

Licenciatura en Ciencias Biológicas

Tesina de grado para optar
por el título de Bióloga

BIOGÉNESIS DE *LIPID DROPLETS*: CARACTERIZACIÓN BIOFÍSICA EN MONOCAPAS Y BICAPAS MODELO

Tesinista:

Muratori Brest, Paula Candela

Director:

Dr. Benjamín Caruso

Lugar de trabajo:

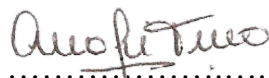
Cátedra de Química Biológica
(Dpto. Química - FCEFyN) -
Instituto de Investigaciones
Biológicas y Tecnológicas
(IIByT, CONICET/UNC)

2022


BIOGÉNESIS DE *LIPID DROPLETS*: CARACTERIZACIÓN BIOFÍSICA EN MONOCAPAS Y BICAPAS MODELO

Tribunal Examinador


Apellido y Nombre: Dra. Turina, Anahí del Valle

Firma: 

Apellido y Nombre: Dr. García, Daniel Asmed

Firma: 

Apellido y Nombre: Dr. Guidobaldi, Alejandro

Firma: 

Calificación: 10 (diez)

Fecha: 07/12/2022

Agradecimientos

Quisiera comenzar este trabajo agradeciendo desde lo profundo de mi corazón a todas aquellas personas que formaron parte de este camino:

A mi mamá, quien siempre me enseñó que el conocimiento es como una escalera o una pared de ladrillos, que se construye poco a poco, con paciencia y dedicación. Mami, estoy subiendo otro escaloncito de tu famosa escalera del aprendizaje, otro ladrillito en mi pared en construcción; gracias por poner tus andamios, prestarme tus ladrillos y darme tus abrazos. Sos mi pilar, inspiración y orgullo.

A Santi, a quien para describir no existen otras palabras que "el amor de mi vida". Gracias por apoyarme siempre, por inspirarme a ser mejor, por brindarme tanta paz y tanta alegría. Es un verdadero placer compartir la vida a tu lado.

A mis amigos, personas entrañables si las hay y mis tesoros de la facu: Male, Levi, Clari, Viki, Giuli, Luz, Agus y Bel. Colman de risas y felicidad hasta los momentos más difíciles. ¿Con quiénes más podré salir a recorrer las verdulerías de Nueva Córdoba identificando tipos de frutos? ¿Y culminar una ardua noche de estudio escuchando "El Polaco"? ¿Y juntar caca de pájaro en Vaquerías? Gracias por su inmenso cariño y apoyo.

A mi amiga desde los 7 años, Lula, fiel compañera de aventuras. Gracias por tu amistad eterna y cariño.

A mi papá, mis hermanos, sobrinos, tíos y primos, de quienes siempre recibí palabras de aliento y, a pesar de la distancia, un amor incondicional.

A Feli, mi profe de biología del monse, quien con el amor de una segunda mamá me hizo enamorarse de esta hermosa y desafiante carrera.

A Benja, mi Dire y una gran persona, quien me guió, enseñó y acompañó con paciencia y alegría durante todo este proceso; brindándome su apoyo y aliento en cuanto curso, beca y concurso decidí inscribirme. También a Marieca, gran inspiración, gracias por abrirme las puertas del laboratorio y apoyar no sólo mi desarrollo como bióloga sino también como docente. A Ine, por introducirme en el mundo de la ciencia. A Pedro, Ani y Dani, por sus cálidas palabras y consejos. Y a cada uno de los becarios que componen la Cátedra de Química Biológica: Meli, Sandra, Nico, Pablo, Caro, Marcos, Iván, Salo y Dami; gracias por sus chistes, consejos, escucha atenta y comidas ricas compartidas.

A la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, a la Universidad Nacional de Córdoba, al Consejo Interuniversitario Nacional y en definitiva a la sociedad argentina, por permitir formarme en lo que me apasiona, de forma gratuita y con un abanico de contenidos y docentes de excelente calidad. Deseo lograr retribuir todas estas oportunidades.

Y por último, pero no menos importante, a mis compañeros peludos durante las noches de estudio: Negri, Rufi, Minu y mi Flopi eterna.

Índice

Resumen	6
Summary	7
Introducción.....	8
Objetivos.....	12
Materiales y Métodos	13
Resultados y discusión	19
Conclusiones.....	39
Bibliografía.....	41

Tabla de abreviaturas

LD = *lipid droplet*

GUV = vesícula unilamelar gigante

TG = triglicérido

TO = trioleína

POPC = palmitoil-oleoil-fosfatidiletanolamina

POPE = palmitoil-oleoil-fosfatidiletanolamina

LysoPC = lisofosfatidilcolina

FL= fosfolípidos en general

“Biogénesis de *lipid droplets*: caracterización biofísica en monocapas y bicapas modelo”

Resumen

Las "*lipid droplets*" son estructuras intracelulares que emergen de la membrana del retículo endoplásmico y están formadas por un núcleo de triglicéridos rodeado por una monocapa de fosfolípidos y proteínas. Actualmente, son reconocidas como organelas clave en la fisiología intracelular, entendiéndose que para comprender su dinámica y funcionamiento resulta fundamental dilucidar los factores implicados en su proceso de biogénesis. El presente trabajo contribuye a este objetivo a través de la descripción del efecto de la composición fosfolipídica sobre la morfología y estabilidad de agregados de triglicéridos en sistemas modelo de monocapa y bicapa que, a diferencia de los utilizados hasta el momento, permitirían: 1) evaluar de forma *progresiva* las etapas de segregación, crecimiento y emergencia de estas estructuras; y 2) evidenciar mediante microscopía espectral la existencia de estructuras iniciales de formación inmersas en la bicapa y de tamaño nanométrico. Para lo primero, se utilizó el modelo de monocapas descrito por Caruso *et al.* (2021) [24] y para bicapas se formularon vesículas unilamerales gigantes (GUVs) con las que se adaptó un método para disminuir su área, procurando así modificar el empaquetamiento de la bicapa y con ello inducir la segregación progresiva de triglicéridos en bicapas. Para lo segundo, se utilizaron las propiedades solvatocrómicas de la sonda fluorescente Nile Red con el fin de evidenciar la segregación de triglicéridos en pequeños agregados dentro de la bicapa. Los resultados obtenidos refuerzan la utilidad del modelo de monocapas pues se encontraron tendencias que se corresponderían con lo observado en otros modelos, pero de una forma más representativa de la formación natural. Así también, el análisis espectral en bicapas evidenció de forma inédita la presencia de agregados de triglicérido inmersos en las mismas, tanto microscópicos como por debajo del límite de resolución microscópico, resultantes de la segregación *in situ* de los triglicéridos. En conjunto, ambos modelos sugieren que la geometría de las moléculas de fosfolípido modula la morfología y estabilidad de estos agregados, siendo importantes tanto los aportes de curvatura positiva como negativa. Además, se diseñó una técnica para disminuir el área de las GUVs, aunque la misma no permitiría aseverar un mayor empaquetamiento.

Palabras clave: *lipid droplets (LDs), desmezcla de lípidos neutros, lentes de triglicéridos, monocapas de Langmuir, vesículas unilamerales gigantes (GUVs), microscopía de ángulo de Brewster, Nile Red*

"Biogenesis of lipid droplets: biophysical characterization in model monolayers and bilayers"

Summary

Lipid droplets are intracellular structures that emerge from the endoplasmic reticulum membrane and are formed by a triglyceride core surrounded by a monolayer of phospholipids and proteins. Currently, they are recognized as key organelles in intracellular physiology, and it is understood that in order to comprehend their dynamics and function it is essential to elucidate their biogenesis process. The present work contributes to this objective through the description of the effect of phospholipid composition on the morphology and stability of triglyceride aggregates in monolayer and bilayer model systems that, unlike those used so far, would allow: 1) to progressively evaluate the stages of segregation, growth and emergence of these structures; and 2) to demonstrate, using spectral microscopy, the existence of initial formation structures immersed in the bilayer and of nanometric size. For the former, we use the monolayer model described by Caruso *et al.* (2021) [24], and for bilayers, we formulated giant unilamellar vesicles (GUVs) and adapted a method to reduce their area, thus trying to modify the packing of the bilayer and thereby induce the progressive segregation of the triglycerides immersed in them. For the latter, we used the solvatochromic properties of the Nile Red fluorescent probe to evidence the segregation of triglycerides into small aggregates within the bilayer. The results reaffirm the usefulness of the monolayer model, showing trends that are comparable to what was observed using other models, but in a manner more representative of the natural formation. Also, the spectral analysis in bilayers demonstrated in a novel way the presence of triglyceride aggregates immersed in these, both microscopic and below the microscope resolution limit, resulting from in place segregation of triglycerides. Taken together, both models suggest that the geometry of phospholipid molecules regulate the morphology and stability of these aggregates, with both positive and negative curvature being relevant. In addition, we report a technique for decreasing the area of GUVs, although it doesn't allow asserting a higher packing.

Keywords: *lipid droplets, neutral lipid unmixing, triglyceride lenses, Langmuir films, giant unilamellar vesicles (GUVs), Brewster's angle microscopy, Nile Red.*

Introducción

Las gotas lipídicas o “*lipid droplets*” (“LDs”, por sus siglas en inglés) son estructuras intracelulares ubicuas a los seres vivos. Las mismas, están constituidas por un núcleo de lípidos neutros (principalmente triglicéridos) rodeado por una capa monomolecular (monocapa) de fosfolípidos (FL) y proteínas [1].

Debido a su composición, históricamente fueron consideradas meros reservorios energéticos, importantes para la regulación del metabolismo celular. Sin embargo, en la actualidad, se conoce que su rol va más allá, con funciones en la señalización celular, el tráfico de membranas, el control de la síntesis y secreción de mediadores inflamatorios, entre tantas otras que se descubren cada año [2]. Se constituyen así como verdaderas organelas inducibles, claves para la fisiología intracelular, generando especial atención tanto su participación en el desarrollo de enfermedades (como dengue, coronavirus, diabetes y cáncer) como su importancia en la industria (dados los esfuerzos para producir triglicéridos en el campo de la ciencia de los alimentos y de los biocombustibles) [3-5].

Ahora bien, la denominación de organelas “inducibles” se debe a que su biogénesis es un proceso celular regulado. Así, la morfología, cantidad y distribución de las LDs en las células es característica del proceso en el que participan e incluso pueden ser indicadoras de ciertas patologías [6,7]. Es por esto que en la actualidad se reconoce que para poder entender la función y dinámica de las LDs resulta de fundamental importancia el estudio de su mecanismo molecular de formación [8,9].

El proceso de biogénesis de LDs ocurre en la membrana del retículo endoplásmico (RE), donde los modelos actuales para células eucariotas establecen que el mismo consta de 3 etapas: nucleación, crecimiento y emergencia (Fig. 1). En primer lugar, ciertas enzimas inician el proceso a partir de la síntesis de lípidos neutros. Estos lípidos, se acumulan entre las hemicapas de la membrana del RE y esta acumulación conduce a su segregación en núcleos nanométricos con forma de “ampolla”. Progresivamente, estos núcleos crecen a medida que se incorporan más lípidos, desarrollando así una estructura que protruye la membrana del RE en forma de “lente” para finalmente emerger desde el retículo hacia el citoplasma [10,11].

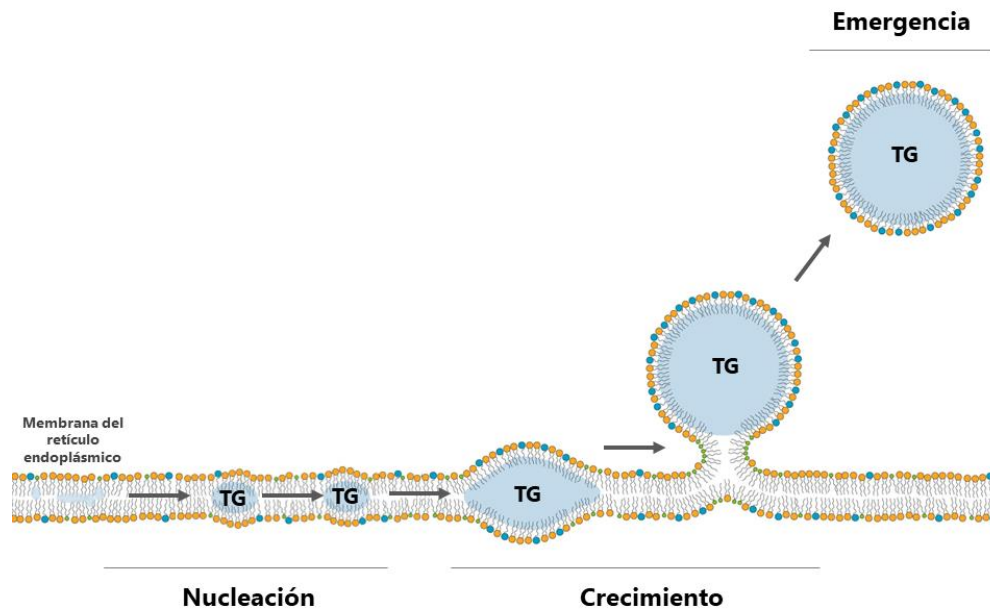


Figura 1. Modelo simplificado de las distintas etapas de biogénesis de *lipid droplets* en el retículo endoplásmico. Imagen tomada y modificada de Renne *et al.* (2020) [12].

Así, se entiende que para que los triglicéridos presentes en el interior de la membrana del RE se agreguen de forma estable, se deben superar dos barreras energéticas íntimamente relacionadas: una, asociada a la energía de interacción entre las moléculas de triglicérido y los fosfolípidos de la membrana; y otra, más física/geométrica, referente a la necesaria deformación de la membrana para permitir el crecimiento y emergencia de la LD [10,12].

La primera determina la baja “solubilidad” de las moléculas de triglicérido (TG) en la bicapa [13, 14]. Esto se debe a que, por su estructura, estas moléculas tienden a presentar un alto grado de degeneración en sus configuraciones, en relación a los fosfolípidos que tienden a orientarse para formar bicapas. Así, la llamada “desmezcla” de los triglicéridos minimiza el costo energético asociado a separar los fosfolípidos estructurados en la bicapa mediante la interacción termodinámicamente favorable de sus grupos apolares. Este fenómeno ha sido abordado a través de modelos matemáticos [10] y dinámica molecular [15, 16], encontrando que las bicapas aceptan una concentración máxima entre el 3 y 6% de triglicéridos dispersos en su interior, antes de favorecerse su agregación en núcleos de entre 10 y 30nm.

La segunda barrera depende de la composición fosfolípida de la membrana. Esto se debe a que esta composición será determinante tanto del grado de empaquetamiento de la membrana como de la curvatura que ésta puede adoptar, modulando por interacción estérica las constricciones físicas/mecánicas (como la tensión superficial) que limitan la desmezcla

de los TGs dispersos en su interior y que modulan la estabilidad de las estructuras que se formarán al agregarse los TGs, favoreciendo o no su posterior emergencia [10, 17-20].

