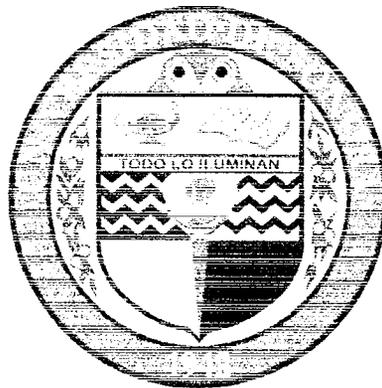


UNIVERSIDAD DE SONORA
DIVISION DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE FISICA

Electroformación de Vesículas de Fosfolípido

Tesis

Que para obtener el título de Licenciado en Física presenta
Carlos Luna López



EL SABER DE MIS HIJOS
HARÁ MI GRANDEZA

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



“El saber de mis hijos
hará mi grandeza”



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

Aprobación de Tesis

Los miembros del jurado designado para revisar la tesis de licenciatura de Carlos Luna López, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Licenciado en Física, en el programa del Departamento de Física de la Universidad de Sonora

Dr. Amir Dario Maldonado Arce

Presidente

Dr. Ricardo Lopez Esparza

Secretario

Dr. Emeso Hernandez Zapata

Vocal

Dr. Cesar Marquez Bojorquez

Suplente

Si tú crees que estás derrotado, lo estás; si tú crees que no te atreves, no lo harás.

Si te gusta ganar, pero crees que no puedes vencer, es casi un hecho que vas a perder.

Si tú crees que vas a perder, estás perdido; porque en este mundo encontramos que el éxito empieza en la voluntad del hombre, y que reside en una actitud personal.

Si tu crees que eres inferior, lo eres; tienes que pensar en grande para elevarte, tienes que estar seguro de ti mismo antes de poder alcanzar la cumbre.

Las batallas no siempre las gana el más fuerte, o el más veloz, tarde o temprano el hombre que triunfa es aquél que cree que puede triunfar.

Vince Lombardi

Agradecimientos

Principalmente a mis padres José Carlos Luna Zacarías y Silvia López
López

A mi asesor, maestro pero sobretodo mi amigo Amir Maldonado Arce,

A la persona que me introdujo en el laboratorio Gerardo Paredes Quijada

Al apoyo del Departamento de Física , administración y contabilidad, que
contribuyeron a que mejorara mi calidad profesional.

Al Laboratorio de Biofísica y a todos sus integrantes por todos sus
conocimientos y su amistad.

Índice

Agradecimientos

Introducción

Capítulo 1 Fosfolípidos.

1.1 Fosfolípidos utilizados

1.1a SOPC

1.1b Serina

1.2. Liposomas o Vesículas de Fosfolípido

1.2.1 Membranas

1.2.2 Geometría

1.2.3 Vesículas

Capítulo 2 Métodos de formación de Vesículas Unilamelares Gigantes (GUVs)

2.1 Deshidratación-Rehidratación

2.2 Hidratación con sacarosa

2.3 Electroformación (con alambres de platino).

2.4 Electroformación con alambres de platino bajo condiciones fisiológicas

2.5 Electroformación con portaobjetos recubiertos de Indio Óxido de Estaño (Indium Tin Oxide, ITOs).

2.6 Teoría sobre Electroformación

Capítulo 3 Experimentos y Resultados.

3.1 Substrato

3.2 Relación entre las vesículas.

3.3 Cinética del crecimiento de las vesículas

3.3.1 SOPC pura

3.3.2 SOPS pura

3.3.3 Mezclas SOPC: SOPS

3.3.4 Electroformación con ITO sin sustrato

Capítulo 4 Aplicaciones de las Vesículas Unilamelares Gigantes (GUVs)

4.1 Energía libre de Helfrich

4.2 Curvatura espontánea

4.3 Elasticidad y morfología de la bicapa

4.4 Membranas activas y reacciones químicas

4.5 Propiedades cohesivas y de transporte

4.6 Adhesión y Adsorción.

4.7 Espectroscopia de fuerza dinámica

4.8 Aparatos Bioelectronicos

4.9 Polimerosomas

Conclusión

Referencias

Introducción

Los Fosfolípidos son moléculas formadas por dos cadenas hidrofóbicas unidas a un grupo fosfato. Estos se autoensamblan y dan origen a las vesículas. Existen diferentes tipos de vesículas, multilamelares y unilamelares. Entre las unilamelares tenemos a las vesículas unilamelares pequeñas o SUV; a las vesículas unilamelares largas LUV y a las vesículas que son objeto del estudio en esta tesis, las vesículas unilamelares gigantes GUV.

Existen diferentes métodos para producir diferentes tipos de vesículas. En particular, el método de hidratación produce vesículas polidispersas con diferente tamaño y forma, esféricas cilíndricas y complejas agregados multilamelares de diámetros desde unas pocas micras hasta 50 micras. Las características de las estructuras dependen de los pasos en el proceso de la formación.

Por otro lado, el método de electroformación produce vesículas unilamelares gigantes (GUV's). Para esto, se utiliza un campo eléctrico alterno aplicado a baja frecuencia a una película de fosfolípido hidratado. Como resultado, vesículas unilamelares se originan a partir de los electrodos. Existen en general dos tipos de electrodos en el proceso de electroformación: con alambres de platino y con portaobjetos recubiertos de Indium Tin Oxide.

Este método es bastante útil ya que por ejemplo podemos estudiar sus propiedades elásticas mediante micropipetas y realizar la observación directa con el microscopio óptico durante el proceso de la formación de GUVs. Esto nos permite controlar el diámetro de las vesículas con el campo eléctrico alterno.

A pesar de flexibilidad del método, aun no está completamente entendido el mecanismo físico del crecimiento y formación de vesículas bajo el campo eléctrico.

El objetivo de este trabajo es caracterizar algunos aspectos del crecimiento y la formación de vesículas de dos mezclas de fosfolípidos (SOPC: SOPS) por medio del método de electroformación. Para esto hemos estudiado la cinética de este proceso, desde que los fosfolípidos son hidratados hasta que se convierten en GUV's.

En el capítulo 1, se presenta una breve descripción de los fosfolípidos utilizados en nuestros experimentos. Estos fosfolípidos corresponden al grupo colina (SOPC) y al grupo serina (SOPS. Estos dos fosfolípidos se encuentran en membranas de diferentes tipos de células biológicas, como en el hígado y en el cerebro respectivamente.

En el capítulo 2, el lector se encontrará con diferentes tipos de métodos para la preparación de vesículas unilamelares gigantes (GUVs). Exploraremos en cada uno su método de preparación, sus ventajas y sus desventajas. Se describe más ampliamente el método utilizado en nuestros experimentos y cuyas bases se encuentran en el método de electroformación descrito por Angelova et al. (Angelova, 1986), donde haremos una descripción teórica sobre el método de electroformación que propusieron en 1986, sin embargo hasta ahora se encuentra sin entender completamente el proceso de formación de vesículas por medio de este método , por lo que se hace énfasis en el capítulo 2 en la teoría propuesta por Angelova et al. y las correcciones que son necesarias, las cuales están apoyadas por los experimentos que hemos realizados así como por algunos artículos de investigación involucrando el proceso de electroformación (Dobereiner, 2000)

En el capítulo 3 presentamos los resultados obtenidos, entre ellos se encuentran el comportamiento del crecimiento de las vesículas durante el proceso de electroformación, así como los experimentos de la cinética de la electroformación de vesículas de fosfolípido y los diferentes fenómenos que en ella ocurren. También se observó la influencia del substrato en la formación de GUVs.

Un resumen sobre diferentes aplicaciones para las vesículas gigantes se mencionan en el capítulo 4. La preocupación por entender completamente la cinética del proceso de electroformación de vesículas unilamelares gigantes es de gran importancia, donde las diferentes aplicaciones pueden ser tales como microcapsulas para terapia génica. Por otro lado, los estudios experimentales con GUVs han sido fundamentales en el análisis de los procesos celulares, en particular la caracterización de las membranas biológicas.

Capítulo 1

Fosfolípidos.

Las vesículas que en este trabajo preparamos con el método de electroformación están formadas por unos materiales que se llaman fosfolípidos. Estos están formados por moléculas *amfipáticas* o *anfifílicas*. Reciben este nombre porque cada molécula tiene un grupo químico soluble en agua y dos colas hidrofóbicas. Esto hace que al solubilizarse en agua, espontáneamente se agrupen y formen ya sea micelas o bicapas. De hecho, bicapas de fosfolípido forman la estructura básica de las membranas biológicas.

A diferencia de los lípidos (grasas), los cuales consisten en glicerol y tres cadenas de ácido graso, los fosfolípidos son derivados ya sea de glicerol o de la esfingosina. Los fosfogliceridos (glicerolfosfolípidos) contienen una fosfatida y dos ácidos grasos esterificados a dos carbonos del glicerol y un grupo de ácido fosfórico esterificado al tercer carbón. El grupo fosfato en turno está esterificado a un alcohol, como etanolamina, colina, serina, o inositol. La esfingomielina está basada en esfingosina, la cual en contraste con el glicerol ya contiene una larga cadena de hidrocarbón. La segunda cadena de hidrocarbón está provista por un éster ligado a un ácido graso. Para la cabeza la esfingosina está esterificada a un grupo de ácido fosfórico la cual está unida por éster a una colina. La cadena de ácidos grasos normalmente contiene un número par de átomos de carbono entre 14 y 24, donde de 16 a 18 es lo más común. En la figura 1.1 y 1.2 se muestra la estructura molecular de diferentes tipos de fosfolípidos.

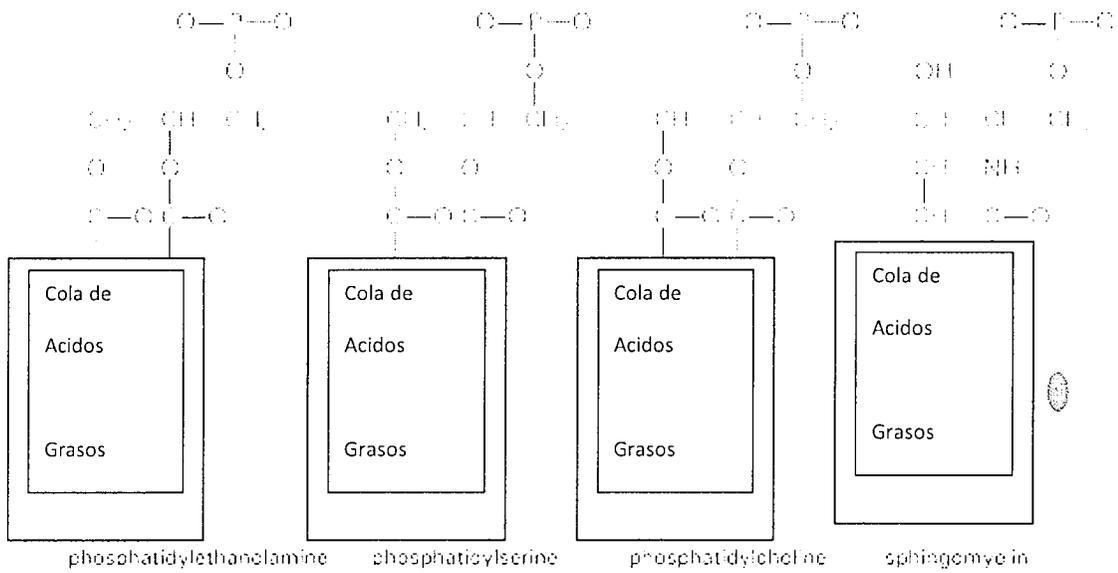


Figura 1.2 Estructura molecular de fosfolipidos

1.1 Fosfolípidos utilizados

Dependiendo del tipo de fosfolípidos y las condiciones del método de preparación se forman diferentes estructuras de liposomas. En nuestro trabajo utilizamos dos fosfolípidos cuyas cabezas polares son representativas de las membranas biológicas. A continuación los describiremos brevemente.

1.1a Colina

El primer fosfolípido de los utilizados tiene como cabeza polar al grupo colina. Además, tiene dos colas hidrofóbicas de 18 carbonos cada una. Una de dichas colas es saturada, mientras que la otra presenta una doble ligadura. El nombre completo de este fosfolípido es: 1-Stearoil-Oleoil-Sn-Glicero-3-Fosfatidilcolina, lo cual en inglés se abrevia como SOPC. Su fórmula química es $C_{44}H_{86}NO_8P$, y su peso molecular es 788.14 gr/mol.

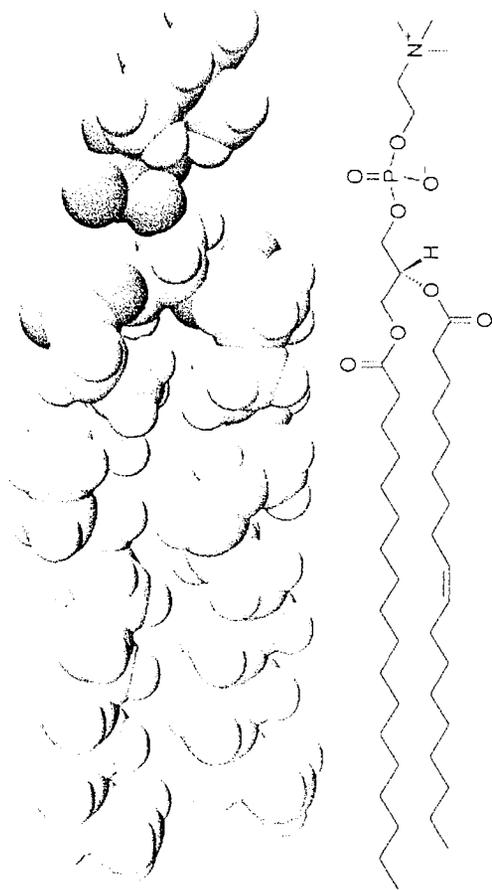


Fig.1.3 Estructura de SOPC

De todos los fosfolípidos, los que tienen la cabeza polar tipo colina son los más importantes pues son los que se encuentran en mayoría en las membranas celulares.

Son también el principal fosfolípido circulando en plasma, donde es el principal componente de las lipoproteínas, especialmente HDL (lipoproteínas de alta densidad las cuales modifican la circulación del torrente sanguíneo y la tensión de la membrana), aunque son poco encontrados en membranas de bacterias. Los fosfolípidos con grupo colina son neutros.

En el caso particular del SOPC, podemos decir que la perturbación de su síntesis en la célula puede llevar a la inhibición del crecimiento celular o incluso a su muerte (Cui Z, 2002). La síntesis acelerada de SOPC parece ocurrir en células de cáncer y tumores sólidos, lo cual puede ayudar a que sea un objetivo para agentes terapéuticos.

Por su estructura prácticamente cilíndrica, el SOPC se organiza espontáneamente en bicapas, por lo cual resulta ideal para utilizar este fosfolípido para modelo experimental de membranas biológicas. Tales propiedades son esenciales para crear un balance con otros lípidos que no forman bicapas o que forman microdominios específicos (rafts). Haciendo combinaciones de esos fosfolípidos con SOPC, se pueden conseguir bicapas como en la figura 1.4.

Además de esta función la molécula también sirve como señalador especialmente en el núcleo. También se conoce que la enzima 3-hidroxi-butirato deshidrogenasa requiere estar unida a SOPC antes de funcionar óptimamente. La SOPC es el precursor biosintético de la esfingomielina y tiene influencia en varios de los procesos metabólicos. Es precursora del ácido fosfatídico, con importantes funciones de señalamiento (Fox, 1976).

En 1985 Yechiel y Barenholtz de la Hebrew University, publicaron un trabajo en el cual hablan sobre la relación de SOPC con el envejecimiento, se trata de un estudio *in vitro* durante 20 días usando células del corazón de ratones alimentándolas con SOPC se aglomeraron latiendo en unisono a 160 latidos por minuto (Yechiel, 1985). Así mismo existen otros artículos donde se intenta utilizar el SOPC en toxicología: hígados diabéticos o alcohólicos, malnutrición, arterioesclerosis y catálisis de drogas (Gundermann, 1993).

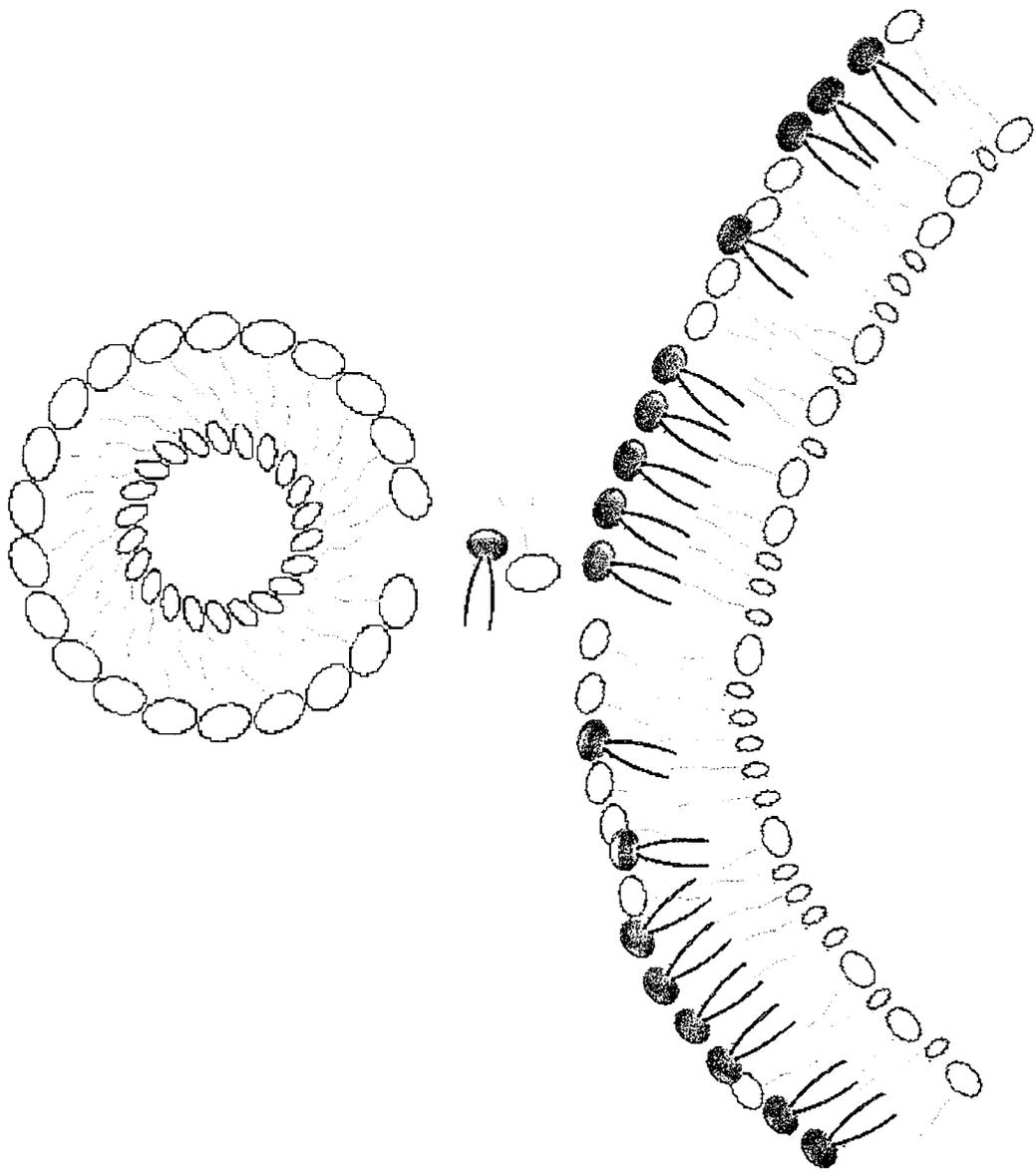


Figura 1.4 Mezclando SOPC con otros fosfolípidos

1.1b Serina

El otro fosfolípido utilizado tiene como cabeza polar al grupo serina, y colas hidrofóbicas idénticas al SOPC. El nombre completo de este fosfolípido es: 1-Stearoil-Oleoil-Sn-Glicero-3-Fosfatidilserina, lo cual en inglés se abrevia como SOPS. Su fórmula química es $C_{42}H_{79}NO_{10}P$ y su peso molecular es 812.05 gr/mol. Cabe decir que los fosfolípidos de grupo serina son los fosfolípidos cargados más abundantes en las células.

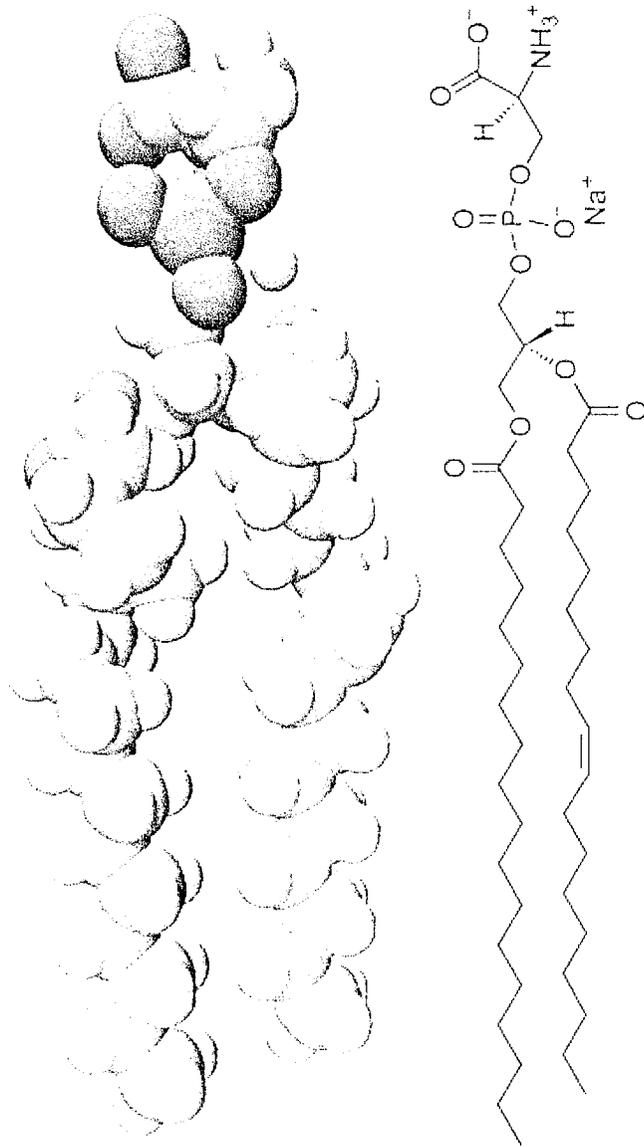


Fig.1.5 Estructura de SOPS

Aunque la SOPS se distribuye ampliamente entre animales, plantas y microorganismos es usualmente menos del 10% del total de fosfolípidos de cada organismo; se concentra mayormente en la mielina y tejido cerebral y puede llegar a ser del 10 al 20 mol% del total de fosfolípidos en la membrana plasmática.

Así como otros fosfolípidos naturales se encuentra en forma salinas, sin embargo es propenso a reaccionar con el calcio vía átomos de oxígeno cargados modificando la composición de la cabeza polar. Esta interacción puede ser de considerable relevancia para el estudio de SOPS sobre todo durante la formación de huesos. La concentración varia de tejido ha tejido entre el hígado y el cerebro (Wu, 2008).

La SOPS se encuentra enteramente en la monocapa interna de la membrana celular y es el fosfolípido aniónico más abundante. La presencia de cantidades apreciables de SOPS en los endosomas y lisosomas habilita a estos compartimientos para engancharse con proteínas con dominios compatibles con la serina. La alta concentración de este lípido aniónico resulta en una carga negativa de la superficie en la cual proteínas policatiónicas pueden adherirse (Bogdanov, 1999).

