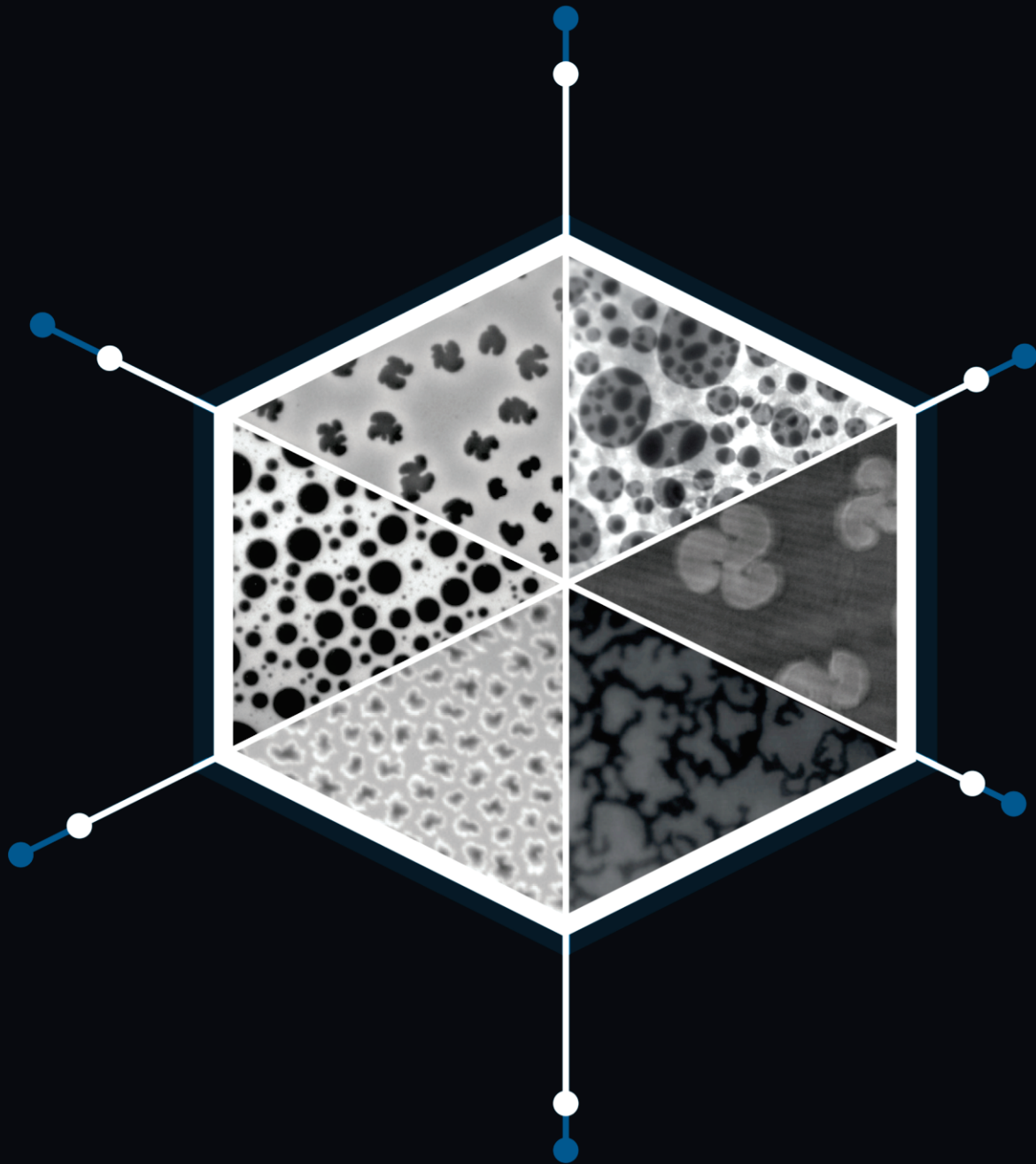
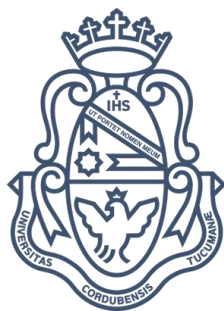


TESIS DOCTORAL

Propiedades termodinámicas y difusionales
de films lipídicos en diferentes
arreglos supramoleculares



Agustín Mangiarotti



Universidad Nacional de Córdoba

Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIC-CONICET), Departamento de Química Biológica
Ranwel Caputto, Facultad de Ciencias Químicas.

TESIS DOCTORAL

PROPIEDADES TERMODINÁMICAS Y DIFUSIONALES DE FILMS LIPÍDICOS EN DIFERENTES ARREGLOS SUPRAMOLECULARES

AGUSTÍN MANGIAROTTI

DIRECTORA: DRA. NATALIA WILKE



C I Q U I B I C

El presente trabajo de tesis fue realizado en el Departamento de Química Biológica Ranwel Caputto, de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba - Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CONICET), bajo la dirección de la Dra. Natalia Wilke.

La Comisión Evaluadora de Tesis se encuentra integrada por los profesores:

Dr. Bruno Maggio

Dra. Cecilia Inés Álvarez Igarzabal

Dra. Lidia Mabel Yudi

Dra. Ana María Gennaro (evaluadora externa)

Agosto de 2017, Córdoba, Argentina.

*Dedicada a mi familia,
por su apoyo incondicional.*

"I get by with a little help from my friends"

The Beatles

Agradecimientos

A la casa de estudios que me educó, y en la que pasé la mayor parte de mis días durante 10 años: a la Facultad de Ciencias Químicas, y a la Universidad Nacional de Córdoba, de la cual me encuentro orgulloso de formar parte. Hoy más que nunca comprendo, y definiendo la importancia de que la Universidad sea pública, gratuita e inclusiva.

Al CONICET por darme la oportunidad de hacer investigación para mi país.

Al Ministerio de Educación de la Nación, y a la comisión Fulbright por becarme para realizar una estadía de investigación en Estados Unidos.

A la Comisión Asesora: Cecilia, Mabel y Bruno, quienes siguieron mi desempeño durante estos años, y me brindaron siempre su apoyo y consejos para poder lograr este objetivo.

A la Dra. Ana María Gennaro, por aceptar evaluar esta Tesis y presenciar la defensa de la misma.

A Natalia Wilke por recibirme en el laboratorio, por guiarme durante estos años y por ser una increíble investigadora, y una excelente persona, para la cual solo tengo palabras de agradecimiento, y admiración. Gracias por apoyarme siempre, en cada actividad que me propuse, ya que contribuyera o no al desarrollo de mi tesis, siempre me permitiste recorrer los caminos que decidí emprender. Más allá de la suerte que significa haber tenido como directora de tesis a una investigadora sobresaliente, inteligente y creativa, lo cual impacta directamente en la calidad de los trabajos, y en los resultados obtenidos, es mucho más importante para mí destacar que tuve una directora motivadora, que sabe cómo sacar lo mejor de cada uno de sus colaboradores, que comprende el trabajo en equipo, y que da libertad y guía en la medida justa. Gracias por posibilitarme realizar esta tesis, y trabajar con vos dentro del hermoso grupo de biofísica.

A Bruno Maggio, porque tuve la dicha de conocerlo, y que integrara mi Comisión de Tesis. Porque sus charlas, clases y discusiones, fueron una fuente de inspiración que me motivaron a querer a la disciplina de biofísica-química, a sorprenderme con la versatilidad de los lípidos, y a mirar (y admirar) a la ciencia como una actividad falible, pero que constituye la mejor herramienta que tiene un país para desarrollarse.