Cabe aquí mencionar que los fosfolípidos más representativos de las membranas biológicas de los eucariotas y particularmente de las monocapas que componen las LDs son: fosfatidilcolina (“PC”, representando casi el 60% del total de fosfolípidos), fosfatidiletanolamina (“PE”, con casi el 20%), fosfatidilinositol (10%) y lisoformas de PC y PE (el restante 10%) [21]. Cada uno de ellos cuenta con geometrías propias que por efecto estérico condicionan el grado máximo de empaquetamiento y así la curvatura intrínseca de sus estructuras autoensambladas. Esta geometría se define por su forma efectiva, que depende de la relación de volúmenes entre su cabeza polar y cadenas hidrofóbicas (Fig. 2). Así, fosfolípidos como PC cuentan con una geometría cilíndrica (pues la relación entre los dos volúmenes es casi 1: cabeza y cadenas son iguales en volumen), por lo que su curvatura intrínseca es nula y en bicapas favorece la formación de estructuras lamelares planas. Por el contrario, PE y las formas liso cuentan con geometrías cónicas: ante una misma cadena hidrocarbonada, PE cuenta con un grupo polar más pequeño que PC, presentando una geometría de cono invertido y favoreciendo curvaturas negativas de la bicapa. En cambio, una forma liso como LysoPC cuenta con el mismo grupo polar que PC pero con una sola cadena, presentando entonces una geometría cónica que favorece curvaturas positivas [12].

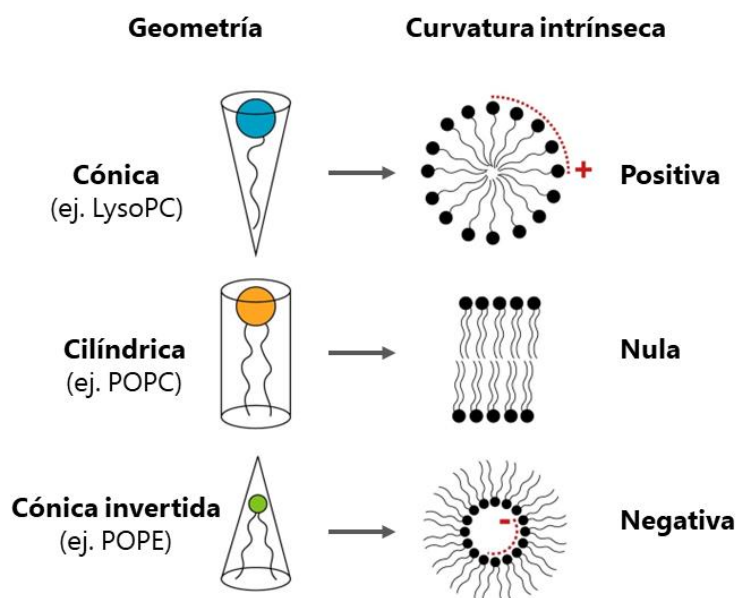


Figura 2. Representación esquemática de la geometría molecular de los lípidos y las curvaturas intrínsecas que favorecen al autoensamblarse. Imagen tomada y modificada de Renne *et al.* (2020) [12].

Ahora bien, los factores implicados en ambas barreras, particularmente la composición fosfolipídica y las curvaturas intrínsecas que esta favorece, han sido estudiados para cada etapa de formación de manera individual y a través de modelos matemáticos [10, 22, 23], de dinámica molecular [15] y experimentos en los que se incorporan gotas de TG grandes (varias micras) administradas externamente a Vesículas Unilamelares Gigantes (GUVs, por su denominación en inglés) [17, 19]. Sin embargo, aunque estos modelos tienen respaldo biofísico, no poseen bases cuantitativas que les otorguen poder predictivo. Esto se debe principalmente a dos razones: por un lado, que los experimentos no son representativos de la formación natural de las lentes de triglicérido (que ocurre mediante la acumulación progresiva en centros de nucleación nanométricos). Y por otro, debido a la dificultad de estudiar las estructuras iniciales de formación por ser nanométricas. Respecto a esto último, cabe aclarar que incluso mediante la utilización de microscopía electrónica sería difícil observar una LD en las etapas iniciales de formación, pues al seccionar la bicapa es poco probable que se seccione también una LD inmersa [22].

Resulta entonces interesante y necesario el desarrollo de un sistema modelo que permita estudiar experimentalmente el efecto de los factores mencionados sobre la formación progresiva de las lentes. Y con este objetivo, el Dr. Caruso [24] ha demostrado que el sistema experimental de monocapas de Langmuir se posiciona como un sistema idóneo para estudiar la composición fosfolipídica como efecto modulador de la instancia inicial de formación de LDs y de su posterior estabilidad y morfología asociada. Esto se debe a que el mismo consiste en capas monomoleculares de fosfolípidos y lípidos neutros ubicadas en una interfase agua/aire y sobre las que se puede generar la exclusión controlada de los lípidos de la interfase a partir de la variación de las presiones de empaquetamiento. Así, se pueden generar “lentes” de triglicéridos en coexistencia con su monocapa circundante, cuya cara orientada hacia el agua representa la superficie de una LD naciente. Estas estructuras son observables mediante Microscopía de Ángulo de Brewster y de fluorescencia, lo que ha permitido determinar que las lentes formadas mediante este sistema son estructuras discretas formadas de TG líquido, que se encuentran en equilibrio y que su forma puede calcularse a partir de los parámetros obtenidos de su observación microscópica.

Así también, en un estudio reciente de Santinho et al. (2021) [20] se describe un método de formación de GUVs en el que, valiéndose de la propiedad de semipermeabilidad de la bicapa de la vesícula, utilizan la presión osmótica como una herramienta para generar el hinchamiento de la vesícula y con ello modular el empaquetamiento de la bicapa

(directamente relacionado a la composición fosfolipídica) en coexistencia con una lente. Resultaría entonces posible adaptar este sistema para generar el deshinchamiento de las vesículas y así lograr empaquetarlas para dilucidar el efecto de la composición fosfolipídica sobre una fase de triglicérido inmersa en su bicapa.

Y aún más, dada la capacidad de ciertos marcadores fluorescentes para identificar y caracterizar las propiedades físicas de las fases lipídicas (extendidas -como las observadas en bicapas- o segregadas -en gotas de lípidos-), sería posible realizar la caracterización de las estructuras iniciales de formación del sistema mencionado. En este sentido, la sonda fluorescente Nile Red (NR) posee espectros de excitación y emisión de fluorescencia muy sensibles a la polaridad y anisotropía del medio en el que se encuentra, exhibiendo así un marcado desplazamiento solvatocrómico entre estar particionada en bicapas o el interior de alguna fase isotrópica de lípidos neutros (tal como una LD) [24-26].

Es entonces que en el presente trabajo se han combinado las herramientas y modelos mencionados con el fin de indagar sobre la posibilidad de contar con un modelo de estudio progresivo de la formación de LDs, evaluando la función moduladora de la composición lipídica y el empaquetamiento molecular sobre las distintas etapas de formación. Se plantean así los siguientes objetivos:

Objetivos

Objetivo general

Describir la formación progresiva de agregados de lípidos neutros en modelos de monocapa y bicapa preparados con fosfolípidos de distinta geometría molecular y sometidos a diferentes empaquetamientos moleculares.

Objetivos específicos

1. Caracterizar el efecto de fosfolípidos de distinta geometría molecular sobre la cantidad, forma y tamaño de gotas de triglicéridos en modelos de monocapa (monocapas de Langmuir).
2. Evaluar el efecto de fosfolípidos de distinta geometría molecular sobre la cantidad, forma y tamaño de gotas de triglicéridos en modelos de bicapa (vesículas unilamelares gigantes).

3. Aplicar y adaptar un método que permita modular el empaquetamiento molecular de vesículas unilamelares gigantes a fin de modelar y evaluar la formación progresiva de *lipid droplets*.
4. Evaluar la correspondencia entre los sistemas monocapa y bicapa propuestos en cuanto a su propensión de segregar lípidos neutros y con ello su capacidad de modelar la formación progresiva de *lipid droplets*.

Materiales y Métodos

Preparación de soluciones de lípidos

Para elaborar las monocapas y bicapas se utilizaron fosfolípidos de curvatura intrínseca:

- Positiva: 1-palmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina, “LysoPC”
- Nula: 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina, “POPC”
- Negativa: 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina, “POPE”

Como triglicérido se utilizó trioleína (TO). Todos los lípidos fueron adquiridos de Avanti Polar Lipids y Sigma-Aldrich. La proporción de TO en las mezclas de FL y TO fue del 30 mol%. Todas las soluciones fueron conservadas a -20°C.

Para permitir la identificación de las bicapas y de las fases lipídicas se utilizó la sonda fluorescente con propiedades solvatocrómicas “Nile Red”, al 1 mol% respecto al total de lípidos.

Como disolvente de cada compuesto se utilizó una solución de cloroformo:metanol 2:1 para monocapas y cloroformo puro para bicapas. Ambos compuestos fueron adquiridos de Dorwil y Merck, respectivamente.

Preparación de monocapas (filmes de Langmuir)

Se prepararon monocapas de Langmuir en interfase agua/aire mediante la utilización de un equipamiento de KSV Instruments Ltd. (Fig. 3). El mismo consta de una cuba de 326 mm², elaborada con material hidrofóbico y oleofóbico (Teflon[®]), y dos barreras móviles hidrofílicas (de Delrin[®]). Estas últimas, se colocan de forma paralela entre sí y perpendicular al largo de la cuba, lo que permite modificar el área de la misma con un margen de error de

$\pm 3 \text{ \AA}^2$. También cuenta con un dinamómetro que, colocado en la interfase agua/aire, permite medir la tensión interfasial -por “entre fases”- (σ) mediante el método de la placa de Wilhelmy. A partir de ella, el equipo calcula la presión lateral (π) de una monocapa formada en la interfase según

$$\pi = \sigma_{\text{agua}} - \sigma_{\text{monocapa}} ,$$

con un margen de error de $\pm 0.2 \text{ mN/m}$ y una reproducibilidad experimental de $\pm 1 \text{ mN/m}$.

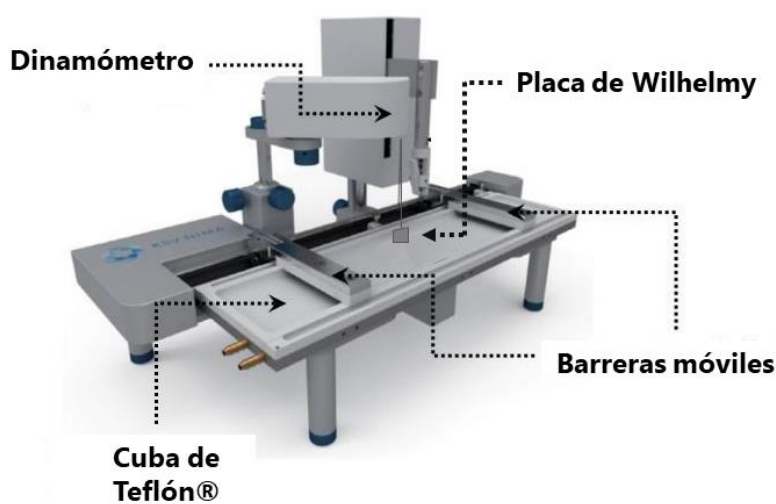


Figura 3. Esquema del equipo utilizado para la elaboración y compresión de monocapas de Langmuir. Imagen tomada y modificada de Osorio Calvopiña (2015) [27].

Previa limpieza del equipo con alcohol etílico y agua bidestilada, y utilizando agua ultrapurificada MiliQ para la subfase, se “sembraron” sobre la interfase agua/aire volúmenes conocidos de las soluciones de lípidos correspondientes a cada experimento, mediante la utilización de una micro jeringa calibrada. Esta monocapa se dejó estabilizar por 10 minutos, para permitir la evaporación del solvente orgánico. Posteriormente, se efectuaron isotermas de compresión (presión lateral - área molecular) a una velocidad constante de 7 mm/min y 25°C . Este modelo experimental permitió generar una segregación controlada y progresiva de los TGs, emulando la síntesis natural de los mismos en la bicapa del RE.

Caracterización de monocapas

Todas las monocapas fueron continuamente observadas durante su compresión mediante Microscopía de Ángulo de Brewster (BAM), utilizando un elipsómetro EP3 Imaging

(Accurion, Gotinga, Alemania). Este modelo experimental permitió la observación microscópica del punto exacto en el que la monocapa colapsa producto de la exclusión de los TGs, con la consecuente formación de estructuras con forma de lente. Se tomaron fotografías cada 1mN/m, con el fin de caracterizar la topografía de las lentes de TG al momento de aparición en el punto de colapso de la monocapa y a presiones superiores a esta.

Para que las fotografías tuvieran validez cuantitativa de la reflectividad de la luz incidente (es decir, que las estructuras más brillantes no estuvieran saturadas), fueron tomadas con una configuración en la que el polarizador y el analizador se colocan a 0° respecto al plano de incidencia, y se ajusta el obturador del láser y la ganancia de señal para lograr imágenes no saturadas con estructuras que presentan bordes bien definidos. Para utilizar esta configuración el sistema fue calibrado antes de cada experimento, es decir, observando la interfase antes de agregar la solución lipídica.

Las fotografías obtenidas fueron procesadas a través del software “FIJI” versión 2.9.0, midiendo la cantidad de lentes totales y el diámetro y reflectividad de 10 lentes seleccionadas al azar en cada imagen. A partir de estos valores se obtuvieron respectivamente los parámetros: densidad y cantidad de lentes por mm²; y diámetro y altura/espesor promedio para cada valor de presión lateral. La metodología y fórmula utilizada para obtener la altura (espesor) de las lentes a partir de su reflectividad fue tomada de Caruso et al. (2021) [24]. Los gráficos fueron elaborados mediante el software “SigmaPlot” versión 11.

El análisis estadístico fue realizado mediante el software “InfoStat” versión estudiantil 2020. Para las variables diámetro y altura/grosor entre tratamientos (diferentes fosfolípidos o mezcla de ellos) se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) suplementado con Test de Tukey en caso de rechazarse la hipótesis nula, previa comprobación de los supuestos de distribución normal de los errores y homogeneidad de varianzas mediante Prueba de Normalidad Shapiro Wilks y Test de Levene, respectivamente. Todos los análisis fueron evaluados con un intervalo de confianza del 95% ($p < 0.05$).

Por otro lado, con el objetivo de observar los espectros de emisión de la sonda fluorescente en monocapas sometidas a diferentes presiones laterales, se elaboraron isothermas de compresión mediante el agregado sucesivo de pequeños volúmenes de solución lipídica (es decir, por goteo, en lugar de la compresión usando barreras). Esto se debe a que el microscopio confocal Olympus FV1000 (necesario para realizar la medición de los

espectros) no cuenta con el equipamiento necesario para montar, a la vez, un equipo de monocapas que permita registrar la presión y el empaquetamiento mediante el uso de barreras. Por ello, se registraron las isotermas de compresión (por goteo) en una placa de Petri (6cm diámetro) conteniendo una ventana de observación con cubreobjeto en un equipo de monocapas tradicional, para luego repetir el mismo procedimiento de siembra en el microscopio espectral.