Además de esta función como componente de las membranas celulares, la SOPS es un cofactor esencial que adhiere y activa la proteína Kinasa C. Está involucrada en el proceso de coagulación de sangre de las plaquetas, mejorando la activación de la molécula clave para la coagulación sanguínea. Anticuerpos para SOPS se forman en ciertos estados de enfermedad, incluyendo trombosis y pérdida de embarazo

Se sabe que la SOPS juega un rol importante en la regulación de apoptosis (muerte celular programada) en respuesta a un estímulo de calcio como se puede observar en la figura 1.6. Así mismo se ha establecido que SOPS y fosfatos inorgánicos deben de estar presentes en la formación del hueso, antes que los iones de calcio sean introducidos, cuando la alta afinidad de SOPS con el calcio se vuelve importante (Balasubramanian, 2007).

Las altas concentraciones de ácido docosahexaenoico (DHA) en el cerebro y SOPS son importantes para el desarrollo de las funciones de sus tejidos. La acumulación de SOPS en

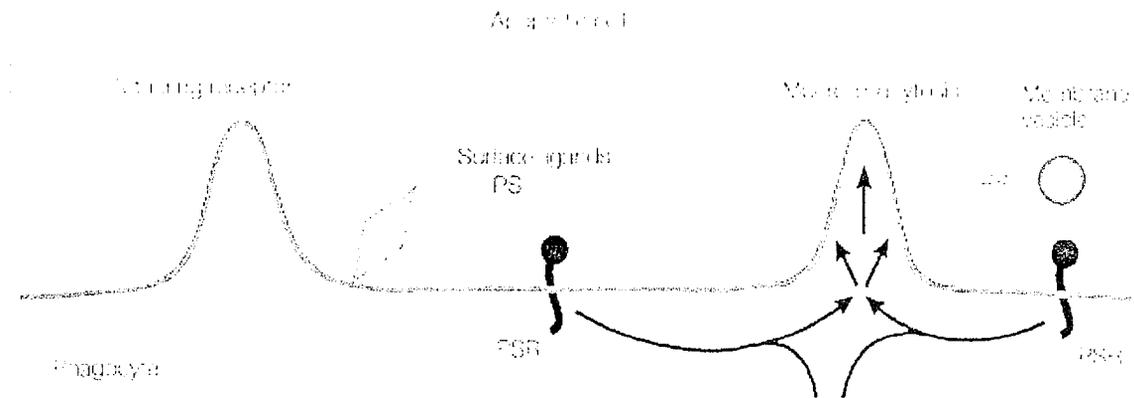


Figura 1.6 Célula Apoptótica adhiriéndose a una superficie gracias a la concentración de serina en su membrana.

las membranas neuronales es promovida por el DHA y es importante para el mantenimiento y la supervivencia de las neuronas(Kim, 2007).

Por el otro lado la FDA (Food and Drug Administration) de Estados unidos considera que hay una alguna evidencia científica de que incluir SOPS en la dieta humana reduce el riesgo de demencia o disfunción cognoscitiva.

1.2. Liposomas o Vesículas de Fosfolípido

1.2.1 Membranas

Las membranas biológicas están formadas por fosfolípidos, colesterol, proteínas, esfingomielina, glicolípidos. Para estudiar las diferentes propiedades de las membranas biológicas en biofísica se utilizan modelos. El modelo experimental más simple es aquel formado por una bicapa de fosfolípidos.

La membrana es una estructura que delimita a las células y a los diferentes organelos. Sin embargo la membrana es más que solo un delimitador de espacio. Algunos organelos están hechos solamente de membranas (retículo endoplásmico, aparato de Golgi). Incluso, si se destruye la membrana externa de una célula, esta muere, a diferencia de lo que ocurre cuando se infringe daño en otras partes como el ADN o el núcleo, donde la célula puede continuar viva.

Una membrana rodea a todas las células que llevan las señales nerviosas en los organismos. Maneja la producción de energía de la mitocondria, en la cual sin su doble estructura membranal no hay separación de carga eléctrica, ni ciclo de Krebs y subsecuentemente tampoco energía. Se encuentra en el manejo de todos nuestros sentidos especialmente el de la vista. Por ejemplo, en la retina hay 100 millones de células fotorreceptoras, de las cuales por cada una de esas células existen 140 millones de receptores (péptidos llamado rodopsina), todos incrustados en membranas y dispuestos a activarse con un fotón (Rodieck, 1998).

Generando una espontánea “burbuja” acuática la membrana formada por una bicapa de fosfolípidos, actúa como un tubo de ensayo natural dentro del cual se encuentran los demás elementos bioquímicos, de tal manera que las reacciones puedan proceder. Los fosfolípidos proveen empaquetamiento biológico y la capacidad de acarrear procesos bioquímicos en su interior, ellos son las moléculas que crean la célula biológica (Rudin 1985).

1.2.2 Geometría

Debido a que los fosfolípidos son anfifílicos tienen una fuerte tendencia a la agregación, sin embargo, depende de la forma de los lípidos y su empaquetamiento si se forman micelas o bicapas. La geometría como podemos ver en la figura 1.7 y 1.8 puede ser aproximada por tres parámetros:

- 1.- El área optima de la cabeza a_0 . (Debido a la repulsión electrostática entre moléculas vecinas, esto depende fuertemente del pH y la fuerza iónica de la solución para lípidos cargados).
- 2.- La longitud de la cadena de hidrocarburos.
- 3.- El volumen molecular de la cadena de hidrocarburos v .

Una teoría simplificada sugiere que la forma del agregado depende esencialmente del parámetro de empaquetamiento (Israelachvili, 1991)

$$r = \frac{v}{a_0 l_c}$$

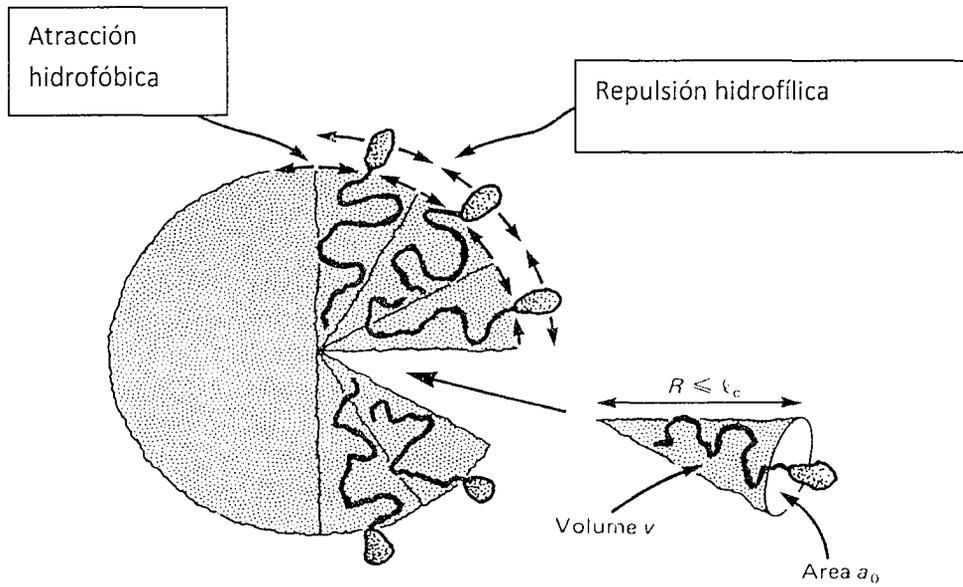


Figura 1.7 Parametros de empaquetamiento

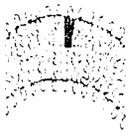
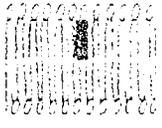
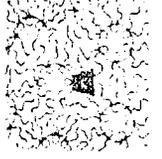
Parámetro de empaquetamiento crítico	Forma crítica de empaquetamiento	Estructura formada
$v / a_0 < 1/3$	cono 	Micela 
$1/3 < v / a_0 < 1/2$	Cono truncado 	Micela cilíndrica 
$1/2 < v / a_0 < 1$	Cono truncado 	Vesícula 
$v / a_0 = 1$	Cilindro 	Bicapa plana 
$v / a_0 > 1$	Cono truncado invertido 	Nicelas invertidas 

Figura 1.8 Geometría según los parámetros de empaquetamiento

1.2.3 Vesículas

Para obtener vesículas, los lípidos normalmente están disueltos en un solvente orgánico, el cual es evaporado utilizando vapor de nitrógeno o poniéndolos al vacío, de tal manera se produce una capa de lípido en una superficie de vidrio (vial o portaobjeto). La capa de lípido es hidratada con una solución acuosa, donde la temperatura debe estar arriba de la temperatura de fusión T_m del lípido. La formación de vesículas después es producida por perturbaciones como agitación, mezclado en una cámara giratoria, o aplicando un campo eléctrico alterno. Los tamaños, las formas y lamellaridad de las vesículas depende del tipo de fosfolípido utilizado y del protocolo seguido.

Las vesículas unilamelares gigantes (GUVs) figura 1.9 tienen un diámetro desde 1 hasta 300 micrómetros. Las GUVs son utilizadas por su tamaño como modelo de membranas biológicas, lo que facilita su visualización en el microscopio óptico y la micro manipulación de vesículas individuales.

En el siguiente capítulo hablaremos con más detalle de los métodos de preparación de vesículas y, en particular, describiremos el método de electroformación.

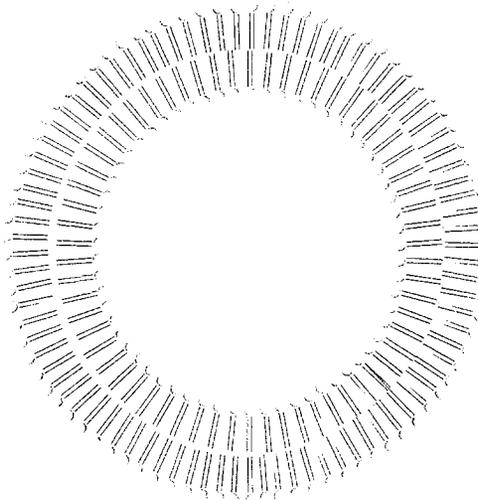


Figura 1.9 Vesícula unilamelar gigante (Bicapa de fosfolípido)

Capítulo 2

Métodos de formación de Vesículas Unilamelares Gigantes (GUVs)

En la literatura se han reportado diferentes métodos experimentales para la formación de membranas unilamelares gigantes. A continuación presentaremos brevemente algunos de ellos y nos extenderemos en el método de nuestro interés, que es el de electroformación con ITOs.

2.1 Deshidratación-Rehidratación

(Orwar, et al.)

Este método es bastante simple y toma muy poco tiempo, al mismo tiempo la mayoría de las vesículas son unilamelares. La desventaja es que el diámetro de las vesículas es en promedio de $10\mu\text{m}$ y las vesículas de fosfolípido están adheridas fuertemente al sustrato.

Orwar et al (Orwar, 1996) reportan el siguiente procedimiento:

1. Preparar vesículas unilamelares largas LUV (Large unilamelar vesicles). Utilizando el proceso de extrusión que consiste en hacer pasar una solución de vesículas de fosfolípido a través de una membrana con un tamaño de poro controlado (dependiendo si quieres vesículas largas o cortas), la solución tiene que pasar a través de la membrana aproximadamente 12 veces.
2. Deshidratar LUV: Agregar una gota de suspensión de LUV ($5\mu\text{l}$) en un sustrato hidrofílico como cuarzo o vidrio. Se coloca el sustrato en una

campana de vacío a temperatura ambiente para deshidratar las vesículas de lípido.

3. Re hidratar LUV: Después de que las LUV estén secas, agregar 5 μ l de solución para re hidratar la membrana lipídica y GUVs se empezaran a formar rápidamente después de un par de minutos como en la figura 2.1

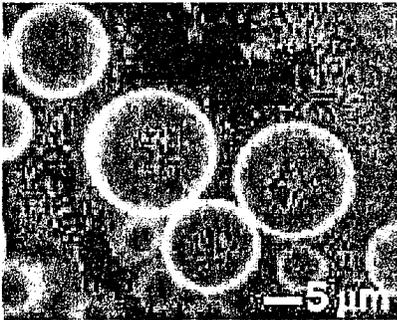


Fig. 2. 1 Vesículas unilamelares gigantes

2.2 Hidratación con sacarosa

(Kinosita, et al.)

Kinosita reporta (Kinosita, 1998) un método eficiente ya que cada preparación de muestra produce varias vesículas unilamelares gigantes GUVs; aprovecha la facilidad de aplicar una diferencia de presión osmótica a las vesículas controlando la concentración interna y externa del soluto. Entre sus desventajas es que utiliza una alta concentración de un elemento externo a las membranas (sacarosa, en concentraciones entre 100 y 500mM). Esto puede afectar algunas propiedades del sistema. Además, las vesículas gigantes no siempre son unilamelares.

Preparación:

1. Crear una Solución de lípidos DMPC. Disolver los lípidos en cloroformo para hacer una solución de concentración 8mg/ml.

2. Crear una Solución de muestra. Use 0.45 g de la solución de lípidos lo cual dará aproximadamente 2.4 mg de lípido DMPC y diluir la solución en 2.4ml de cloroformo.
3. Poner a evaporación. Secar la muestra de lípido diluida en una cámara de vacío manteniendo nitrógeno en la atmosfera por 2 horas.
4. Realizar la hidratación. Agregar 2.4ml de solución de sacarosa (100-500mM) para hidratar la muestra seca de lípido, una vez que el cloroformo se haya evaporado.
5. Mantener en incubación. Se mantiene la muestra en el vacío a 37° C toda la noche. Se formaran las GUVs y flotaran en la suspensión.



Fig. 2.2 GUVs flotando en suspensión

2.3 Electroformación (con alambres de platino).

(Angelova et al)

Este método reportado por Angelova et al (Angelova, 1986) es ampliamente utilizado para producir GUVs y puede incluir varios componentes. La ventaja de este método es que según los estudios realizados el diámetro de las vesículas está controlado por el campo eléctrico y las vesículas son fácilmente separadas del alambre de platino; las vesículas son transferibles hacia otro medio gracias a que la cámara está abierta ver figura 2.3 y todas las GUVs son unilamelares.

Para saber si las GUVs son unilamelares se mide el módulo de ruptura de la membrana con la técnica de aspiración de micropipetas, el cual tendrá un determinado valor para vesículas unilamelares y un valor más alto para vesículas multilamelares.

Entre las desventajas tenemos que cada muestra tiene que pasar un largo periodo de tiempo mientras se le aplica el campo eléctrico comparado con los otros métodos, esto es debido a que la muestra de vesículas unilamelares gigantes se encuentra homogeneizándose dando como producto final una gran cantidad de vesículas gigantes homogéneas y unilamelares a diferencia de los otros métodos, y así mismo consume más tiempo el limpiar la cámara cada vez que se realiza una muestra.

Es difícil poner el lípido en los alambres de platino, no siempre se realizan las GUVs debido a la dificultad de poner correctamente el lípido en los alambres, y además debido a que no se puede poner una gran cantidad de lípido en los alambres no son muchas las GUVs que se obtienen.

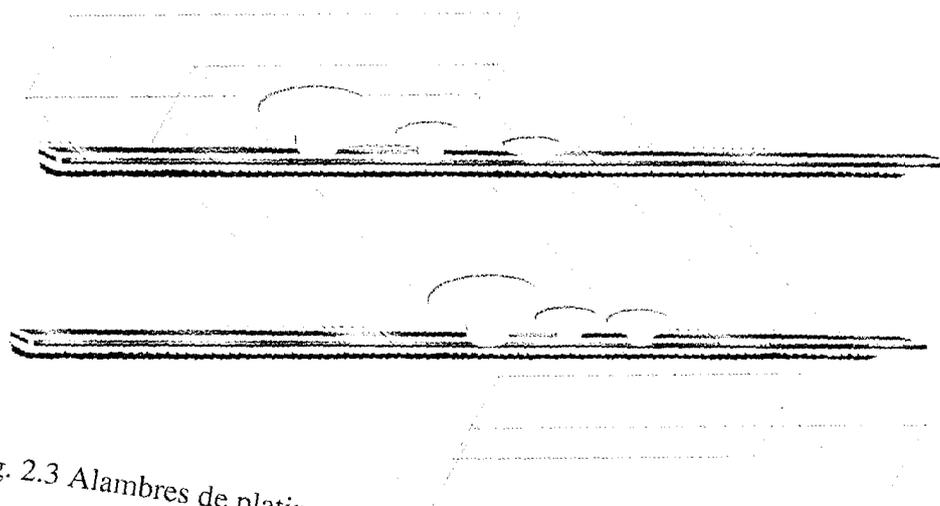


Fig. 2.3 Alambres de platino en la cámara. Electroformación de vesículas gigantes

Procedimiento:

1. Limpieza de la cámara. Para limpiar la cámara en donde se colocan los alambres de platino primero se mete a sonicar en una solución jabonosa, después se saca y se limpia con agua desionizada y después con etanol, para secar la cámara se suele usar nitrógeno líquido.
2. Depositar la gota de lípido. Agregue $3\mu\text{l}$ de solución de lípido (0.2mg/ml) a cada alambre de platino. Mantenga todo el dispositivo en una cámara de vacío con nitrógeno en la atmósfera por 2 horas para evacuar los solventes orgánicos.
3. Pegado de la cubierta de vidrio. Utilizar adhesivo epóxico para sellar la cámara con una cubierta de vidrio.
4. Agregar agua/buffer. 2ml de agua son suficientes y se debe asegurar que no haya fuga de agua en la cámara.

5. Hidratación de lípido. Prender el campo eléctrico (10Hz, 3V) por 9 minutos. GUVs se formaran a lo largo de los alambres de platino.

Actualmente el proceso de electroformación es el mas utilizado para producir vesículas unilamelares gigantes (GUVs) ya sea en alambres de platino o utilizando los portaobjetos recubiertos de ITO. Sin embargo existen todavía dos parámetros del método de electroformación que siguen sin solución: i) se debe utilizar una baja concentración salina (<10mM NaCl) durante el proceso de preparación, ya que se ha visto que altas fuerzas iónicas impiden la formación de GUVs (Bagatolli, 2000). Y ii) las membranas carecen de asimetría (Pautot, 2003), y es difícil y poco practico insertar proteínas en las GUVs.

2.4 Electroformación con alambres de platino bajo condiciones fisiológicas

(Bagatolli et al)

Bagatolli et al muestran un nuevo protocolo de electroformación en donde simulan mejor el medio ambiente nativo de la membrana biológica, es decir, obtienen vesículas unilamelares gigantes (GUVs) por electroformación compuestas de membranas nativas o mezclas de fosfolípidos que crecieron en condiciones fisiológicas (Bagatolli, 2007).

Este nuevo método prepara vesículas unilamelares gigantes utilizando una solución especial de células de sangre, eritrocitos fantasmas (los eritrocitos fantasmas constan de eritrocitos a los cuales se les ha dejado sin organelos es decir, solamente se tiene la membrana de los eritrocito; Steck, 1974), los cuales se depositan en los alambres de platino, en una cámara que permite la visualización en el microscopio óptico, después de depositar los eritrocitos fantasmas en la cámara esta se cubre para evitar exponerla a la luz, y se dejan precipitar por 5 minutos. Después de este ultimo paso se adhieren 500µl de HEPES 25 mM (un buffer orgánico utilizado para cultivar células) y 500µl de una solución de NaCl 150mM. Una vez rehidratada se enciende el campo eléctrico alterno, primero con una frecuencia de 500hz y 940mV por 20 minutos, después se cambia a 2.61V por 90 minutos a una temperatura de 37°C. El resultado de este proceso son GUVs de eritrocitos fantasmas a los cuales llaman RSO G-ghosts con diámetros entre 1 y 50µm.

En la figura 2.4 se muestra una imagen de fluorescencia de RSO G-ghosts etiquetadas con DiIC18 (perclorato de tetrametilindocianina, utilizado para etiquetar membranas insertando sus dos largas cadenas de hidrocarbóno en la bicapa de lípido), electroformadas de eritrocitos fantasmas cargados con Alexa 488 dextran, el cual sirve para la fluorescencia, (MW 300, verde). Se puede notar en la imagen parte A que el dextran fluorescente se mantiene atrapado dentro de las vesículas (G-ghosts) después de la electroformación. En la parte B y C se muestran los posibles mecanismos propuestos para el proceso de electroformación. La parte C se excluye debido a que como podemos observar la solución que se encuentra adentro de los eritrocitos fantasmas, que es diferente a la que se encuentra afuera, se conserva después de la electroformación cuando se convierten en GUVs, esto hace que sea imposible el proceso de la parte C y mas probable el proceso propuesto en la parte B donde no se pierde la solución que se encuentra adentro al convertirse en GUVs.

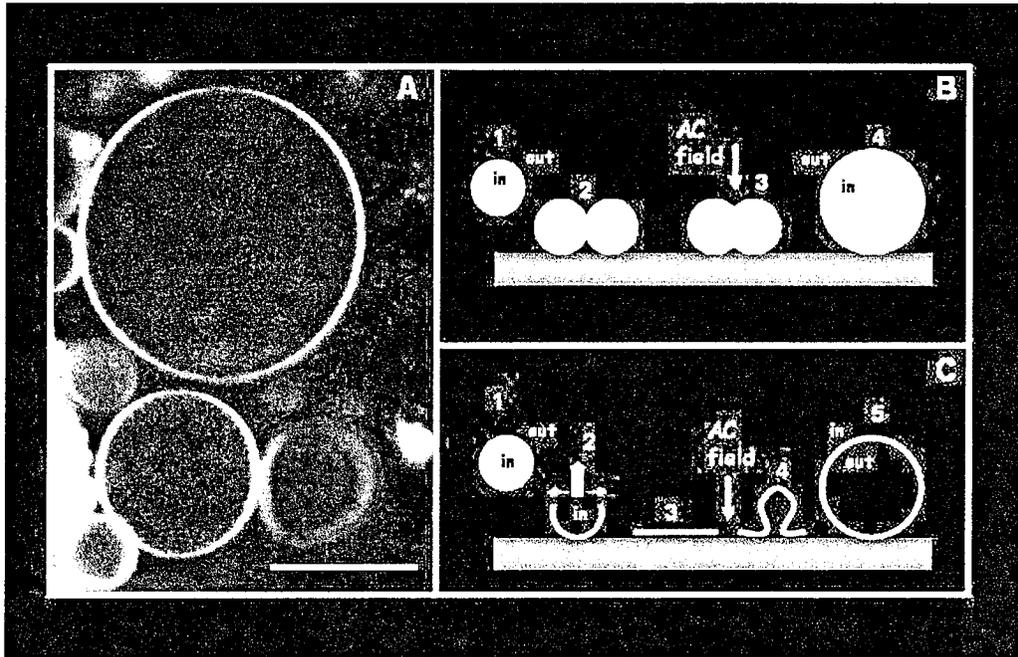


Fig. 2.4 RSO ghosts (GUVS formadas por eritrocitos fantasmas) la barra blanca corresponde a $20\mu\text{m}$.

2.5 Electroformación con portaobjetos recubiertos de Indio Oxido de Estaño (Indium Tin Oxide, ITOs).

(Mayer, 2005)

El método de electroformación produce GUVs con tamaños entre $20\ \mu\text{m}$ y $80\ \mu\text{m}$ de diámetro. Este método sobre la electroformación en lugar de utilizar alambres de platino utiliza portaobjetos recubiertos con una mezcla sólida de dos óxidos metálicos: óxido de indio y óxido de estaño. Por sus siglas en inglés, a este tipo de recubrimiento se le denomina ITO (Indium Tin Oxide). Los portaobjetos ITO ver figura 2.5 son eléctricamente neutros y ópticamente transparentes; están hechos de un substrato de vidrio de alta calidad y presentan una conducción eléctrica uniforme y homogénea.

