existe diferencia estadísticamente significativa entre los resultados, por lo que estamos confiados de haber reproducido correctamente el protocolo de electroformación de liposomas y del análisis de la fluctuación de contornos.

La dispersión incrementada en los valores puede atribuirse a diversas imprecisiones experimentales entre las que se puede incluir la forma de detección de contornos en el algoritmo.

De acuerdo a otros autores (Pécrcéaux, Döbereiner, Prost, Joanny, & Bassereau, 2004) la posición de la membrana del liposoma no coincide con el píxel que presenta el mínimo en intensidad del nivel de gris tal como lo refiere Genova en 2013; sino en realidad con la posición en la que se encuentra el máximo del gradiente de intensidad, en su intersección con el valor medio.

A su vez, los criterios de selección para los liposomas que se sometieron al análisis basándonos en el reporte de Genova, han sido criticados como imprecisos en reportes en los que se realiza un análisis estadístico de los datos generados por la función de autocorrelación angular (Méléard P. , Pott, Bouvrais, & Ipsen, 2011).

En este reporte, los autores compilan un set de criterios que se basan en la distribución estadística de los coeficientes de la expansión de Fourier de la función de autocorrelación, argumentando que presentan una distribución de tipo Boltzmann. Además se incluye un criterio para el coeficiente de correlación de la matriz de covarianza entre la constante elástica de flexión y la tensión de membrana eliminando los liposomas en los que estos valores se encuentran fuertemente acoplados.

El resultado obtenido tras la adición de tetracaína parece demostrar que la interacción del fármaco con la membrana sigue un mecanismo complejo en el que el efecto sobre la constante se modifica dependiendo de la temperatura en el que se analice.

En un reporte de espectroscopía de eco de espín de neutrón (Yi, Nagao, & Bossev, 2010) se observó, al igual que en nuestro resultado, un incremento en la constante elástica de flexión de liposomas de DMPC tras la adición del anestésico (en este caso, lidocaína) cuando se aplicó a temperaturas mayores a la temperatura de transición.

Los autores argumentan que si bien el anestésico incrementa el desorden molecular a nivel de las colas de fosfolípido, también puede incrementar la interacción entre las cabezas polares debido al empaquetamiento incrementado entre la región polar del anestésico y las moléculas de fosfolípido, con lo que se obtendría el efecto dual sobre la constante elástica.

## 7. Trabajo a futuro

El prospecto del presente trabajo se centra en la implementación de las mejoras en el algoritmo que permitan reducir la dispersión de valores para la determinación de la constante al incrementar la precisión en la determinación de la posición de la membrana y establecer un set de criterios de mayor robustez para la selección de los liposomas.

Con respecto a la interacción con tetracaína haría falta realizar una curva de concentración del anestésico, probar con otras moléculas de anestésicos locales, otros lípidos o combinaciones de ellos y variar sistemáticamente la temperatura, con el objetivo de caracterizar adecuadamente la interacción fármaco-membrana al modificar todas estas variables.

Un resultado bastante favorable del trabajo fue la mejora al método de deposición por micro contacto mediante las exposiciones a vapor de agua. Una vez perfeccionado puede abrir las puertas a la realización de experimentos que exijan una mayor calidad de producción de liposomas, y esta mejora puede conducir hacia ese objetivo.