Preparación de bicapas

En primera instancia, se prepararon GUVs mediante el método de electroformación descrito por Angelova y Dimitrov (1986) [28]. Para ello se utilizaron vidrios conductores transparentes recubiertos con “ITO” (óxido de indio y estaño) sobre los que se sembraron, en cada cara conductora, las soluciones de FL o FL+TGs, según el experimento. Una vez sellados los vidrios con sus caras conductoras enfrentadas a un marco de Teflon[®], se agregó en el interior una solución de sacarosa 0,2M y se conectó el sistema a una fuente de voltaje (función sinusoidal de 10Hz y 1,35V de amplitud) por 2 horas. Transcurrido ese tiempo, se extrajo la suspensión de GUVs, que fueron observadas al microscopio el mismo día de su elaboración.

Por otro lado, con el asesoramiento del Dr. Matías Crosio, perteneciente al Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba, se utilizó el método de formación asistida por gel de polivinil-alcohol, descrito por Weinberger y colaboradores (2013) [29]. El mismo consistió en la elaboración de películas de 100 μ l de polivinil-alcohol (PVA, de peso molecular 146.000, obtenido de Sigma Aldrich) al 5% p/p, secadas en estufa a 60°C por 1 hora sobre un vidrio cubre objeto pegado a una placa de Petri (6cm diámetro) con una perforación central circular de 1cm de diámetro (Fig. 4A). Sobre estas películas se sembraron 10 μ l de las soluciones de lípidos correspondientes a cada experimento (Fig. 4B) y el sistema se liofilizó durante 1 hora con el objetivo de extraer totalmente el solvente orgánico (cloroformo) (Fig. 4C). Luego de liofilizadas, se colocó sobre las películas lipídicas una solución de sacarosa 0,2M durante 2 horas a 25°C, permitiendo su hinchamiento natural. Transcurrido ese tiempo, se extrajo la solución de GUVs, que fueron observadas al microscopio el mismo día de su elaboración.

Debido a que este segundo método resultó más eficiente y reproducible tanto en cantidad como en tamaño de GUVs formadas, fue escogido para los ensayos que se mencionan en esta tesina.

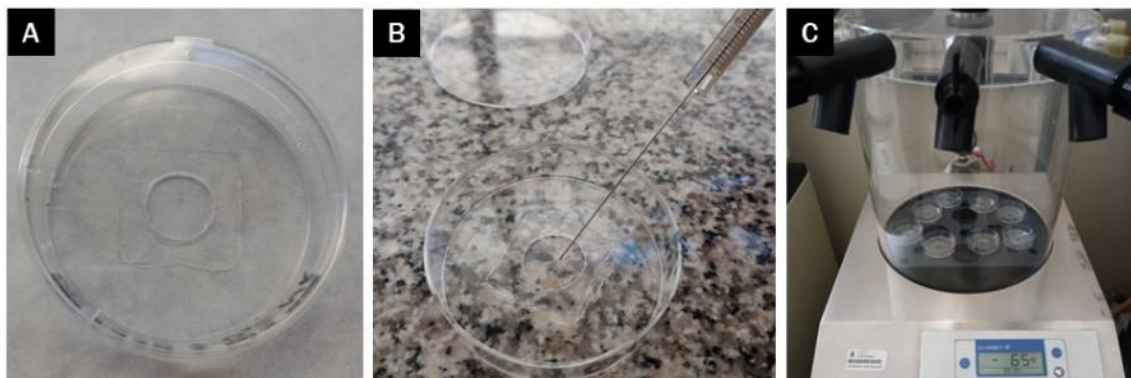


Figura 4. Equipamiento utilizado para la producción de GUVs mediante el método de formación asistida por gel de polivinil-alcohol (PVA). **A:** Placa de petri de 6cm con perforación central de 1cm sellada mediante un vidrio cubreobjetos de 0.17mm de espesor. Sobre el vidrio se ha secado con estufa un film de PVA al 5% p/p. **B:** Siembra de solución lipídica sobre film de PVA mediante la utilización de una micro jeringa. **C:** Liofilización de films lipídicos.

Cabe aclarar que las soluciones de FL fueron preparadas con cloroformo, a una concentración de 1mg/ml. Además, debido a la inestabilidad de LysoPC para formar bicapas en concentraciones mayores al 20% [19], las soluciones de lípidos con curvatura fueron mezclados con POPC (es decir, se elaboraron mezclas de LysoPC:POPC y POPE:POPC) en una proporción 1:9.

Visualización de bicapas (GUVs) y caracterización de las mismas

Se utilizó la sonda fluorescente Nile Red (NR) al 1 mol% del total de lípidos. Esto permitió la visualización de las GUVs en el microscopio de Epifluorescencia Nikon ECLIPSE TE2000-U, utilizando filtros de excitación y emisión “al azul” (465-495/515-555 nm) y “al verde” (528-553/578-633 nm).

El NR posee espectros de excitación y emisión de fluorescencia muy sensibles a la polaridad y anisotropía del medio en el que se encuentra, exhibiendo un marcado solvatocromismo entre estar particionada en bicapas o el interior de alguna fase isotrópica de lípidos neutros, tal como una LD. Esta propiedad permitió la caracterización de las fases presentes en

monocapas y GUVs mediante microscopía confocal espectral (microscopio Olympus FV1000), excitando con láseres de 488 y 543 nm, para luego registrar un escaneo de longitudes de onda de emisión entre 505 y 691nm y entre 560 y 692nm, respectivamente.

Por otro lado, para la visualización de las muestras de GUVs en los microscopios invertidos mencionados, se elaboró una estructura compuesta de una placa multiwell opaca negra a la que se le realizaron perforaciones para la colocación de un vidrio cubreobjetos reemplazable (Fig. 5A). Cabe aclarar que estos vidrios, previo a la incorporación de las muestras, fueron lavados con solución sulfonítrica y abundante agua y luego tratados con albúmina al 1% p/p, con el fin de evitar la adherencia de las GUVs a los mismos y así aumentar su vida media.

Además, cada muestra fue obtenida mediante la suspensión 1:4 de las soluciones de GUVs producidas mediante el método correspondiente, en una solución de Glucosa 0,2M para permitir la decantación de las vesículas y evitar así su movimiento difusional (Fig. 5B).

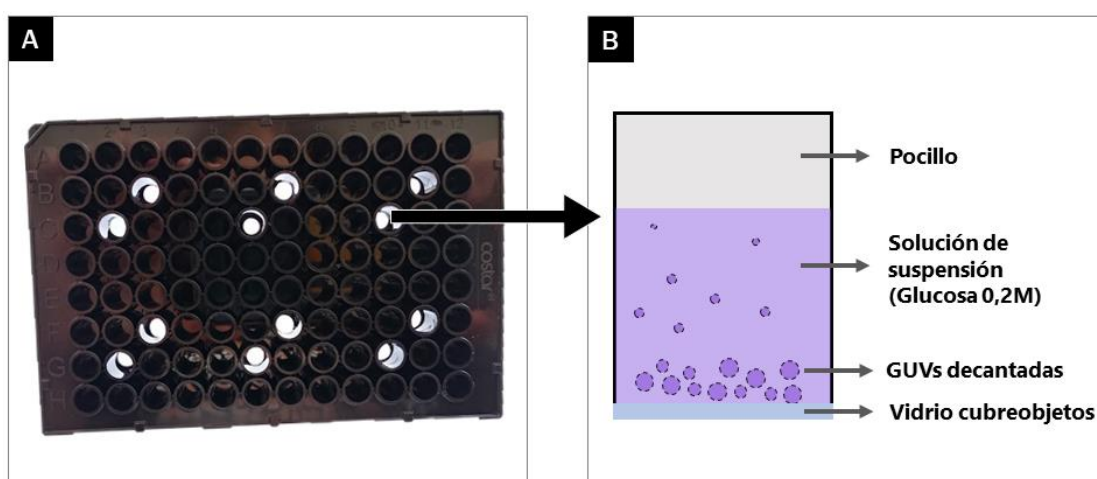


Figura 5. Equipamiento utilizado para la visualización de GUVs al microscopio. **A:** Placa multiwell con pocillos perforados y sellados con un vidrio cubreobjetos de 0.17mm de espesor. **B:** Esquema de suspensión de GUVs en pocillos perforados de placa multiwell. Las GUVs contienen en su interior sacarosa 0.2M, lo que les permite decantar al fondo cuando son colocadas en una solución de glucosa 0.2M (menos densa).

Los espectros de emisión obtenidos fueron analizados mediante el software “FIJI” versión 2.9.0, midiendo (por separado y en conjunto) el promedio de la intensidad de fluorescencia de la membrana de la GUV y de los llamados “agregados” en su interior para cada longitud de onda de emisión.

Deshinchamiento de GUVs por diferencial osmótico

Una vez escogida una GUV de tamaño representativo de la muestra en estudio, y habiendo tomado su espectro de emisión de fluorescencia, se aplicó un cambio en la concentración de su medio de suspensión. Este cambio se logró mediante la incorporación progresiva de cantidades creciente de NaCl 0,5M o glucosa 1M. La incorporación progresiva se realizó con el fin de evitar disturbios en el medio que pudieran provocar el desplazamiento brusco y pérdida de la vesícula en estudio. En cada paso, se esperó que el sistema se estabilizara y se tomaron imágenes y espectros de emisión en el plano ecuatorial de la GUV.

Las imágenes fueron procesadas mediante el software “FIJI”, con el que se midió el área de la GUV en cada paso y el promedio de la intensidad de fluorescencia de su membrana a cada longitud de onda del espectro de emisión obtenido (cabe aclarar que estos valores fueron evaluados en términos de intensidad de fluorescencia relativa para cada longitud de onda).

Resultados y discusión

Caracterización de monocapas

A continuación se presenta el estudio de las propiedades interfaciales de films de mezclas de fosfolípidos con TO, con el fin de determinar su estabilidad como film monomolecular (monocapa) y las propiedades de las estructuras segregadas de TO (lentes) en ellos. Respecto a lo mencionado en la introducción, las diferentes geometrías de los FL en estudio pueden afectar, por un lado, la miscibilidad de la TO en la fase monocapa; y por otro, pueden favorecer o desfavorecer la formación de estas estructuras segregadas. Ambos aspectos podrían entonces afectar la presión de exclusión de la TO de la fase monocapa, lo que se evidencia en su isoterma de compresión como un colapso. El colapso de una monocapa puede identificarse a partir del máximo de la pendiente en la isoterma.

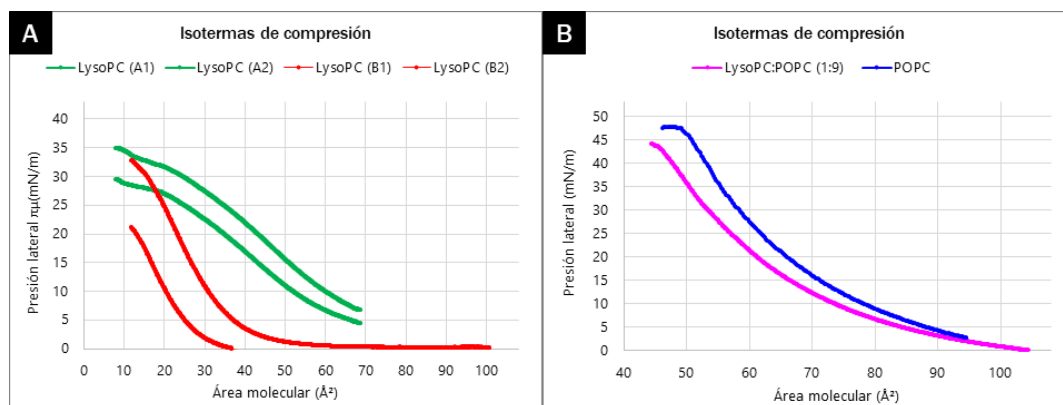


Figura 6. Isotermas de compresión de monocapas de Langmuir. **A:** Monocapas de LysoPC, sembradas a partir de soluciones de diferente concentración (verde: 53,24 $\mu\text{mol/ml}$ y roja: 2 $\mu\text{mol/ml}$). **B:** Monocapa de POPC (en azul) y de la mezcla LysoPC:POPC (1:9) (en fucsia).

En primer lugar se debe mencionar que, debido a la solubilidad de las moléculas de LysoPC en agua, sus monocapas (y por lo tanto sus isotermas de compresión) no fueron estables ni reproducibles, colapsando a bajas y diferentes presiones, tal como se observa en la Fig 6A. Por esta razón y dado que en M'Barek *et al.* (2017) [19] se observa que LysoPC no forma bicapas en concentraciones mayores al 20% del total de lípidos, es que para observar el efecto de este fosfolípido en los diferentes objetivos planteados para monocapas y bicapas, se decidió utilizar una mezcla de LysoPC:POPC en una proporción 1:9. En la Fig. 6B, se observa que esta mezcla, estable y reproducible, posee una presión de colapso menor a la de POPC en estado puro ($40\pm 1\text{mN/m}$ y $44\pm 1\text{mN/m}$, respectivamente), indicando que el efecto de LysoPC sobre la estabilidad del film es evidenciable en esta proporción.

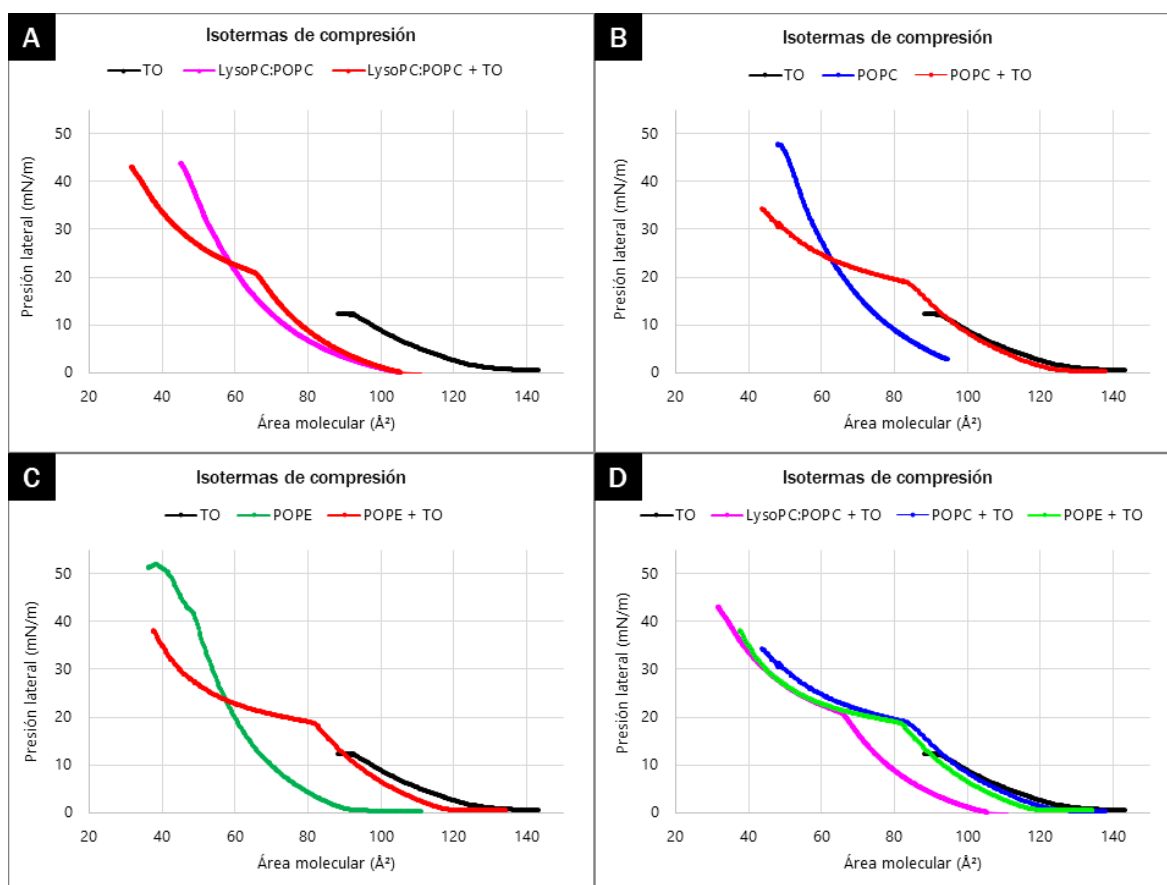


Figura 7. Isotermas de compresión de monocapas de Langmuir de trioleína (en color negro), de los fosfolípidos en estudio con diferentes curvaturas (**A:** positiva, **B:** neutra y **C:** negativa, curvas fucsia, azul y verde, respectivamente) y de la mezcla de ellos con trioleína (curvas

rojas). En **D** se comparan las mezclas en relación a trioleína pura (las curvas rojas de las otras figuras que se muestran como fucsia, azul y verde según lo mencionado anteriormente).