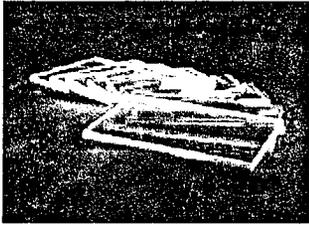


Figura 2.5 Indium Tin Oxide

La utilidad de los ITOs es evidente para cualquier experimento donde se necesite una superficie conductora y que a la vez sea ópticamente transparente.

La limpieza y el buen cuidado de los ITOs es esencial para la formación de GUVs, ya que la composición de la bicapa, sus propiedades elásticas así como otras propiedades son sensibles a los contaminantes, por lo tanto en el proceso de electroformación el paso de la limpieza es uno de los más importantes.

En los experimentos reportados en este trabajo utilizamos este tipo de portaobjetos como electrodos para preparar las muestras. Para crear una cámara y sellar los dos ITOs utilizamos un tipo de plastilina que no contiene grasa, utilizada en laboratorios clínicos.



Fig. 2.6 Cámara de electroformación sellada con plastilina, la parte circular representa la plastilina y la parte oscura es la gota de fosfolípido.

En la figura 2.6 se muestra como se sella la cámara formada con los ITOs; en su interior se deposita el fosfolípido.

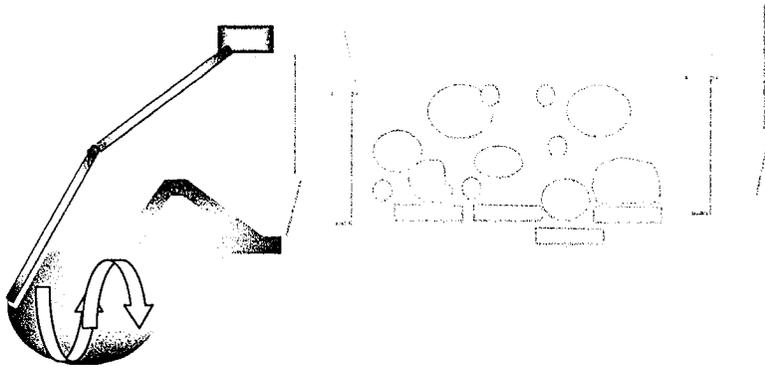


Fig. 2.7 Representación de la electroformación con ITOs

En la figura 2.7 se muestra como se conectan los ITOs con el generador de funciones, el cual sirve para aplicar un campo eléctrico alterno que provoca la formación de las GUVs.

Debido a que este es el método de nuestro interés en los siguientes temas se hablara con más detalle sobre el procedimiento experimental, y posteriormente discutiremos brevemente la teoría propuesta por Angelova y Dimitrov (Angelova, 1986) para explicar el crecimiento de las vesículas por electroformación electroformación.

El procedimiento utilizado para formar vesículas por electroformación consta de los siguientes pasos:

Limpieza.

1. Los ITOs se limpian primero con una solución jabonosa y con agua desionizada. Después se limpian con etanol y cloroformo alternando los

solventes al menos 5 veces, finalizando con etanol que se evapora rápidamente, poniendo el lado cubierto de metal boca arriba (se detecta el lado cubierto de metal utilizando un multímetro, en la versión de resistencia).

2. Después se limpian las micro jeringas con cloroformo al menos 10 veces pero es recomendable 15 veces para evitar que queden residuos de fosfolípidos utilizados en experimentos anteriores y se contamine la muestra.
3. También se debe preparar teflón para el vial donde se encuentran los fosfolípidos, ya que sino este se contaminara echando a perder todo el fosfolípido. Así mismo los viales en donde se deposite la muestra obtenida por electroformación deben de ser limpiados de la misma manera que como se limpian los ITOs.
4. Después de utilizar el fosfolípido y depositarlo en los ITOs, las micro jeringas tienen que ser nuevamente lavadas de 10 a 15 veces con cloroformo y bien guardadas para así asegurar que no haya contaminación de parte de las micro jeringas en la muestra.

Método:

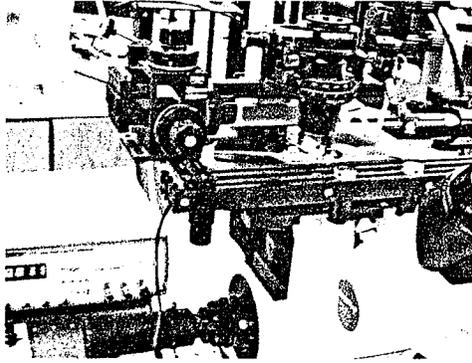


Figura 2.8 Montaje experimental para visualizar la electroformación.

1. Primero se toma la micro jeringa y se obtienen 5 μ l de la solución de lípido con cloroformo (10mg/ml) y se deposita en un ITO tratando de que el depósito quede de la manera mas regular posible (no solo dejar la gota, sino esparcirla suavemente en una zona en el centro del ITO).
2. Después se coloca el ITO en la campana de vacio por 3 horas para que se evapore todo el cloroformo. Se tapa la campana de vacio con un fieltro negro para evitar que la luz afecte al fosfolípido.
3. Se crea la cámara de electroformación con la plastilina clínica como se mostro en la figura 2.6 (se debe preparar la plastilina antes para exponer el ITO con fosfolípido el menor tiempo posible a la intemperie).
4. Se hidrata con la solución deseada, se termina de sellar la cámara y se enciende el campo eléctrico alterno figura 2.9.

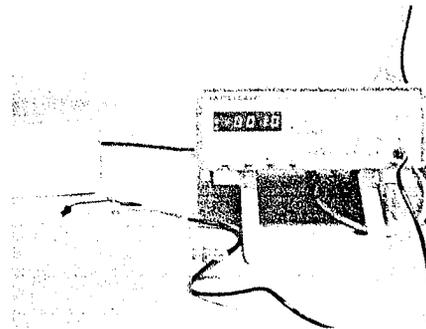


Fig. 2.9 Generador de Funciones

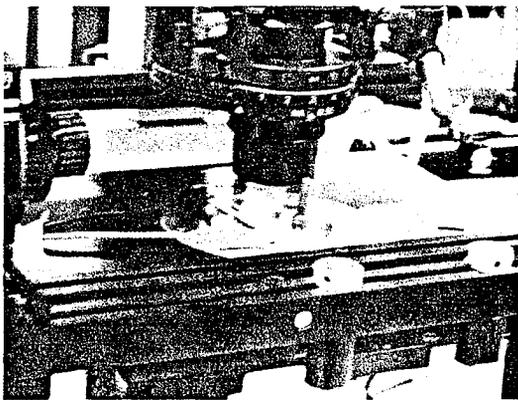


Figura 2.10 Cámara de electroformación bajo el microscopio

Las observaciones se realizaron bajo el microscopio óptico con el método de contraste de fases figuras 2.8 y 2.9. Se utiliza esta técnica pues permite visualizar mejor las vesículas. De hecho, la técnica de contraste de fases permite mejorar las imágenes de muestras donde las estructuras presentan una transparencia similar. Tal es el caso de la mayoría de las células vivas, las cuales son indetectables bajo el microscopio de campo brillante debido al poco contraste. Sin embargo dado que los diferentes organelos presentan una variación en su índice de refracción, esto proporciona una oportunidad de distinguir los objetos.

Lo mismo pasa con las membranas de fosfolípido, debido a que tienen la misma solución dentro de la membrana que afuera se obtiene una mejor imagen utilizando el contraste de fases.

El contraste de fases es un instrumento figura 2.11 vital para la investigación biológica y medica. Cuando se trata de estructuras transparentes o con falta de color, el contraste de fases ha hecho posible el estudiar células vivas, vesículas ver figura 2.12, división celular, componentes biológicos in vivo. El microscopio de contraste de fases fue premiado con el premio Nobel de Física en 1953.

El mecanismo físico del contraste de fases consiste en lo siguiente: Estructuras con un alto índice de refracción refractan la luz a un ángulo más grande que las estructuras con bajo índice de refracción. Las mismas propiedades que causan que la luz se refracte también retrasan la trayectoria de la luz. En un microscopio de campo brillante la luz de estructuras con alto índice de refracción se refractan más allá del centro del lente que las de bajo índice de refracción y llega un cuarto de longitud de onda fuera de fase.

La luz de la mayoría de los objetos pasa por el centro del lente así como por la periferia. Ahora si la luz del borde de un objeto hacia el lente es retrasada por media longitud de onda y la luz del centro no es retrasada, entonces los rayos de luz se encuentran fuera de fase por media longitud de onda. Se cancelan la una a la otra cuando el lente objetivo pone la imagen en foco. Una reducción en el brillo de la imagen se observa. La reducción en el brillo depende en el índice de refracción del objeto.

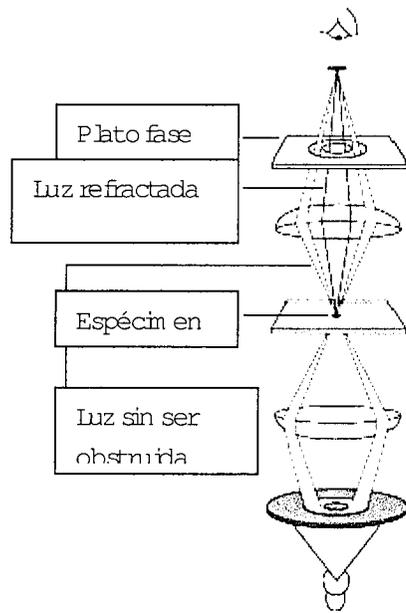


Figura 2.11 Contraste de fases

Figura 2.12 Imagen de vesículas bajo contraste de fases



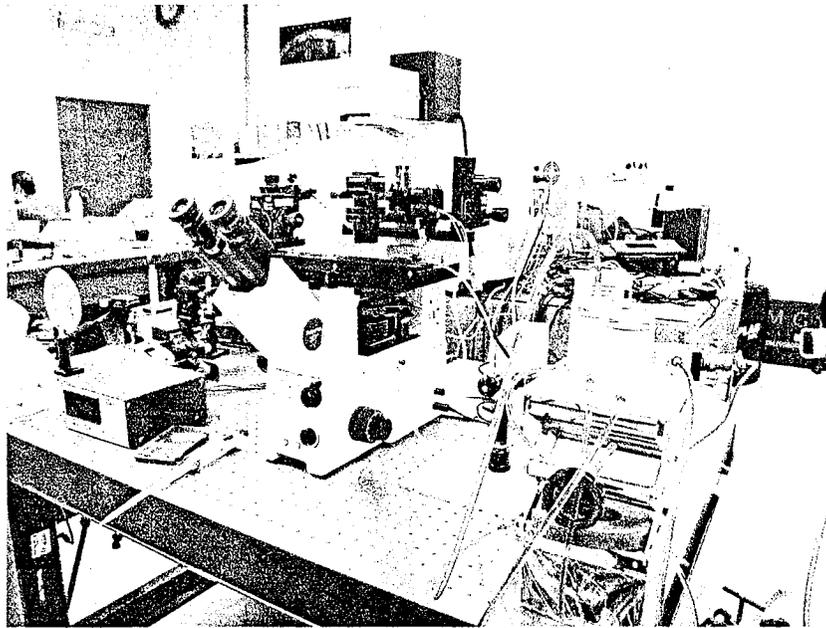


Fig. 2.13 Montaje experimental completo

En la figura 2.13 se muestra el montaje experimental completo, se tiene el microscopio óptico la electroformación a la derecha y a la izquierda el sistema de aspiración por micro pipetas, los cilindros con agua son para controlar la presión ejercida al sistema.

2.6 Teoría sobre Electroformación

En el artículo donde Angelova y Dimitrov reportan por primera vez el método de electroformación de vesículas gigantes, estos autores también presentan un modelo teórico para explicar sus resultados. En dicho modelo, ellos conciben el crecimiento de las vesículas como resultado de dos tipos de fuerzas: unas que lo favorecen y otras que tienden a inhibirlo. A continuación describiremos con cierto detalle dicho modelo para posteriormente realizar algunos comentarios críticos al mismo.

Fig. 2. 14

El planteamiento del modelo comienza suponiendo que al hidratar la película seca de fosfolípido, a partir de ella se forman protuberancias más o menos esféricas, las cuales son precursoras de las vesículas gigantes (figura 2.14). Al aplicar un campo eléctrico, dichas protuberancias crecen hasta formar vesículas unilamelares gigantes.



Fig. 2.15

Entre las fuerzas que favorecen el crecimiento de las vesículas gigantes, Angelova y Dimitrov consideran obviamente en primer término el efecto del campo eléctrico aplicado. Para ello consideran dos placas paralelas, separadas una distancia d , entre las que se aplica una diferencia de potencial V (figura 2.15). El campo eléctrico entre las

placas es constante (se desprecian efectos de borde) y está dado por $E = \frac{V}{d}$. De esta forma, la fuerza eléctrica que una carga puntual q siente al ubicarse en el espacio entre las placas es: $F = \frac{V}{d}q$. Ahora, si la carga se encuentra en una superficie de área A , la fuerza por unidad de área que actúa sobre la superficie es una presión de origen electrostático y está dada por:

$$P_{el} = \frac{V}{d}\sigma \quad (\text{ecuación 1})$$

donde la densidad de carga de la superficie es: $\sigma = \frac{q}{A}$. En el modelo de Angelova y Dimitrov, la ecuación 1 representa la presión, debida al campo eléctrico, y favorece el crecimiento de las vesículas unilamelares gigantes.

La segunda fuerza considerada en el modelo es debida a la presión osmótica. Esta presión existe cuando una membrana separa dos soluciones con diferentes concentraciones de soluto. En tal situación hay una presión debido al gradiente de concentración, la cual, si la membrana fuera permeable al agua, originaría un flujo de agua desde la región menos concentrada hasta la más concentrada. Esto es debido a que la situación de equilibrio es aquella donde las concentraciones son iguales a ambos lados de la membrana.

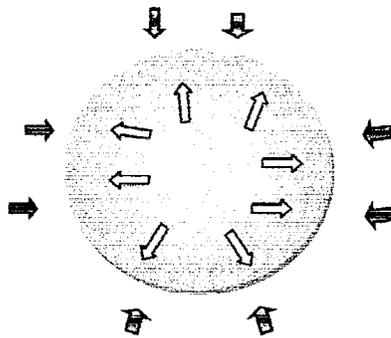


Fig.2.16

En el caso del método de electroformación, Angelova y Dimitrov suponen que en el interior de la vesícula en crecimiento hay una concentración de soluto diferente que en el exterior (figura 2.16). De esta forma, existe una diferencia de presión que favorece el crecimiento de las vesículas, la cual se puede calcular según la expresión:

$$\Delta P_{os} = R_g T (c_i - c_o) \quad (\text{ecuación 2})$$

2)

donde R_g es la constante universal de los gases y T la temperatura absoluta. c_i y c_o son las concentraciones de soluto en el interior y en el exterior de la vesícula, respectivamente. De acuerdo a Angelova y Dimitrov, esta presión favorece el crecimiento de las vesículas gigantes.

Finalmente, el modelo considera una fuerza que se opone al crecimiento de las vesículas: la debida a la Ley de Laplace. Esta ley considera una membrana esférica de tensión superficial γ , parámetro que representa la energía superficial por unidad de área de membrana $\gamma = \frac{E}{A}$. Dado que la energía superficial es proporcional al área de la membrana, esta tiene una tendencia a disminuir su tamaño, encogiéndose. Sin embargo, en el equilibrio, esta tendencia es balanceada por una diferencia de presión que mantiene a la esfera de un tamaño dado. Tal diferencia de presión está dada por

$$\Delta P_{lap} = \frac{2\gamma}{R} \quad (\text{ecuación 3})$$

3)

donde R es el radio de la esfera.

Considerando estos tres términos, el modelo de Angelova y Dimitrov supone que la velocidad de crecimiento del radio de la vesícula es proporcional a las presiones mencionadas

$$\frac{dR}{dt} = L(P_{el} + \Delta P_{os} - \Delta P_{lap}) \quad \text{(ecuación 4)}$$

Los signos del lado derecho de la ecuación anterior reflejan un efecto favorable (positivo) o desfavorable (negativo) de la presión respectiva. La constante de proporcionalidad, L, es denominada “permeabilidad hidráulica” del sistema.

Para integrar esta ecuación, es necesario escribir todos los términos en función del radio de la vesícula en crecimiento. De hecho, el término electrostático no depende de dicho radio, mientras que el término debido a la Ley de Laplace depende explícitamente de él. Por ello, es necesario expresar solamente el término osmótico. Para ello, notemos que si la concentración de soluto en el interior de una vesícula en el instante inicial es c_{i0} , en un

instante t posterior, dicha concentración es: $c_i = c_{i0} \frac{R_0^3}{R^3}$.

Donde R_0 es el radio inicial de la vesícula y R el radio al tiempo t. En esta expresión se ha supuesto que la vesícula es impermeable al paso de soluto. Al introducir esta expresión en el término osmótico, este queda expresado en función del radio de la vesícula.

Sustituyendo las ecuaciones 1, 2 y 3, la ecuación 4 se escribe:

$$\frac{dR}{dt} = L \left(\frac{V}{d} \sigma + R_g T (c_{io} \frac{R_0^3}{R^3} - c_o) - \frac{2\gamma}{R} \right) \quad (\text{ecuación 5)}$$

Para integrar esta ecuación, se cambia a la variable $\Delta R = R - R_0 \ll R$ y se desarrollan en serie de Taylor alrededor de R_0 (a primer orden) los términos que dependen de R . Con esto, tenemos:

$$\frac{d\Delta R}{dt} = L \left(\frac{V}{d} \sigma + R_g T (c_{io} - c_o) - (3R_g T \frac{c_{io}}{R_0} + \frac{4K}{R_0^2}) \Delta R \right) \quad (\text{ecuación 6})$$

En esta expresión, la tensión superficial se ha escrito en términos de una constante elástica K de la siguiente forma:

$$\gamma = 2K \frac{\Delta R}{R_0}$$

La ecuación 6 es fácil de integrar, pues es de la forma $\frac{d\Delta R}{dt} = a - b\Delta R$, donde a y b son constantes. El resultado de la integración es:

$$\Delta R = \Delta R_\infty [1 - \exp(-t/\tau)] \quad (\text{ecuación 7})$$

donde se usó la condición inicial $\Delta R = 0$ a $t = 0$. Los valores de las constantes en la ecuación 7 son:

$$\Delta R_{\infty} = [R_g T (c_{i0} - c_o) + \frac{V}{d} \sigma] / (3R_g T c_{i0} / R_0 + 4K / R_0^2) \text{ y}$$

$$\frac{1}{\tau} = L(3R_g T c_{i0} / R_0 + 4K / R_0^2).$$

Considerando que el radio de las vesículas está dado por $R = R_0 + \Delta R$, los límites de la ecuación 7, predicen el comportamiento a tiempos largos y cortos. En primer término, para tiempos muy grandes, de la ecuación 7 se puede ver que las vesículas alcanzan un radio máximo $R_{\infty} = R_0 + \Delta R_{\infty}$. Por otra parte, desarrollando la función exponencial de la ecuación 7 para tiempos cortos ($t \ll \gamma$), se predice que el crecimiento de las vesículas es lineal en los primeros instantes después de aplicar el campo:

$$R \approx R_0 + \frac{\Delta R_{\infty}}{\tau} t \quad \text{(ecuación 8)}$$

Esta ecuación describe cualitativamente el crecimiento de las vesículas por el método de electroformación.

La ecuación 7 es el resultado principal del modelo propuesto por Angelova y Dimitrov para explicar el crecimiento de vesículas por electroformación. A continuación hacemos algunos comentarios críticos a dicho modelo.

La primer observación que se puede hacer al modelo se refiere tanto a la pertinencia como a al modelo escogido para las presiones favorables y desfavorables al crecimiento de vesículas (ecuaciones 1, 2 y 3).

Si bien la fuerza por la cual el método de electroformación difiere de los demás métodos es la debida al campo eléctrico, la ecuación 1 parece demasiado simplista para modelar bien su efecto. Esto debido a que dicha ecuación no considera la forma esférica de la vesícula. De hecho, si se considera que la superficie del agregado está uniformemente cargada, la fuerza que se siente en cada punto de la misma apunta siempre en la misma dirección: hacia un electrodo, y no en dirección radial (figura 2.17). Aunado a este detalle, se encuentra el hecho de que el método de electroformación funciona aún para fosfolípidos que no tienen carga neta, sino un dipolo en su cabeza polar, tal como la fosfatidilcolina. Además, en versiones más modernas, las vesículas se preparan aplicando un campo eléctrico oscilante, lo cual no está contemplado en la ecuación 1.



Fig. 2.17

En cuanto al término de la presión osmótica (ecuación 2), la objeción que puede plantearse es que el crecimiento de las vesículas ocurre incluso si no hay gradientes de concentración, es decir, aún y cuando la concentración de soluto en el interior y en el exterior del agregado sean iguales: $c_i = c_o$. De hecho, en la mayoría de las situaciones experimentales las vesículas se preparan sin gradientes de concentración entre su interior y su exterior.

Por otra parte, cabe resaltar que el término osmótico puede ser favorable o desfavorable al crecimiento de las vesículas, dependiendo de la dirección del gradiente de

concentración. De hecho, en el caso en que el gradiente es favorable, la ecuación 6 predice el crecimiento de las vesículas aún en ausencia de campo eléctrico. Este es un hecho que, hasta donde sabemos, no ha sido reportado.

Sobre el término relativo a la presión de Laplace (ecuación 3), podemos comentar que se trata de una expresión válida solamente en el equilibrio. Es decir, debido a la existencia de la tensión en la membrana (tensión superficial), es necesario que el interior de la esfera se encuentre a una presión mayor que el exterior, para que su radio no cambie. De hecho, la diferencia en presiones entre el interior y el exterior, necesaria para mantener el equilibrio, depende del radio y está dada por la ecuación 3. Si tal diferencia de presiones no existe, el término de Laplace no tiene sentido. En el caso del modelo de Angelova y Dimitrov, podría argumentarse que tal diferencia de presiones se origina en los efectos combinados de la presión osmótica y del campo eléctrico.

Además de las objeciones que se pueden plantear a los términos considerados en la ecuación 4, también es factible preguntarse sobre la necesidad de considerar alguna otra propiedad del sistema para explicar el crecimiento de las vesículas.

Por ejemplo, si el proceso implica deformaciones de las membranas (formación de protuberancias, aumentos de tamaño, etc.) cabe cuestionarse si es necesario considerar las propiedades elásticas de las mismas. Es sabido que implica diferente gasto energético curvar de igual manera dos membranas con diferente módulo de curvatura media κ .

Asimismo, el gasto energético al incrementar el área de dos membranas diferentes depende de su módulo de compresibilidad superficial K_A . Esto permite suponer que una teoría más completa debería tomar en cuenta el efecto de las propiedades elásticas de las membranas.

Además de estas observaciones de carácter teórico, existen otras de naturaleza experimental que dejan ver que el modelo de Angelova y Dimitrov no explica completamente la formación de vesículas por electroformación.

La primera observación viene del hecho de que al hidratar una película seca de fosfolípido, espontáneamente se forman agregados en solución. A este método de fabricación de vesículas se le conoce como "rehidratación". De hecho, los agregados obtenidos son polidispersos en forma, tamaño y número de membranas que los conforman. Esta observación permite afirmar que no es necesario tener un campo eléctrico para obtener vesículas de fosfolípido. Entonces, el efecto del campo en el método de electroformación consiste en restringir la polidispersidad de las vesículas, haciendo que todas adquirieran una forma esférica y estén conformadas por una única membrana.

El hecho de que la rehidratación permita formar vesículas, aunque polidispersas, en ausencia de campo eléctrico plantea una interrogante relacionada directamente con el modelo de Angelova y Dimitrov: ¿es posible que el efecto del campo eléctrico consista en facilitar la unión de vesículas polidispersas pequeñas para formar vesículas unilamelares gigantes?