## 8. Referencias

- Akashi, K.-i., Miyata, H., Itoh, H., & Kazuhiko Kinoshita, J. (1996). Preparation of Giant Liposomes in Physiological Conditions and Their Characterization under an Optical Microscope. *Biophysical Journal*, 3242-3250.
- Akashi, K.-i., Miyata, H., Itoh, H., & Kazuhiko Kinoshita, J. (1998). Formation of Giant Liposomes Promoted by Divalent Cations: Critical Role of Electrostatic Repulsion. *Biophysical Journal*, 2973-2982.
- Angelova, M. I. (1999). Liposome Electroformation. En P. L. Luisi, & P. Walde, *Giant Vesicles: Perspectives in Supramolecular Chemistry Volume 6* (págs. 27-37). Chichester: John Wiley & Sons Ltd.
- Angelova, M. I., & Dimitrov, D. S. (1986). Liposome Electroformation. *Faraday Discussions of the Chemical Society*, 303-311.
- Angelova, M. I., & Dimitrov, D. S. (1987). Swelling of charged lipids and formation of liposomes on electrode surfaces. *Molecular Crystals and Liquid Crystals Incorporating Nonlinear Optics*, 89-104.
- Angelova, M. I., Hristova, N., & Tsoneva, I. (1999). DNA-induced endocytosis upon local microinjection to giant unilamellar cationic vesicles. *European biophysics journal*, 142-150.
- Angelova, M. I., Soléau, S., Méléard, P., Faucon, J. F., & Bothorel, P. (1992). AC Field Controlled Formation of Giant Fluctuating Vesicles and Bending Elasticity Measurements. *Springer Proceedings in Physics*, 178-182.
- Angelova, M. I., Soléau, S., Méléard, P., Faucon, J. F., & Bothorel, P. (1992). Preparation of giant vesicles by external AC electric fields. Kinetics and applications. *Progress in Colloid & Polymer Science*, 127-131.
- Angelova, M., & Dimitrov, D. S. (1988). A mechanism of liposome electroformation. *Progress in Colloid & Polymer Science*, 59-67.
- Antonietti, M., & Förster, S. (2003). Vesicles and Liposomes: A Self-Assembly Principle Beyond Lipids. *Advanced Materials*, 1323-1333.
- Bagatolli, L. A., & Gratton, E. (1999). Two-Photon Fluorescence Microscopy Observation of Shape Changes at the Phase Transition in Phospholipid Giant Unilamellar Vesicles. *Biophysical Journal*, 2090-2101.
- Bagatolli, L. A., Parasassi, T., & Gratton, E. (2000). Giant phospholipid vesicles: comparison among the whole lipid sample characteristics using different preparation methods. A two photon fluorescence microscopy study. *Chemistry and Physics of Lipids*, 135-147.

- Bailey, A. L., & Cullis, P. R. (1997). Membrane Fusion with Cationic Liposomes: Effects of Target Membrane Lipid Composition. *Biochemistry*, 1628-1634.
- Bangham, A. D. (1968). Membrane models with phospholipids. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 29-95.
- Bangham, A. D., Grier, J. D., & Greville, G. D. (1967). Osmotic properties and water permeability of phospholipid liquid crystals. *Chemistry and Physics of Lipids*, 225-246.
- Baykal-Caglar, E., Hassan-Zadeh, E., Saremi, B., & Huang, J. (2012). Preparation of giant unilamellar vesicles from damp lipid film for better lipid compositional uniformity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2598-2604.
- Berre, M. L., Yamada, A., Reck, L., Chen, Y., & Baigl, D. (2008). Electroformation of Giant Phospholipid Vesicles on a Silicon Substrate: Advantages of Controllable Surface Properties. *Langmuir*, 2643-2649.
- Bi, H., Yang, B., Wang, L., Cao, W., & Han, X. (2013). Electroformation of giant unilamellar vesicles using interdigitated ITO electrodes. *Journal of Materials Chemistry A*, 7125-7130.
- Bivas, J., Hanusse, P., Bothorel, P., Lalanne, J., & Aguerre-Chariol, O. (1987). An application of the optical microscopy to the determination of the curvature elastic modulus of biological and model membranes. *Journal de Physique*, 855-867.
- Bouvrais, H., Méléard, P., Pott, T., Jensen, K. J., Brask, J., & H., I. J. (2008). Softening of POPC membranes by magainin. *Biophysical Chemistry*, 7-12.
- Brochard, F., & Lennon, J. F. (1975). Frequency spectrum of the flicker phenomenon in erythrocytes. *Le Journal de Physique*, 1035-1047.
- Bucher, P., Fischer, A., Luisi, P. L., Oberholzer, T., & Walde, P. (1998). Giant Vesicles as Biochemical Compartments: The Use of Microinjection Techniques. *Langmuir*, 2712-2721.
- Büschl, R., Ringsdorf, H., & Zimmermann, U. (1982). Electric field-induced fusion of large liposomes from natural and polymerizable lipids. *FEBS Letters*, 38-42.
- Butterworth IV, J. F., & Strichartz, G. R. (1990). Molecular Mechanisms of Local Anesthesia: A Review. *Anesthesiology*, 711-734.
- Castro, V., Stevansson, B., Dvinskikh, S. V., Högberg, C.-J., Lyubartsev, A. P., Zimmermann, H., y otros. (2008). NMR investigations of interactions between anesthetics and lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2604-2611.