A todos los integrantes y personajes del CIQUIBIC, porque hacen que el instituto sea un excelente lugar de trabajo, y están siempre dispuestos a brindar su ayuda cuando es necesaria.

A mis compañeros del laboratorio, los viejos y los nuevos, con quienes compartimos amistad, la vida, el trabajo, e infinitos mates, y gracias a quienes todo camino se hace mucho más fácil de transitar: Benja, Fer, Erne, Andre, Fra, Yeni, Mati, Mili, Darío, Ginger Ale, y Elida. Y a los biofísicos en general (también viejos y nuevos), que son un grupo de gente bastante peculiar, y del que me siento orgulloso de formar parte: Vane, Ceci, Carla, Belén, Sole B., Beny, Alain, Eze, Elisa, Julio, Rafa, Ernesto, Graciela, Sole C., Fide, Willy, y Lau.

A mis amigos facultativos, y a mis amigos de la vida, los que están y estuvieron, porque sin su amistad los días serían grises, y muchas veces sin sentido: Fernando, Fede, Martín, Edu, Chuky “El Bowser” (alias Pablo) Ramos, Matías, Maca, Yane, Claudio, Romi, Ceci A, y Ceci G. Los que conocí en el cursillo: Quino, Giuli, Xime, Jan, y los que llegaron después: Bere, Emi, Juli, Lucas, Luri, Ferto y Betsy.

A Nachito, con quién compartimos una amistad, un doctorado y un hogar. Gracias por bancarme, y por hacer que ese par de años que vivimos juntos fueran de los mejores de mi vida: espero que sigamos recorriendo caminos juntos. (¡Qué regalada vida!)

A mi familia en Indianápolis: Michael, Jackie, Betty, Harpreet, y Nancy. A mis amigos allí: Kent, Ítallo, Nawaf, Elissa y Ritika; y a Christoph Naumann que cálidamente me recibió en el laboratorio.

A Carla Muser, con quién compartí estos últimos tres años, que fueron años hermosos, porque fuimos soporte el uno del otro, y por haberme brindado su amor incondicional, que fue fundamental para atravesar los momentos difíciles que se presentan en la vida, y para tomar las decisiones que me llevan a donde estoy hoy. Gracias por haber hecho de mí una mejor persona.

Esta tesis está dedicada a mi familia, porque sin su apoyo no podría haber alcanzado ningún objetivo. A mis padres Andrea y Fabián, y mi hermano Santiago. A mis tías Pato, Nani, Ana, Chus, y a mi tío Gustavo. A ñopo y pirulo. A mis abuelos queridos: Teresa, Lala y Lolo. A mi prima “grande” Sole, a la ya no tan chica María Sol, y a todos mis primitos pequeños Guadi, Anto, Juan Martín, Lucía, Lucre, y Pili. A mi nona Antonia, mi nono Carlos y a mi tío Negro que los llevo en el corazón.

*“Cuánto camino hicieron mis pasos aquí,
hoy soy sólo los abrazos que di”*

Pedro Aznar

Un hombre se propone la tarea de dibujar el mundo.

*A lo largo de los años puebla un espacio con imágenes de provincias,
de reinos, montañas, de bahías, de naves, de islas, de peces, de habitaciones,
de instrumentos, de astros, de caballos y de personas.*

*Pero antes de morir, descubre que ese paciente laberinto de líneas
traza la imagen de su cara.*

El Hacedor, Jorge Luis Borges.

Índice

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Presentación del problema	1
1.2 Lípidos. Modelos de la membrana celular	3
1.3 Transiciones de fase. Efecto del colesterol.....	7
1.4 Heterogeneidad lateral. Dominios de membrana	9
1.5 Objetivos	11
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
2.1 Modelos y metodologías empleadas. Fundamentos teóricos.....	13
2.1.1. Monocapas de Langmuir en la interfase agua-aire.....	13
2.1.1.A Miscibilidad de componentes en monocapas.....	15
2.1.2. Membranas soportadas	16
2.1.2.A Monocapas y bicapas soportadas a partir de monocapas de Langmuir	16
2.1.2.B Bicapas soportadas formadas por la ruptura de vesículas (SVRs).....	17
2.1.3. Bicapas <i>free-standing</i>	18
2.1.3.A Vesículas unilamelares	18
2.1.3.B Bicapas planas sobre grillas de oro.....	19
2.1.3.B.I Acoplamiento de dominios en bicapas planas.....	22
2.2 Técnicas de caracterización superficial y análisis de imágenes.....	23
2.2.1. Microscopía de ángulo de Brewster (BAM)	23
2.2.2. Microscopía de fluorescencia (FM)	24
2.2.3. Microscopía de fuerza atómica (AFM).....	25
2.2.4. Segmentación y análisis de las imágenes obtenidas por microscopía	26
2.2.5. Determinación del área de captura y polígonos de Voronoi	28
2.3 Técnicas y metodologías complementarias utilizadas	28
2.3.1. Dispersión dinámica de luz (DLS).....	28
2.3.2. Seguimiento de dominios y determinación del coeficiente de difusión	29
2.3.3. Determinación de la función de distribución radial de dominios.....	30
2.3.4. Cantidad de dominios vs tiempo.....	31
2.3.5. Tamaño de dominios vs velocidad de enfriamiento.....	32
2.3.6. Modificación del porcentaje de fase ordenada en <i>LMs</i> y bicapas planas <i>free-standing</i>	32
2.4 Especificaciones técnicas. Reactivos.	34
2.4.1. Lípidos	34
2.4.2. Membranas soportadas	36
2.4.3. Bicapas planas <i>free-standing</i>	37
2.4.4. Vesículas unilamelares pequeñas y gigantes.....	37

CAPÍTULO 3: COMPARACIÓN DE MODELOS EXPERIMENTALES DE MEMBRANAS LIPÍDICAS.....	38
3.1 Monocapas de Langmuir - Isotermas y diagramas de fases.....	38
3.2 Membranas soportadas.....	43
3.2.1. Transferidas desde monocapas.....	43
3.2.2. Transferidas desde SUVs.....	44
3.3 Bicapas no soportadas (<i>free-standing</i>).....	46
3.3.1. <i>GUVs</i>	46
3.4 Comparación de los modelos de membrana.....	46
3.5 Conclusiones.....	52
CAPÍTULO 4: TRANSICIONES DE FASE DE LÍPIDOS PUROS EN FILMS <i>FREE-STANDING</i> Y SOPORTADOS.....	54
4.1 Diagramas de fase y composición de las fases en coexistencia.....	55
4.2 Cálculo de la energía libre para la transición de fase.....	58
4.3 Resumen y discusión de los parámetros que modifican la transición de fase.....	60
4.4 Conclusiones.....	65
CAPÍTULO 5: INTERACCIONES ELECTROSTÁTICAS EN BICAPAS LIPÍDICAS.....	66
5.1 Coeficiente de difusión de dominios de fase ordenada.....	67
5.2 Función de distribución radial de los dominios en el plano de la membrana.....	70
5.3 Potencial de campo medio entre dominios en bicapas lipídicas.....	72
5.4 Fusión de dominios.....	73
5.5 Síntesis y conclusiones.....	75
CAPÍTULO 6: NUCLEACIÓN DE DOMINIOS EN BICAPAS LIPÍDICAS. INFLUENCIA DE LA VELOCIDAD DE PERTURBACIÓN Y LA DINÁMICA DEL FILM.....	77
6.1 Tamaño de dominios vs velocidad de perturbación.....	78
6.2 Tamaño de dominios vs área de captura.....	80
6.3 Conclusiones.....	81
CAPÍTULO 7: CONCLUSIONES GENERALES.....	82

CAPÍTULO 8: PERSPECTIVAS	83
8.1 Monocapas de compuestos puros.....	84
8.2 Monocapas mezcla. Diagramas de fases	87
8.3 Propiedades dinámicas de los films en la interfase agua-aire	89
8.4 Conclusiones.....	90
ANEXO	92
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
LISTADO DE PUBLICACIONES REALIZADAS	109

Abreviaciones y símbolos

LMs: Monocapa de Langmuir (del inglés: *Langmuir Monolayers*).