Por otra parte, el modelo tampoco explica la procedencia de las moléculas de fosfolípido necesarias para el crecimiento de las vesículas gigantes. En efecto, si en el método de

electroformación el radio de las vesículas crece linealmente con el tiempo, su área debe crecer cuadráticamente con la misma variable. Y si suponemos que cada molécula de fosfolípido ocupa un área determinada a_0 en la membrana, vemos que la cantidad de moléculas de fosfolípido que contiene la vesícula crece también cuadráticamente con el tiempo.

Cabe preguntarse entonces: ¿de donde proviene el fosfolípido necesario para el crecimiento de las vesículas? Tres opciones nos parecen plausibles: 1) que la vesícula mantenga contacto todo el tiempo con el substrato, como sugieren Angelova y Dimitrov (figura 2.18a);

2) que exista un flujo o difusión de moléculas de fosfolípido del substrato o del bulto de la solución hacia la vesícula en crecimiento (figura 2.18b); o,

3) que el campo eléctrico favorezca la fusión de vesículas pequeñas a la vesícula en crecimiento (figura 2.18c).

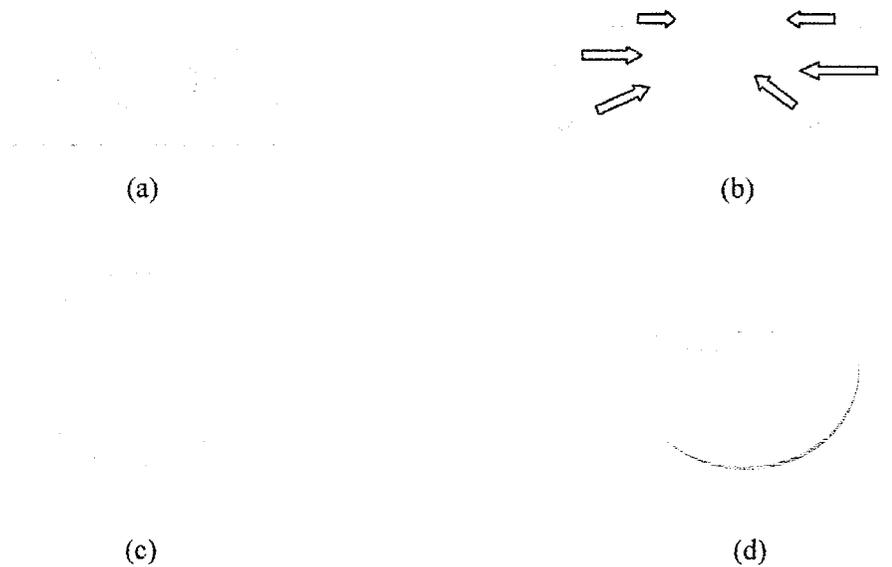


Fig. 2.18

Finalmente, un punto importante que no aclara el modelo es el hecho de que las vesículas gigantes obtenidas por electroformación están constituidas por una sola membrana. ¿Cuál es el mecanismo para que esto ocurra? De hecho, esto pudiera sugerir una nueva posibilidad para la procedencia de las moléculas de fosfolípido que permiten que la vesículas gigantes crezcan: ¿es posible que el efecto del campo eléctrico consista en fusionar capas vecinas de una vesícula multilamelar pequeña para dar lugar a una vesícula gigante unilamelar (figura 6d)? Aun mas crítico, ¿De dónde proviene el agua para llenar el volumen?, estas son preguntas que aun siguen sin contestar sin embargo diferentes experimentos son realizados con el fin de ir aclarando el proceso de electroformación

Como vemos, el modelo de Angelova y Dimitrov presenta limitaciones tanto de carácter teórico como experimental. A pesar de ello, en la literatura no existe otro intento por explicar de mejor manera el crecimiento de vesículas por electroformación. De hecho, trabajos recientes subrayan el hecho de que los detalles del mecanismo del crecimiento de vesículas por este método son aún desconocidos. Nuestro trabajo pretende contribuir, con observaciones experimentales, a clarificar dichos mecanismos.

Capítulo 3

Experimentos y Resultados.

En este capítulo se mostrarán los experimentos que se realizaron con el fin de entender de una mejor manera la cinética del proceso de electroformación ya que en realidad el proceso no está completamente entendido.

Así mismo se presentan los resultados obtenidos y su interpretación, la observación de la cinética de la electroformación y los diferentes fenómenos que ocurren en ella nos llevara a poder crear una teoría más completa sobre el método de electroformación, un mayor entendimiento de cómo interacciona las membranas de fosfolípido con un campo eléctrico así como mejorar las aplicaciones en las que participa. También se comparan los resultados obtenidos con resultados que se encuentran en la literatura sobre otras personas que han realizado experimentos con electroformación.

3.1 Substrato

Utilizando el microscopio de contraste de fases se obtuvieron fotografías del substrato antes de ser hidratado e inmediatamente después de ser hidratado se observa la formación y el crecimiento de las vesículas en el substrato inmediatamente después de ser hidratadas. También se tomaron videos sobre el crecimiento donde se observa de una mejor manera como las vesículas se forman y empiezan a crecer del substrato donde se encuentra la capa de fosfolípido figura 3.1.

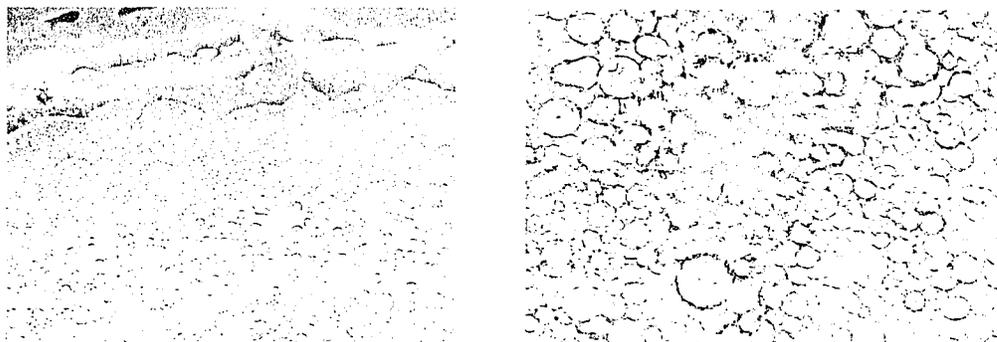


Fig. 3.1 Substrato y rehidratación

El sustrato ha resultado de gran importancia en el proceso de electroformación, es sin duda uno de los pasos más importantes cuando se trata de obtener GUVs. Si se tratara de escoger una de las características más importantes del proceso de electroformación es el sustrato y lo podemos ver en como en diferentes artículos cuando realizan diferentes métodos para colocar el sustrato de la manera más homogénea posible. A continuación se citaran algunos.



Fig. 3.2 Impresiones de fosfolípido

En la figura 3.2 se muestra como se crea un estampado de fosfolípido de tal manera que al encender el campo eléctrico cuando las vesículas se encuentran creciendo más rápido tienen el suficiente espacio para poder crecer homogéneamente (Chun Xu, 2007). Según este artículo el diámetro de las vesículas depende de la longitud de los patrones de fosfolípido y del espacio entre ellos, también deteniendo el campo eléctrico en cualquier momento del proceso.

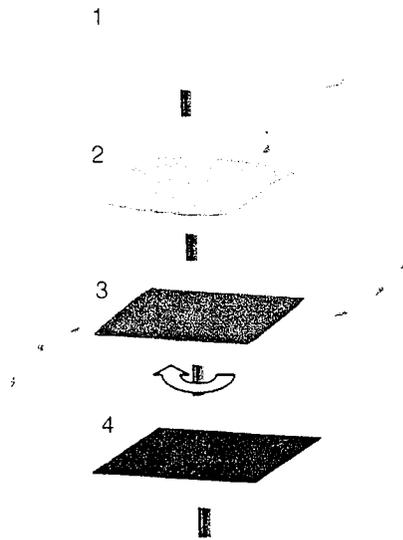


Fig. 3.3 Portaobjetos giratorio

En la figura 3.3 se muestra un método (Mayer, 2005) en el cual después de depositar la gota de fosfolípido se pone a girar el ITO en una plataforma giratoria y se mantiene girando ligeramente en el vacío. De esta manera el ITO se cubre de fosfolípido, se pone a girar entre 50-1200rpm 2 segundos después de depositar el fosfolípido y después de 4-10 minutos se detiene, dejando una capa homogénea de fosfolípido en el ITO.

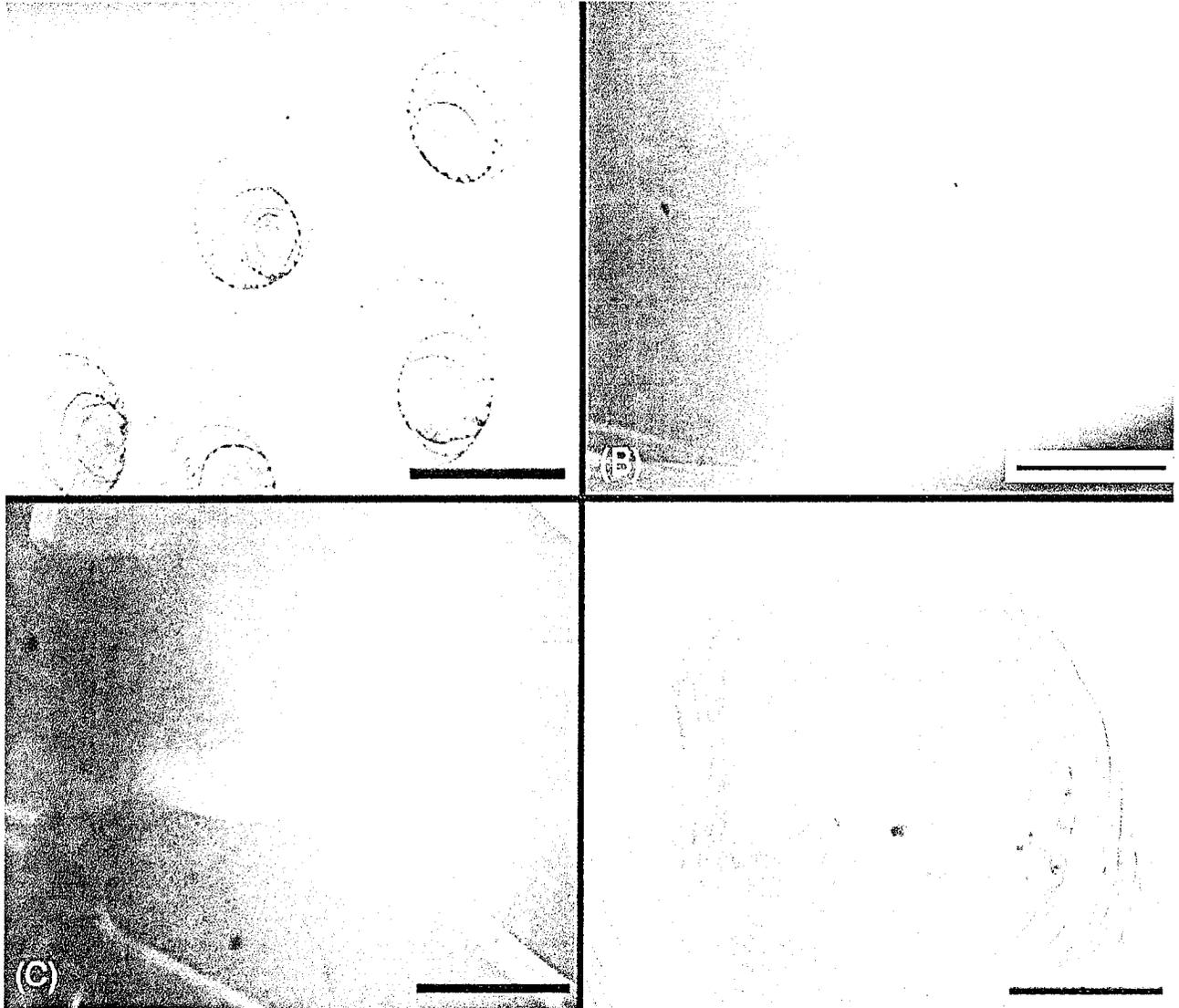


Fig. 3.4 Comparación entre diferentes películas de fosfolípido formadas con diferentes métodos. (a) Evaporación de 5 gotas.
(b) Película Homogénea
(c) No homogénea gota esparcida en el substrato.
(d) Película no homogénea con un giro de 100rpm que es demasiado lento como para homogeneizar la película de fosfolípido.

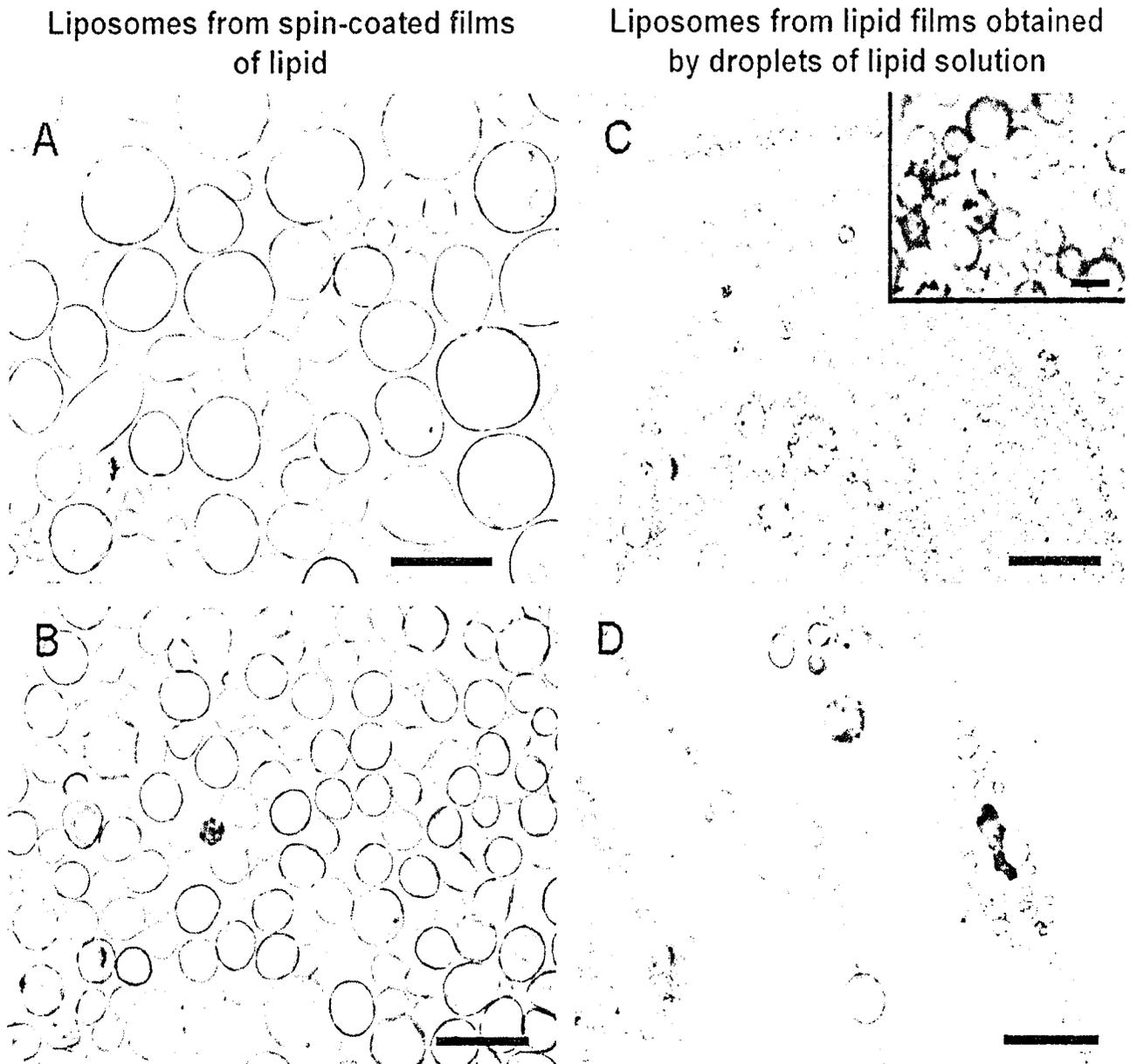


Fig. 3.5 Crecimiento según sustrato

En la figura 3.5 se muestran imágenes tomadas con contraste de fases, en la izquierda se muestra el crecimiento de vesículas en donde se dejó una película de fosfolípido con el método de la plataforma giratoria, a la derecha se observa el crecimiento de vesículas donde la película de fosfolípido se dejó solamente con gotas en el vacío.

En la figura 3.6 se presenta otro tipo de depósito de película. En el se muestra un montaje microfluidico en el cual se forman GUVs y se promueve la fusión de estos liposomas. Se crean 4 cámaras paralelas en donde se puede controlar el flujo y la solución que entra en cada cámara. En el artículo (Mayer, 2005) también se menciona como utilizando el flujo en las cámaras se promueve la fusión entre las vesículas para crear mas GUVs.

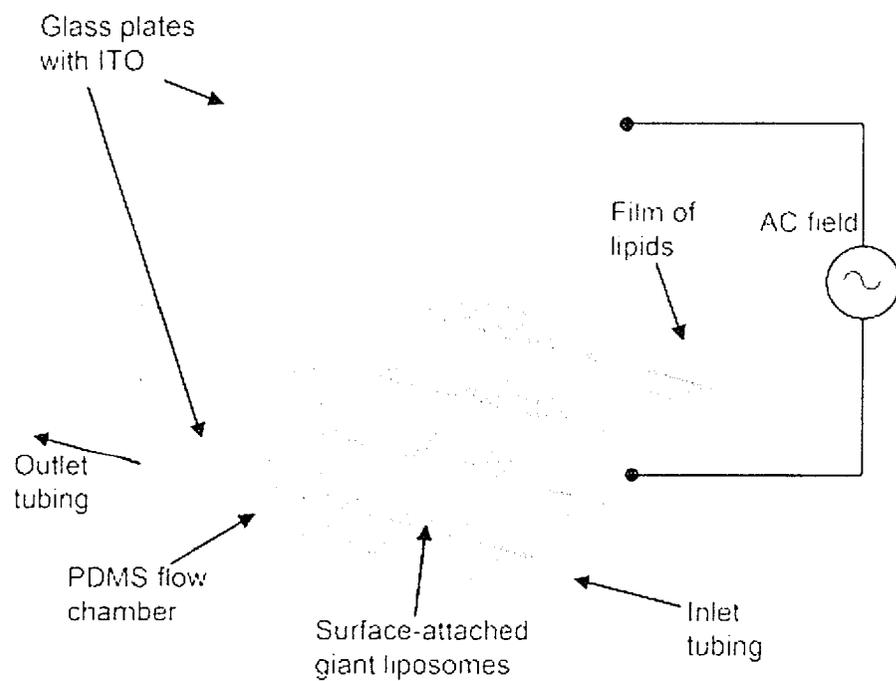


Fig...

Figura 3.6 Cámara de electroformación con flujo inducido

3.2 Relación entre las vesículas.

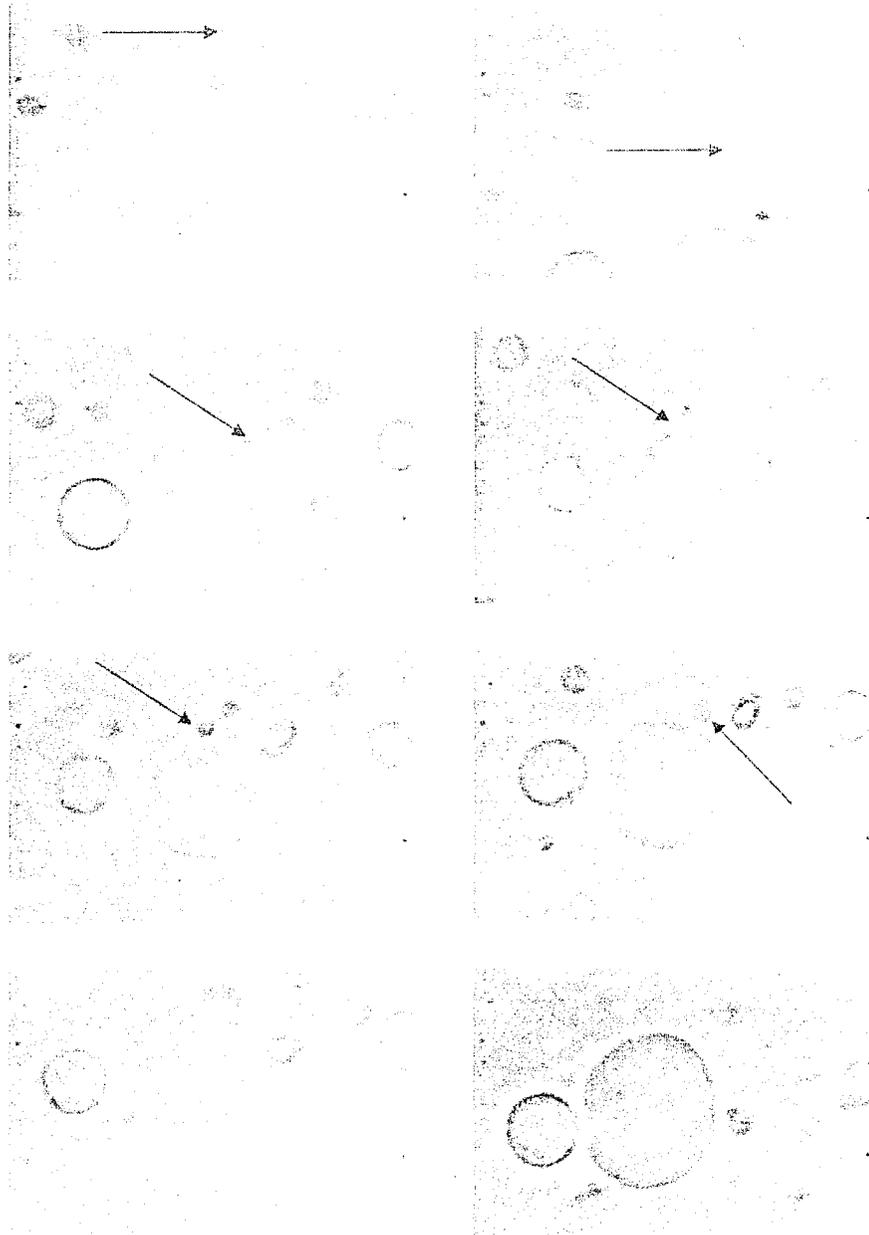


Fig. 3.7 Protuberancias

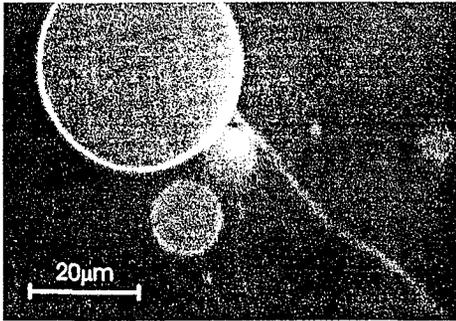


Fig. 3.8 Protuberancias vistas con fluorescencia

En el artículo (Svetina, 2007) se examinan las formas cuasiestables de vesículas de fosfolípido durante la aplicación del campo eléctrico alterno. En este las vesículas son descritas como una esfera madre cargando una protuberancia en forma de un tubo de mielina.

Esta forma es aparentemente una fase común en la transformación de la forma de las vesículas desde la hidratación hasta convertirse en vesículas unilamelares gigantes de diferentes diámetros.