- Chu, N., Kučerka, N., Liu, Y., Tristram-Nagle, S., & Nagle, J. F. (2005). Anomalous swelling of lipid bilayer stacks is caused by softening of the bending modulus. *Physical Review E*, 041904(8).
- Cooper, J. R., & Dooley, R. B. (2008). *Release on the IAPWS Formulation 2008 for the Viscosity of Ordinary Water Substance*. Berlin: The International Association for the Properties of Water and Steam.
- Diguet, A., Berre, M. L., Chen, Y., & Baigl, D. (2009). Preparation of Phospholipid Multilayer Patterns of a Controlled Size and Thickness by Capillary Assembly on a Microstructured Substrate. *Small*, 1661-1666.
- Dimitrov, D. S., & Angelova, M. I. (1987). Lipid swelling and liposome formation on solid surfaces in external electric fields. *Progress in Colloid & Polymer Science*, 48-56.
- Dimitrov, D. S., & Angelova, M. I. (1988). Lipid swelling and liposome formation mediated by electric fields. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 323-336.
- Dimitrov, D. S., Li, J., Angelova, M., & Jain, R. K. (1984). Surface effects in preparation of cell-size liposomes. *FEBS*, 398-400.
- Dimova, R. (2014). Recent developments in the field of bending rigidity measurements on membranes. *Advances in Colloid and Interface Science*, 225-234.
- Dimova, R. (2014). Recent developments in the field of bending rigidity measurements on membranes. *Advances in Colloid and Interface Science*, 225-234.
- Dimova, R., Aranda, S., Bezlyepkina, N., Nikolov, V., Riske, K. A., & Lipowsky, R. (2006). A practical guide to giant vesicles. Probing the membrane nanoregime via optical microscopy. *Journal of Physics: Condensed Matter*, S1151-S1176.
- Eleršič, K., Pavlič, J. I., Iglič, A., Vesel, A., & Mozetič, M. (2012). Electric-field controlled liposome formation with embedded superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Chemistry and Physics of Lipids*, 120-124.
- Estes, D. J., & Mayer, M. (2005). Electroformation of giant liposomes from spin-coated films. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 115-123.
- Estes, D. J., & Mayer, M. (2005). Giant liposomes in physiological buffer using electroformation in a flow chamber. *Biochimica et Biophysica Acta*, 152-160.
- Estes, D. J., Lopez, S. R., Fuller, A. O., & Mayer, M. (2006). Triggering and Visualizing the Aggregation and Fusion of Lipid Membranes in Microfluidic Chambers. *Biophysical Journal*, 233-243.