SLMs: Monocapas soportadas (del inglés: *Supported Lipid Monolayers*).

SLBs: Bicapas soportadas (del inglés: *Supported Lipid Bilayers*).

^d*SLBs*: bicapa soportada en la que se observa la hemicapa distal respecto del sólido.

^p*SLBs*: bicapa soportada en la que se observa la hemicapa proximal al sólido.

SVRs: bicapas soportadas formadas por ruptura de vesículas (del inglés: *Supported bilayers formed by Vesicle Rupture*).

SUVs: Vesículas unilamelares pequeñas (del inglés: *Small Unilamellar Vesicles*).

LUVs: Vesículas unilamelares grandes (del inglés: *Large Unilamellar Vesicles*).

GUVs: Vesículas unilamelares gigantes (del inglés: *Giant Unilamellar Vesicles*).

MLVs: Vesículas multilamelares (del inglés: *Multilamellar vesicles*).

BLMs: bicapas planas *free-standing* (del inglés: *Black Lipid Membranes*).

fo: fase ordenada: referida a la fase líquido-condensada en monocapas, gel en bicapas, y líquido-ordenada en sistemas con colesterol.

fd: fase desordenada: referida a la fase líquido-expandida en monocapas, líquido-cristalina en bicapas, y líquido-desordenada en sistemas con colesterol.

DLPC: Dilauroilfosfatidilcolina.

DMPC: Dimiristoilfosfatidilcolina.

DPPC: Dipalmitoilfosfatidilcolina.

DSPC: Diesteroilfosfatidilcolina.

DAPC: Diaraquidoilfosfatidilcolina.

DPPS: Dipalmitoilfosfatidilcolina.

DOPC: Dioleoilfosfatidilcolina.

pSM: Palmitoilesfingomielina.

Col: Colesterol.

DiIc18: 1,1- α -dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina perclorato.

PE-Rho: α -fosfatidiletanolamina-N-lissamina rodamina B sulfonil sal de monio, transfosforilada de huevo de pollo.

LB: transferencia de Langmuir-Blodgett.

LS: transferencia de Langmuir-Schaefer.

BAM: Microscopía de ángulo de Brewster (del inglés: *Brewster Angle Microscopy*).

FM: Microscopía de fluorescencia (del inglés: *Fluorescence Microscopy*).

AFM: Microscopía de fuerza atómica (del inglés: *Atomic Force Microscopy*).

DLS: Dispersión dinámica de luz (del inglés: *Dynamic Light Scattering*).

D: Coeficiente de difusión obtenido experimentalmente.

D_t : Coeficiente de difusión calculado a partir de un modelo.

DCM: Desplazamiento cuadrático medio.

DCMr: Desplazamiento cuadrático medio relativo entre dos dominios o partículas.

$g(r)$: función de distribución radial.

T_m : temperatura de transición de fase principal de bicapas o monocapas lipídicas.

ec.: ecuación.

P: coeficiente de distribución de la sonda fluorescente entre las fases en coexistencia.

*“Somos polvo de estrellas que piensa acerca de las estrellas.
Somos el medio a través del cual el universo puede conocerse a sí mismo.”*

Carl Sagan.

Capítulo 1: Introducción.

1.1 Presentación del problema.

Nuestra forma de comprender el mundo se basa fundamentalmente en la interpretación de modelos simplificados de la realidad: experimentamos la vida a través de representaciones de ideas, en su mayor parte implícitas en nuestra mente, y de los objetos que nos rodean. La comprensión de un sistema físico o un fenómeno natural, por ejemplo, implica que poseamos un modelo mental del sistema que nos permita explicarlo, y hacer previsiones con respecto a él. En ciencia, la construcción de modelos conceptuales y experimentales, permite el estudio de la realidad. No obstante, deben conocerse las aproximaciones realizadas, y las limitaciones de los modelos experimentales, a fin de interpretar correctamente los resultados:

“...la omisión y la simplificación nos ayudan a comprender, pero, en muchos casos, nos ayudan a comprender lo erróneo”.

Aldous Huxley.

Un claro y práctico ejemplo lo constituye lo que denominaremos el “eterno dilema de los cartógrafos”, que discutiremos brevemente para ilustrar el concepto de modelo: es fácil imaginarse que una manera simplificada de visualizar el globo terrestre es verlo como un plano en dos dimensiones (lo que conocemos como mapa). Es así, que desde el año 1500 los matemáticos y cartógrafos realizan esta tarea, y lo que han logrado es un proceso denominado “proyección”. Ejemplos de distintos tipos de proyecciones se muestran en la Figura 1.1. Si se proyecta una esfera sobre la superficie de un cilindro de papel, se obtendrán resultados diferentes que al proyectarla sobre un cono. En este sentido, Carl Friedrich Gauss advirtió que la tierra no puede representarse en el plano sin realizar algún tipo de distorsión, ya sea de forma, de área, de distancias, o alguna combinación de ellas. Es decir, que por más precisa que sea la proyección, en el intento de simplificación de la realidad (en este caso la tierra), se cometen errores, y aparecen “desviaciones de la realidad” como puede observarse en los ejemplos de la Figura 1.1.

Una de las proyecciones más populares es la proyección de Mercator, llamada así por su inventor Gerardus Mercator (1569), que posee la ventaja de preservar las formas de los países (ver Figura 1.1). Esta proyección fue ampliamente utilizada durante el siglo XVIII en

las cartas náuticas, porque permitía trazar las rutas como líneas rectas e ininterrumpidas, y si bien existía una desviación en las distancias, permitían viajar y fijar rumbos con bastante precisión.¹

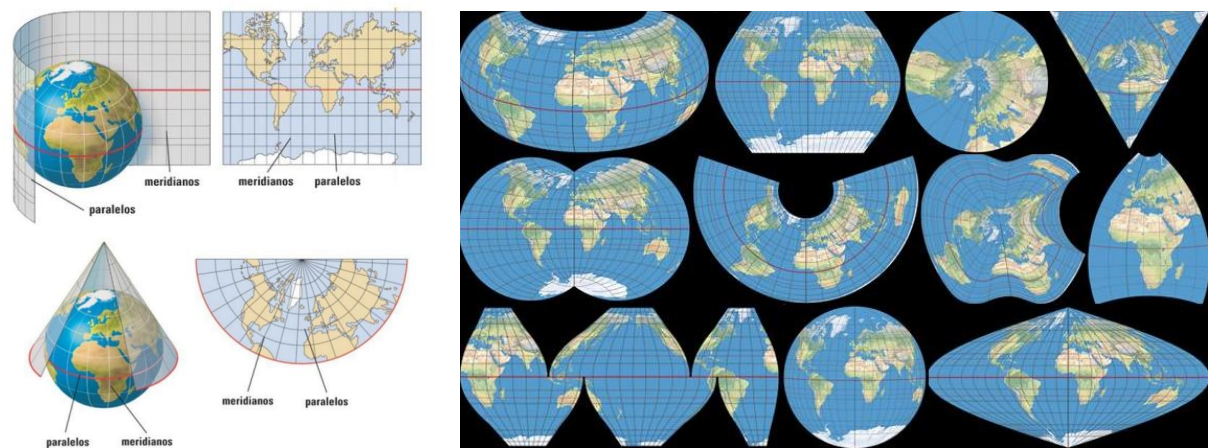


Figura 1.1. Se muestran ejemplos de distintas proyecciones. La primera, realizada sobre un cilindro, corresponde a la proyección de Mercator. Puede observarse que dependiendo de la proyección que se utilice, pueden ocurrir variaciones de forma, de tamaño, y/o de distancias.