En la Fig. 7 se observa que, tal como se esperaba por bibliografía, las monocapas elaboradas con una mezcla de fosfolípidos y trioleína presentaron una presión de “colapso” intermedia a las monocapas realizadas con sus componentes puros. Además, las monocapas mezcla se observaron (por BAM, datos no mostrados) homogéneas hasta esta presión y en conjunto, esto es indicativo de la miscibilidad total de los componentes hasta el punto en el que se excluyen los triglicéridos [30].

Este punto de presión (en el cual la isoterma presenta un quiebre y los triglicéridos se excluyen) será referido en este trabajo como la “presión de colapso” del sistema FL+TO, tal como se utiliza en Caruso *et al.* (2021) [24]. Sin embargo, cabe aclarar que en un sentido tradicional del término, el colapso propiamente dicho de la monocapa ocurre a presiones más elevadas que han sido previamente estudiadas pero que no se muestran ni resultan de interés a los fines de esta tesina. No obstante, en Caruso *et al.* (2021) [24] se utiliza este término para el punto en el que comienza la segregación/exclusión de los triglicéridos, debido a que la misma ocurre hacia una fase no bidimensional (por la formación de lentes). Así, cabe aclarar también que la elección de una proporción del 30mol% de TO en las mezclas se debe a que estos resultados evidenciaban que esta proporción permitiría evaluar el efecto de la composición fosfolipídica del film en un amplio rango de presiones por encima de la presión inicial de segregación; y con ello disponer de una amplia gama de empaquetamientos de la monocapa en donde se produce la segregación progresiva de moléculas de TO hacia las lentes.

Por otro lado, considerando que la geometría molecular de los FL puede determinar el empaquetamiento de los films y ello afectar la presión de exclusión de la TO de la fase monocapa, se esperaba encontrar diferencias en las presiones de colapso de estas mezclas según el fosfolípido que las componía. En este sentido, si se observa la Fig. 7D, se advierte que la presión de colapso para todas las mezclas ocurre a $19 \pm 1 \text{ mN/m}$; no existiendo diferencias entre fosfolípidos.

Para el caso de LysoPC:POPC esto último podría explicarse por la forma en la que estos fosfolípidos se intercalarían para “acomodar” las moléculas de TO. En este sentido, cabe mencionar que las moléculas de TO son grandes y voluminosas, con tres cadenas de ácidos grasos y una cabeza polar muy pequeña (solo el esqueleto de glicerol), determinando que su

geometría al encontrarse orientada en la superficie de la interfase sea cónica invertida. De esta manera, las moléculas pequeñas de geometría cónica de LysoPC resultarían importantes compensadoras del empaquetamiento impuesto por TO, estabilizando la fase monocapa al intercalarse entre las moléculas de TO y POPC y permitiendo así alcanzar una presión de colapso similar e incluso algo mayor que la de las monocapas de POPC+TO. Esta explicación estaría respaldada por la observación de que la presión de colapso de LysoPC:POPC + TO es algo mayor que la compuesta por POPC+TO (Fig. 7D).

No obstante, esta explicación no podría aplicarse para el caso de POPE, ya que también es una molécula de geometría cónica invertida. Por esto, surge una explicación más general para explicar la similitud en las presiones de colapso, en la cual el empaquetamiento molecular al momento de colapsar la monocapa no es máximo, siendo entonces una condición en las cadenas hidrocarbonadas se encuentran muy explayadas y las diferentes geometrías que pueden asumir los fosfolípidos escogidos no se manifiestan aún en la fase monocapa.

Por otro lado, estos colapsos bien marcados en las isotermas de todas las composiciones lipídicas observados mediante BAM, se correlacionaron efectivamente con la formación de lentes de trioleína en el punto exacto en el que se producía el colapso de la monocapa (Fig. 8). De esta manera, se procedió a evaluar si existían diferencias morfológicas entre estas lentes ya formadas, que pudieran explicarse por las curvaturas espontáneas que favorecen cada uno de los fosfolípidos en estudio.

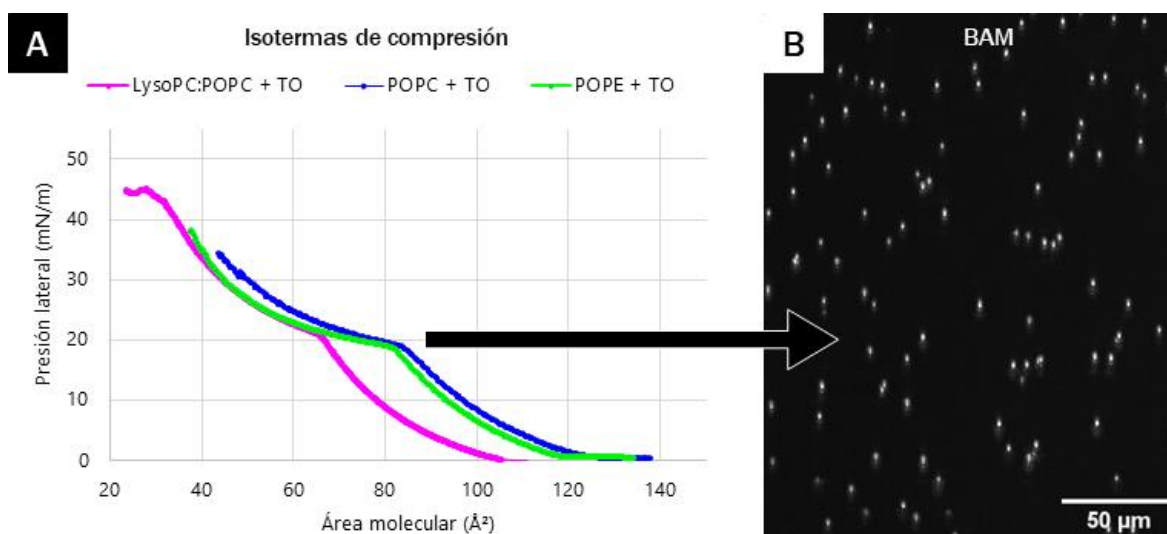


Figura 8. Figura representativa de la observación de lentes de trioleína en el punto exacto en el que la monocapa mezcla de fosfolípidos con trioleína colapsa. **A**: Presiones de colapso

para cada mezcla, siendo el color representativo del fosfolípido que contienen (fucsia: de curvatura positiva, LysoPC:POPC; azul: de curvatura neutra, POPC y verde: de curvatura negativa, POPE). **B**: Imagen tomada mediante microscopía de ángulo de Brewster a las lentes de triglicérido formadas en el colapso de monocapas de POPE, representativas de lo observado para las demás monocapas estudiadas.

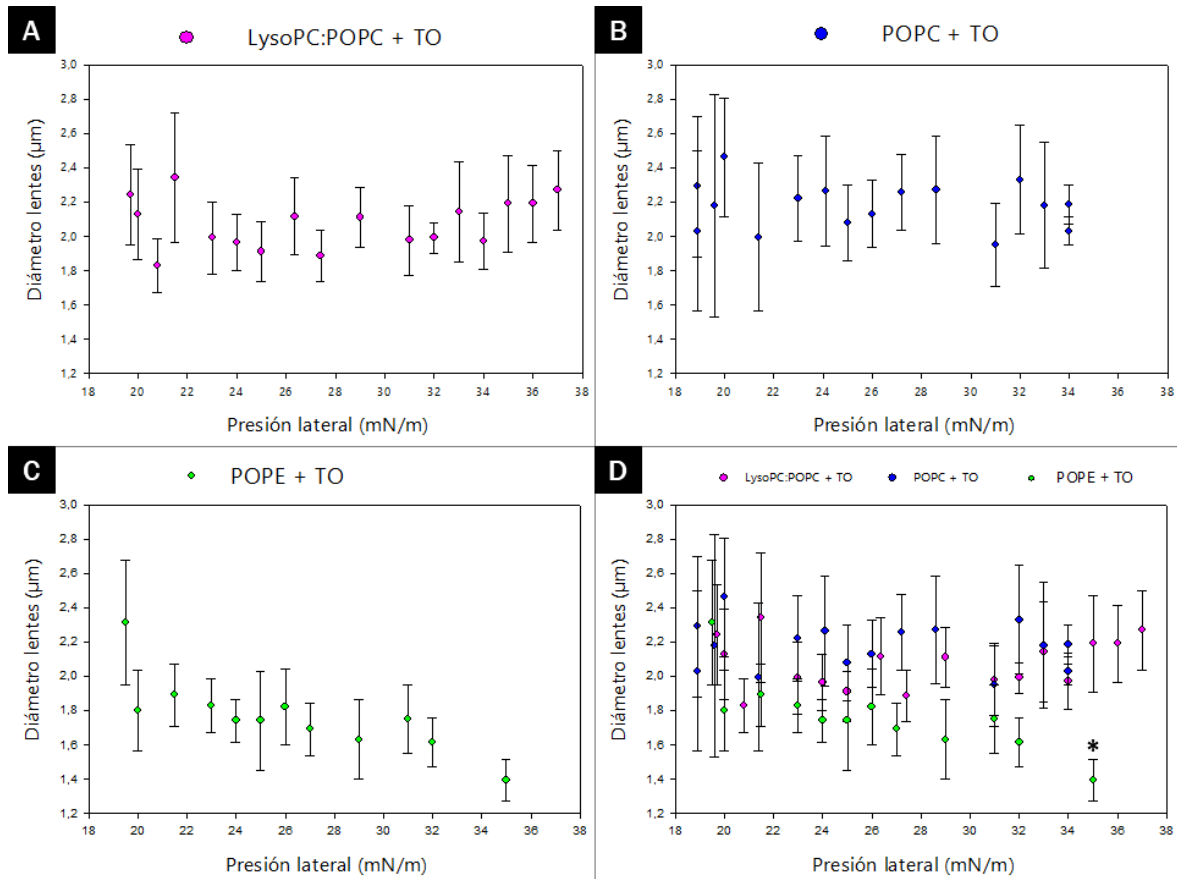


Figura 9. Diámetro (en vista superior) de lentes observadas mediante BAM en función de la presión lateral de la monocapa elaborada con mezclas de distintos fosfolípidos con trioleína (**A**, **B**, **C**) y **D** (comparativo de los 3 gráficos anteriores). El asterisco indica diferencia estadísticamente significativa en relación a los demás valores de la misma presión ($p < 0.05$).

Respecto al diámetro de las lentes, se observa en la Fig. 9 que el mismo oscila alrededor de un valor de $2 \pm 1 \mu\text{m}$. A medida que la presión lateral de empaquetamiento aumenta, las lentes formadas en monocapas compuestas por los FL LysoPC:POPC y POPC no exhiben diferencias significativas entre ellas respecto a su diámetro y parecen seguir una tendencia a mantenerlo constante. Sin embargo, aquellas formadas en monocapas con POPE, exhiben una tendencia a disminuir su diámetro, diferenciándose significativamente de los demás fosfolípidos a una presión de 35mN/m . Como el material de trioleína excluido debe ser el

mismo, una de las explicaciones posibles para entender esta disminución en el diámetro consistió en que la altura/espesor de las lentes debería aumentar; explicación que será entonces retomada luego de analizar lo observado para la altura de las lentes.

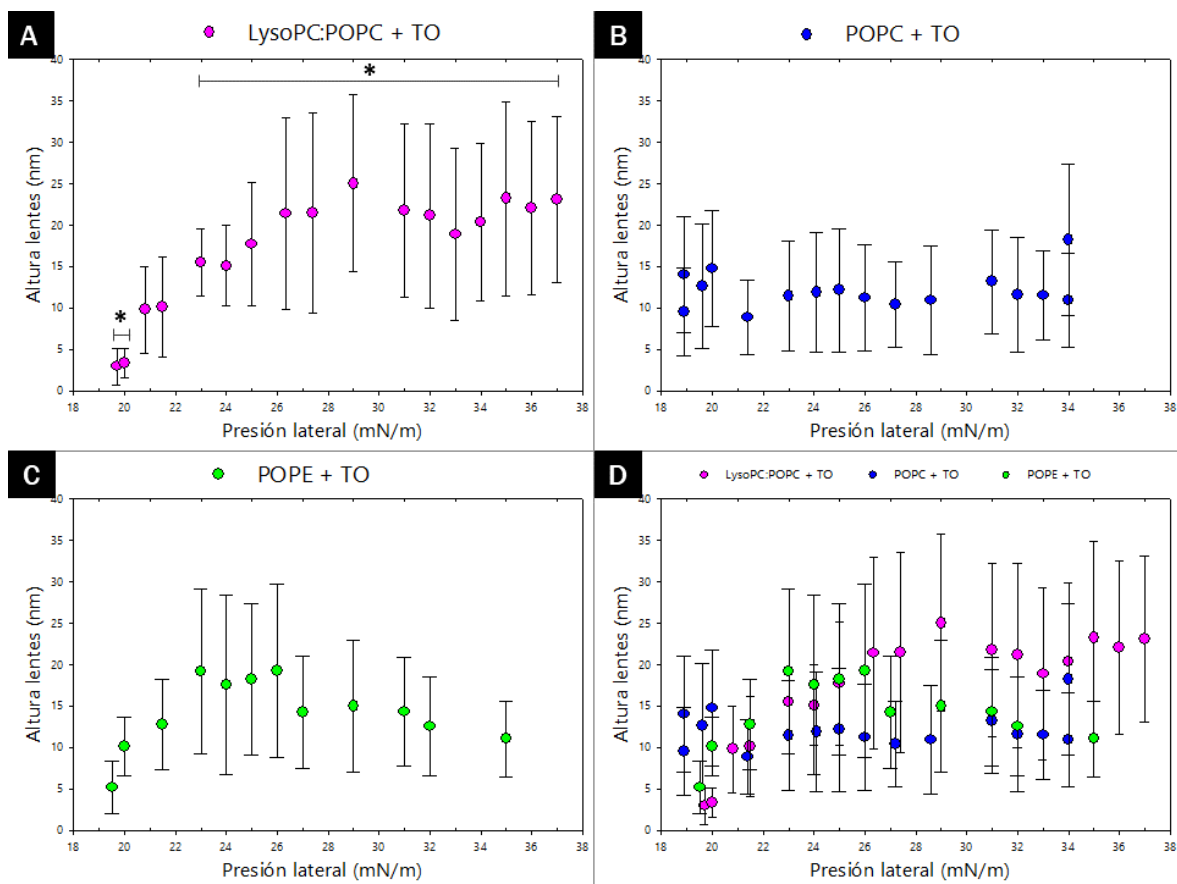


Figura 10. Altura (o espesor) de lentes observadas mediante BAM en función de la presión lateral de la monocapa elaborada con mezclas de distintos fosfolípidos con trioleína (**A**, **B**, **C**) y **D** (comparativo de los 3 gráficos anteriores). La altura se obtiene a partir de la reflectividad de las lentes, como se detalla en Materiales y Métodos. Las barras con asteriscos corresponden a diferencias significativas entre barras ($p < 0.05$).