- Fernandez-Puente, L., Bivas, I., Mitov, M. D., & Méléard, P. (1994). Temperature and Chain Length Effects on Bending Elasticity of Phosphatidylcholine Bilayers. *Europhysics Letters*, 181-186.
- Fischer, A., Luisi, P. L., Oberholzer, T., & Walde, P. (1999). Formation of Giant Vesicles from Different Kinds of Lipids using the Electroformation Method. En P. L. Luisi, & P. Walde, *Giant Vesicles: Perspectives in Supramolecular Chemistry Volumen 6* (págs. 37-44). Chichester: John Wiley & Sons Ltd.
- Francis Szoka, J., & Papahadjopoulos, D. (1980). Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). *Annual review of biophysics and bioengineering*, 467-508.
- Frangopol, P. T., & Mihăilescu, D. (2001). Interactions of some local anesthetics and alcohols with membranes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 3-22.
- Genova, J. (2013). Marin Mitov Lectures: Measuring the Bending Elasticity of Lipid Bilayers. *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, 2-25.
- Genova, J., & Pavlič, J. I. (2012). Realization of Marin Mitov Idea for the Stroboscopic Illumination Used in Optical Microscopy. *Bulgarian Journal of Physics*, 65-71.
- Girard, P., Pécéréaux, J., Lenoir, G., Falson, P., Rigaud, J.-L., & Bassereau, P. (2004). A New Method for the Reconstruction of Membrane Proteins into Giant Unilamellar Vesicles. *Biophysical Journal*, 419-429.
- Goldstein, D. B. (1984). The effects of drugs on membrane fluidity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 43-64.
- Græsbøll, K., Sasse-Middelhoff, H., & Heimburg, T. (2014). The Thermodynamics of General and Local Anesthesia. *Biophysical Journal*, 2143-2156.
- Guida, V. (2010). Thermodynamics and kinetics of vesicles formation processes. *Advances in Colloid and Interface Science*, 77-88.
- Harbich, W., & Helfrich, W. (1984). The swelling of egg lecithin in water. *Chemistry and Physics of Lipids*, 39-63.
- Hata, T., Matsuki, H., & Kaneshina, S. (2000). Effect of local anesthetics on the bilayer membrane of dipalmitoylphosphatidylcholine: interdigitation of lipid bilayer and vesicle-micelle transition. *Biophysical Chemistry*, 25-36.
- Heimburg, T., & Jackson, A. D. (2005). On soliton propagation in bioimembranes and nerves. *PNAS*, 9790-9795.
- Heimburg, T., & Jackson, A. D. (2007). The Thermodynamics of General Anesthesia. *Biophysical Journal*, 3159-3165.

- Helfrich, W. (1973). Elastic properties of lipid bilayers: theory and possible experiments. *Zeitschrift fur Naturforschung. Teil C: Biochemie, Biophysik, Biologie, Virologie*, 693-703.
- Henriksen, J., Rowat, A., & Ipsen, J. (2004). Vesicle fluctuation analysis of the effects of sterols on membrane bending rigidity. *European Biophysics Journal*, 732-741.
- Herold, C., Chwastek, G., Schwille, P., & Petrov, E. P. (2012). Efficient Electroformation of Supergiant Unilamellar Vesicles Containing Cationic Lipids on ITO-Coated Electrodes. *Langmuir*, 5518-5521.
- Horger, K. S., Estes, D. J., Capone, R., & Mayer, M. (2009). Films of Agarose Enable Rapid Formation of Giant Liposomes in Solutions of Physiologic Ionic Strength. *Journal of the American Chemical Society*, 1810-1819.
- Jadidi, T., Seyyed-Allaei, H., Tabar, M. R., & Mashaghi, A. (2014). Poisson's ratio and Young's modulus of lipid bilayers in different phases. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 1-6.
- Janiak, M. J., Small, D. M., & Shipley, G. G. (1979). Temperature and Compositional Dependence of the Structure of Hydrated Dimyristoyl Lecithin. *The Journal of Biological Chemistry*, 6068-6078.
- Kaminoh, Y., Kamaya, H., & Ueda, I. (1989). Differential affinity of charged local anesthetics to solid-gel and liquid-crystalline states of dimyristoylphosphatidic acid vesicle membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 63-68.
- Kang, Y. J., Wostein, H. S., & Majd, S. (2013). A Simple and Versatile Method for the Formation of Arrays of Giant Vesicles with Controlled Size and Composition. *Advanced Materials*, 6834-6838.
- Kuribayashi, K., Tresset, G., Coquet, P., Fujita, H., & Takeuchi, S. (2006). Electroformation of giant liposomes in microfluidic channels. *Measurement Science and Technology*, 3121-3126.
- Kuribayashi, K., Utada, A., & Takeuchi, S. (2008). Electroformation of giant liposomes from densely micro-patterned lipid films. *Twelfth International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*, 1120-1122.
- Kurihara, K., Tamura, M., Shohda, K.-i., Toyota, T., Suzuki, K., & Sugawara, T. (2011). Self-reproduction of supramolecular giant vesicles combined with the amplification of encapsulated DNA. *Nature chemistry*, 775-781.
- L.Wilbur, J., Kumar, A., Biebuyck, H. A., Kim, E., & Whitesides, G. M. (1996). Microcontact printing of self-assembled monolayers: applications in microfabrication. *Nanotechnology*, 452-457.