No obstante, a pesar de encontrarse vigente hasta hoy en día, esta proyección posee una gran distorsión de área hacia los polos. Los países que se encuentran cerca del polo norte poseen un tamaño muy superior al real; un caso extremo es el de Groenlandia, por ejemplo, que en la proyección de Mercator posee un área equivalente a la de todo el continente africano como muestra la Figura 1.2.

Este es el modelo que se sigue utilizando para la enseñanza en la mayoría de las escuelas (una crítica moderna a esta proyección habla de una connotación imperialista de Europa y América del Norte sobre los países del sur; lo mismo respecto de la orientación del norte hacia arriba y el sur hacia abajo). Inclusive, la mayor parte de los mapas webs, incluido *Google Maps*, utilizan el Mercator debido a que preserva las formas, y por sobre todo, a que con mucha magnificación, pueden medirse ángulos, verse ciudades, y calles con bastante precisión; sin embargo, desde lejos la distorsión adquiere importancia. De modo que, se advierte que las proyecciones son modelos utilizados para representar la tierra, que pueden ser confusas o muy útiles dependiendo de para qué se las emplee.

Desde la década del 60', con el lanzamiento de tecnología satelital al espacio, se han creado y refinado cientos de proyecciones, e incluso se han realizado combinaciones de las mismas a fin de obtener una representación cada vez más precisa, y en la cual se alteren menos factores. Desde 1998, la *National Geographic Society* adoptó la proyección de Winkel-Tripel como oficial, debido a que es la que mantiene una mejor relación entre forma y área.

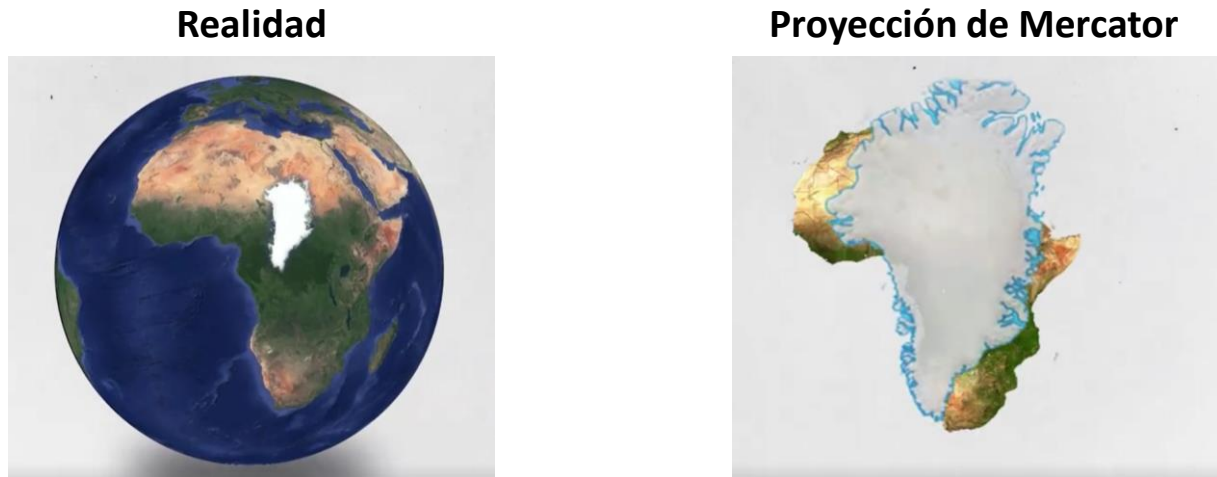


Figura 1.2. En la proyección de Mercator existe una distorsión de área hacia los polos. Por ejemplo, Groenlandia posee una superficie equivalente a la del continente africano, lo cual dista mucho de la realidad.

La moraleja del “eterno dilema de los cartógrafos”, es que dentro de los cientos de proyecciones existentes no hay una “correcta”, sino que cada proyección posee una perspectiva distinta y aporta información diferente. Lo importante en todo caso, es conocer qué mapa (o modelo para interpretar la realidad) estamos utilizando, cuáles son sus limitaciones, y para qué nos puede ser útil.

Con esto en mente, debemos decir que, en ciencia, cuando intentamos abordar un problema de la realidad, la definición de un modelo teórico o experimental, así como su elección, son cruciales. Es importante saber qué modelo debemos utilizar para responder a nuestros interrogantes, así como no menos importante es conocer qué preguntas pueden ser respondidas mediante la interpretación de dicho modelo.

En relación a esto, a lo largo de esta tesis intentaremos dar respuesta a preguntas relacionadas con la similitud y validez de resultados obtenidos a través de la utilización de distintos modelos experimentales de membranas lipídicas.

1.2 Lípidos. Modelos de la membrana celular.

Los lípidos son moléculas anfipáticas que poseen un grupo polar zwitteriónico, cargado, o dipolar, y cadenas hidrocarbonadas que determinan una región hidrofóbica. Esta anfipaticidad les confiere características especiales, ya que en la superficie acuosa orientan el grupo hidrofílico hacia el medio acuoso y sus cadenas hacia el aire, disminuyendo así la tensión superficial del agua líquida. Por otra parte, cuando se dispersan en soluciones acuosas, se autoensamblan en diferentes tipos de agregados supramoleculares como resultado del efecto hidrofóbico, como se ejemplifica en la Figura 1.3.

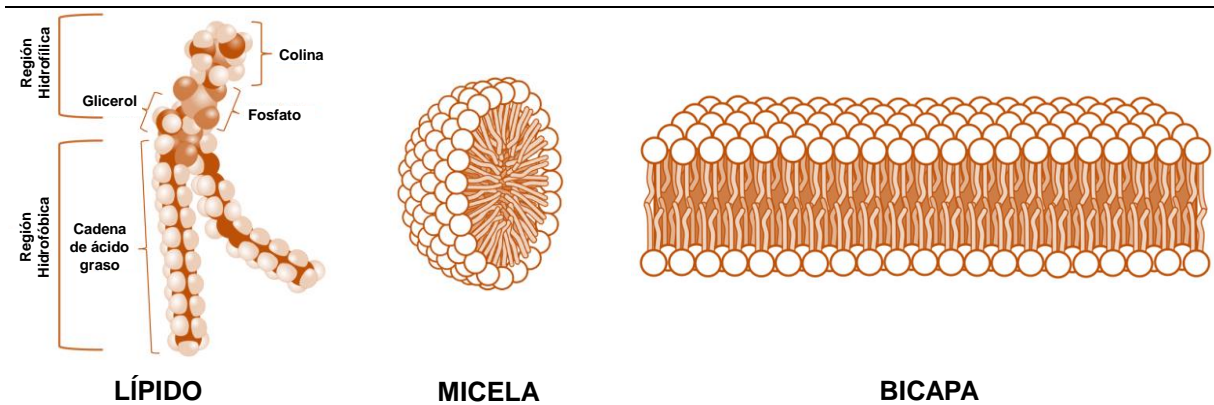


Figura 1.3. Izquierda: lípido monomérico (fosfatidilcolina). Se indica la región polar y la hidrofóbica. Centro: micela lipídica. Derecha: bicapa lipídica. Existen diferentes tipos de agregados multimoleculares que variarán de acuerdo a la geometría molecular de los lípidos y la cantidad de agua del sistema (mesomorfismo liotrópico).