Así, en la Fig. 10 se observa que la altura de las lentes formadas en las diferentes monocapas presentan diversas tendencias que podrían evaluarse con mayor certeza disminuyendo el error asociado a la necesidad de más réplicas de estos experimentos. Cabe mencionar que lamentablemente estas réplicas no pudieron ser realizadas debido a la rotura del equipamiento necesario para realizar BAM.

Observando entonces las tendencias individuales, podría decirse que las lentes formadas en monocapas de POPC tienden a mantener constante su altura. Y aquellas formadas con LysoPC:POPC y POPE tenderían a aumentar su altura hasta mantenerla relativamente

constante a valores de presión mayores a 26mN/m y 23mN/m, respectivamente. Además, con LysoPC:POPC se alcanzarían alturas mayores que con los demás FL, lo cual se sustentaría con lo observado en M'Barek *et al.* (2017) [19] pero, como se dijo anteriormente, exigiría más réplicas del experimento para analizar si la diferencia es realmente significativa.

Esto último sustentaría parcialmente lo mencionado para el diámetro de las lentes en monocapas de POPE, pues indicaría que la disminución en el diámetro de las lentes se correspondería con un aumento en su altura, al menos hasta llegar a un punto de empaquetamiento en el que ambas variables tienden a disminuir. Esto podría indicar que las lentes, llegada una altura máxima de crecimiento, comienzan a excluirse/emergir hacia la subfase, lo que debería ser reforzado por una disminución en la cantidad de lentes totales y será analizado a continuación.

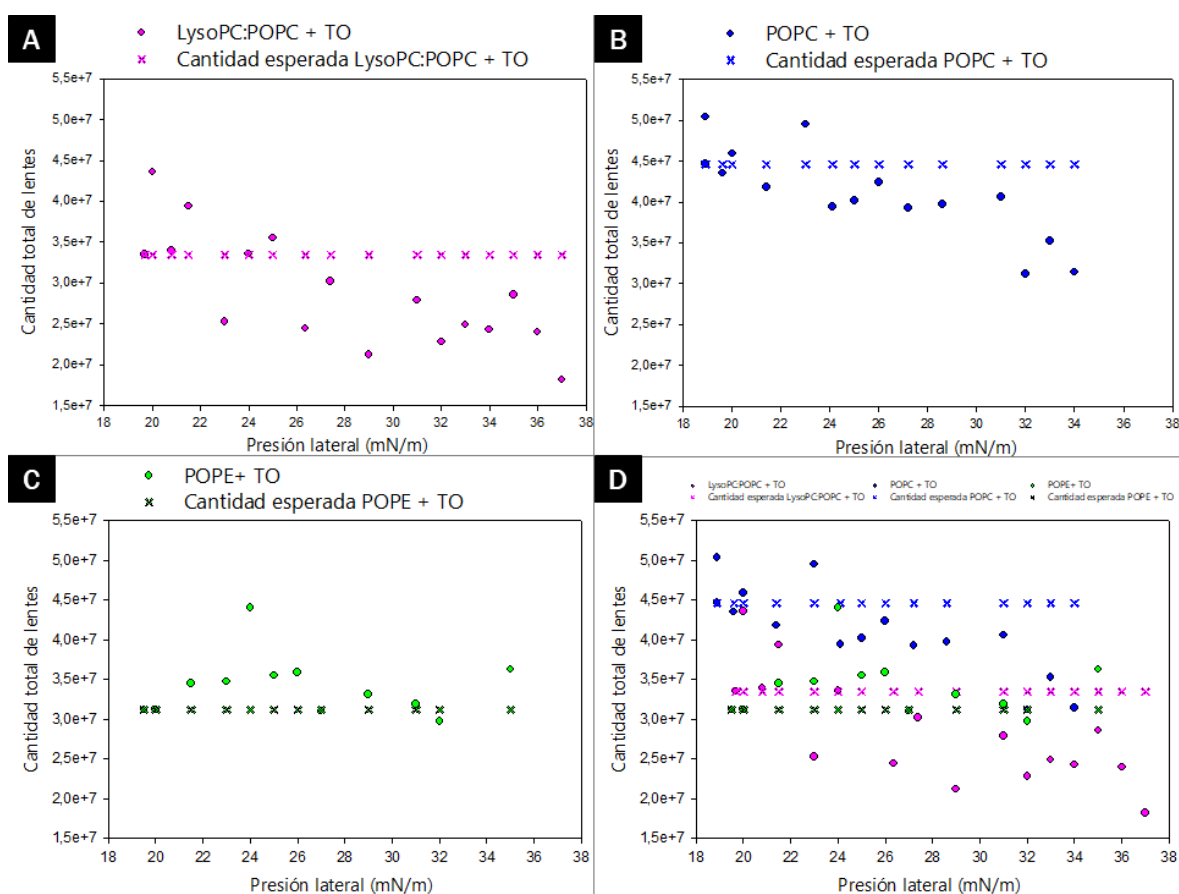


Figura 11. Cantidad de lentes observadas mediante BAM en función de la presión lateral de la monocapa elaborada con mezclas de distintos fosfolípidos con trioleína (A, B, C) y D (comparativo de los 3 gráficos anteriores). La cantidad de lentes fue ponderada por el área de la monocapa para normalizar respecto a los distintos estados de compresión de la monocapa.

En la Fig. 11 resulta importante aclarar que, debido a que cada valor de presión lateral corresponde a un área total diferente (producto de la compresión de la cuba donde se realiza la monocapa), la cantidad total de lentes fue calculada en función del área correspondiente a cada presión lateral. En este sentido, los valores marcados con cruces representan la cantidad esperada de lentes para cada valor de presión si el área total no fuera modificada y la cantidad de lentes se mantuviera constante. Es decir, los valores esperados fueron obtenidos a partir de la densidad inicial de lentes en el punto de colapso de la monocapa, por el área correspondiente a cada presión lateral.

Hecha la aclaración, si se observan las tendencias individuales en la cantidad de lentes observadas con respecto a las esperadas (Fig. 11A-C), se nota que tanto POPC como LysoPC:POPC tienden a disminuir la cantidad de lentes y POPE a aumentarla hasta llegar a valores de presión mayores a 26mN/m, donde la tendencia se revierte para volver a la cantidad inicial de lentes.

Si se analiza esto en relación a lo observado para el diámetro y altura, se puede decir que las lentes de TO formadas en monocapas de LysoPC:POPC tienden a mantener su diámetro pero aumentar su altura hasta llegar a un valor máximo a partir del cual las lentes emergerían hacia la subfase; lo cual se sustenta en la tendencia a la disminución de la cantidad de lentes observadas.

Para el caso de las lentes formadas en monocapas de POPE, se observa que a medida que aumenta el empaquetamiento se forma una cantidad creciente de lentes, de las cuales algunas tenderían a disminuir su diámetro y aumentar su altura hasta llegar a un valor máximo en el que emergen hacia la subfase, manteniéndose en la interfase aquellas más pequeñas.

Por otro lado, las lentes formadas en monocapas con POPC mantuvieron su altura y diámetro constante, lo que en función de lo observado para los demás fosfolípidos tiene sentido por la curvatura intrínseca nula que este fosfolípido favorece. Sin embargo, se observó una marcada tendencia a la disminución en la cantidad de lentes, lo que indicaría que las mismas se escapan hacia la subfase. Esto permite reforzar lo observado para POPE (en donde la cantidad de lentes totales aumentó o se mantuvo), lo que indicaría que la curvatura negativa de este fosfolípido da mayor estabilidad a las estructuras formadas, permitiendo así su retención en la interfase.

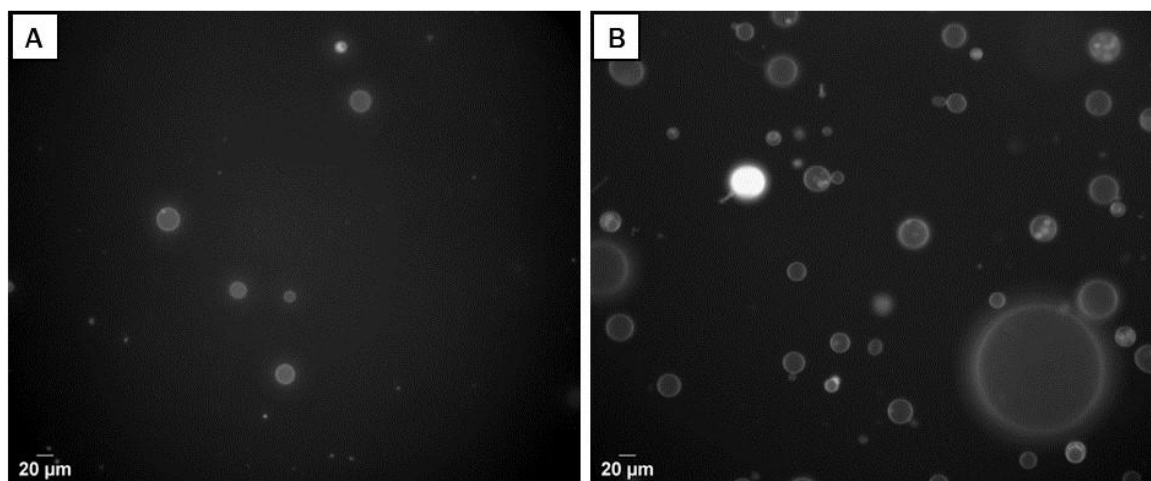


Figura 12. Imágenes de microscopía de fluorescencia de GUVs de POPC marcadas con Nile Red al 1 mol%, obtenidas mediante un rango de excitación/emisión: 528-553/578-633 nm. **A:** Formadas mediante método de electroformación. **B:** Formadas mediante método de hidratación asistida por gel de PVA.

Como puede observarse en la Fig. 12B, mediante el método de hidratación asistida por gel de polivinil-alcohol se lograron obtener de manera reproducible numerosas GUVs, de tamaño heterogéneo pero no menor a 20µm. Por el contrario, el método de electroformación (Fig. 12A) resultó poco reproducible, además de obtenerse una cantidad mucho menor de vesículas.

Cabe mencionar que, dado que el método de electroformación es el más utilizado en la bibliografía, se insistió en la utilización de esta técnica modificando las condiciones de cada una de las variables involucradas: tiempo de incubación y voltaje durante la electroformación; solventes, concentraciones y volúmenes de siembra de lípidos; evaporación de solvente mediante bomba de vacío o liofilización de films lipídicos; y composiciones lipídicas con sondas fluorescentes conocidas para formar GUVs (POPC puro marcado con la sonda fluorescentes NBD-PE, DiI-PC o Nile Red). A pesar de todo esto, la técnica presentó la misma baja eficiencia y reproducibilidad para todas las condiciones probadas. Se considera entonces que la fuente de error provino de la pérdida de conductividad de los vidrios ITO con los que se contaba para realizar esta técnica, puesto que los mismos fueron amablemente prestados y presentaban varios usos previos con un período prolongado sin utilizar [31]. Es por esta razón que se continuó utilizando el primer método mencionado (Fig. 12B).

Así, una vez obtenidas las GUVs para cada composición en estudio, se encontró que algunas de ellas presentaban pequeños abultamientos más brillantes ubicados al nivel de la bicapa (Fig. 13A). Estas estructuras, que serán denominadas genéricamente como “agregados” presentaban un movimiento aleatorio y rápido alrededor de toda la membrana de las vesículas, lo que dificultó pero no impidió la medición de sus espectros de emisión para intentar caracterizar su composición.

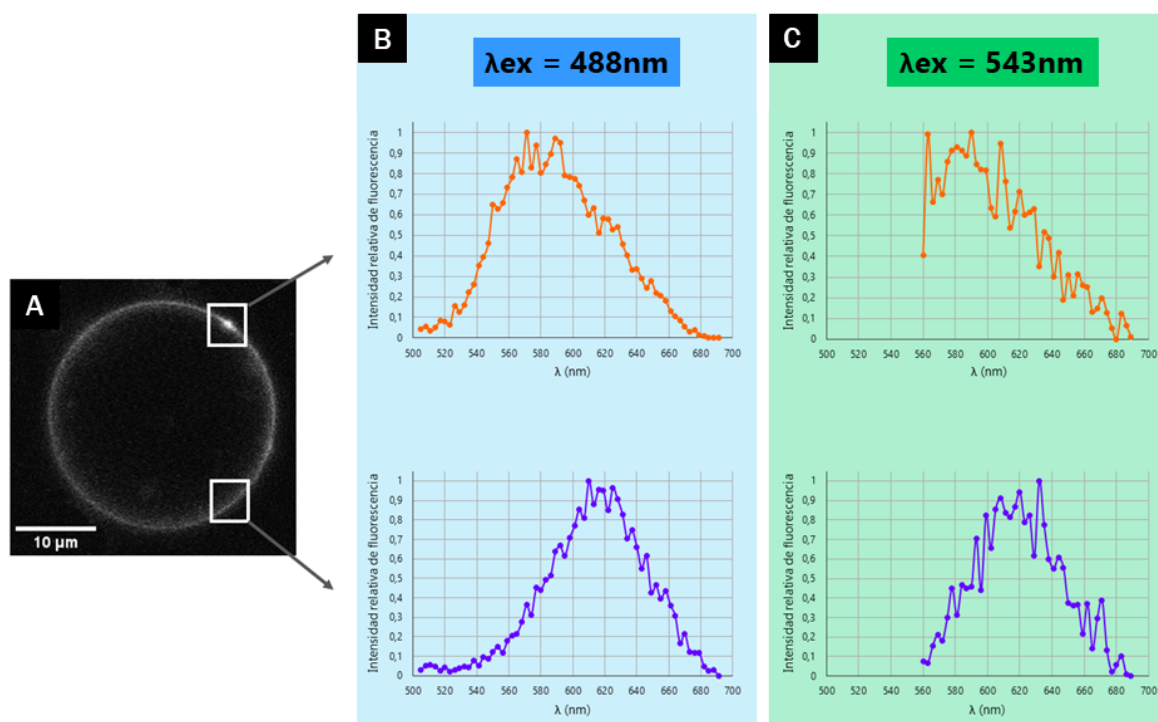


Figura 13. Caracterización de los espectros de emisión de fluorescencia de la bicapa y de un agregado brillante visualizado en una GUV de LysoPC:POPC+TO, pero representativa de lo observado para otras composiciones. **A:** Imagen de una GUV de LysoPC:POPC+TO conteniendo agregados en la membrana; obtenida mediante microscopía confocal. **B:** Espectros de emisión de fluorescencia de Nile Red contenido en la bicapa y en el agregado ($\lambda_{excitación}= 488\text{nm}$, rango de $\lambda_{emisión}=505\text{nm}-691\text{nm}$). **C:** Espectros de emisión de fluorescencia de Nile Red contenido en la bicapa y en el agregado ($\lambda_{excitación}= 543\text{nm}$, rango de $\lambda_{emisión}=560\text{nm}-692\text{nm}$).