- Lorite, G. S., Nobre, T. M., Zaniquelli, M. E., Paula, E. d., & Cotta, M. A. (2009). Dibucaine effects on structural and elastic properties of lipid bilayers. *Biophysical Chemistry*, 75-83.
- Luisi, P. L. (1999). Why Giant Vesicles? En P. L. Luisi, & P. Walde, *Giant Vesicles: Perspectives in Supramolecular Chemistry Volume 6* (págs. 3-9). Chichester: John Wiley & Sons Ltd.
- Lundbaek, J. A., Birn, P., Hansen, A. J., Sogaard, R., Nielsen, C., Girshman, J., y otros. (2004). Regulation of Sodium Channel Function by Bilayer Elasticity: The Importance of Hydrophobic Coupling. Effects of Micelle-forming Amphiphiles and Cholesterol. *The Journal of General Physiology*, 599-621.
- Majd, S., & Mayer, M. (2008). Generating Arrays with High Content and Minimal Consumption of Functional Membrane Proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 16060-16064.
- Majd, S., Estes, D. J., & Mayer, M. (2006). Assays for Studying Annexin Binding to Artificial Bilayers. *Calcium Binding Proteins*, 26-29.
- Marsden, H. R., Tomatsu, I., & Kros, A. (2011). Model systems for membrane fusion. *Chemical Society Reviews*, 1572-1585.
- Marsh, D. (2006). Elastic curvature constants of lipid monolayers and bilayers. *Chemistry and Physics of Lipids*, 146-159.
- Marsh, D. (2006). Elastic curvature constants of lipid monolayers and bilayers. *Chemistry and Physics of Lipids*, 146-159.
- Mathivet, L., Cribier, S., & Devaux, P. F. (1996). Shape Change and Physical Properties of Giant Phospholipid Vesicles Prepared in the Presence of an AC Electric Field. *Biophysical Journal*, 1112-1121.
- Matosevic, S., & Paegel, B. M. (2011). Stepwise Synthesis of Giant Unilamellar Vesicles on a Microfluidic Assembly Line. *Journal of the American Chemical Society*, 2798-2800.
- Méléard, P., & Pott, T. (2013). Overview of a Quest for Bending Elasticity Measurement. *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, 55-75.
- Méléard, P., Bagatolli, L. A., & Pott, T. (2009). Giant Unilamellar Vesicle Electroformation: From Lipid Mixtures to Native Membranes Under Physiological Conditions. *Methods in enzymology*, 161-176.
- Méléard, P., Gerbeaud, C., Pott, T., Fernandez-Puente, L., Bivas, I., Mitov, M. D., y otros. (1997). Bending Elasticities of Model Membranes: Influences of Temperature and Sterol Content. *Biophysical Journal*, 2616-2629.
- Méléard, P., Mitov, M. D., Faucon, J. F., & Bothorel, P. (1990). Dynamics of Fluctuating Vesicles. *Europhysics Letters*, 355-360.