En este cambio de forma las protuberancias con forma de tubos de mielina parecen ser un caso que aparece bastante, las cuales actúan según como reservorios que incrementan el área de membrana al ser incluidos en la esfera madre.(Fig 3.7)

En la figura 3.8 se muestra una imagen de microscopia con fluorescencia de una vesícula hecha con POPC en donde la longitud de la protuberancia es varias veces el diámetro de la esfera madre.

En nuestros experimentos (Fig 3.9) observamos el mismo fenómeno sobretodo con vesículas formadas con SOPS la formación de las protuberancias como tubos era evidente y con diámetros mayores a los antes vistos así como con un movimiento diferente a la hora de incorporarse a la esfera madre.

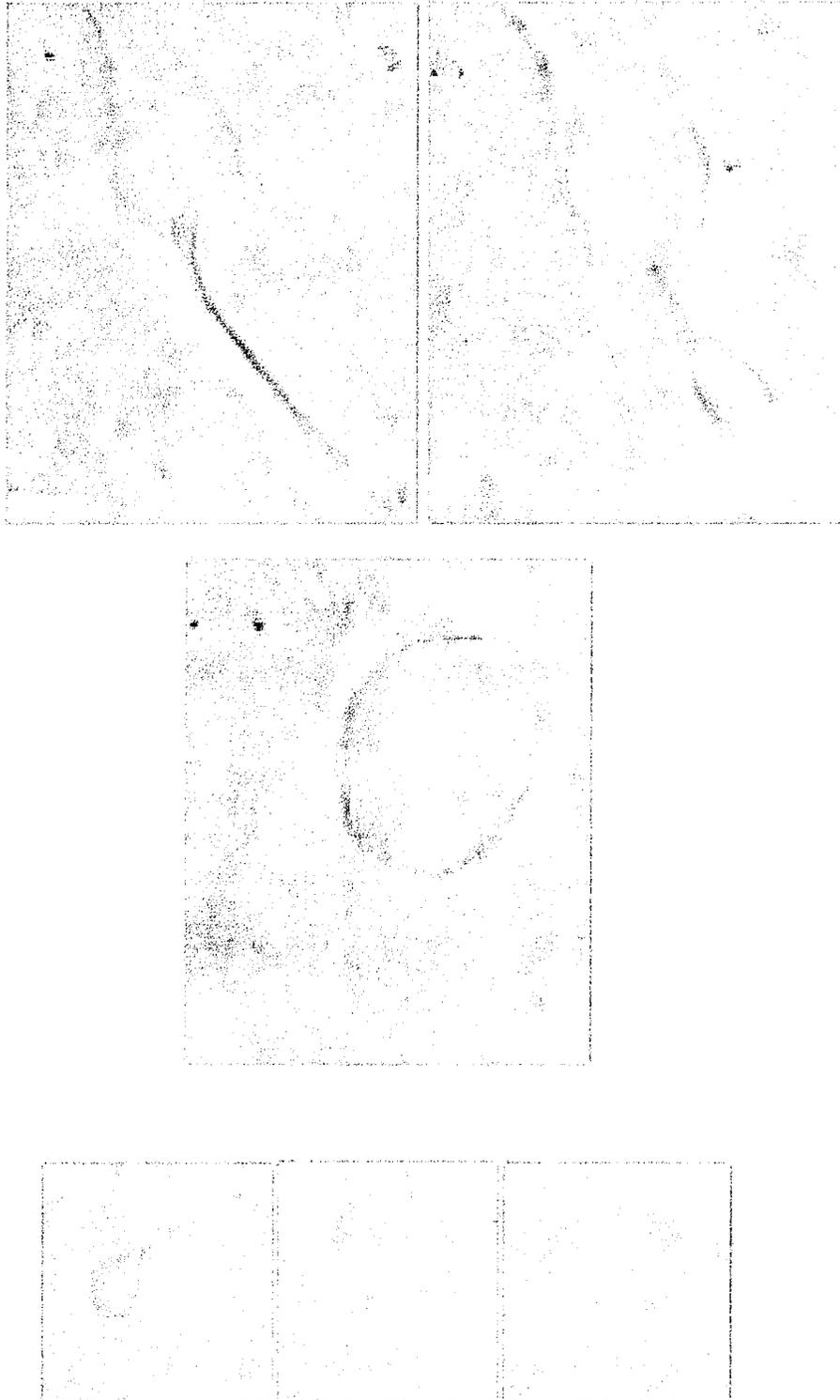


Fig. 3.9 Vesículas de SOPS bajo electroformación

La influencia de un campo eléctrico externo en una membrana pobremente conductora se estudia de manera teórica en diferentes artículos (Isambert, 2007)

El estrés eléctrico desbalanceado creado por una corriente iónica a través de una membrana no perfectamente plana, da lugar a una desestabilización de la energía superficial creando ondulaciones. La deformación de la membrana y la inestabilidad electrodinámica de una membrana flotando libre es estudiada teóricamente figura 3.10

Se encuentra un modulo de ondulación muy inestable con una longitud de onda del orden de micras conectado a la difusión dominante entre membrana y solvente.

Se ha propuesto que la inestabilidad de la membrana bajo un campo eléctrico alterno juega un importante papel en las primeras etapas del proceso de electroformación. Se ha encontrado un rápido crecimiento del modulo de ondulación de longitudes de onda del orden de micras.

Estas deformaciones junto con otros factores complejos, pueden ser los factores de deformaciones a grande escala en las membranas, lo cual después de un complejo proceso, una interacción con fosfolípido vecino da lugar a la formación de vesículas cerradas de un diámetro controlado por medio del campo eléctrico.

Actualmente también se estudian estas fluctuaciones incluyendo el tratamiento de poros con un diámetro muy chico, presentes en la membrana bajo tensión (Diminova, 2007) las cuales son realizadas en GUVs como modelo de membrana celular para el estudio de la electroporacion en células.

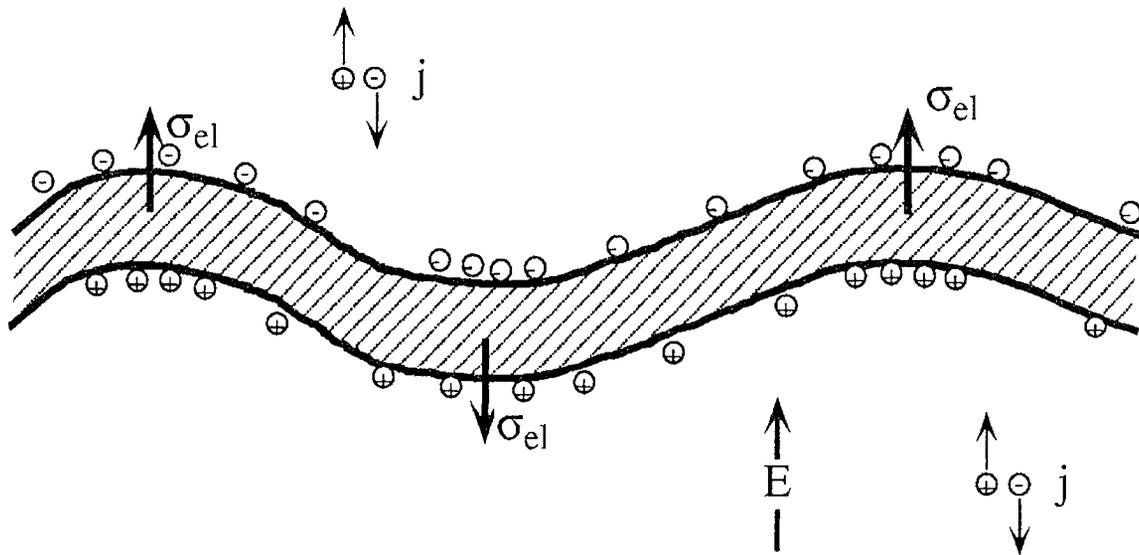


Fig. 3.10 Membrana bajo campo eléctrico

3.3 Cinética del crecimiento de las vesículas

Hemos estudiado la cinética de la electroformación de vesículas formadas con dos mezclas de fosfolípidos: SOPC (neutral) y SOPS (cargado).

Estas vesículas son fácilmente manipulables y actualmente son utilizadas para estudiar las propiedades mecánicas de las membranas por medio de diferentes técnicas como la aspiración con micropipetas con la que obtenemos el modulo de compresibilidad de las membranas.

Cambiando la composición relativa de las membranas se modifica la densidad de carga. El sistema SOPC: SOPS ha sido escogido porque las vesículas obtenidas cuando se hidrata este sistema tienen diferentes características dependiendo de la composición relativa de la membrana. (Fig 11)

Spherical vesicles
for all proportions

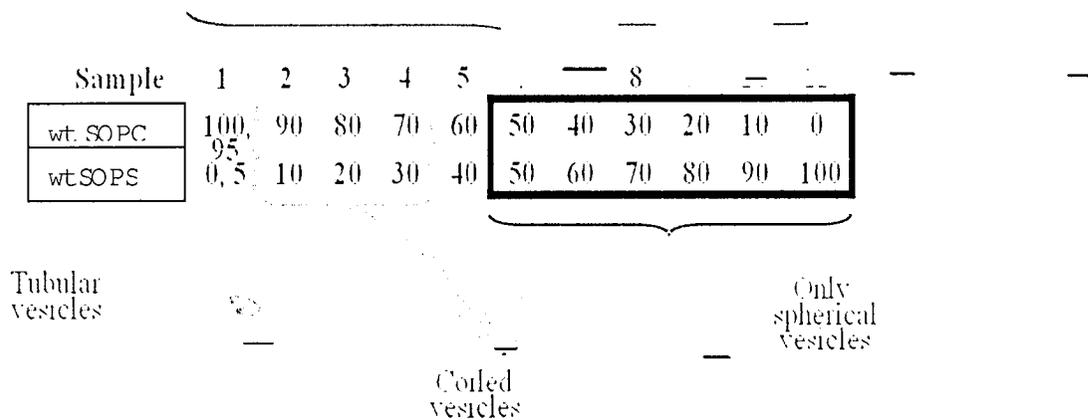


Fig 3.11 Mezclas con hidratación

Experimental

- ⊥ SOPC (1-stearoyl-2oleoyl-sn-glycerophosphocholine) y SOPS (1-stearoyl-2oleoyl-sn-glycero-[phospho-L-serine]) fueron obtenidos de Avanti Polar Lipids en una solución con cloroformo (10mg/ml).
- ⊥ Las mezclas de fosfolípido (SOPC:SOPS) se realizaron en viales limpios extrayendo de la solución original con extremo cuidado y limpieza 20µl (como el 100%) de ahí se realizaron mezclas desde 100:0 hasta 0:100 (%).
- ⊥ Cada filme de fosfolípido depositado en un ITO fue puesto en el vacío durante 3 horas para después realizar el procedimiento de electroformación colocando en el generador de funciones los valores para el voltaje y la frecuencia de 1.7V y 10Hz
- ⊥ Las vesículas fueron observadas durante 3 horas utilizando el microscopio con contraste de fases. Cada media hora se obtuvieron fotografías de 9 zonas

específicas (escogidas de tal manera que representen al resto de la población.) Después utilizando un software de análisis de imágenes se midió el diámetro de las vesículas, se realizó una estadística para así obtener un promedio del cambio del diámetro de las vesículas con respecto al tiempo.

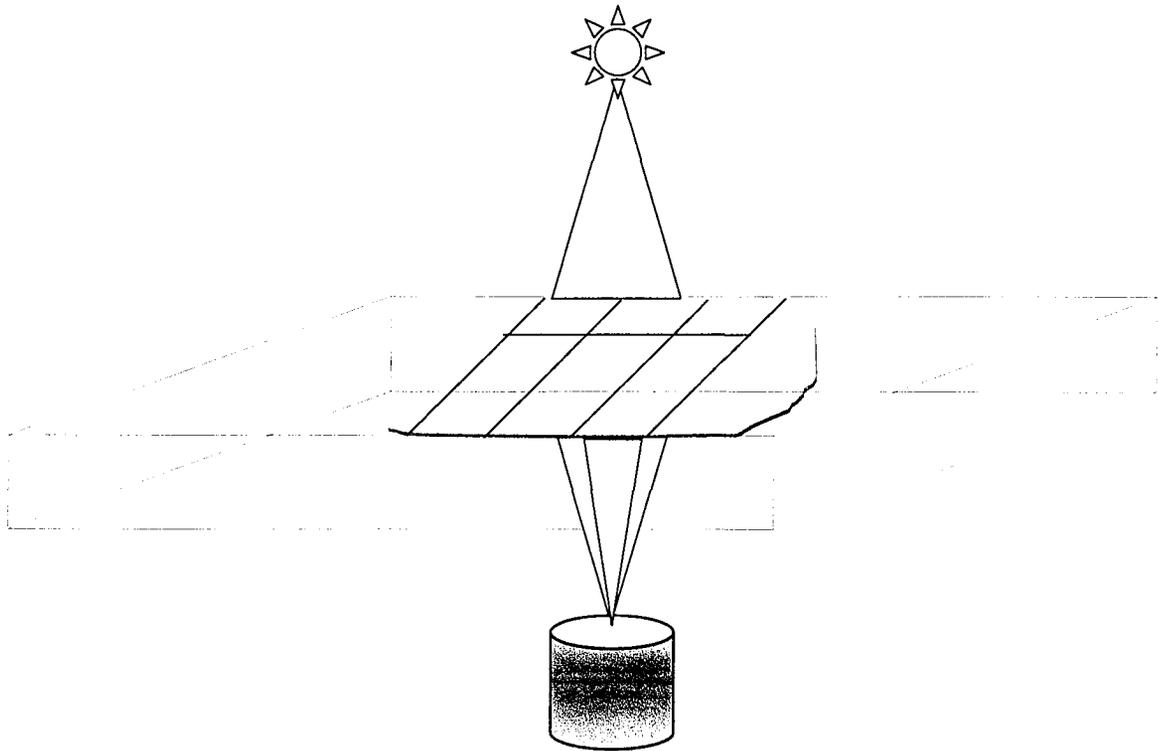


Figura 3.12 Simulación del experimento

3.3.1 SOPC pura

Estas fueron las primeras vesículas que se hicieron mediante el método de electroformación debido a que SOPC es neutro y es excelente fosfolípido para estudiar la cinética de la electroformación ya que el sistema es menos complejo que si fueran vesículas con carga eléctrica.

También son a las que más se le ha estudiado sus propiedades mecánicas tales como la tensión de la membrana, y son las más seguras ya que al hacer la electroformación sabremos que siempre se obtendrán GUVs sin importar tanto la concentración de la solución hidratante ni la concentración de fosfolípido.

En la figura 3.13 se muestra como se ven las vesículas de electroformación con SOPC pura.



50um

Fig. 3.13 Electroformación SOPC

Después de realizar el experimento antes mencionado obtuvimos la siguiente grafica figura 3.14 de crecimiento para SOPC pura.

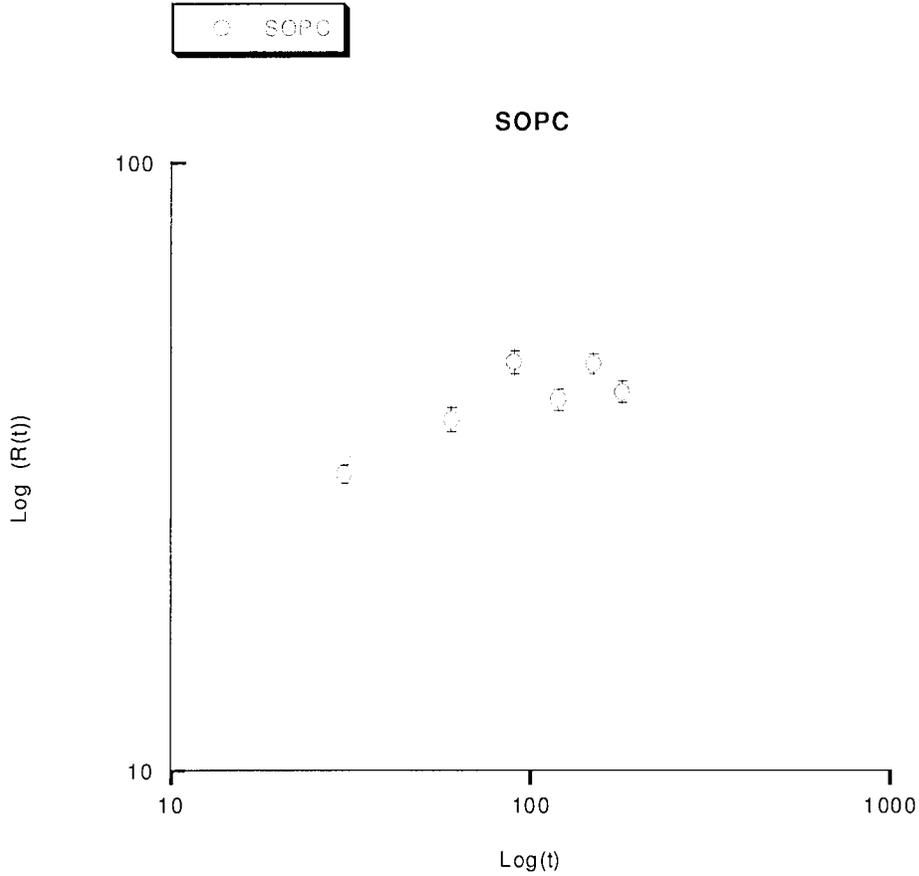


Fig 3.14 Crecimiento SOPC Log-Log

3.3.2 SOPS pura

Estas vesículas presentan una mayor inestabilidad cuando se realiza el método de electroformación ya que en muchos de los casos no se forman GUVs o si se forman desaparecen rápidamente al ser almacenadas. Incluso hay reportes en artículos donde dice que no se han formado GUVs por electroformación y ni siquiera vesículas con campo eléctrico figura 3.15.

Table 1. Preparation of Giant Vesicles by the Electroformation Method (ac Electric Field) Using Phospholipids Different from POPC and Using Phospholipid Mixtures containing POPC (ac electric fields with frequency ν and voltage U)

phospholipids ^a	lipid film ^b	ν (Hz)	U (V)	observations
POPC	A	10	0.01–1.3	within the first 10–30 min vesicles formed ($R_v \approx 10$ – $20 \mu\text{m}$) that contained other smaller vesicles; after 1–2 h the giant vesicles disappeared
			8	$R_v \approx 35$ – $55 \mu\text{m}$; vesicles often contained smaller vesicles
			17	after 1 h 15 min $R_v \approx 20 \mu\text{m}$ ($R_v = 0$), containing smaller vesicles (see Figure 3A)
POPG:POPC (4:1 wt %)	A	10	5	after 1 h 30 min $R_v \approx 10$ – $20 \mu\text{m}$ ($R_v = 0$) and a few vesicles with $R_v \approx 30$ – $55 \mu\text{m}$ ($R_v = 0$)
POPC:cardine	B	10	8 or 2	no giant vesicles formed; also no giant vesicles with dc electric field (1 V)
DOP:cardine	B	10	4	no giant vesicles formed
	A	10	8	in a few min $R_v \approx 25 \mu\text{m}$ ($R_v = 0$) and $R_v \approx 10$ – $15 \mu\text{m}$ ($R_v = 0$) containing many smaller vesicles; after 1 h 15 min only a few vesicles
	B	10	16	$R_v \approx 10 \mu\text{m}$ (see Figure 3B)
DOP:cardine:POPC (50:50)	B	10	16	giant vesicles formed which were stained with YO-PRO-1 (see Figure 3C,D)
DOP:adenosine	A	10	2.5	no giant vesicles formed
DOP:cytidine	A	10	2.5	no giant vesicles formed
HDP:cytidine	B	10	4	no giant vesicles formed
HDP:cytidine:POPC (50:50)	B	10	4	giant vesicles formed quickly (after a few min) comparable with pure POPC (Figure 3E); the vesicles were stained with YO-PRO-1; after several min the thin-walled giant vesicles disappeared and filled aggregates appeared
HDP:uridine:POPC (50:50)	B	10	4	giant vesicles formed quickly followed by the reorganization to filled giant vesicles which were stained with YO-PRO-1 (see Figure 3F,G)
bovine brain PS	A	10	8	no giant vesicles formed; also no vesicle formation with dc electric field (1 V)
DIPE:POPC (1:100 wt %)	B	10	2	giant vesicles formed as in the case of pure POPC
Texasred-DIPE:POPC (1:50 wt %)	B	10	2	giant vesicles formed with $R_v \approx 25 \mu\text{m}$
POPC:DDAB (65:5 wt %)	B	10	2	giant vesicles formed; neighbored vesicles often had shared membranes (see Figure 3H)

Fig. 3.15 Tabla de Electroformación

Cuando se logra la electroformación con SOPS estas vesículas presentan una mayor desviación estándar (Fig 3.17) y también son las que presentan mayor diámetro de crecimiento. Sin embargo por su inestabilidad y poca probabilidad de formación preferimos escoger otro tipo de fosfolípido a la hora de estudiar las propiedades mecánicas de las vesículas, por ejemplo las mezclas SOPC: SOPS.

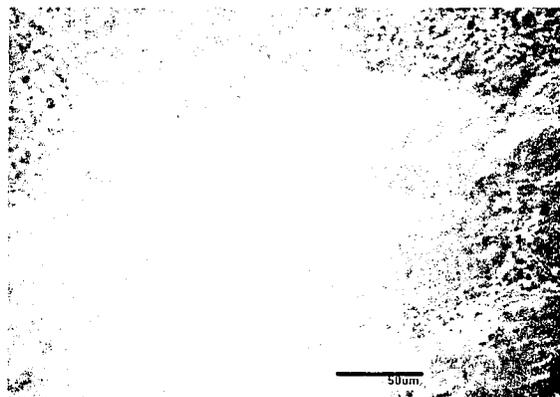


Fig 3.16 Electroformación SOPS

La figura 3.16 nos muestra como se observan vesículas de SOPS bajo el microscopio con contraste de fase.

En la grafica podemos observar cómo crece más rápido que las vesículas de SOPC pura y también que las vesículas de mezcla de SOPC: SOPS.

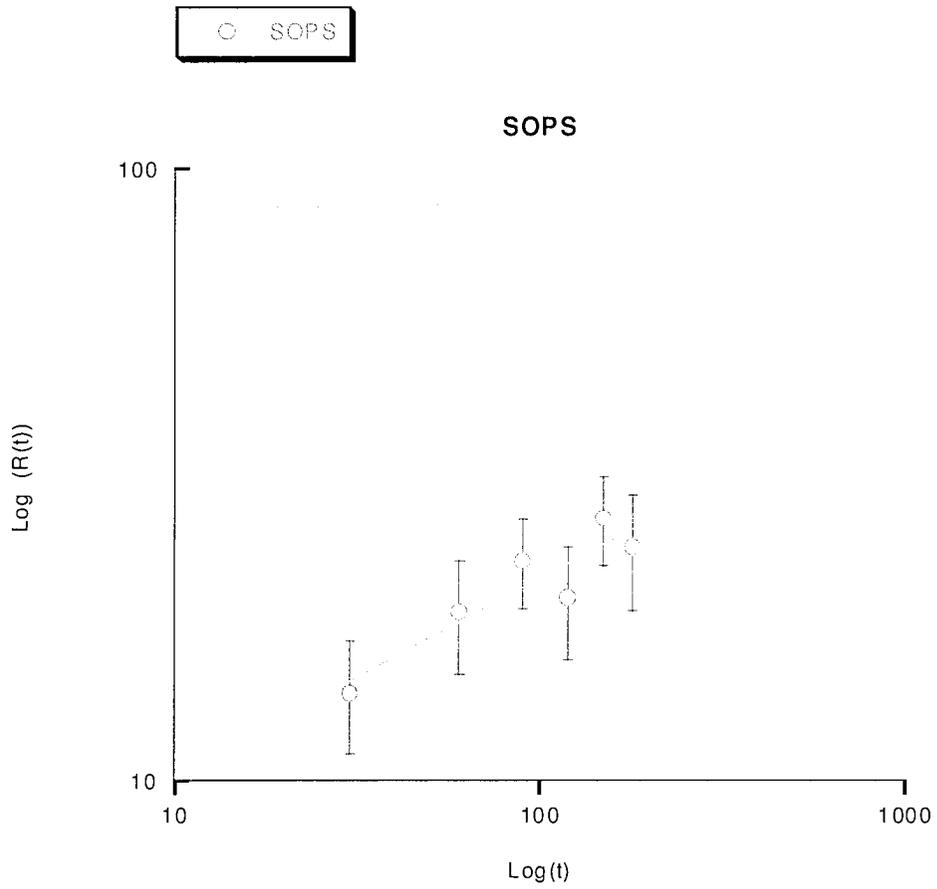


Fig. 3.17 Crecimiento SOPS

3.3.3 Mezclas SOPC: SOPS

Las mezclas presentaron propiedades interesantes ya que guardaron la propiedad del gran crecimiento del SOPS y la estabilidad del SOPC, al realizar la hidratación y poner a electroformar presentó un buen diámetro. Según la cantidad del tipo de fosfolípido dominante las propiedades se inclinaban hacia las de ese fosfolípido.