Como se observa en la Fig. 13B-C, se realizaron espectros de emisión de fluorescencia para los agregados y para las porciones de membrana libre de los mismos. Así, se encontró que estas dos estructuras presentaban un pico de emisión diferente, que era más claramente diferenciable al utilizar un láser de excitación de 488nm en lugar de 543nm. Es por esto que, debido a la movilidad de estos agregados y con el fin de evitar el riesgo metodológico de

perder o medir otro agregado a la hora de cambiar el láser de excitación, se continuó trabajando únicamente con el láser de 488nm.

Ahora bien, la visualización de estos agregados ocurrió tanto para aquellas muestras que contenían TO en su composición como las que no (a excepción de las vesículas compuestas por LysoPC:POPC sin TO, en donde no se visualizaron estos agregados microscópicos). Sin embargo, entre tratamientos con y sin TO, los picos de emisión de fluorescencia del NR para estos agregados no fueron iguales (Tabla 1).

Pico de emisión de fluorescencia en "agregados"		
Composición FLs	Sin TO	+ TO
LysoPC:POPC	---	577 nm
POPC	595 nm	595 nm
POPE:POPC	595 nm	568 nm

Tabla 1. Valores del máximo de emisión de fluorescencia de Nile Red en agregados observados en las membranas de GUVs de diferente composición ($\lambda_{excitación}= 488nm$, rango de $\lambda_{emisión}=505nm-691nm$).

Se observa entonces en la Tabla 1 que, cuando los agregados están presentes en composiciones sin trioleína, la fluorescencia del NR en los mismos presenta siempre un pico de emisión de fluorescencia a 595nm. Por el contrario, si la trioleína estaba presente en la composición de las vesículas, los picos de emisión en sus agregados variaron según el fosfolípido (o mezcla de FL) componente de esas vesículas, ocurriendo para las de POPC a 595nm y para las de LysoPC:POPC y POPE:POPC a valores menores a 580nm.

De acuerdo a lo observado por Caruso et al. (2021) [24], un máximo de emisión de fluorescencia igual o menor 580nm coincide con lo que correspondería a la sonda Nile Red (NR) ubicada en una estructura de triglicérido líquido (es decir, en una estructura isotrópica y deshidratada), como lo es una lente de TO. Esto se corresponde con los espectros de emisión de fluorescencia observados en emulsiones de trioleína en sacarosa 0.2M (componente del interior de las GUVs), registradas tanto mediante un espectrofluorímetro (espectro no mostrado) como en el microscopio confocal utilizado para medir los espectros de las muestras de GUVs, donde el pico de emisión ocurrió a 580nm (Fig. 14). Así, todo indicaría que los agregados observados en las vesículas elaboradas con LysoPC:POPC+TO y POPE:POPC+TO corresponden a lentes de trioleína.

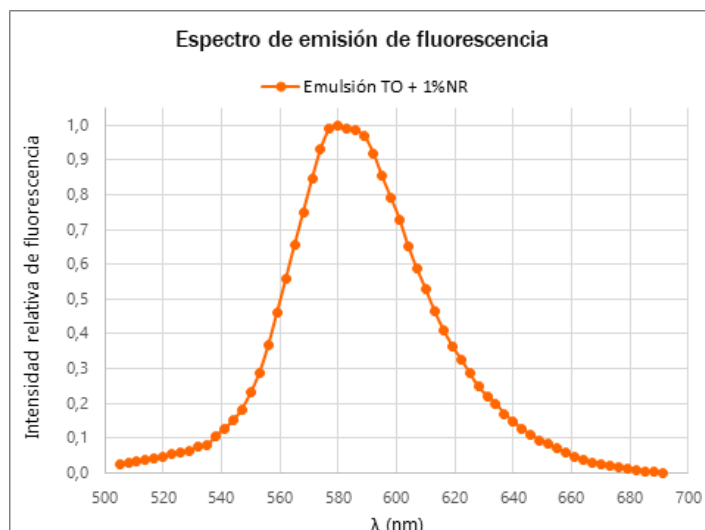


Figura 14. Espectro de emisión de fluorescencia de Nile Red en gotas de emulsión de TO ($\lambda_{excitación}= 488nm$, rango de $\lambda_{emisión}=505nm-691nm$).

Sin embargo, esto no explica lo que ocurre en las vesículas de POPC+TO en las que se observan agregados morfológicamente iguales pero donde el NR exhibe un máximo de emisión de fluorescencia a 595nm. Para entender esto, se realizó un control del espectro de emisión de fluorescencia del Nile Red en una solución de sacarosa 0.2M y glucosa 0.2M, en las mismas proporciones que se utilizaban para preparar las muestras de GUVs. Se observó en estas soluciones la presencia de agregados fluorescentes, igual de pequeños y móviles que los agregados observados en bicapas, con picos de emisión de fluorescencia a 595nm (Fig.15).

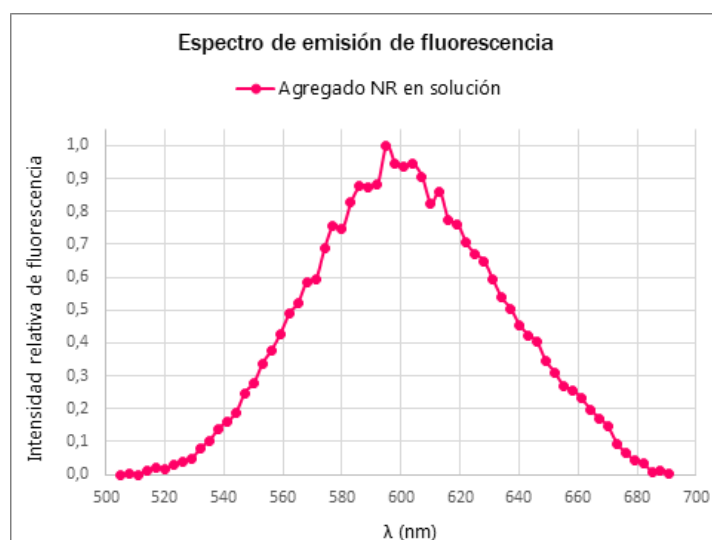


Figura 15. Espectro de emisión de fluorescencia de Nile Red en agregados observados en solución de sacarosa 0.2M ($\lambda_{excitación}= 488nm$, rango de $\lambda_{emisión}=505nm-691nm$).

Esto indicaría la existencia en el sistema de otros agregados indistinguibles morfológicamente de los correspondientes a fases isotrópicas de trioleína, pero diferenciables por los espectros de emisión de fluorescencia del NR en su interior. Así, los agregados observados en las vesículas compuestas de POPC+TO con un pico de emisión a 595nm no corresponderían a lentes de trioleína. En este sentido, debido a que con los demás FL sí se observan agregados de trioleína, cabe preguntarse si las vesículas de esta composición incorporaron efectivamente la trioleína dentro de su bicapa. En concreto, ¿existen en estas vesículas agregados de trioleína por debajo del poder de resolución del microscopio utilizado?

Para poner a prueba esto se analizó lo que ocurría con los espectros de emisión de las membranas de las vesículas, excluyendo cualquier agregado (Tabla 2). Cabe aclarar que esto se corresponde con una de las hipótesis de trabajo de esta tesina, mencionada en la introducción, donde se entiende que de existir agregados de TO inmersos en la bicapa y no visibles mediante microscopía por corresponderse a estados nanométricos del proceso de biogénesis, los mismos serán “observables” mediante un cambio en el espectro de emisión del NR en sus membranas.

Pico de emisión de fluorescencia en membranas		
Composición FLs	Sin TO	+ TO
LysoPC:POPC	620 nm	614 nm *
POPC	617 nm	613 nm *
POPE:POPC	617 nm	602 nm *

Tabla 2: Valores del máximo de emisión de fluorescencia de Nile Red en membranas de GUVs de diferente composición, excluyendo del análisis los agregados microscópicos ($\lambda_{excitación}= 488nm$, rango de $\lambda_{emisión}=505nm-691nm$).

Así, en la Tabla 2 se observa que, sin incluir los agregados mencionados anteriormente en el análisis espectral de la imagen, todas las membranas de las GUVs elaboradas con trioleína en su composición presentan picos de emisión de fluorescencia menores y significativamente diferentes que los de aquellas elaboradas sin trioleína. Esto refuerza lo esperado e indicaría la existencia de lentes de triglicérido en estados nanoscópicos de su formación en el interior de las membranas. Esta afirmación se sustenta en que si las moléculas de triglicérido se encontraran dispersas en la bicapa (en lugar de formando agregados nanoscópicos)

contribuirían a alejar las moléculas de FL entre sí, favoreciendo así la hidratación de la membrana y corriendo el pico del espectro del NR allí ubicado hacia mayores longitudes de onda [20, 26].

Entonces, dado que en las vesículas compuestas por POPC + TO sí existirían agregados de TO por debajo del límite de resolución del microscopio, se volverá al interrogante de por qué no se lograron observar estos agregados a escala microscópica pero sí fue posible con LysoPC y POPE. La explicación que permitiría entender esto rememora lo expresado en la introducción y lo analizado para bicapas en Thiam *et al.* (2013) [10], Renne *et al.* (2020) [12] y M'Barek *et al.* (2017) [19], donde LysoPC y POPE estabilizan el crecimiento de las lentes de TO al ubicarse en lugares específicos de la hemicapa protruyente (Fig. 16). Esta ubicación les permite igualar la presión de flexión impuesta por la lente con la curvatura intrínseca de la membrana, disminuyendo así la barrera energética necesaria para estabilizar la lente y hacer posible entonces su crecimiento y visualización microscópica en el sistema aquí estudiado.

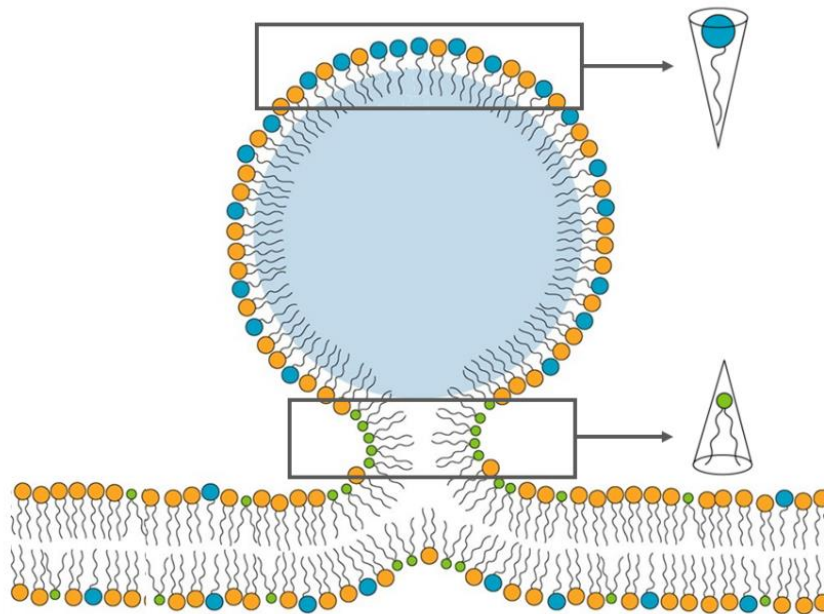


Figura 16. Esquema representativo de lo que se sospecha sería la ubicación espontánea de LysoPC y POPE en la hemicapas protruyente durante la formación de *lipid droplets*. Imagen tomada y modificada de Renne *et al.* (2020) [12].

En este punto, cabe recordar lo observado en monocapas, donde aquellas elaboradas con POPC+TO fueron capaces de formar lentes microscópicas de triglicérido, de altura y

diámetro constantes. Así, aunque la explicación anterior tenga sentido para bicapas de POPC (ya que la restricción a la deformación es mayor que en una monocapa debido a que la presión de flexión de la lente debe superar dos estructuras de curvatura intrínseca nula), se considera un interrogante digno de ser fuente de nuevos y futuros estudios que refieran a entender qué efecto generan en la etapa de crecimiento de las LDs la presencia de fosfolípidos que no favorecen ninguna curvatura espontánea. También es importante recordar que, en estas monocapas, la cantidad de lentes formadas presentó una tendencia a disminuir continuamente, lo que indicaba que las mismas emergían hacia la subfase y que podría indicar que en bicapas estas estructuras no se observan porque ya brotaron.

Ahora bien, para los fines de esta tesina, resultó importante la reproducibilidad de este sistema de GUVs y lo observado para sus membranas (excluyendo los agregados de tamaño microscópico, Tabla 2). Se procedió entonces a explorar un método que permitiera deshinchar las vesículas; asumiendo que esto aumentaría la presión de empaquetamiento molecular en ellas y permitiría así evaluar qué sucedía con los agregados nanométricos de TO inmersos en ellas y/o con sus espectros de emisión de fluorescencia debido al Nile Red allí contenido.

Deshinchamiento de GUVs por diferencial osmótico y caracterización de las mismas

Para este ensayo se tomó como referencia el trabajo de Santinho *et al.* (2021) [20], en el cual al disminuir en 80mOsm la osmolaridad del medio de suspensión de GUVs mediante la incorporación de agua, se logró un hinchamiento de las mismas que fue observable microscópicamente y se correspondió con un aumento en su área de aproximadamente el 10%. En el marco de esta tesina, el objetivo consistió en modificar en sentido contrario la osmolaridad del medio para lograr un deshinchamiento de las GUVs, pues se postula que la contracción ocasionaría un incremento en el empaquetamiento molecular de la bicapa y permitiría evaluar si esto ocasiona una segregación de la TO inmersa en la misma (en analogía a lo efectuado en monocapas).