- Méléard, P., Pott, T., Bouvrais, H., & Ipsen, J. H. (2011). Advantages of statistical analysis of giant vesicle flickering for bending elasticity measurements. *The European Physical Journal E*, 116.
- Menger, F. M., & Angelova, M. I. (1998). Giant Vesicles: Imitating the Cytological Processes of Cell Membranes. *Accounts of Chemical Research*, 789-797.
- Menger, F. M., & Gabrielson, K. D. (1995). Cytomimetic Organic Chemistry: Early Developments. *Angewandte Chemie, International Edition in English*, 2091-2106.
- Menger, F. M., & Keiper, J. S. (1998). Giant Vesicles: Micromanipulation of Membrane Bilayers. *Advanced Materials*, 888-890.
- Menger, F. M., & Lee, S. J. (1995). Induced Morphological Changes in Synthetic Giant Vesicles: Growth, Fusion, Undulation, Excretion, Wounding, and Healing. *Langmuir*, 3685-3689.
- Metso, A. J., Zhao, H., Tuunainen, I., & Kinnunen, P. K. (2005). Observation of the main phase transition of dinervonoylphosphocholine giant liposomes by fluorescence microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 83-91.
- Mikelj, M., Praper, T., Demič, R., Hodnik, V., Turk, T., & Anderluh, G. (2013). Electroformation of giant unilamellar vesicles from erythrocyte membranes under low-salt conditions. *Analytical Biochemistry*, 174-180.
- Miliner, S. T., & Safran, S. A. (1987). Dynamical fluctuations of droplet microemulsions and vesicles. *Physical Review A*, 4371-4379.
- Mitov, M. D., Faucon, J. F., Méléard, P., & Bothorel, P. (1992). Thermal fluctuations of membranes. En G. W. Gokel, *Advances in Supramolecular Chemistry, vol. 2* (págs. 93-139). Greenwich: JAI Press.
- Mitov, M. D., Méléard, P., Winterhalter, M., Angelova, M. I., & Bothorel, P. (1993). Electric-field-dependent thermal fluctuations of giant vesicles. *Physical Review E*, 628-632.
- Montes, L. R., Alonso, A., Goñi, F. M., & Bagatolli, L. A. (2007). Giant Unilamellar Vesicles Electroformed from Native Membranes and Organic Lipid Mixtures under Physiological Conditions. *Biophysical Journal*, 3548-3554.
- Mora, N. L., Hansen, J. S., Gao, Y., Ronald, A. A., Kieltyka, R., Malmstadt, N., y otros. (2014). Preparation of size tunable giant vesicles from cross-linked dextran(ethylene glycol) hydrogels. *Chemical communications*, 1953-1955.
- Morales-Pennington, N. F., Wu, J., Farkas, E. R., Goh, S. L., Konyakhina, T. M., Zheng, J. Y., y otros. (2010). GUV preparation and imaging: Minimizing artifacts. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1324-1332.

- Mueller, P., Chien, T. F., & Rudy, B. (1983). Formation and properties of cell-size lipid bilayer vesicles. *Biophysical Journal*, 375-381.
- Mutz, M., & Helfrich, W. (1990). Bending rigidities of some biological model membranes as obtained from the Fourier analysis of contour sections. *Journal de Physique France*, 991-1002.
- Niri, V. H., Flatt, B. K., Fakhraai, Z., & Forrest, J. A. (2010). Simultaneous monitoring of electroformation of phospholipid vesicles by quartz crystal microbalance and optical microscopy. *Chemistry and Physics of Lipids*, 36-41.
- Oku, N., & MacDonald, R. C. (1983). Formation of giant liposomes from lipids in chaotropic ion solutions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 54-61.
- Okumura, Y., & Iwata, Y. (2011). Electroformation of Giant Vesicles and Electrode Polarity. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 1147-1149.
- Okumura, Y., & Iwata, Y. (2011). Electroformation of Giant Vesicles on Indium Tin Oxide (ITO)-Coated Poly(ethylene terephthalate) (PET) Electrodes. *Membranes*, 109-118.
- Okumura, Y., & Oana, S. (2011). Effect of Counter Electrode in Electroformation of Giant Vesicles. *Membranes*, 345-353.
- Okumura, Y., & Sugiyama, T. (2011). Electroformation of Giant Vesicles on a Polymer Mesh. *Membranes*, 184-194.
- Okumura, Y., Zhang, H., Sugiyama, T., & Iwata, Y. (2007). Electroformation of Giant Vesicles on a Non-Electroconductive Substrate. *Journal of the American Chemical Society*, 1490-1491.
- Ota, S., Yoshizawa, S., & Takeuchi, S. (2009). Microfluidic Formation of Monodisperse, Cell-Sized, and Unilamellar Vesicles. *Angewandte Chemie*, 6533-6537.
- Paiva, J., Paradiso, P., Serro, A., Fernandez, A., & Saramago, B. (2012). Interaction of local and general anesthetics with liposomal membrane models: A QCM-D and DSC study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 65-74.
- Patil, Y. P., & Jadhav, S. (2014). Novel methods for liposome preparation. *Chemistry and Physics of Lipids*, 8-18.
- Pavlič, J. I., Genova, J., Popkirov, G., Kralj-Iglič, V., Iglič, A., & Mitov, M. D. (2011). Mechanoformation of neutral giant phospholipid vesicles in high ionic strength solution. *Chemistry and Physics of Lipids*, 727-731.
- Pécéréaux, J., Döbereiner, H. G., Prost, J., Joanny, J. F., & Bassereau, P. (2004). Refined contour analysis of giant unilamellar vesicles. *The European Physical Journal E*, 277-290.