Por esto creemos que estas vesículas serían excelentes para estudiar las propiedades mecánicas de modelos de membranas celulares ya que contienen más de un fosfolípido y presentan buenas propiedades al ser formadas con electroformación lo cual nos da unas GUVs de buen diámetro y estabilidad.

SOPC: SOPS (75:25)

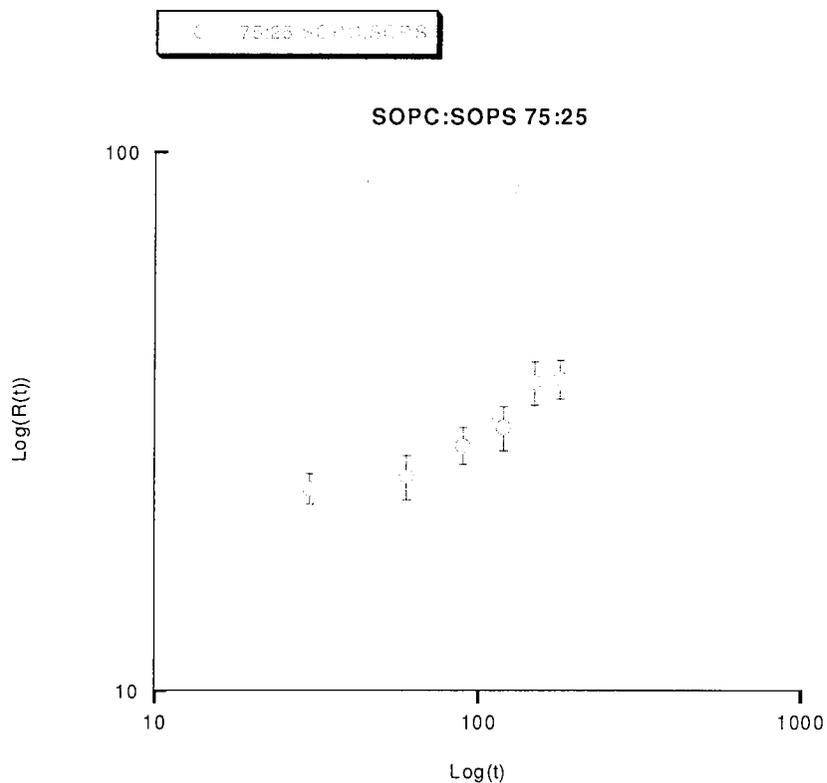


Fig. 3.18

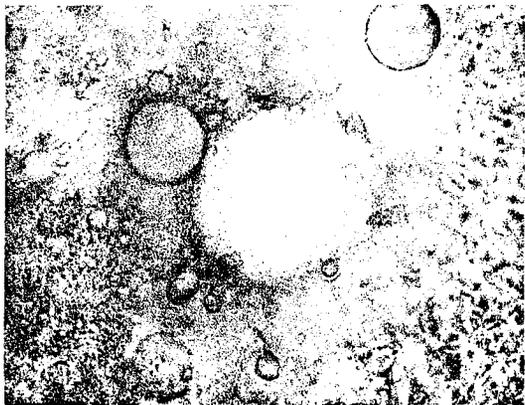


Fig. 3.19 Electroformación Mezcla

SOPC: SOPS (25:75)

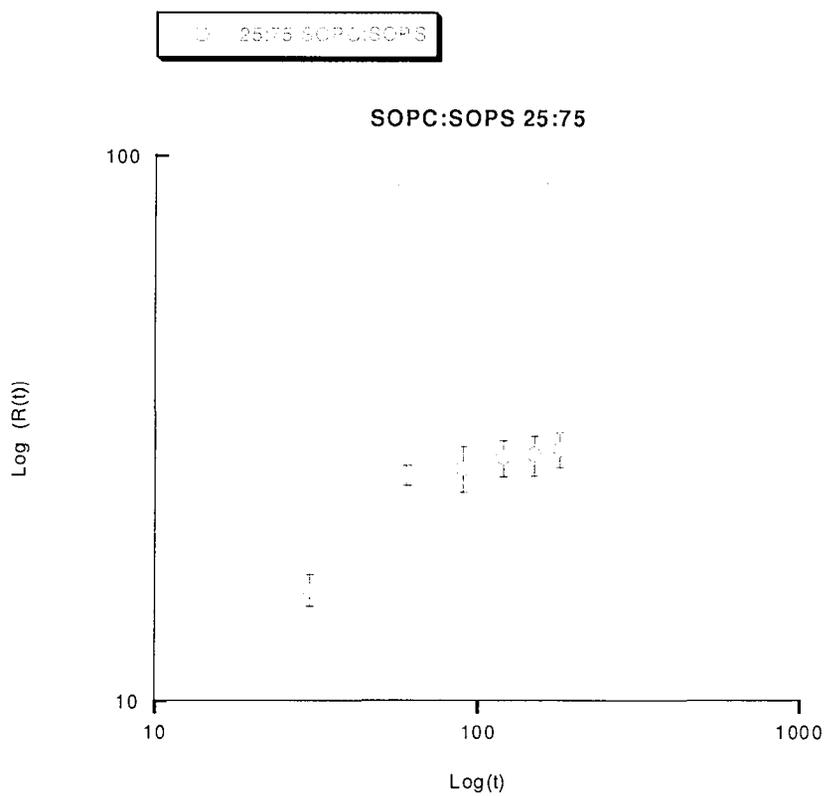


Fig. 3.20

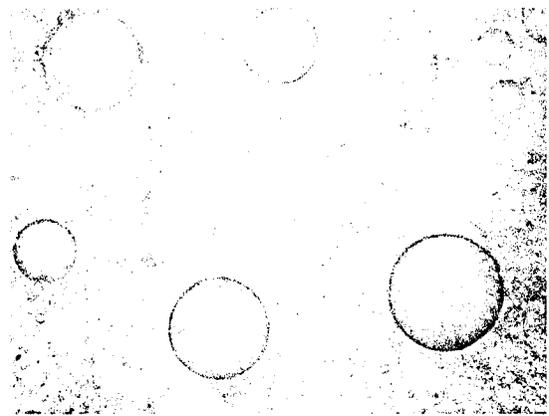


Fig.3.21 Electroformación Mezcla

SOPC: SOPS 50:50

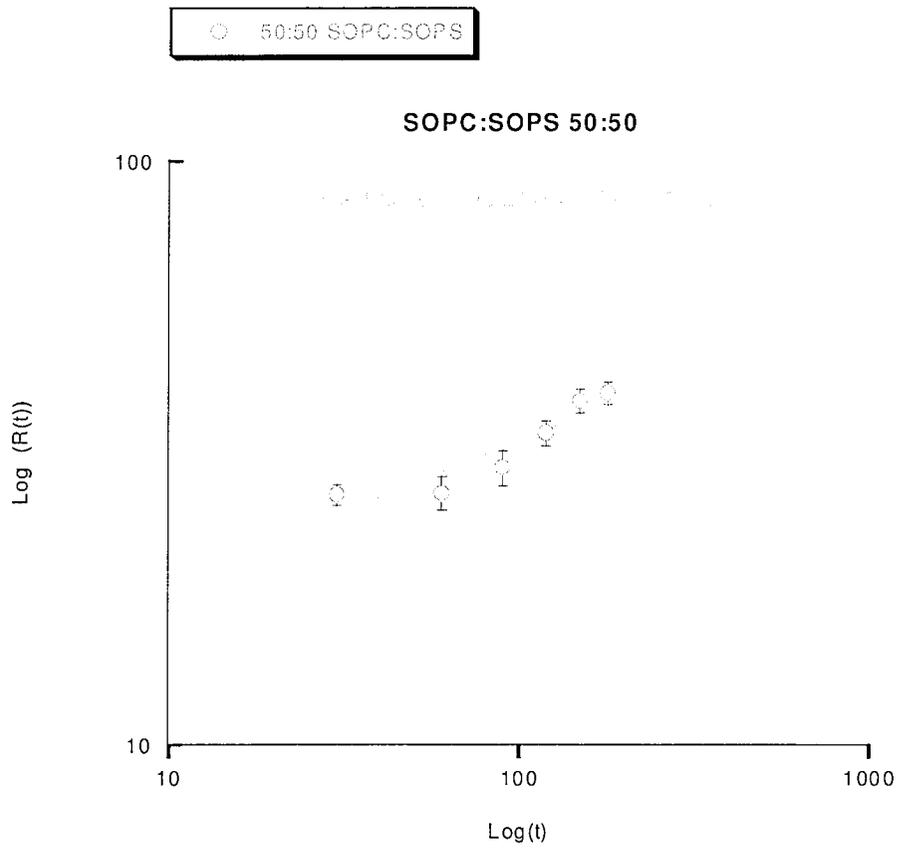


Figura 3.22

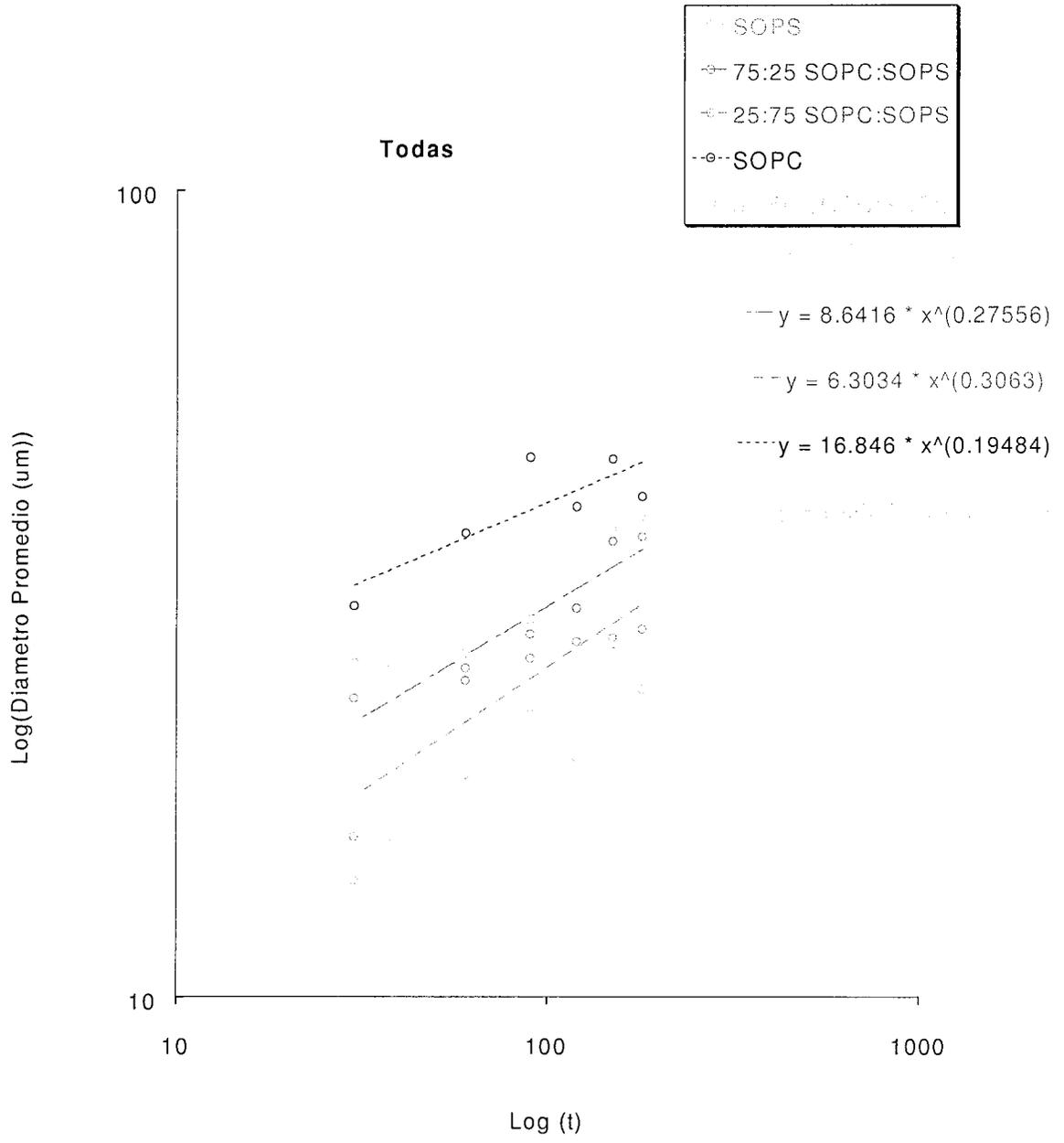


Figura 3.23 Todas las graficas de crecimiento log-log juntas.

POPC

También se realizó un experimento con otro tipo de fosfolípido debido a que es muy parecido a la SOPS y se contaba con él en el momento. Ahora en vez de seguir 9 áreas cada 30 minutos, en este experimento se siguió una sola área durante un periodo corto de tiempo. La diferencia también radica en que el campo eléctrico se puso a 3V con 10Hz. Se observó que empiezan a crecer muy rápidamente y que con el tiempo surgen nuevas vesículas o vesículas ya existentes (vesículas de gran diámetro) pasan a otros planos del eje Z.

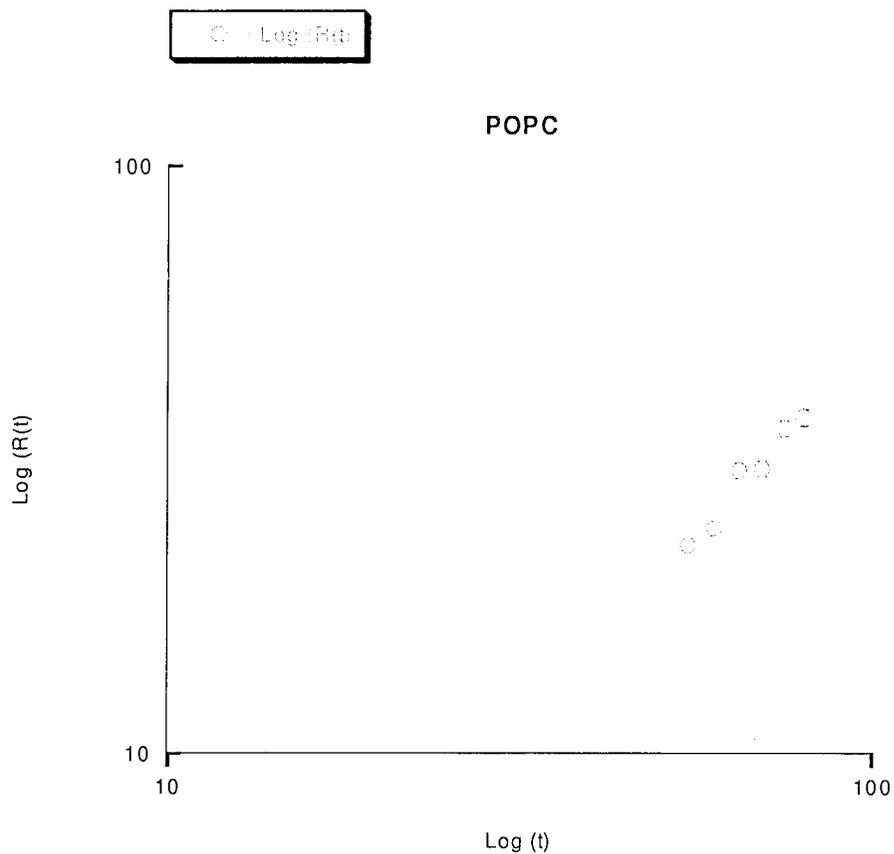


Fig. 3.24 Crecimiento

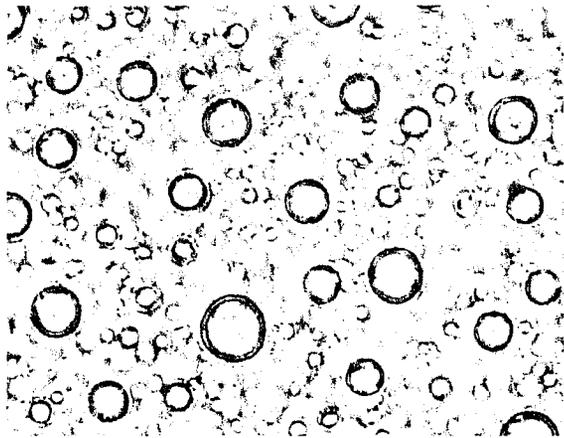


Fig. 3.25 Electroformación bajo contraste de fases

3.3.4 Electroformación con ITO sin sustrato

Para ver cómo afecta la electroformación a vesículas sin sustrato, creamos vesículas con electroformación por aproximadamente 1 hora, después se extrajeron vesículas utilizando una pipeta Pasteur a unos ITOs sin el sustrato y aplicamos el mismo campo eléctrico y observamos las vesículas durante 30 minutos seguidos y después fueron observadas cada media hora.



Fig. 3.26

Al observar durante un tiempo continuo de 30 minutos las vesículas no parecen ser afectadas por el campo eléctrico alterno.

Pero, al ser observadas durante un largo periodo de tiempo las vesículas se mueven hacia el ITO estabilizándose ahí y creando agregados, donde después de varias observaciones de media hora aparentan verse nuevas vesículas en el nuevo sustrato. Figura 3.26

Podemos entonces concluir que en el método de electroformación el sustrato juega un papel importante, así como la relación entre las vesículas.

Capítulo 4

Aplicaciones de las Vesículas Unilamelares Gigantes (GUVs)

Las vesículas unilamelares gigantes (GUVs) tienen una gran importancia debido a sus características. Pueden ser utilizadas para realizar investigaciones sobre las propiedades biológicas y físicas de membranas, las cuales con otro tipo de vesículas no podrían realizarse o serían más difíciles de interpretar.

Debido a su unilamellaridad y a su gran diámetro son un modelo ideal para membranas celulares y para realizar experimentos bajo el microscopio óptico y utilizando las micropipetas.

En este capítulo comentaremos algunos avances recientes en la investigación utilizando vesículas unilamelares gigantes. Tales trabajos se encuentran publicados en diversos artículos de divulgación científica, cuyas referencias mostraremos más adelante, así como en artículos de revisión sobre las propiedades de las vesículas unilamelares gigantes varios de estos artículos se encuentran englobados en un trabajo de antología como el de Dobereiner (Dobereiner, 2000). Entre las aplicaciones tenemos:

- ❖ Sistemas modelo para interfaces fluidicas (Seifert, 1999).
- ❖ Sistemas modelo para biomembranas (Sackmann, 1994; Menger, 1998).
- ❖ Mediciones sistemáticas de los parámetros visco-elásticos como función de la composición de la membrana(Dimova, 1999).
- ❖ Experimentos con membranas activas en soluciones acuosas (Manneville, 1999).
- ❖ Investigación de las interacciones hidrodinámicas en la membrana(Seifert, 1999; Cantat, 1999) .
- ❖ Medición de la curvatura espontanea para una diferente variedad de sistemas (Miao, 1994; Dobereiner, 1999) .
- ❖ Construcción de aparatos bioelectronicos (Fromherz, 1999) .
- ❖ La introducción de una nueva clase de vesículas hechas de polímeros (Discher, 1999; Ilhan 2000).

El diámetro promedio de las GUVs tiene la gran ventaja de poder realizar experimentos bajo el microscopio óptico dando así la oportunidad de estudiar algunas propiedades físicas de las membranas.

La incorporación de proteínas en la bicapa de las GUVs también es posible y provee un excelente modelo para estudiar las propiedades y funciones de una biomembrana más cercana a la realidad biológica. Por ejemplo, Hoekstra et al presentan un estudio reconstituyendo proteínas de membrana en vesículas unilamelares gigantes vía fusión inducida de péptidos (Hoekstra, 2001). Esto se debe a que las vesículas unilamelares gigantes proveen una bien definida matriz de lípidos lo cual es lo más parecido al estado nativo en el que se encuentran las proteínas que se incrustan en la membrana celular. Por ello, trabajar con este sistema es lo más parecido a trabajar en una biomembrana. Asimismo, debido a la simplicidad del sistema, se evitan interacciones entre las proteínas; estas pueden consistir en : fuerzas de Van der Waals cuando las proteínas están tan densamente empaquetadas que permiten el máximo contacto entre los átomos de las cadenas laterales, fuerzas electrostáticas que son interacciones atractivas o repulsivas entre grupos cargados de las cadenas laterales o en un ambiente polar (como el agua) interacciones hidrofobicas donde los grupos hidrofobos se agrupan en el interior de la molécula de proteína, estabilizando la forma plegada de la proteína.

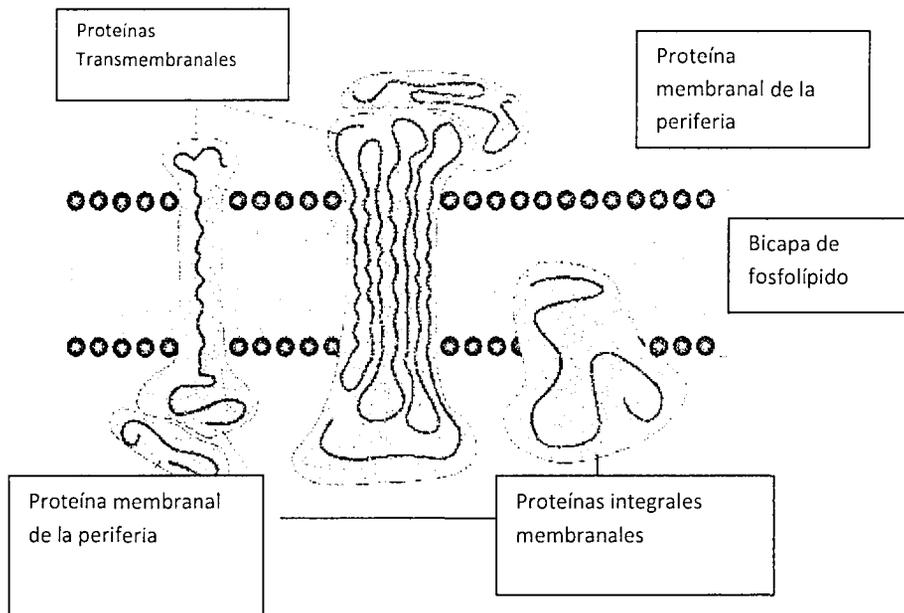


Fig. 4.1 Proteínas en Membranas

La investigación en GUVs se ha hecho cada vez más popular. En el 2000 se realizó una conferencia internacional dedicada a la investigación en vesículas unilamelares gigantes de la cual los editores Dr. Pier Luigi Luisi profesor emérito del ETH-Zúrich (llamado Instituto Federal de Tecnología) y Dr. Peter Walde profesor del ETH-Zúrich han seleccionado varios trabajos con investigaciones acerca de GUVs de científicos de diferentes áreas, dando como resultado un libro que es parte de la serie de Perspective in Supramolecular Chemistry (Giant Vesicles perspectives in supramolecular chemistry vol 6, 2000).