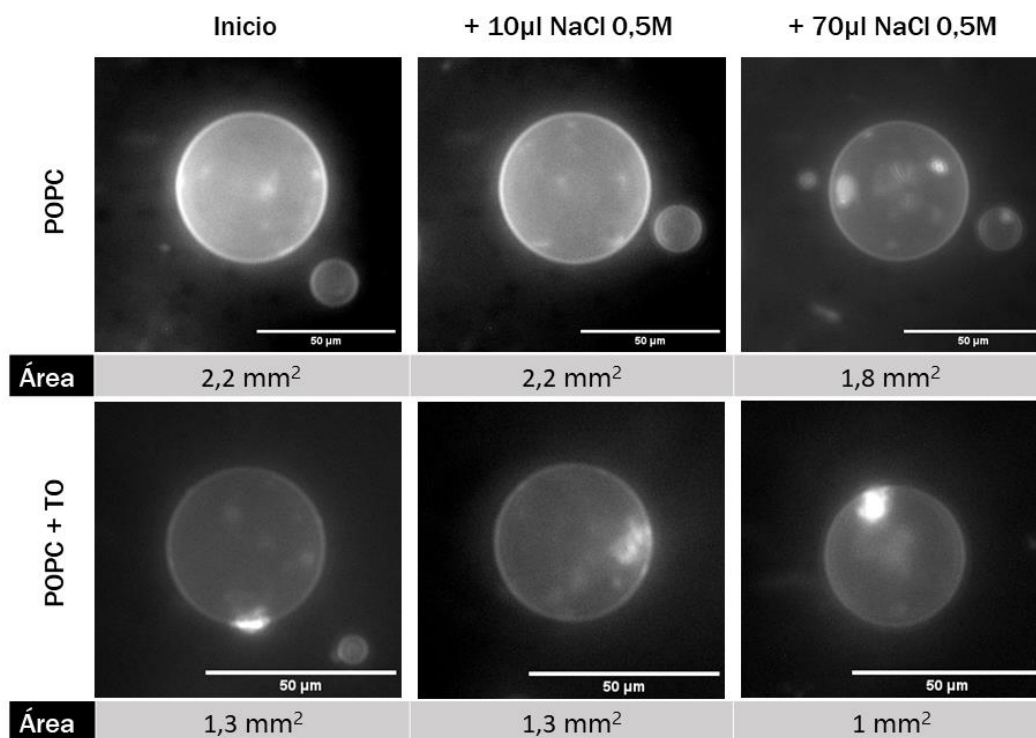


Figura 17. Efecto sobre GUVs de POPC y POPC+TO de un cambio hiperosmótico en el medio de suspensión de las mismas, mediante la incorporación de NaCl 0.5M. El mismo es representativo de lo ocurrido para las demás composiciones. El agregado de 10 microlitros de NaCl ocasiona un cambio de osmolaridad (dentro/afuera de la GUV) de 80mOsm.

En la Fig. 17 se observa de forma representativa que, para el sistema de estudio de esta tesina, era necesario añadir muchos más microlitros de NaCl que los correspondiente a un cambio de 80mOsm para lograr extraer agua de las mismas y así generar un cambio en su área observable. Se interpretó que esto no se debe a la necesidad de generar una diferencia de concentraciones mayor para lograr el deshinchamiento que el hinchamiento, sino que podría deberse a que las membranas en estudio son permeables a los iones. Esta permeabilidad les permitiría establecer un equilibrio en las concentraciones dentro y fuera de la membrana de forma rápida, sin necesidad que el agua evacúe el interior de las vesículas.

Por esto, para generar la diferencia de concentración necesaria, se probó la utilización de glucosa 1M, que corresponde a una concentración mayor del medio de suspensión utilizado para la observación de las muestras (ver Materiales y Métodos). Como se observa en la Fig. 18, este método logró disminuir el área de las vesículas utilizando incluso una menor cantidad de microlitros de solución concentrada; lo que a la vez permitió, a nivel metodológico, disminuir el riesgo de perder la vesícula en estudio debido la generación de corrientes bruscas al incorporar la solución.

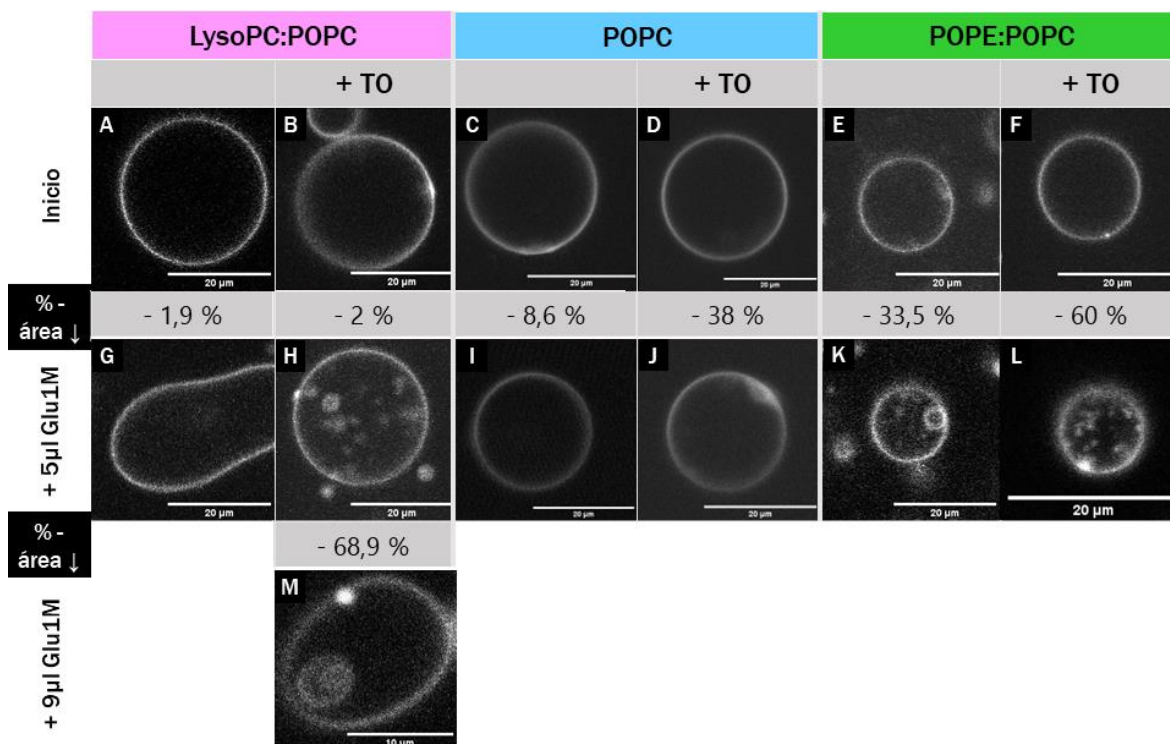


Figura 18. Efecto sobre GUVs de distinta composición de un cambio hiperosmótico en el medio de suspensión de las mismas, mediante la incorporación glucosa 1M (Glu). El agregado de 5µl de Glu ocasiona un cambio de osmolaridad (dentro/afuera de la GUV) de 80mOsm. Las columnas corresponden a distintas composiciones de fosfolípidos con las que se elaboraron las GUVs. **A-F**: GUVs antes del cambio de concentración de su medio. **G-L**: GUVs luego del agregado de 5µl de Glu1M en su medio de suspensión. **M**: GUV de LysoPC:POPC+TO luego del agregado de 9µl de Glu1M en su medio de suspensión.

En la Fig. 18 se observa que el método utilizado permite disminuir el área de las vesículas; sin embargo, sobre todo en aquellas composiciones que contienen LysoPC y POPE, esta disminución se vio acompañada por fenómenos de aparición de vesículas internas. La formación de estas vesículas genera dudas acerca de estar efectivamente generando un mayor empaquetamiento molecular de la bicapa a través del deshinchamiento. Aún así, es importante destacar que con POPC y LysoPC (sin trioleína), el deshinchamiento ocurrió sin la formación de estructuras internas ni externas (o emergentes).

En cuanto a los espectros de emisión de fluorescencia, se observó que, para todos los tratamientos, las vesículas internas presentaron los mismos picos de emisión que el resto de la bicapa, indicando que estas estructuras no contienen material excluido diferencialmente de la membrana original. Aún así, existe variabilidad entre tratamientos y a continuación se analizará cada caso en particular (Tabla 3).

Pico de emisión de fluorescencia de NR en membranas		
Composición FLs	0μl Glucosa 1M	5μl Glucosa 1M
LysoPC:POPC	619 nm	619 nm
LysoPC:POPC + TO	613 nm	607 nm
POPC	616 nm	616 nm
POPC + TO	613 nm	613 nm
POPE:POPC	613 nm	604 nm
POPE:POPC + TO	604 nm	619 nm

Tabla 3. Valores del máximo de emisión de fluorescencia de Nile Red en membranas de GUVs de diferente composición antes y después de la incorporación de 5 μ l de glucosa 1M en su medio de suspensión ($\lambda_{excitación}= 488nm$, rango de $\lambda_{emisión}=505nm-691nm$). En negrita se destacan los valores que cambian entre un estado y otro del medio de suspensión.

Para las vesículas de POPC y POPC+TO, ambas composiciones de membrana mantuvieron ante el deshinchamiento sus picos de emisión a 616nm y 613nm, respectivamente. Esto indicaría que, para el caso de la composición de POPC+TO, el empaquetamiento no estaría provocando el aumento en cantidad de los agregados de TO por debajo del límite de resolución del microscopio, ni se estaría favoreciendo su crecimiento (que se esperaba fuera evidenciado por la aparición de estructuras visibles a escala microscópica).

Para el caso de LysoPC:POPC, las vesículas sin TO en su composición son flexibles y responden al cambio de concentración estirándose y retrayéndose. Además, mantuvieron la ausencia de agregados en su bicapa y el pico de emisión de fluorescencia del NR en la membrana se mantuvo en 619nm. Sin embargo, cuando las vesículas contenían TO en la composición, se necesitó generar una diferencia de concentraciones mayor para observar una disminución en su área, fenómeno que fue acompañado por la aparición de una gran cantidad de vesículas internas que con el tiempo se fusionaron (Fig. 18-M).

Además, en LysoPC:POPC+TO se observó que la membrana de la vesícula pasó de tener un máximo de emisión de fluorescencia del NR en 613nm a tenerlo a 607nm, lo que se correspondería con la aparición o agrandamiento de fases isotrópicas de triglicérido inmersas en la bicapa y por debajo del límite de resolución del microscopio. Este fenómeno tendría sentido a la luz de lo analizado durante la caracterización de estas GUVs, donde se discutió

que la geometría de LysoPC favorecería la estabilización de los agregados de TO, permitiendo así su crecimiento o aparición.

Por último, las membranas que contienen POPE sufren, tanto con y sin TO, una disminución bastante pronunciada en su área, que en ambos casos es acompañada por la aparición de vesículas internas. Además, la vesícula deshinchada de POPE:POPC+TO presenta la aparición de lo que parecerían “dominios” más brillantes en la bicapa. Ambas estructuras, vesículas y los llamados dominios, conservan los espectros de emisión de fluorescencia del resto de la bicapa por lo que no corresponderían a estructuras diferentes. Aún así, estas vesículas presentan particularidades respecto a los espectros de emisión ante el deshinchamiento: sin TO el pico del NR cambia de 613 a 604nm y, por el contrario, con TO el pico cambia de 604 a 619nm. Estos resultados llevaron a indagar sobre la posibilidad de que la fluorescencia de la sonda permita entonces evidenciar diferentes empaquetamientos moleculares de la membrana.

Para comprobar esto, se realizó la caracterización de la fluorescencia de la sonda en monocapas de POPE:POPC (1:9) sometidas a distintos empaquetamientos moleculares. Los resultados obtenidos indicaron por un lado, que la solución de POPE:POPC presenta dominios en la monocapa, con picos de emisión de fluorescencia del NR a 565nm para el dominio y a 625nm para la monocapa circundante (Fig. 19); y por otro, que no es posible diferenciar empaquetamientos moleculares de las membranas mediante esta sonda, pues el pico de emisión del NR (medido por fuera de los dominios) se mantuvo a 625nm entre 15 y 40 mN/m de presión de empaquetamiento.

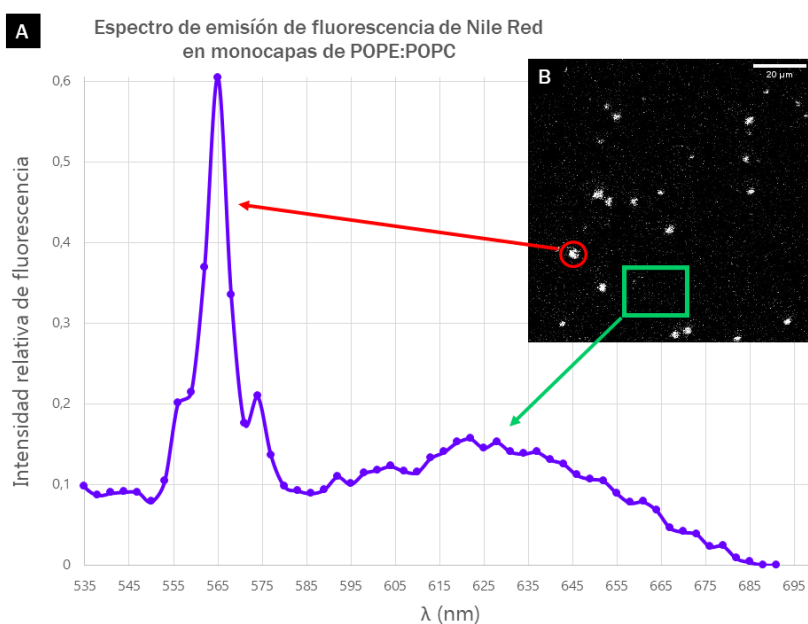


Figura 19. Espectro de emisión de fluorescencia de Nile Red en una monocapa de POPE:POPC. **A:** Espectros de emisión de fluorescencia de Nile Red en dominios y monocapa circundante ($\lambda_{\text{excitación}}= 488\text{nm}$, rango de $\lambda_{\text{emisión}}=505\text{nm}-691\text{nm}$). **B:** Imagen de la monocapa conteniendo dominios; obtenida mediante microscopía confocal.

La identificación de estos dominios en las monocapas de POPE:POPC llevaron a indagar sobre su existencia en los films lipídicos liofilizados del método de producción de GUVs y, de existir, qué ocurriría con ellos durante el proceso de hidratación de los mismos para formar las GUVs. Los resultados evidenciaron la existencia de al menos 2 fases de POPE:POPC en los films liofilizados, diferenciables por su fluorescencia y espectro de emisión (Fig. 20). La observación de estos films durante la hidratación (registrada en videos a distintas alturas con el microscopio confocal) evidencian que el proceso es más complejo y los resultados obtenidos no permiten explicar por qué las bicapas de POPE:POPC+TO aumentan su máximo de emisión al deshincharse. Se plantea el interrogante para futuros estudios, en los que incluso se podrían realizar visualizaciones 3D de las GUVs para identificar la existencia de dominios condensados de POPE ante el deshinchamiento, que puedan estar afectando la formación de agregados de TG inmerso en la bicapa y/o que afecten la caracterización espectral de los mismos.