- Pernodet, N., Maaloum, M., & Tinland, B. (1997). Pore size of agarose gels by atomic force microscopy. *Electrophoresis*, 55-58.
- Peterlin, P., & Arrigler, V. (2008). Electroformation in a flow chamber with solution exchange as a means of preparation of flaccid giant vesicles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 77-87.
- Politano, T. J., Froude, V. E., Jing, B., & Zhu, Y. (2010). AC-electric field dependent electroformation of giant lipid vesicles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75-82.
- Pott, T., Bouvrais, H., & Méléard, P. (2008). Giant unilamellar vesicle formation under physiologically relevant conditions. *Chemistry and Physics of Lipids*, 115-119.
- Richmond, D. L., M.Schmid, E., Martens, S., Stachowiak, J. C., Liska, N., & Fletcher, D. A. (2011). Forming giant vesicles with controlled membrane composition, asymmetry, and contents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 9431-9436.
- Riske, K. A., Bezlyepkina, N., Lipowsky, R., & Dimova, R. (2006). Electrofusion of model lipid membranes viewed with high temporal resolution. *Biophysical Reviews and Letters*, 387-400.
- Rodriguez, N., Pincet, F., & Cribier, S. (2005). Giant vesicles formed by gentle hydration and electroformation: A comparison by fluorescence microscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 125-130.
- Safran, S. A. (1999). Curvature elasticity of thin films. *Advances in Physics*, 395-448.
- Serro, A. P., Galante, R., Kozica, A., Paradiso, P., Silva, A. M., Lyzyanin, K. V., y otros. (2014). Effect of tetracaine on DMPC and DMPC+cholesterol biomembrane models: Liposomes and monolayers. *Colloids and Surfaces B*, 63-71.
- Servuss, R. M., Harbich, W., & Helfrich, W. (1976). Measurement of the curvature-elastic modulus of egg lecithin bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 900-903.
- Seul, M., & Sammon, M. J. (1990). Preparation of surfactant multilayer films on solid substrates by deposition from organic solution. *Thin Solid Films*, 287-305.
- Seydel, J. K., Coats, E. A., Cordes, H. P., & Wiese, M. (1994). Drug Membrane Interaction and the Importance for Drug Transport, Distribution, Accumulation, Efficacy and Resistance. *Archiv der Pharmazie*, 601-610.
- Shimanouchi, T., Umakoshi, H., & Kuboi, R. (2009). Kinetic Study on Giant Vesicle Formation with Electroformation Method. *Langmuir*, 4835-4840.