Los lípidos que se encuentran en una célula están, en su mayor parte, asociados entre sí y con proteínas formando interfases que conocemos como membranas.² Nuestro conocimiento actual sobre la estructura y la función de las biomembranas, e incluso el concepto de bicapa lipídica, nacen ligados al estudio de fenómenos de adsorción interfacial: al comportamiento de lípidos en el agua, como films de jabón, burbujas, y monocapas de Langmuir, que han sido estudiados y han evolucionado como consecuencia de la aplicación de los principios clásicos de la química interfacial y de sistemas coloidales.³

Los primeros indicios de los efectos provocados por el aceite en el agua datan de la obra “Historia Natural”, escrita por Plinio el Viejo en el año 77 D.C.⁴ Allí, el autor señala que el agua del mar puede ser calmada fácilmente con el petróleo, idea que con el pasar del tiempo se convirtió en parte del folclore. Siglos después, los estudios de films de jabón, realizados por Robert Hook en 1672, constituyeron el puntapié inicial en la investigación de las estructuras formadas por los lípidos en agua. Isaac Newton, años más tarde, realizó estudios de interferencia de la luz, que le permitieron calcular con bastante precisión el espesor correspondiente a cada color observado en los films, que se veían blancos cuando más capas de lípidos poseían, y negros, cuando el film era de espesor bimolecular⁵ (aunque Newton desconocía este hecho, así como la estructura molecular de dichos films).

Algunas décadas después, Benjamín Franklin derramó una pequeña cantidad de aceite sobre un lago, y describió sus resultados:

“[...] aunque no era más que una cucharada, producía una calma instantánea sobre varias yardas cuadradas, la cual se extendía de manera asombrosa y gradual hasta que alcanzó el sotavento e hizo que toda esa porción del estanque, tal vez la mitad de un acre, fuera tan lisa como un cristal.”

A estas primeras observaciones, se sumaron experimentos determinantes para la comprensión del comportamiento de los lípidos en agua y el desarrollo del concepto de bicapa lipídica en sus aspectos estructurales y dinámicos. Algunos de ellos, se resumen en la Tabla 1.1, que concluye con el modelo de “mosaico fluido” propuesto por Singer y Nicholson en 1972.⁶

Tabla 1.1. Conceptos clave en el desarrollo del modelo de membrana.

FASE DEL DESARROLLO DEL MODELO	PRINCIPALES HITOS
Comportamiento de lípidos sobre la superficie del agua	<p>77 D.C. - Plinio el Viejo: menciona los efectos del petróleo en el agua.</p> <p>1774 - Benjamin Franklin: describe como se “calma” la superficie del agua ante el agregado de aceite.</p> <p>1890 - Lord Rayleigh: mide el volumen y el área ocupada por una determinada cantidad de petróleo esparcido en agua.</p> <p>1891 - Agnes Pockels: desarrolla un dispositivo para medir el área exacta de aceites sobre agua.</p> <p>1916 - Irving Langmuir: perfecciona la cuba para medir presión lateral en la interfase agua-aire, y describe el comportamiento de monocapas de lípidos.</p>
Características estructurales (estáticas) de las membranas	<p>1887 - Pfeffer: crea la hipótesis de la existencia de una barrera osmótica de espesor definido que separa el interior del exterior celular.</p> <p>1895 - Ernest C. Overton: describe que la permeabilidad de las moléculas en la membrana celular (la llamó capas lipoideas) se relaciona con el coeficiente de partición entre agua y aceite.</p> <p>1925 - E. Gortel y F. Grendel: mediante un experimento en monocapas de Langmuir concluyen que lípidos extraídos de membranas de eritrocitos ocupan el doble de área de las membranas, proponiendo la estructura de bicapa lipídica.</p> <p>1932 - Kenneth S. Cole: propone la existencia de otros componentes de membrana diferentes de los lípidos.</p> <p>1935 - J. F. Danielli y H. Davson: proponen un modelo de membrana tipo “sándwich” donde la bicapa lipídica se encuentra revestida por capas proteicas.</p> <p>1957 - J. D. Robertson: propone el modelo de unidad de membrana por el cual todas las membranas tendrían la misma estructura aunque variara la composición. Respalda los resultados de Gortel y Grendel mediante microscopía electrónica, y apoya la estructura propuesta por Davson y Danielli.</p>
Aspectos dinámicos de la membrana plasmática	<p>1972 - S. J. Singer y G. Nicholson: proponen el modelo de “mosaico fluido” donde la bicapa lipídica posee fluidez lateral y transversal, y las proteínas pueden estar insertas, y atravesar la membrana, además de estar adsorbidas a la misma.</p>

Con el correr de los años, el modelo de Singer y Nicholson se ha ido refinando⁷. Por ejemplo, J. Israelachvili propuso en 1977, la existencia de interacciones laterales entre lípidos y proteínas.⁸ Por otra parte, también incorporó al modelo el plegamiento de la membrana, la formación de poros, y variaciones en su espesor, como así también cierto grado de heterogeneidad lateral.

En 1984, Mouritsen y Bloom⁹ propusieron el modelo del “colchón” que toma en cuenta las tensiones interfaciales, y las fuerzas capilares debido al “desajuste hidrofóbico” que se

produce cuando las proteínas exceden o son mucho menores que el espesor de la bicapa lipídica. Por su parte, Sackmann en 1995,¹⁰ destacó la importancia de las interacciones de la membrana con el citoesqueleto y el glicocaliz. En la Figura 1.4 se proporciona un resumen gráfico de la evolución de los principales modelos de membrana.

La evolución conceptual y experimental del modelo de bicapa lipídica hasta nuestros días, nos ha permitido comprender que la membrana celular no es simplemente una barrera difusional a diferentes solutos, sino que posee un rol crucial en la comunicación intracelular, intercelular y con el medio, así como en el desplazamiento de la célula. Sin embargo, aún estamos muy lejos de comprender todas sus propiedades particulares.