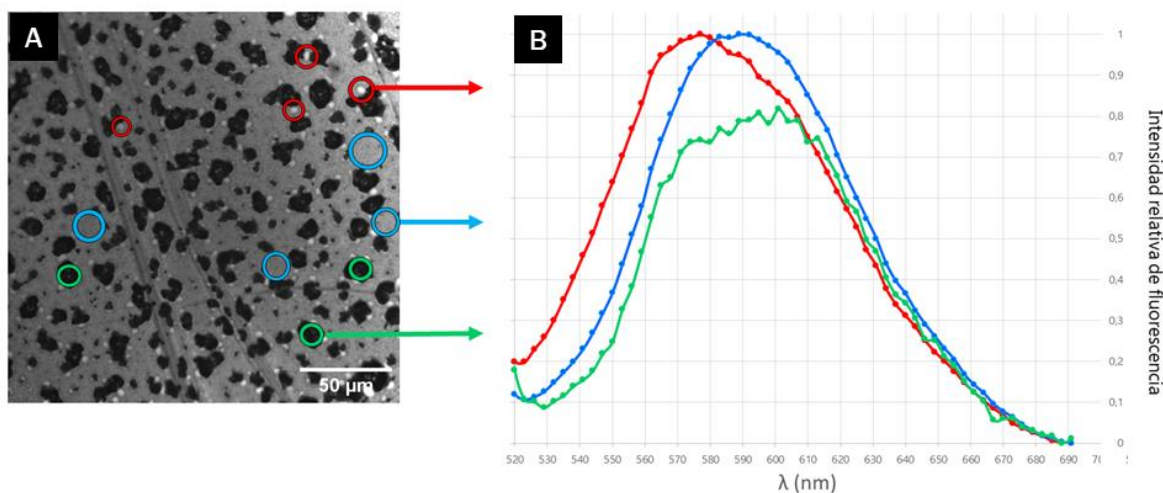


Figura 20. Caracterización espectral del Nile Red en un film de POPE:POPC luego de liofilizar y previo a su hidratación. **A:** Imagen del film obtenida mediante microscopía confocal ($\lambda_{\text{excitación}}= 488\text{nm}$, rango de $\lambda_{\text{emisión}}=540\text{nm}-640\text{nm}$). **B:** Espectro de emisión de fluorescencia del Nile Red en cada una de las estructuras visualizadas en el film ($\lambda_{\text{ex}}= 488\text{nm}$, rango de $\lambda_{\text{emisión}}=505\text{nm}-691\text{nm}$). Rojo: puntos brillantes, azul: fondo, verde: “huecos”.

Conclusiones

A modo de conclusión general, se podría mencionar que el presente trabajo permite avanzar hacia la obtención de un modelo que posibilite el estudio *progresivo* del proceso de biogénesis de *lipid droplets*, con el fin de evaluar la influencia de los distintos y diversos factores implicados a lo largo de todas sus etapas. Además de sugerir un nuevo modelo experimental para el estudio de *lipid droplets* en bicapas, las conclusiones que se mencionan a continuación permiten proyectar varios ensayos para dar continuidad a esta línea de estudio.

Respecto al sistema de monocapas utilizado, se contribuyó en la descripción de la morfología y estabilidad de lentes de triglicérido formadas de manera estable sobre monocapas sometidas a distintas presiones de empaquetamiento. Así, las presiones de empaquetamiento logradas para las monocapas propuestas, permitieron medir el efecto de su composición fosfolípídica sobre las etapas de crecimiento y emergencia de las lentes.

En este sentido, se observaron dos tendencias que refuerzan la utilidad de este modelo: las monocapas compuestas de fosfolípidos con curvaturas positivas (LysoPC) favorecerían el crecimiento en altura y la emergencia de las lentes, mientras que aquellas compuestas de fosfolípidos con curvaturas negativas (POPE), favorecerían su estabilidad y retención en la interfase. Estas tendencias se corresponderían con las observaciones realizadas por M'Barek *et al.* (2017) [19] y Choudhary *et al.* (2018) [18], pero permitiendo sustentarlas a partir de un modelo que no sólo resulta más representativo de la formación natural de las *lipid droplets* sino que también permitiría generar ensayos con mezclas de LysoPC y POPE para evaluar la existencia de una sinergia entre sus contribuciones.

Por su parte, la etapa inicial de segregación de las lentes no evidenció diferencias entre composiciones fosfolípídicas. Sin embargo, resultaría interesante repetir estos experimentos a concentraciones de trioleína menores al 30mol%, lo que permitiría aumentar aún más el empaquetamiento de los fosfolípidos en el punto del colapso, favoreciendo que se evidencien en esta etapa los impedimentos estéricos propios de la geometría de cada fosfolípido en estudio.

Respecto al sistema de GUVs utilizado para evaluar en bicapas la formación de lentes de triglicérido, cabe destacar que en este estudio se evidencia de forma inédita la existencia de agregados de trioleína formados a partir de la segregación natural del material inmerso en la bicapa por incorporación espontánea en el momento de su formación. Como se

menciona en la introducción, en otros estudios se prepararon GUVs compuestas únicamente de fosfolípidos para luego agregarles externamente gotas de emulsión de TG de varias micras; o bien GUVs que contienen TG desde su formulación pero no consiguieron demostrar la presencia de ampollas de estos en su interior.

Así, haciendo uso de la propiedad solvatocrómica de la sonda Nile Red, se pudo demostrar la presencia de lentes de TO con un tamaño apenas por encima del poder de resolución óptico o bien por debajo del mismo, pero evidenciables en todos los casos por su efecto en el espectro de emisión de la sonda. Esto constituye un avance importante al campo de investigación de las *lipid droplets*, pues provee un sistema modelo para poder evidenciar las mismas en bicapas y así poder evaluarlas durante las distintas etapas de formación.

En este sentido, respecto a la evaluación del efecto de la composición fosfolipídica sobre la formación de agregados de TG en bicapas, la utilización de los sistemas mencionados permitió: por un lado, detectar agregados de TG y por otro, aportar evidencias que respaldan el marco teórico previo sobre el efecto que ejercen las curvaturas intrínsecas de los fosfolípidos sobre estos agregados en bicapas. Así, los agregados de TG que pudieron ser observadas microscópicamente ocurrieron en las GUVs de POPC mezcladas con LysoPC y POPE. Esto establecería un punto de contacto con el modelo de monocapas y reforzaría el concepto de que ambas geometrías contribuyen en aspectos diferentes para estabilizar estas agregados y permitir su crecimiento.

Por otro lado, respecto al deshinchamiento de GUVs, se adaptó un ensayo que permite generarlo por diferencial osmótico. El mismo, permitió identificar la aparición de agregados nanoscópicos de trioleína en las GUVs compuestas por una mezcla de LysoPC:POPC+TO. No obstante, se cuestiona su utilidad como sistema para generar el empaquetamiento molecular de bicapas, debido a la formación de vesículas internas durante el proceso de deshinchamiento para algunas composiciones de membrana.

Por último, siendo que la segregación de triglicéridos por compresión de membranas es una aproximación útil a la formación progresiva e *in situ* de *lipid droplets*, los resultados aquí obtenidos justifican avanzar en estudios complementarios, ya que más allá de las limitaciones que impongan las bicapas a ser alteradas en su empaquetamiento, ha sido posible evidenciar la presencia de agregados de triglicéridos en las mismas y resulta interesante describir la progresividad en su formación para contrastarlo con lo observado en monocapas. Además, el sistema experimental aquí postulado fue utilizado para caracterizar

los espectros de emisión del Nile Red durante el proceso de formación de GUVs a partir de films en PVA y estos resultados permiten establecer un marco de referencia para interpretar a futuro los resultados del deshinchamiento de las vesículas como punto de conexión entre bicapas y monocapas.

Bibliografía

1. WALTHER, T. C. & R. V. FARESE. 2012. Lipid droplets and cellular lipid metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* 81: 687-714.
2. FUJIMOTO, T. & R. G. PARTON. 2011. Not just fat: the structure and function of the lipid droplet. *Cold Spring Harb. perspect. biol.* 3(3).
3. OLZMANN J. A. & P. CARVALHO. 2019. Dynamics and functions of lipid droplets. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 20(3): 137-155.
4. THIAM A.R., R.V. JR FARESE, T.C. WALTHER. The biophysics and cell biology of lipid droplets. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013 (12): 775-86.
5. DIAS, S., V. C. SOARES, A. C. FERREIRA, C. Q. SACRAMENTO, N. FINTELMAN-RODRIGUES, J. R. TEMEROSO, L. TEIXEIRA, M. A. NUNES DA SILVA, E. BARRETO, M. MATTOS, C. S. DE FREITAS, I. G. AZEVEDO-QUINTANILHA, P. MANSO, M. D. MIRANDA, M. M. SIQUEIRA, E. D. HOTTZ, C. PÃO, D. C. BOU-HABIB, D. F. BARRETO-VIEIRA, C. DUMITH, F. A. BOZZA & M. L. SOUZA. 2020. Lipid droplets fuel SARS-CoV-2 replication and production of inflammatory mediators. *PLoS Pathog.* 16 (12).
6. BOZZA, P. T., & J. P. VIOLA. 2010. Lipid droplets in inflammation and cancer. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)* 82(4-6): 243-250.
7. FADER KAISER C. M., P. S. ROMANO, M. C. VANRELL, C. A. POCOIGNONI, J. JACOB, B. CARUSO & L. R. DELGUI. 2022. Biogenesis and Breakdown of Lipid Droplets in Pathological Conditions. *Front Cell Dev Biol.* 9.
8. GAO, M., X. HUANG, B. L. SONG & H. YANG. 2019. The biogenesis of lipid droplets: lipids take center stage. *Progress in Lipid Research* 75.
9. HENNE, W. M., M. L. REESE, & J. M. GOODMAN. 2018. The assembly of lipid droplets and their roles in challenged cells. *EMBO J.* 37(12).

10. THIAM, A. R. & L. FORET. 2016. The physics of lipid droplet nucleation, growth and budding. *BBA* 1861(8 Pt A): 715-22.
11. CHAPMAN, K. D., M. AZIZ, J. M. DYER & R. T. MULLEN. 2019. Mechanisms of lipid droplet biogenesis. *Biochem J.* 476(13): 1929-1942.
12. RENNE, M. F., Y. A. KLUG & P. CARVALHO. 2020. Lipid droplet biogenesis: A mystery “unmixing”? *In Seminars in cell & developmental biology* 108: 14-23.
13. HAMILTON, J. A. 1989. Interactions of Triglycerides with Phospholipids: Incorporation into the Bilayer Structure and Formation of Emulsions. *Biochem.* 28: 2514-2520.
14. LI, R., W. SCHMIDT, S. RANKIN, R. L. WALZEM & E. BOYLE-RODEN. 2003. Solubilization of Acyl Heterogeneous Triacylglycerol in Phosphatidylcholine Vesicles. *J. Agric. Food Chem.* 51: 477-482.
15. KHANDELIA, H., L. DUELUND, K. I. PAKKANEN & J. H. IPSEN. 2010. Triglyceride blisters in lipid bilayers: implications for lipid droplet biogenesis and the mobile lipid signal in cancer cell membranes. *PLoS one* 5(9).
16. DUELUND, L., G. V. JENSEN, H. K. HANNIBAL-BACH, C. S. EJSING, J. S. PEDERSEN, K. I. PAKKANEN & J. H. IPSEN. 2013. Composition, structure and properties of POPC–triolein mixtures. Evidence of triglyceride domains in phospholipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1828(8): 1909-1917.
17. CHORLAY A. & A. R. THIAM. 2018. An Asymmetry in Monolayer Tension Regulates Lipid Droplet Budding Direction. *Biophys J.* 114(3): 631-640.
18. CHOUDHARY, V., G. GOLANI, A. S. JOSHI, S. COTTIER, R. SCHNEITER, W. A. PRINZ & M. M. KOZLOV. 2018. Architecture of Lipid Droplets in Endoplasmic Reticulum is determined by phospholipid intrinsic curvature. *Curr. Biol.* 28(6): 915-926.
19. M'BAREK B., D. AJAJI, A. CHORLAY, S. VANNI, L. FORÊT & A. R. THIAM. 2017. ER Membrane Phospholipids and Surface Tension Control Cellular Lipid Droplet Formation. *Dev Cell.* 19;41(6): 591-604.
20. SANTINHO, A., A. CHORLAY, L. FORET & A. R. THIAM. 2021. Fat inclusions strongly alter membrane mechanics. *Biophys J.* 120(4): 607-617.

21. PENNO, A., G. HACKENBROICH & C. THIELE. 2013. Phospholipids and lipid droplets. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1831(3): 589-594.
22. ZANGHELLINI, J., F. WODLEI & H. H. VON GRÜNBERG. 2010. Phospholipid demixing and the birth of a lipid droplet. *J. Theor. Biol.* 264(3): 952-961.
23. DESLANDES F., A. R. THIAM & L. FORÊT Lipid Droplets Can Spontaneously Bud Off from a Symmetric Bilayer. *Biophys J.* 2017 Jul 11;113(1):15-18. doi: 10.1016/j.bpj.2017.05.045. Epub 2017 Jun 21. PMID: 28647060; PMCID: PMC5510809.
24. CARUSO B., N. WILKE & M. A. PERILLO. 2021. Triglyceride Lenses at the Air–Water Interface as a Model System for Studying the Initial Stage in the Biogenesis of Lipid Droplets. *Langmuir* 37(37): 10958-10970.
25. GREENSPAN, P., E. P. MAYER & S. D. FOWLER. 1985. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J. Cell Biol.* 100(3): 965-973.
26. GHANADZADEH GILANI A., M. MOGHADAM & M.S. ZAKERHAMIDI. 2012. Solvatochromism of Nile red in anisotropic media. *Dyes Pigm.* 92(3): 1052-1057.
27. OSORIO, H. M. 2015. Ensamblaje y caracterización de compuestos orgánicos para la fabricación de dispositivos electrónicos moleculares. Disertación doctoral, Universidad de Zaragoza, España.
28. ANGELOVA, M. I. & D. S. DIMITROV. 1986. Liposome electroformation. *Faraday Discuss.* 81: 303-311.
29. WEINBERGER A., TSAI F. C., KOENDERINK G. H., SCHMIDT T. F., ITRI R., MEIER W., SCHMATKO T., SCHRÖDER A. & MARQUES C. 2013. Gel-assisted formation of giant unilamellar vesicles. *Biophys J.* 105 (1): 154-64.
30. GAINES, G.L. 1966. *Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces*. Interscience Publishers, Nueva York.
31. BELLON, J. A., M. J. PINO & N. WILKE. 2018. Low-cost equipment for electroformation of Giant Unilamellar Vesicles. *HardwareX* 4.