A continuación haremos una breve reseña histórica sobre los descubrimientos en cuanto a vesículas gigantes se tratan, experimentales y teóricos.

Desde un punto de vista histórico se puede decir que Angelova et al introdujeron la técnica de electroformación de fosfolípidos (Angelova, 1992). Dicha técnica es ahora bastante bien conocida por los investigadores en este ámbito y el método, con sus variantes, se ha convertido en un estándar de los laboratorios de investigación en membranas, así mismo como ya hemos leído Angelova introdujo un poco de la teoría sobre cómo se realiza la electroformación, y Helfrich se ha destacado en los conceptos teóricos de la elasticidad de curvatura de las membranas fluidicas, en cuanto a esta teoría resultan los conceptos de la energía libre de Helfrich y la curvatura espontánea los cuales serán mencionados más adelante de una forma breve ya que están relacionadas con aplicaciones de las GUVs.

Por su parte, Needham y Zhelev describieron la técnica de manipulación con micropipetas para medir las propiedades de mecánicas de las GUVs (Needham, 2000; Zhelev, 1998). La cual es una ventaja para el método de electroformación el cual se caracteriza también porque en el mismo se pueden aplicar otras técnicas así como la aspiración con micropipetas.

El propósito es obtener micropipetas de aproximadamente $5\mu\text{m}$ de diámetro para así poder aspirar vesículas y describir sus propiedades mecánicas, así mismo la técnica de micropipetas permite manipular vesículas de maneras diferentes, no solamente absorberlas.

Las micropipetas pueden ser compradas, o también se pueden comprar los capilares y ser creadas mediante el puller (estirador) para estirar el capilar y crear la forma de micropipeta y la microforja para controlar la punta de la micropipeta, limarla de tal manera que no quede puntiaguda sino rompería las vesículas, obteniendo así micropipetas de diámetros diferentes.

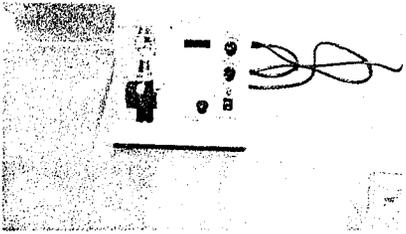


Fig 4.2 Microforja

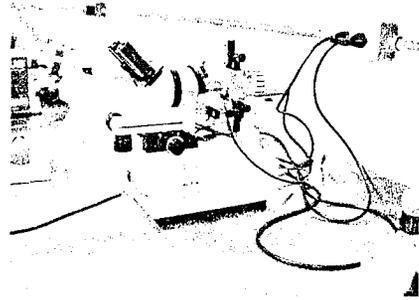


Fig 4.3 Puller (Estirador de capilares)

Con la micromanipulación de vesículas gigantes se pueden obtener propiedades mecánicas de las vesículas de fosfolípido como modelo de membranas celulares, obteniendo así propiedades como la tensión de la vesícula.

$$\Delta p = 2\pi R_2^2 \left(1 + \sqrt{1 - (R_1/R_2)^2} \right) + 2\pi R_1 L + 2\pi R_1^2$$

$$\tau = \frac{R_1 \Delta p}{2(1 - R_1/R_2)}$$

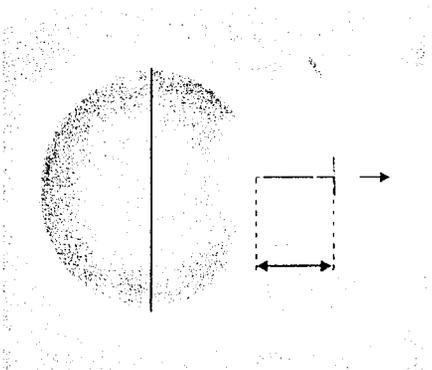


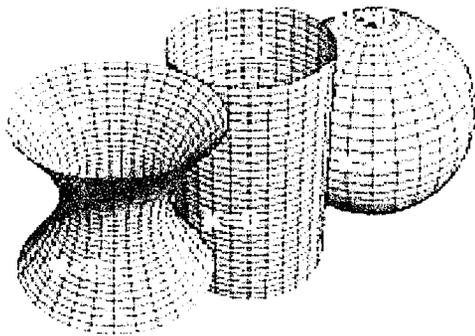
Fig. 4.4 Micromanipulación de vesículas gigantes

4.1 Energía libre de Helfrich

Dado que una membrana lipídica tiene un espesor muy pequeño (del orden de 50 Å) comparado con las dimensiones laterales de la membrana, ya sea en una célula real o en una vesícula gigante, donde los diámetros son del orden de decenas de micrómetros, la bicapa puede modelarse teóricamente como una superficie bidimensional.

Además, si una bicapa está en equilibrio con la solución acuosa; es decir, se encuentra constreñida a un plano y el número de moléculas que la forman se mantiene constante; entonces, la única contribución a la energía libre de la bicapa se debe a las deformaciones fuera del plano. Estas deformaciones son debidas ya sea a la asimetría de las monocapas que forman la bicapa o a las fluctuaciones térmicas provocadas por el solvente y pueden ser caracterizadas mediante la curvatura local.

La energía libre puede calcularse usando como coordenadas generalizadas el área, A , de cada molécula y las curvaturas media (H) y gaussiana (K), ver Figura 4.5 ,



$$H = \frac{c_1 + c_2}{2} \text{ y } K = c_1 * c_2$$

Fig. 4.5 Curvatura espontanea

donde c_1 y c_2 son las curvaturas principales de la superficie, definiendo a

$$c_1 = 1/r_1 \quad \text{y} \quad c_2 = 1/r_2$$

Puesto que la energía libre debe ser invariante bajo cualquier parametrización de la superficie y como, a segundo orden en las curvaturas principales, las únicas cantidades invariantes ante cualquier parametrización son las curvaturas media y gaussiana, la energía de la bicapa puede expresarse en función de estas cantidades (Helfrich, 1973),

$$f = f(\Sigma, H, K)$$

como se mantiene constante y las curvaturas son pequeñas, la energía libre por molécula, f , puede ser expandida en serie y escribir:

$$f(\Sigma, H, K) = f_0 + f_1 H + f_2 H^2 + f_3 K$$

Aquí, las constantes f_0 , f_1 , f_2 y f_3 dependen únicamente del área de las moléculas. Completando el binomio cuadrado en H ,

$$f = f_2 \left(H + \frac{f_1}{2f_2} \right)^2 + \left(f_0 - \frac{f_1^2}{4f_2} \right) + f_3 K.$$

Definiendo las cantidades

$$\kappa \equiv \frac{f_2}{2\Sigma}, \quad c_0 \equiv -\frac{f_1}{2f_2} \quad \text{y} \quad \bar{\kappa} \equiv \frac{f_3}{\Sigma},$$

finalmente la energía libre, por unidad de área, tiene la forma:

$$f = 2\kappa(H - c_0)^2 + \bar{\kappa}K \quad (1a)$$

O de manera equivalente

$$F = \int \left\{ 2\kappa(H - c_0)^2 + \bar{\kappa}K \right\} dA$$

(2b)

La ecuación (1) establece que, cuando no hay cambio de topología, la curvatura media que minimiza la energía libre corresponde a c_0 . Esta ecuación fue determinada por Helfrich en 1973 (W. Helfrich, 1973) y es conocida como la energía libre de Helfrich.

El hecho de poder calcular la energía libre de una bicapa de moléculas anfifílicas ha permitido modelar la forma de sistemas biológicos reales como el aparato de Golgi y la forma discoidal de los glóbulos rojos.

El modelo presentado es relativamente simple y debido a las bases generales en que se sustenta ha permitido adecuarlo a distintos sistemas. Sin embargo, este modelo sólo considera membranas fluidas con pequeñas fluctuaciones, despreciando características como el cito esqueleto de la célula, las deformaciones laterales, las proteínas transmembranales y demás complejidades presentadas en las membranas biológicas.

Este modelo ha sido muy exitoso y es una referencia fundamental en el estudio de las membranas biológicas

Se puede obtener mas información de la tesis de licenciatura de L. Martinez (L. Martinez, 2008)

4.2 Curvatura espontanea

Este concepto fue introducido por Helfrich en 1973 y tiene que ver con la curvatura que adquiere una membrana en ausencia de perturbaciones

En la bicapa de las vesículas de fosfolípidos la organización de las cabezas polares, sobre todo cuando nos encontramos con vesículas de más de un tipo de fosfolípido, produce una curvatura espontanea que modifica la forma de las vesículas de fosfolípido y produce

morfologías diferentes, así también existen factores externos que pueden modificar la curvatura espontanea en la vesícula, como el que se mencionara a continuación.

Lipowsky estudio el efecto de las nano partículas en contacto con vesículas (Lipowsky, 1998).

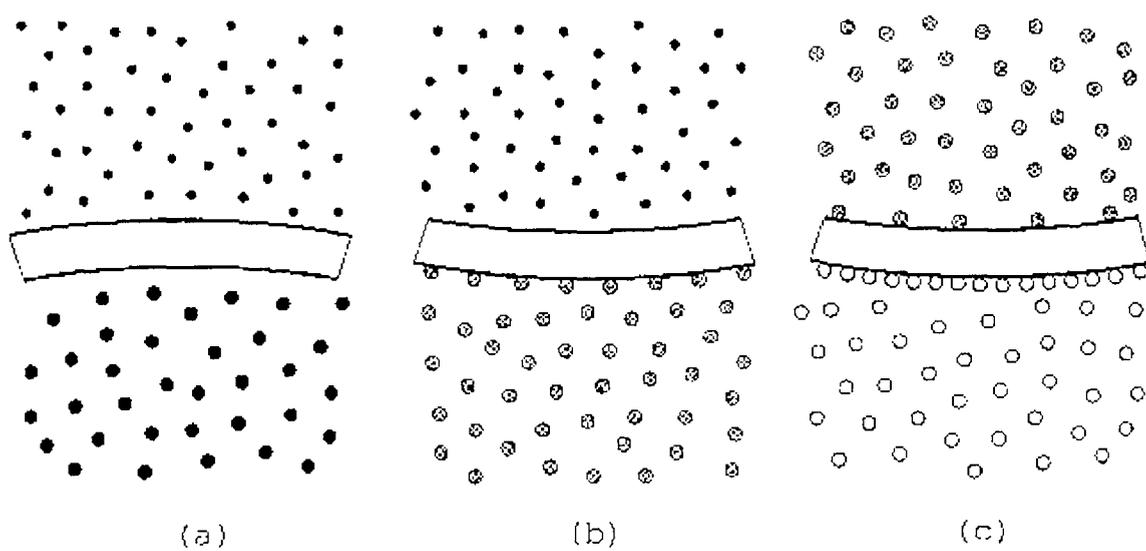


Fig. 4.6 Curvatura espontanea de membranas afectada por nano partículas

En la fig 4.6 se muestra la curvatura espontanea de un segmento de membrana en contacto con partículas dispersadas. En (a) dos especies de partículas no adhesivas, (b) una adhesiva y otra no adhesiva, (c) dos especies adhesivas. Se muestra que en adhesión a los efectos osmóticos, las partículas dispersadas inducen una curvatura espontanea en la vesícula.

En este trabajo de Lipowsky podemos distinguir tres casos, en el caso (a) si las especies son no adhesivas la membrana se curva en dirección de las partículas más grandes, es decir, la curvatura espontanea se incrementa aumentando el tamaño de las partículas; en el caso (b) si todas las partículas son adhesivas y pequeñas comparadas con el tamaño de las bicapa la membrana se curva en dirección contraria de las partículas más grandes, es decir, la curvatura espontanea disminuye cuando aumenta el tamaño de las partículas; en el caso (c) si las partículas adhesivas son grandes comparadas con el tamaño de la bicapa pero

pequeñas con respecto al tamaño de la vesícula, la membrana típicamente encapsula a las partículas completamente.

Este efecto también fue estudiado por Dinsmore et al quien reporto observaciones experimentales sobre interacciones de partículas coloidales adentro de vesículas gigantes (Dinsmore, 1998). Ambos autores encontraron que las esferas grandes son atraídas a las paredes de la membrana, especialmente hacia regiones de alta curvatura.

También se han reportado los efectos en la curvatura espontanea en membranas con polímeros, en las cuales se ha visto como los polímeros producen pronunciados cambios en la morfología de la membrana (Breidenich, 2000; Doberiner, 1998).

También se ha observado el efecto del pH en la curvatura espontanea en membranas con fosfolípido zwitterionico, las transiciones observadas durante el experimento son discutidas con un modelo electrostático de adsorción tomando en cuenta los cambios en la densidad de carga durante la curvatura (Lee, 1999). En este trabajo se investiga la morfología de GUVs formadas por PC (phosphatidylcholine) en soluciones variando el pH; se ha encontrado que el aumentar el pH induce brotes en las vesículas como se puede observar en la figura..... donde el pH fue aumentando de uno en uno empezando con 7 en A, hasta 10.1 en D. El artículo concluye que estas formas son reversibles regresando el pH a su valor original. Así la curvatura espontanea de una membrana zwitterionica puede ser controlada vía el pH; controlar al curvatura de las interfaces anfífilicas es un asunto importante para los procesos biológicos y aplicaciones tecnológicas, así como el transporte de proteínas en las células.

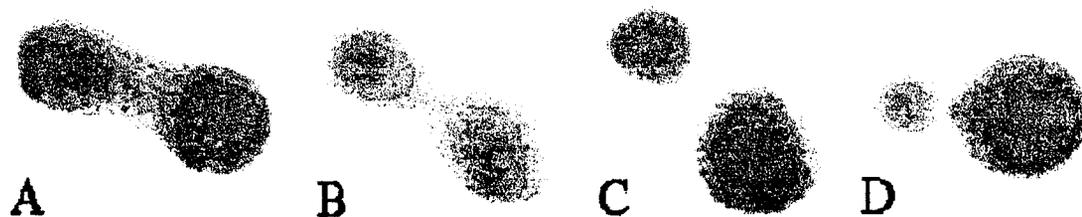


Fig. 4.7 Morfología de Membranas

La endocitosis inducida de ADN ha sido investigado por Angelova et al (Angelova, 1999), en sus experimentos cuantitativos, en particular se ha estudiado el sumergimiento de cortos segmentos de ADN en vesículas cationicas, en donde se sugiere un posible mecanismo para las interacciones DNA y membranas lipidias, estas interacciones se incluyen el encapsulamiento de DNA dentro de una micela invertida, los resultados pueden ayudar en el entendimiento de los eventos asociados con la interacción del DNA con membranas biológicas así como complejos constituidos por liposomas cationicos y DNA formados en el proceso de transferencia de genes.

4.3 Elasticidad y morfología de la bicapa

La forma media de una vesícula con un determinado volumen y área de membrana está determinada por la energía mínima de curvatura de la bicapa de la membrana (Dobereiner, 1996). El área y el volumen de la vesícula se pueden considerar fijos a una temperatura constante y a condiciones osmóticas constantes.

No debemos olvidar que la bicapa de las vesículas es semipermeable. Es decir, la membrana tiene una alta permeabilidad al agua (10 – 100 pm/s) para un flujo osmóticamente inducido, pero usualmente son impermeables a solutos como iones de sal o azúcares simples, al menos en escalas de tiempo relevantes para experimentos con vesículas gigantes. Por lo tanto el volumen de la vesícula se ajusta de tal manera que la presión osmótica sea la misma adentro que afuera. Aunque para vesículas por debajo de los 100 nm existe una diferencia de presión residual debido a la curvatura de la membrana, para las vesículas gigantes este no es un problema.

Cuando estamos hablando de la elasticidad y morfología de la bicapa generalmente se acepta el modelo elástico de las vesículas conocido como el modelo de la elasticidad de diferencia de áreas (Svetina, 1989; Miao, 1994). En este modelo los parámetros relevantes para determinar la forma de la vesícula son el radio volumen-área y la diferencia de área efectiva. El diagrama de fases resultante después de aplicar el modelo de elasticidad de diferencia de áreas se muestra en la figura 4.8 donde las formas de mínima energía son descritas en cada región por los parámetros relevantes mencionados anteriormente

En la figura... para cada región del diagrama de fases las formas de mínima energía están indicadas con sus centros de gravedad localizados en la posición correspondiente del diagrama . El eje horizontal mide la razón volumen/área de las vesículas. El eje vertical muestra la diferencia de área efectiva, es decir, la curvatura preferida de la vesícula.

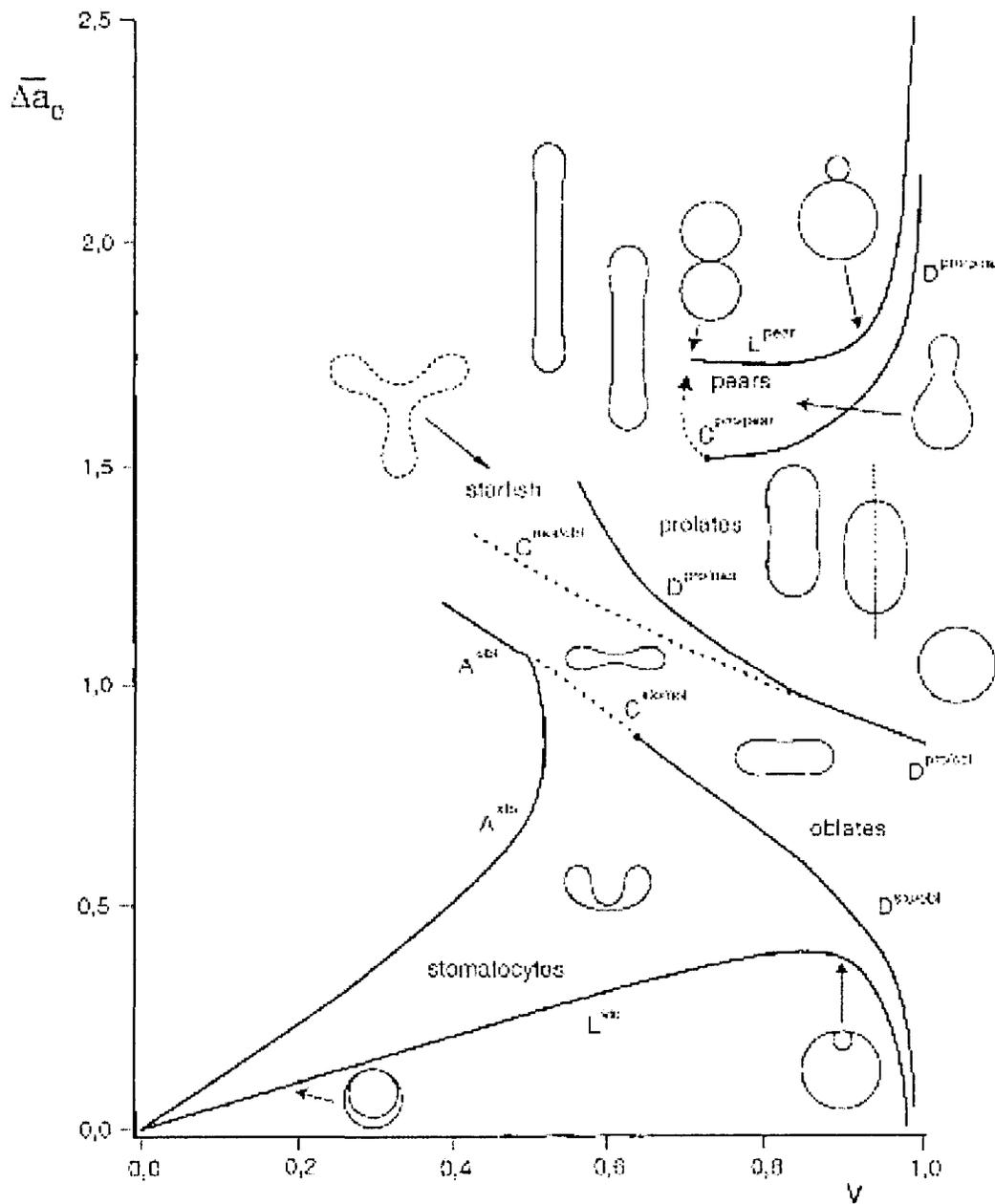


Fig 4.8 Diagrama de fases

La elasticidad y morfología de la bicapa es importante para obtener características importantes de la membrana obtenidas teniendo el modulo de curvatura, estas características importantes pueden ser mecánicas como la tensión, o dinámicas como el flip-flop que presentan los lípidos en la bicapa o la fricción entre las monocapas que forman la bicapa, de tal manera que se pueda entender mejor la morfología y el funcionamiento de la bicapa de fosfolípidos.

4.4 Membranas activas y reacciones químicas

Las membranas pueden servir como reactores químicos, es decir, se pueden realizar reacciones químicas adentro de ellas haciendo a estas reacciones independientes de lo que suceda afuera de la membrana, teniendo así un pequeño reactor químico; esto ha provocado el estudio de las reacciones químicas dentro de las GUVs y también el estudio de la actividad de las membranas al hacerlas reaccionar con algún factor externo, así como la luz

Las reacciones químicas en el perímetro de la membrana fueron investigadas por Petrov et al (Petrov, 1999); utilizando el metal complejo hexacyanoferrato y su propiedad de fotoquímica se ha podido construir un switch que puede controlar la morfología de la membrana. Se ha visto que las vesículas reaccionan con cambios pronunciados en su forma cuando se encuentran bajo una alta concentración de luz. Los autores mostraron que incluso para concentraciones mínimas de luz en el componente fotoquímica, cuando no hay cambios visibles en la forma de las membranas, la iluminación da origen a un cambio fácilmente detectable de la morfología en el espectro de fluctuaciones. Encontraron la forma de controlar la morfología por medio de la luz, lo cual abre las puertas a interesantes posibilidades para la construcción de aplicaciones utilizando las vesículas como maquinas.

4.5 Propiedades cohesivas y de transporte

La muerte de las células por rompimiento de la membrana (Lisis) y la dinámica de los poros ha sido estudiada por Sandre et al (Sandre, 1999). La Lisis de las membranas ya había sido investigada con anterioridad, sin embargo debido a los instrumentos de medición disponibles no había sido posible estudiar la dinámica de los poros debido a la escala de tiempo y espacio relativamente cortos (nm y ps). Los autores resolvieron este problema incrementando la viscosidad del medio; se obtuvieron imágenes de fluorescencia en las que

se capturan repetidamente los poros abriéndose y cerrándose y la viscosidad de la superficie de la membrana fue determinada utilizando la velocidad de cerrado de los poros.

Olbrich et al midió la tensión de lisis (tensión de ruptura) y la permeabilidad del agua utilizando un bicapas de fosfoatidilcolina poli-insaturadas y la técnica de aspiración con micropipetas a temperatura de medio ambiente (Olbrich, 2000). Aparentemente la permeabilidad al agua crece exponencialmente reduciendo la temperatura de los lípidos. Asimismo, se observa una pérdida en la fuerza mecánica de las membranas debido a la reducción en la temperatura.

La viscosidad de la fase fluida y la elasticidad de la fase gel han sido investigadas por Dimova et al en un estudio cuidadoso de vesículas de DMPC alrededor de la principal transición de fase de estos lípidos ($T = 23.4^{\circ}\text{C}$). Efectos dramáticos se han encontrado debajo de la transición de fase, una caída de rigidez y de tensión superficial.