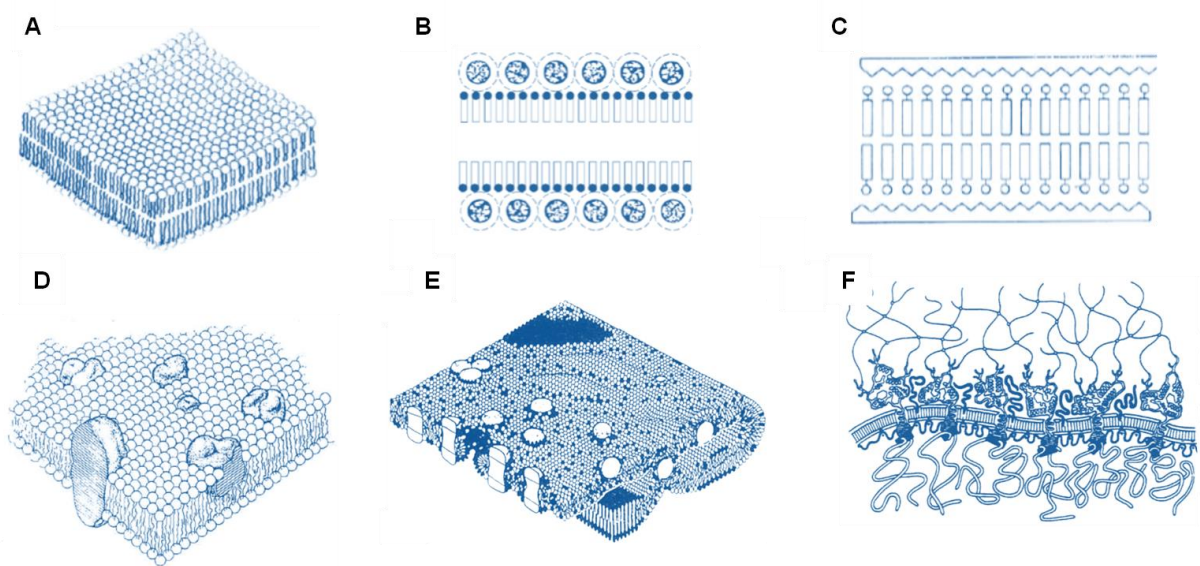


Figura 1.4. Modelos de membrana (1925-1995) **(A)** Modelo de Gortel y Grendel; **(B)** Modelo de Davson y Danielli; **(C)** Modelo de Robertson; **(D)** Modelo de Singer y Nicholson; **(E)** Modelo de Israelachvili y **(F)** Modelo de Sackmann.

La membrana celular emerge entonces como un sistema abierto y complejo, en el cual las condiciones locales externas como cambios de pH o de pCa, el grado de saturación de las cadenas carbonadas de los lípidos, y la interacción con la matriz extracelular y proteínas periféricas, pueden generar transiciones de fase locales, cambios locales de estructura (diferentes a la mesofase esméctica lamelar), deformaciones, cambios en la dinámica, entre otros.¹¹ En ese sentido, la Figura 1.5 muestra un esquema más elaborado y realista de una membrana celular en donde se tienen en cuenta los diferentes componentes proteicos, lipídicos y carbohidratos, y las dimensiones relativas entre ellos. Esta ilustración revela que en un ambiente tan complejo, no es posible pensar en términos individuales de causa-efecto, con entidades moleculares unívocamente responsables de cierto proceso, sino que las moléculas pierden su individualidad para hacerse parte de un conglomerado dinámico, cuyas propiedades emergentes corresponden a los aspectos físico-químicos del conjunto.²

Es por ello, que para estudiar un sistema de multicomponentes, sensible a cambios en la temperatura, en la presión, y en el potencial químico de sus componentes, es esencial la utilización de modelos experimentales simples que permitan el control de variables y condiciones experimentales, para llegar a describir características generales de comportamiento y topología.

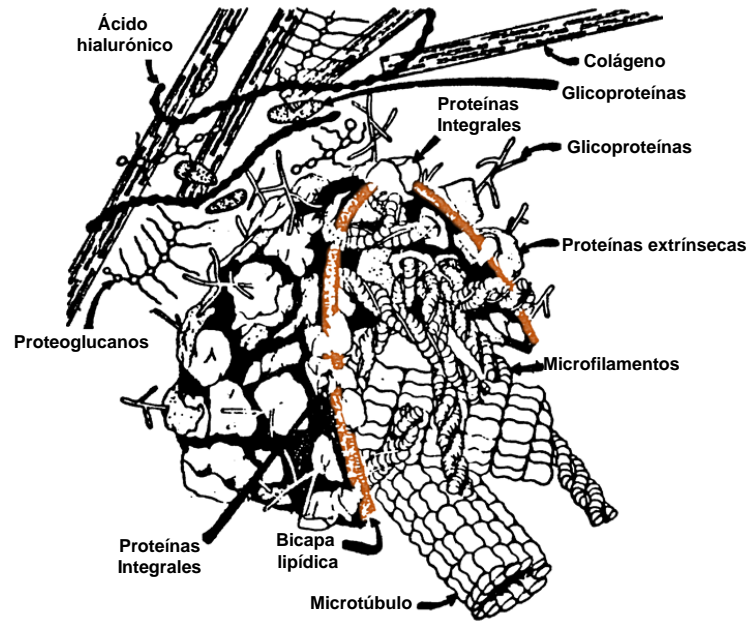


Figura 1.5. Esquema de la sección transversal de una célula, los componentes se muestran a escala. La bicapa lipídica está resaltada en color. (Figura adaptada de la referencia 12).

1.3 Transiciones de fase. Efecto del colesterol.

Como se mencionó anteriormente, los lípidos pueden formar diferentes agregados supramoleculares de acuerdo a la cantidad de agua que conforme el sistema, lo que se define como mesomorfismo liotrópico. A su vez, cada fase liotrópica puede exhibir transiciones entre diferentes estados al cambiar la temperatura (transiciones termotrópicas). En particular, las bicapas lipídicas, también denominadas fases lamelares, presentan diferentes transiciones termotrópicas¹³:

L_β: fase cristalina. Altamente ordenada, con los lípidos en conformación *trans*, formando una estructura cristalina regular de tipo sólida.

L_{β'}: fase líquido-cristalina, o gel. Es una fase altamente estructurada con los lípidos en conformación *trans* y con una dada inclinación respecto a la normal de la membrana (simbolizada por el apóstrofe). Dicha inclinación depende del grupo polar del lípido.¹⁴ Los lípidos se organizan en una red triangular en el plano de la membrana.¹⁵

P_{β} : fase ondulada (*ripple phase*), muestra ondulaciones periódicas en la superficie de la membrana.¹⁵ Esta fase se forma antes de la denominada transición de fase principal ($L_{\beta} \rightarrow L_{\alpha}$), y consiste probablemente de una fase lipídica parcialmente fundida con menor ordenamiento que la fase L_{β} . Esta fase constituye un estadio intermedio que raras veces es detectable.

L_{α} : fase fluida o líquido-desordenada. Las cadenas se encuentran desordenadas y se pierde la estructura de red.

En la Figura 1.6 se muestra un esquema representando cada una de las fases mencionadas.

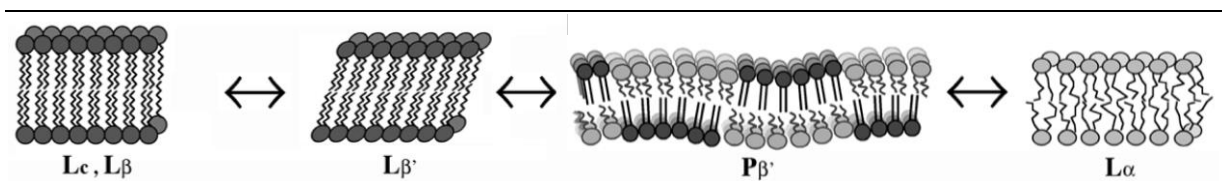


Figura 1.6. Transiciones termotrópicas de la fase esméctica lamelar: Fase cristalina L_{β} , fase gel L_{β} , fase ondulada P_{β} y fase líquido-desordenada L_{α} .

La transición principal $L_{\beta} \rightarrow L_{\alpha}$ es una transición cooperativa que se caracteriza por una temperatura de transición, T_m , en donde la capacidad calorífica es máxima. La misma está asociada a cambios conformacionales abruptos que ocurren en las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos, encontrándose las cadenas hidrocarbonadas extremadamente ordenadas por debajo de la temperatura de transición principal, y muy desordenadas por encima de ésta.¹⁶

La temperatura de transición para lípidos saturados de cadena larga será, en general, mayor que para lípidos saturados de cadena corta (considerando un mismo grupo polar). Así, para una mezcla de lípidos que difieren en el largo de su cadena hidrocarbonada es posible encontrar coexistencia de fases a una temperatura determinada. Para fosfatidilcolinas de cadenas de 16 carbonos o más, se espera la fase gel a temperatura ambiente, mientras que para lípidos de cadena más corta, prevalece la fase líquido-desordenada.