- Sierra-Valdez, F. J., & Ruiz-Suárez, J. C. (2013). Noble Gases in Pure Lipid Membranes. *The Journal of Physical Chemistry B*, 3167-3172.
- Sierra-Valdez, F. J., Forero-Quintero, L. S., Zapata-Morin, P. A., Costas, M., Chavez-Reyes, A., & Ruiz-Suárez, J. C. (2013). The Influence of Non Polar and Polar Molecules in Mouse Motile Cells Membranes and Pure Lipid Bilayers. *PLoS ONE*, e59364.
- Smith, I. C., Auger, M., & Jarrell, H. C. (1991). Molecular Details of Anesthetic-Lipid Interaction. *Annals of the New York Academy of Science*, 668-684.
- Stachowiak, J. C., Richmond, D. L., Li, T. H., Liu, A. P., Parekh, S. H., & Fletcher, D. A. (2008). Unilamellar vesicle formation and encapsulation by microfluidic jetting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 4697-4702.
- Staneva, G., Angelova, M. I., & Koumanov, K. (2004). Phospholipase A2 promotes raft budding and fission from giant liposomes. *Chemistry and physics of lipids*, 53-62.
- Strömberg, A., Karlsson, A., Ryttsén, F., Davidson, M., Chiu, D. T., & Orwar, O. (2001). Microfluidic Device for Combinatorial Fusion of Liposomes and Cells. *Analytical Chemistry*, 126-130.
- Swaay, D. v., & deMello, A. (2013). Microfluidic methods for forming liposomes. *Lab on a Chip*, 752-767.
- Takeda, K., Okuno, H., Hata, T., Nishimoto, M., Matsuki, H., & Kaneshina, S. (2009). Interdigitation and vesicle-to-micelle transformation induced by a local anesthetic tetracaine in phospholipid bilayers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 135-140.
- Tanaka, T., & Yamazaki, M. (2004). Membrane Fusion of Giant Unilamellar Vesicles of Neutral Phospholipid Membranes Induced by La<sup>3+</sup>. *Langmuir*, 5160-5164.
- Taylor, P., Xu, C., Fletcher, P. D., & Paunov, V. N. (2003). A novel technique for preparation of monodisperse giant liposomes. *Chemical communications*, 1732-1733.
- Taylor, P., Xu, C., Fletcher, P. D., & Paunov, V. N. (2003). Fabrication of 2D arrays of giant liposomes on solid substrates by microcontact printing. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 4918-4922.
- Tsumoto, K., Kamiya, K., & Yoshimura, T. (2006). Membrane Fusion between a Giant Vesicle and Small Enveloped Particles: Possibilities for the Application to Construct Model Cells. *2006 IEEE International Symposium on Micro-Nano Mechanical and Human Science, MHS*, 1-6.

- Tsumoto, K., Matsuo, H., Tomita, M., & Yoshimura, T. (2009). Efficient formation of giant liposomes through the gentle hydration of phosphatidylcholine films doped with sugar. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 98-105.
- Vemuri, S., & Rhodes, C. T. (1995). Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharmaceutica Acta Helvetica*, 95-111.
- Walde, P., Cosentino, K., Engel, H., & Stano, P. (2010). Giant Vesicles: Preparations and Applications. *Chembiochem*, 848-865.
- Wang, Z., Hu, N., Yeh, L.-H., Zheng, X., Yang, J., Joo, S. W., y otros. (2013). Electroformation and electrofusion of giant vesicles in a microfluidic device. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 81-87.
- Weizenmann, N., Huster, D., & Scheidt, H. A. (2012). Interaction of local anesthetics with lipid bilayers investigated by 1H MAS NMR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 3010-3018.
- Xia, Y., & Whitesides, G. M. (1998). Soft Lithography. *Angewandte Chemie International Edition*, 550-575.
- Yi, Z., Nagao, M., & Bossev, D. P. (2010). How lidocaine influence the bilayer thickness and bending elasticity of biomembranes. *Journal of Physics: Conference Series*, 012037.
- Yi, Z., Nagao, M., & Bossev, D. P. (2012). Effect of charged lidocaine on static and dynamic properties of model bio-membranes. *Biophysical Chemistry*, 20-27.
- Yun, I., Cho, E.-S., Jang, H.-O., Kim, U.-K., Choi, C.-H., Chung, I.-K., y otros. (2002). Amphiphilic effects of local anesthetics on rotational mobility in neuronal and model membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 123-132.
- Zapata-Morin, P. A., Sierra-Valdez, F. J., & Ruiz-Suárez, J. C. (2014). The interaction of local anesthetics with lipid membranes. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 200-205.
- Zhang, J., Hadlock, T., Gent, A., & Strichartz, G. R. (2007). Tetracaine-Membrane Interactions: Effects of Lipid Composition and Phase on Drug Partitioning, Location, and Ionization. *Biophysical Journal*, 3988-4001.