4.6 Adhesión y Adsorción.

Se ha desarrollado un sistema modelo de bioadhesión involucrando vesículas gigantes con bicapas de soporte (Klobucek, 1999), se desarrollo un análisis teórico mas a fondo de este problema por Bruinsma (Bruinsma, 2000). Otro trabajo puramente teórico en adhesión celular utilizando vesículas gigantes es el hecho por Weikl (Weikl, 2000). Estos tres artículos mencionados involucran adhesión de estructuras laterales célula con célula.

La adsorción de esferas de látex negativamente cargadas en vesículas positivamente cargadas ha sido estudiado por Aranda-Espinoza et al (Aranda-Espinoza, 1999). Los autores discuten que las interacciones electrostáticas llevan a una partición lateral de las cargas de la membrana en zonas adhesivas y zonas repulsivas con cargas opuestas.

Interacciones elásticas laterales de enlaces químicos de partículas coloides en GUVs han sido investigadas por Koltover. Se ha encontrado que las partículas inducen un cambio en la morfología, distorsiones en la membrana debido a la interacción entre partículas, resultando en un agregado bidimensional (Koltover, 1999).

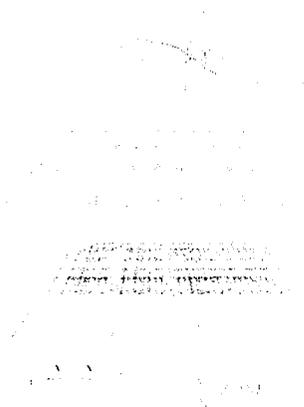
4.7 Espectroscopia de fuerza dinámica

Una ingeniosa y novedosa técnica utiliza vesículas gigantes como biomembranas de prueba, para experimentos que involucran ejercer una fuerza directa donde la fuerza de los enlaces entre receptores biológicos es una función de la razón de carga. Merkel et al ha medido el espectro de fuerzas para las interacciones de biomembranas prototipo, que sirven como receptoras-ligadoras (Merkel, 1999) en donde las vesículas gigantes enganchadas en una micropipeta sirven como transductores de fuerza entre ellas y un receptor

A diferencia de las técnicas de AFM se ha podido regular la fuerza provocada por la interacción entre receptor-ligador modificando la tensión de la membrana. Esta técnica servirá como una herramienta para investigar la adhesión celular.

4.8 Aparatos Bioelectronicos

Una aplicación muy interesante de las vesículas gigantes ha sido en el acoplamiento de dispositivos semiconductores a sistemas biológicos (Fromhertz, 1999). Estos estudios llevan como aplicación la incorporación de estas estructuras necesarias para construir aparatos bioelectronicos como ojos artificiales y riñones controlados automáticamente. Como se menciona en el artículo de Fromhertz el producto , una estructura de lípido-silicio que es excelente para acoplar proteínas electroactivas que fueron reconstituidas en la membrana (Hoekstra, 2001) que funciona como un transistor de efecto de campo, la propiedad clave es la alta resistencia en la unión. Los autores caracterizaron su sistema ópticamente con microscopia de interferencia con contraste fluorescente (FLIC, Fluorescence interference contrast microscopy) una técnica apropiada para substratos opacos.



. Fig 4.9 Aparatos Bioelectronicos

En la fig 4.9 se muestra como el fin de los aparatos bioelectronicos es unir la tecnología de un microchip con la biocompatibilidad de las biomembranas para poderse conectar con las células del cerebro; ese es el principio fundamental del prototipo de un ojo artificial en el cual consistiría de un sistema bioelectrónico el cual interpretaría la luz que le llega al ojo y transformaría esto en una señal eléctrica que conectada al cerebro se transformara en una imagen.

4.9 Polimerosomas

Se ha desarrollado un nuevo tipo de vesículas gigantes que, a diferencia de las formadas por lípidos, están formadas por polímeros anfifílicos. Estos materiales forman igualmente bicapas con algunas de las propiedades elásticas similares a las formadas puramente por lípidos, sin embargo se ha encontrado que su tensión de ruptura es considerablemente alta. (Discher, 1999).

Se han producido GUVs mediante el ensamblaje de los polímeros en solvente orgánico. Estas vesículas se mostraron estables en solución pero no estables en altas temperaturas (Ilhan, 2000).

Las polimerosomas, sin embargo, cuentan con una ventaja enorme: pueden ser controladas. Uniendo moléculas diferentes, los investigadores están aprendiendo a manipular sus

características, consiguiendo que hagan cosas que las células biológicas simplemente no pueden hacer.

Por ejemplo, las uniones de las Polimerosomas son fuertes. A pesar de que ciertamente, los fosfolípidos de las membranas naturales se unen entre sí, no lo hacen firmemente. Se mueven o difunden a lo largo de la membrana celular y, cuando desaparece la presión del ambiente acuoso, se separan.

Por otra parte, las Polimerosomas pueden diseñarse de modo que se unan unas con otras con mucha firmeza. Sus átomos pueden enlazarse no sólo dentro de un polímero simple, sino también con los átomos de los polímeros cercanos. A esto se le conoce como enlace cruzado, lo cual aumenta enormemente la resistencia de las células artificiales. (Son estos enlaces cruzados los que refuerzan los rizos de las permanentes del salón de belleza lo suficiente como para que mantengan la forma que les da el peinado). De hecho, gracias a los enlaces cruzados y al incremento en la resistencia de los polímeros, resulta mil veces más difícil quebrar a una Polimerosoma que a una célula fosfolípida. En la figura 4.10 se muestra un polimerosoma GUVs en una solución salina (Hammer, 2005).



Fig. 4.10 Polimerosomas

Como hemos visto la rama de aplicaciones para las vesículas unilamelares gigantes es bastante amplia y es una rama de la investigación que se encuentra todavía en desarrollo tecnológico, los beneficios de unir la física con la biología y la química han tenido consecuencias muy buenas para el desarrollo de nueva tecnología y en el área de vesículas unilamelares gigantes en este capítulo se mostraron varias de las aplicaciones.

Conclusiones

Durante el trabajo experimental realizado para entender la formación de vesículas de fosfolípido se han llegado a conocer diferentes técnicas experimentales con las cuales se obtienen vesículas de fosfolípido de diferente tamaño y morfología, estas técnicas son las de hidratación, extrusión y electroformación.

Debido a la importancia de las vesículas unilamelares gigantes nuestro centro de atención se torno hacia el método de electroformación que es el principal método por el cual estas vesículas son formadas.

Después de realizar una revisión bibliográfica con el fin de entender los conceptos relacionados con las vesículas de fosfolípido, nuestras primeras preguntas eran qué tipo de fosfolípidos utilizar para realizar experimentos que como principal aplicación tengan la de funcionar como modelos de membranas biológicas. Es por esto que se realiza una revisión bibliográfica acerca de dos tipos de fosfolípidos mencionados en la literatura y cuya importancia biológica los hacen clave para la investigación en membranas biológicas, estos fosfolípidos son 1-Stearoil-Oleoil-Sn-Glycero-3-Fosfatidilcolina, lo cual en inglés se abrevia como SOPC y -Stearoil-Oleoil-Sn-Glycero-3-Fosfatidilserina, lo cual en inglés se abrevia como SOPS.

Nuestro objetivo principal el cual consiste en el entendimiento de la teoría de electroformación y a partir de ello empezar el camino hacia una nueva teoría de electroformación más completa fue desarrollado satisfactoriamente. Para ello en esta tesis se realizo trabajo experimental tomando en cuenta aquellas características del proceso de electroformación y así poder observar los diferentes fenómenos que ocurren durante este proceso.

La obtención de estos resultados nos ha llevado a: i) Analizar el crecimiento de las vesículas con respecto al tiempo bajo una frecuencia y un campo eléctrico alterno constantes y ii) A poder observar experimentalmente fenómenos en el proceso de electroformación que no están contemplados en la teoría de electroformación existente y de esta manera sentar las bases para empezar a crear una nueva teoría.

Se han comparado también los resultados con las investigaciones contemporáneas hechas en la literatura de tal manera que podemos presentar un trabajo de tesis más completo que no solo incluye los resultados obtenidos en el laboratorio sino que también son comparados con diferentes artículos en donde se han visto los mismos fenómenos, o fenómenos parecidos en el proceso de electroformación. Esta comparación nos ayudo también ha mejorar nuestra técnica de electroformación y añadir diferentes técnicas al proceso como la manipulación con micropipetas.

Así mismo se realizo una extensa revisión bibliográfica sobre las aplicaciones de las vesículas unilamelares gigantes, el objeto de nuestro estudio, las cuales debido a su unilamellaridad y tamaño son un excelente modelo de membrana biológica. Estas aplicaciones van desde sistemas modelo para biomembranas, pasando por experimentos con membranas activas, adhesión, hasta la construcción de aparatos bioelectronicos.

Es por esto que los objetivos de la tesis que son el análisis de la teoría de electroformación, la critica y la realización de experimentos que sirvan como base para una nueva teoría mas completa, no llevan solo el fin de describir el proceso de electroformación, sino también tienen el objetivo de entender la cinética y morfología de las vesículas de fosfolípido bajo fuerzas externas, como el campo eléctrico alterno; todo esto con el fin de que podamos entender con seguridad los diferentes fenómenos que existen y así teniendo unas bases fuertes en teoría y experimento, crear aplicaciones solidas para las vesículas unilamelares gigantes.

Referencias y Bibliografía adicional.

- Liposome Electroformation Faraday Discuss. Chem. SOC., 1986, 81, 303-311
Miglena I. Angelova" and Dimiter S. Dimitrov Central Laboratory of
Biophysics, Bulgarian Academy of Sciences, B1.21, 11 13 Sojia, Bulgaria
- Cui Z, Houweling M, (Review), Phosphatidylcholine and Cell Death,
Biochimica et Biophysica Acta 2002,(1585) 87-96
- Yechiel E, Barenholz Y., J Biol Chem 1985 Aug 5;260(16):9123-31.
Relationships between membrane lipid composition and biological properties of
rat myocytes. Effects of aging and manipulation of lipid composition.
- Gundermann KJ, PhD, MD, Associate Professor at the Institute of Pharmacology
and Toxicology, Medical Academy, Szczecin, Poland. "The Essential
Phospholipids as a Membrane Therapeutic" 1993
- Fox JM, A glossary of essential phospholipids, lipids, and lipoproteins in:
Phosphatidylcholine, Biochemical and Clinical Aspects of Essential
Phospholipids. (H. Peters, Ed.), Springer Press, Berlin-Heidelberg-New York
(1976), 2-7
- Wu, L.N.Y., Genge, B.R. and Wuthier, R.E. Analysis and molecular modeling
of the formation, structure, and activity of the phosphatidylserine-calcium-
phosphate complex associated with biomineralization. J. Biol. Chem., 283,
3827-3838 (2008).
- Bogdanov, M. and Dowhan, W. Lipid-assisted protein folding. J. Biol. Chem.,
274, 36827-36830 (1999).
- Kim, H.-Y. Novel metabolism of docosahexaenoic acid in neural cells. J. Biol.
Chem., 282, 18661-18665 (2007).
- Rodieck RW, The First Steps in Seeing, 1998, Ch 10, Photoreceptor Attributes,
pg 214, Sinauer Associates, Sunderland MA 01375,
- Rudin Do, unpublished manuscript, "The Omega Factor: Our Nutritional
Missing Link" 1985. Chapter 7:pg 18.

- Myelin-like protrusions of giant phospholipid vesicles prepared by electroformation, Veronika Kralj-Iglic^{a,*}, Gregor Gomisč^{ek} ^a, Janja Majhenc^a, Vesna Arrigler ^a, Sas^a Svetina
- Triggering and Visualizing the Aggregation and Fusion of Lipid Membranes in Microfluidic Chambers Daniel J. Estes,^{*} Santiago R. Lopez,^y A. Oveta Fuller,^{y§} and Michael Mayer^{*z}
- Electro-Deformation and Poration of Giant Vesicles Viewed with High Temporal Resolution Karin A. Riske and Rumiana Dimova 2007
- A novel technique for preparation of monodisperse giant liposomes Pietro Taylor, Chun Xu, Paul D. I. Fletcher and Vesselin N. Paunov. Surfactant & Colloid Group, Department of Chemistry, University of Hull, Hull, UK HU6 7RX. 2007
- Electroformation of Giant Liposomes from spin-coated films of lipids Daniel J. Estes, Michael Mayer. Department of Biomedical Engineering and Department of Chemical Engineering, University of Michigan, Ann Arbor, MI 48109, USA 2005
- Undulation Instability of Lipid Membranes under an Electric Field Pierre Sens^{1,*} and H. Isambert² 2007
- Shapes of Mixed Phospholipid Vesicles Gerardo Paredes, Amir Maldonado, Hemir Aranda-Hespinoza Journal of Biological Physics 32:177-181, 2006
- Jacob Israelachvili. Intermolecular & Surface Forces. Academic Press Limited, 1991.
- Walter Hoppe. Biophysik. Springer Verlag, 1982.
- S.J. Singer and G.L. Nicolson. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes.
- Science, 175(23):720_31, Feb 1972.
- K. Simons and D. Toomre. Lipid rafts and signal transduction. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.,
- 1(1):31_9, Oct 2000.
- Bray D. Alberts, B. Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing, 1994.

- Jacob Israelachvili. Intermolecular & Surface Forces. Academic Press Limited, 1991.
- H. W. Meyer, K. Semmler, and P. J. Quinn. The effect of sterols on structures formed in
- the gel/subgel phase state of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers. Mol. Membr. Biol.,
- 14(4):187_93, 1997.
- M. R. Vist and J. H. Davis. Phase equilibria of cholesterol/dipalmitoylphosphatidylcholine
- mixtures: 2H nuclear magnetic resonance and differential scanning calorimetry. Biochemistry,
- 29(2):451_64, Jan 1990.
- J. H. Ipsen, G. Karlström, O. G. Mouritsen, H. Wennerström, and M. J. Zuckermann. Phase
- equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system. Biochim. Biophys. Acta., 905(1):162_
- 72, Nov 1987.
- M. Nielsen, L. Miao, J. H. Ipsen, M. J. Zuckermann, and O. G. Mouritsen. O_-
- lattice model
- for the phase behavior of lipid-cholesterol bilayers. Phys. Rev. E. Stat. Phys. Plasmas. Fluids.
- Relat. Interdiscip. Topics, 59(5 Pt B):5790_803, May 1999.
- P.L. Yeagle. The Structure of Biological Membranes. CRC Press, 1991.
- Nicoletta Kahya, Dag Scherfeld, Kirsten Bacia, Bert Poolman, and Petra Schwille. Probing

- lipid mobility of raft-exhibiting model membranes by fluorescence correlation spectroscopy.
- J. Biol. Chem., 278(30):28109_15, Jul 2003.
- Dowben R.M. Reeves, J.P. Formation and properties of thin-walled vesicles. J. Cell. Physiol., 73:49_60, 1968.
- K. Akashi, H. Miyata, H. Itoh, and K. Kinoshita. Formation of giant liposomes promoted by
- divalent cations: critical role of electrostatic repulsion. Biophys. J., 74(6):2973_82, Jun 1998.
- K. Akashi, H. Miyata, H. Itoh, and K. Kinoshita. Preparation of giant liposomes in physiological conditions and their characterization under an optical microscope. Biophys. J., 71(6):3242_50, Dec 1996.
- M. I. Angelova and D. S. Dimitrov. Liposome electroformation. Faraday Discuss.Chem. Soc., 81(81):303_311, 1986.
- L. K. Tamm and H. M. McConnell. Supported phospholipid-bilayers. Biophys. J., 47(1):105_113, 1985.
- E. Sackmann. Supported membranes: scientific and practical applications. Science,
- 271(5245):43_8, Jan 1996.
- D.S. Dimitrov and M.I. Angelova. Lipid swelling and liposome formation mediated by electric fields. Bioelectrochem. Bioenerg., 19(2):323_336, 1988.
- Soelau S. Meleard Ph. Faucon J.F. Bothorel P. Angelova, M.I. Preparation of
- membrane
- proteins into giant unilamellar vesicles via peptide-induced fusion. Prog. Colloid. Polym.

- Sci., 89:127_131, 1992.
- 17
- Menger FM, Keiper JS. Chemistry and physics of giant vesicles as biomembrane models. Curr Opin Chem Bio Hotani H, Nomura F, Suzuki Y. Giant liposomes: from membrane dynamics to cell morphogenesis. Curr Opin Coll Int Sci Luisi PL, Wflde P.
- Giant vesicles. John Wiley & Sons, 2000. Svetina S, ZekS B. Membrane bending energy and shape determination of phospholipid vesicles and red blood cells. Eur Biophys J 1989;17(2):101-111.
- Miao L, Seifert U, Wortis M, Dobereiner HG. Budding transitions of fluid-bilayer vesicles - the effect of area-difference elasticity. Phys Rev E 1994;49:5389-5407.
- Dobereiner HG, Evans E, Kraus M, Seifert U, Wortis M. Mapping vesicle shapes into the phase diagram: a comparison of experiment and theory. Phys Rev E 1997;55:4458-4474.
- Dobereiner HG, Selchow O, Lipowsky R. Spontaneous curvature of fluid vesicles induced by trans-bilayer sugar asymmetry. Eur Biophys J 1999;28:174-118.
- Heinrich V, SevSek F, Svetina S, ZekS B. Large deviations of the average shapes of vesicles from equilibrium-effects of thermal fluctuations in the presence of constraints'. Phys Rev Heinrich V, Bozic B, Svetina S, Zeks B. Vesicle deformation by an axial load: from elongated shapes to tethered vesicles. Biophys J 1999;76(4):2056-2071.
- MClCard P, Gerbeaud C, Pott T et al. Bending elasticities of model membranes - influences of temperature and sterol content. Biophys J 1997;72:2616-2629.
- Evans E, Rawicz W. Elasticity of 'fuzzy' biomembranes. Phys Rev Lett 1997;79(12):2379-2382.
- Rawicz W, Olbrich KC, McIntosh T, Needham D, Evans E. Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipidbilayers. Biophys J 2000;79(1):328-339.

- Lipowsky R, Dobereiner HG. Vesicles in contact with nanoparticles and colloids. *Europhys Lett* 1998;43:219-225.
- Dinsmore AD, Wong DT, Nelson P, Yodh AG. Hard spheres in vesicles: curvature-induced forces and particle-induced curvature. *Phys Rev Lett* 1998;80:409-412.
- Breidenich M, Netz RR, Lipowsky R. The shape of polymerdecorated membranes. *Europhys Lett* 2000;49(4):431-437.
- Dobereiner HG, Lehmann A, Goedel W, Selchow O, Lipowsky R. In: Mulder B, Vogel V, Schmidt C, editors. *Materials Science of the Cell. Mat Res SOCS ymp Proc*, 1998;
- Frette V, Tsafirir I, Guedeau-Boudeville MA, Jullien L, Kandel D, Stavans J. Coiling of cylindrical membrane stacks with anchored polymers. *Phys Rev Lett* 1999;83(12):2465-2468.
- Chou T, Jaric MV, Siggia ED. Electrostatics of lipid bilayer bending. *Biophys J* 1998;72:2042-2055.
- Lee J, Petrov PC, Dobereiner HG. Curvature of zwitterionic membranes in transverse pH gradients. *Langmuir* 1999;15:8543-8546.
- Angelova M, Hristova N, Tsoneva I. DNA-induced endocytosis Upon local microinjection to giant unilamellar. *Eur Bio- Groh B.* 1999;4:358-368.
- Vesicles in solutions of hard rods. *Phys Rev E* Dobereiner H-C, Seifert U. 1999;59:5606-5612.
- Giant vesicles at the prolate-oblate transition: a macroscopic bistable system. *Europhys Lett* 1996;36(5):325-330.
- Hackl W, Seifert U, Sackmann E. Effect of fully and partially solubilized amphiphiles on bilayer bending stiffness and temperature dependence of the effective tension of giant vesicles. 1995:213-305. *J Phys II* 1997;7(8):1141-1157.
- Zhelev DV. Material property characteristics for lipid bilayers containing lysolipid. *Biophys J* 1998;75(1):321-330.
- Bruckner E, Sonntag P, Rehage H. Influence of toluene on the bending elastic properties of giant phosphatidylcholine vesicles. *J Phys Chem B* 2000;104(10):2311-2319.

- Manneville JB, Bassereau P, Levy D, Prost J. Activity of transmembrane proteins induces magnification of shape fluctuations of lipid membranes. *Phys Rev Lett* 1999;
- Petrov PG, Lee J, Dobereiner HG. Coupling chemical reactions to membrane curvature: a photochemical morphology switch. *Europhys Lett* 1999;48:435-441.
- Seifert U. Fluid membranes in hydrodynamic flow fields: formalism and an application to fluctuating quasi-spherical vesicles in shear flow. *Eur Phys J B* 1999;8:405-415.
- Seifert U. Hydrodynamic lift on bound vesicles. *Phys Rev Lett* 1999;83:876-879.
- Cantat I, Misbah C. Lift force and dynamical unbinding of adhering vesicles under shear flow. *Phys Rev Lett* 1999;
- Cantat I, Misbah C. Dynamics and similarity laws for adhering vesicles in haptotaxis. *Phys Rev Lett* 1999;83:235-238.
- Sandre O, Moreaux L, Brochard-Wyart F. Dynamics of transient pores in stretched vesicles [see comments]. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96(19):10591-10596.
- Olbrich KC, Rawicz W, Needham D, Evans E. Water permeability and mechanical strength of polyunsaturated lipid bilayers. *Biophys J* 2000;79(1):321-327.
- Dimova R, Pouligny B, Dietrich C. Pre-transitional effects in DMPC-vesicle membranes: optical dynamometry study. *Bio-phys J* 2000;79(1):340-356.
- Dimova R, Dietrich C, Hadjiisky A, Danov K, Pouligny B. Falling ball viscosimetry of giant vesicle membranes: finite-size effects. *Europhys J B* 1999;12(4):589-598.
- Kloboucek A, Behrisch A, Faix J, Sackmann E. Adhesion-induced receptor segregation and adhesion plaque formation: a model membrane study. *Biophys J* 1999;77(4):2311-2328.
- Bruinsma R, Behrisch A, Sackmann E. Adhesive switching of membranes: experiment and theory. *Phys Rev E* 2000;
- Weikl TR, Netz RR, Lipowsky R. Unbinding transitions and phase separation of multi-component membranes. *Phys Rev E* 2000;62:1.

- Aranda-Espinoza H, Chen Y, Dan N et al. Electrostatic repulsion of positively charged vesicles and negatively charged objects'. *Science* 1999;285:394-397.
- Koltover I, Radler JO, Safinya CR. Membrane mediated attraction and ordered aggregation of colloidal particles bound to giant phospholipid vesicles. *Phys Rev Lett*
- Merkel R, Nassoy P, Leung A, Ritchie K, Evans E. Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy. *Nature* 1999;397(6714):50-53.
- Fromherz P, Kiessling V, Kottig K, Zeck G. Membrane transistor with giant lipid vesicle touching a silicon chip. *App*
- Boey SK, Boal DH, Discher DE. Simulations of the erythrocyte cytoskeleton at large deformation. I. Microscopic models. *Biophys J* 1998;75:1573-1583.
- Discher DE, Boal DH, Boey SK. Simulations of the erythrocyte cytoskeleton at large deformation. II. Micropipette aspiration. *Biophys J* 1998;75:1584-1597.
- Gompper G, Kroll DM. Statistical mechanics of membranes: freezing, undulations, and topology fluctuations'. *J Phys Cond Matter* 2000;12(8A):A29-A37.
- Discher BM, Won YY, Ege DS, Lee JCM, Bates FS, Discher DE, Hammer DA. Polymersomes: tough vesicles made from diblock copolymers. *Science* 1999;284(5417): 1143-1146.
- Ilhan F, Galow TH, Gray M, Clavier G, Rotello VM. Giant vesicle formation through self-assembly of complementary random copolymers. *J Am Chem Soc* 2000;122:5895-5896.