El colesterol es un lípido derivado del ciclopentanoperhidrofenantreno, que posee un grupo polar constituido por un hidroxilo, y una región apolar formada por un carbociclo de núcleos condensados y sustituyentes alifáticos. Esta molécula, posee un efecto bastante peculiar sobre las propiedades de las membranas, debido a que propicia la formación de una fase de propiedades intermedias entre L_{β} y L_{α} , denominada líquido-ordenada, ya que conserva el orden conformacional, y al mismo tiempo presenta fluidez en el plano lateral. La incorporación de colesterol a una fase líquido-desordenada incrementa el espesor de la membrana, lo cual le provee una estructura mecánicamente cohesiva y menos flexible, confiriéndole menor permeabilidad, y al mismo tiempo reteniendo su fluidez traslacional, conservando su funcionalidad. Este efecto es característico de los esteroides en general, los

cuales usualmente representan entre el 30-50% del total de lípidos de la membrana plasmática de organismos eucariotas.¹⁶

En las monocapas de Langmuir, los lípidos también experimentan transiciones de fase similares a las expuestas para bicapas, sólo que reciben diferentes nombres; el estado más laxo se denomina fase gaseosa (la cual no posee un análogo en bicapas), debido a que las interacciones entre lípidos pueden desprenderse dado que se encuentran a grandes distancias entre ellos (en analogía a lo que ocurre con un gas pero en dos dimensiones). A este estado le suceden las fases líquido-expandida, líquido-condensada, y sólida ordenada, esta última pudiendo subclasificarse según la inclinación de las moléculas¹⁷(en el próximo capítulo se discutirá más en detalle este modelo de membrana).

Debido a que en esta Tesis utilizaremos diferentes modelos de membrana segregados en fases para realizar análisis y comparaciones entre ellos, y dado que siempre se tratará de sólo dos fases en coexistencia, nos referiremos siempre a **fases “ordenadas” (fo) y “desordenadas” (fd)**, con el objetivo de evitar confusiones. De esta manera, por ejemplo, cuando en bicapas haya coexistencia de fase gel con líquido desordenada, y en monocapas coexistencia de fase líquido-condensada y líquido-expandida, al comparar los sistemas entre sí, nos referiremos en general con el término fase ordenada que considerará las fases gel y líquido-condensada, y la fase desordenada, correspondiente a las fases líquido-desordenada y líquido-expandida, en sus respectivos sistemas.

1.4 Heterogeneidad lateral. Dominios de membrana.

Debido a la diversidad composicional de las membranas, los lípidos se organizan lateralmente de forma no aleatoria y no uniforme, dando lugar a la formación de heterogeneidades de diferente densidad y composición lipídica.¹⁶ Estos “parches” lipídicos que se forman debido a la inmiscibilidad lateral, se denominan dominios de membrana. En sistemas modelo, ya sea en bicapas o en monocapas, se ha observado la presencia de dominios en la región de transición de fase de lípidos puros, o de mezclas de lípidos. Mediante diferentes técnicas de microscopía es posible visualizar la coexistencia de fases, como se muestra en la Figura 1.7.

La presencia de dominios se ha propuesto como un importante factor de control tanto para la actividad de enzimas,^{18,19} como para macromoléculas que interactúan con membranas.²⁰⁻²² El fenómeno de difusión lateral dentro de la membrana, juega un rol clave en muchos aspectos de la vida de la célula, por lo tanto, es importante comprender la física de la difusión lateral en un ambiente tan complejo. Esto requiere considerar tanto el tamaño finito de los dominios de membrana, como la interacción entre los dominios y la entidad que

difunde. El efecto de restricciones geométricas sobre la difusión ha sido estudiado en detalle principalmente por Saxton.²³⁻²⁵

Considerando que las moléculas están insertas en un medio de electrostática no homogénea y de baja constante dieléctrica, nos encontramos ante un escenario complejo en el que la electrostática regula directa e indirectamente la interacción, y por lo tanto los procesos que ocurrirán en este ambiente. En este sentido, experimentos simulados indican que potenciales de interacción de unos pocos $k_B T$ de energía son capaces de confinar la partícula que difunde, con la correspondiente disminución de la dimensionalidad, y de modular la difusión a largo alcance.²⁶⁻²⁸ Si la molécula que difunde es una proteína, sus propiedades electrostáticas quedan definidas tanto por la secuencia primaria como por la secundaria y la terciaria, ya que depende no solamente de la carga puntual sino también de su distribución a lo largo de la molécula²², por lo que el efecto de la electrostática local en la adsorción, inserción y difusión de la proteína será específico para cada proteína en una estructura particular. Este sería un mecanismo altamente selectivo que permitiría que la molécula se mueva relativamente libre o altamente restringida. Una disminución en la dimensionalidad de la difusión, lleva a un aumento importante en la velocidad de las reacciones bioquímicas.²⁹ De esta forma, si consideramos que una molécula con alta atracción por el dominio difundirá en una dimensión y acoplada a la difusión del dominio, mientras que otra con baja interacción difundirá solamente restringida por el obstáculo estérico que el dominio implica, encontraremos que moléculas similares insertas en la misma membrana presentan propiedades dinámicas altamente diferentes.

En cuanto al tamaño, la forma y la distribución de dominios en una membrana (textura de la membrana), se han realizado estudios en monocapas que indican que la densidad superficial de los dominios queda determinada en el proceso de nucleación, que a su vez determina el tamaño promedio de los mismos ya que define el área de captura de cada dominio, a tiempos cortos (segundos).^{30,31} A tiempos más largos (minutos, horas), la fusión de dominios puede ser importante cuando la repulsión inter-dominios es baja.¹¹

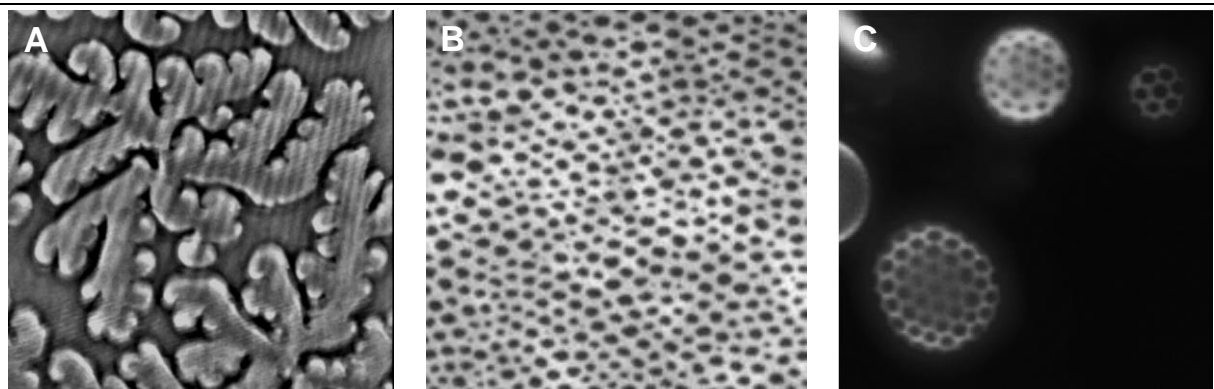


Figura 1.7. Presencia de dominios en sistemas segregados en fases compuestos por diferentes lípidos, y observados por distintas técnicas. (A) Monocapa de Langmuir observada por BAM. (B) Bicapa soportada observada por microscopía de fluorescencia. (C) GUVs observadas por microscopía confocal, (imagen extraída de la referencia 32).

La forma del dominio depende del tamaño del dominio relativo a un tamaño crítico que, en el caso de formas de equilibrio, depende de la tensión de línea y de la repulsión intermolecular dentro del dominio³³, mientras que para formas fuera del equilibrio, dependerá de la velocidad de formación del dominio relativa a la velocidad de migración las moléculas hacia el dominio que se está formando.^{34,35} Si bien se ha propuesto que, a diferencia de lo observado en monocapas, en bicapas la repulsión electrostática intermolecular sería despreciable³², y por lo tanto, la fusión de los dominios sería más rápida, existen pocos reportes tendientes a comparar sistemáticamente la texturas de monocapas con las de bicapas,³⁶⁻³⁸ lo que motiva uno de los principales objetivos de esta Tesis, como se detalla en la siguiente sección.

1.5 Objetivos.

En el laboratorio de trabajo se ha observado que el efecto de cada fase en coexistencia sobre las propiedades del sistema, depende del porcentaje en área de cada fase. La mayor parte de los estudios del grupo de investigación previos a este trabajo de Tesis, se enfocaron en sistemas formados por monocapas de moléculas dipolares neutras y cargadas. Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, se abarcó también el estudio de bicapas con diferentes texturas, y propiedades dinámicas.

La utilización de diferentes modelos de membrana permite controlar distintas variables. En las monocapas de Langmuir (*LMs*) se puede variar la densidad molecular mientras se registran la tensión superficial y el potencial de superficie, y la membrana puede ser observada en simultáneo por microscopía de ángulo de Brewster (BAM) o microscopía de fluorescencia (FM). Mediante la utilización de esta última técnica, se pueden visualizar vesículas unilamelares gigantes (GUVs) y estudiar las deformaciones fuera del plano de la membrana. Por otra parte, las bicapas planas *free-standing* facilitan los estudios de permeabilidad y de seguimiento de partícula única, pero poseen menor estabilidad que las vesículas. Las bicapas soportadas poseen la ventaja de que pueden ser caracterizadas mediante la utilización de técnicas de alta resolución y sensibilidad, como microscopía de fuerza atómica, difracción de rayos X, reflectividad de neutrones, y microbalanza de cristal de cuarzo.¹¹ De esta manera, cada modelo posee ciertas ventajas y desventajas, y, dependiendo de la pregunta que se quiera responder se deberá escoger cuál es el más apropiado para tal fin. Para ello, es esencial conocer la influencia que tienen las condiciones de preparación sobre el film lipídico, que determinarán la validez de los resultados obtenidos con cada modelo.

En biofísica, se utilizan indistintamente diferentes modelos experimentales para estudiar fenómenos que ocurren en las membranas biológicas, sin embargo, existen pocos estudios tendientes a comparar los resultados obtenidos con los diferentes modelos entre sí, como se explicó anteriormente. De esta manera, surge el objetivo general de la presente Tesis Doctoral, que consiste en comparar las propiedades de membranas lipídicas organizadas en diferentes modelos de monocapas y bicapas, investigando el efecto de la densidad dipolar y el estado de ionización de las moléculas que forman el dominio lipídico.

Adicionalmente, se establecen los siguientes objetivos específicos:

- ❖ Comparar el diagrama de fases de mezclas lipídicas entre diferentes modelos de membrana, investigando el origen de las posibles diferencias observadas.
- ❖ Analizar el efecto de las interacciones electrostáticas en bicapas comparadas con monocapas.
- ❖ Evaluar los factores que determinan la textura en bicapas.

En el próximo capítulo, se incluyen detalles sobre los modelos experimentales utilizados, así como las técnicas empleadas para la recopilación y el análisis de la información. Posteriormente, se exponen los resultados obtenidos, y las conclusiones a las que se arribaron a partir de la interpretación de los mismos.

"Dijo Tennyson que si pudiéramos comprender una sola flor
sabríamos quiénes somos y qué es el mundo."

J. L. Borges, El Aleph.

Capítulo 2: Materiales y Métodos.

2.1 Modelos y metodologías empleadas. Fundamentos teóricos.

2.1.1. Monocapas de Langmuir en la interfase agua-aire.

Esta técnica fue inicialmente implementada por la científica alemana Agnes Pockels, quien diseñó la cuba que se emplea actualmente. En 1891, con la ayuda de Lord Rayleigh publicó en la revista Nature sus experimentos sobre tensión superficial que llevaba a cabo en su casa.³⁹ Posteriormente, en 1917 trabajando en la empresa General Electric, Irving Langmuir perfeccionó esta técnica, y por sus investigaciones sobre la química de superficies, fue galardonado con el Premio Nobel en 1932. A partir de sus estudios, la cuba que se utiliza se denomina cuba de Langmuir y a los films lipídicos en la interfase agua-aire, monocapas de Langmuir. Fundamentalmente, la técnica se basa en la optimización energética de moléculas anfipáticas en la interfase agua-aire, las cuales orientan sus cadenas hidrocarbonadas hacia el aire y sus grupos polares al medio acuoso (ver Figura 2.1A). De esta manera, cuando lípidos anfipáticos son disueltos en un solvente volátil insoluble en agua y se deposita la solución sobre una superficie acuosa con ayuda de una microjeringa, la misma se esparce hasta ocupar toda el área disponible. Así, el film resultante (de una molécula de espesor) provee un sistema modelo útil para estudiar las interacciones de empaquetamiento lateral de los lípidos en cada hemicapa de una membrana biológica.¹⁷

Al ubicarse en la interfase agua-aire, los lípidos se comportan como surfactantes, ya que producen una disminución de la energía libre de superficie. Esta energía libre puede cuantificarse mediante medidas de tensión superficial, γ . La tensión superficial del agua se encuentra alrededor de los 73 mNm^{-1} a $20 \text{ }^\circ\text{C}$, el cual es un valor excepcionalmente alto comparado con otros líquidos, y convierte al agua en una excelente subfase para estudios de monocapas.

Cuando el área disponible para la monocapa es grande, las interacciones entre las moléculas de lípidos son débiles, debido a la gran distancia existente entre ellas. Bajo estas condiciones, la monocapa puede ser considerada como un gas en dos dimensiones, y su efecto sobre la tensión superficial del agua es pequeño. Al reducir el área superficial disponible para la monocapa, se produce un aumento en la concentración de las moléculas por unidad de área, que se traduce en una disminución de la energía libre de superficie (tensión

superficial). De esta manera, la presión superficial, π , se define como un análogo en dos dimensiones de la presión, dado por la siguiente relación:

$$\pi = -\Delta\gamma = \gamma_0 - \gamma \quad \text{ec. 2.1}$$

Donde γ_0 es la tensión superficial en ausencia de monocapa, y γ es el valor que toma la tensión superficial cuando hay una monocapa presente en la interfase. Las unidades usualmente empleadas para expresar la presión superficial son mNm^{-1} (mili Newton por metro).

El área superficial de la monocapa puede controlarse mediante la utilización de un sistema de barreras como se muestra en la Figura 2.1B. La cuba que contiene la subfase puede controlarse térmicamente por circulación de agua en canales colocados debajo de la misma. La variación de la presión superficial durante el proceso de compresión, se mide mediante el método de placa de Wilhelmy. Por otra parte, también es posible variar la velocidad de la compresión.

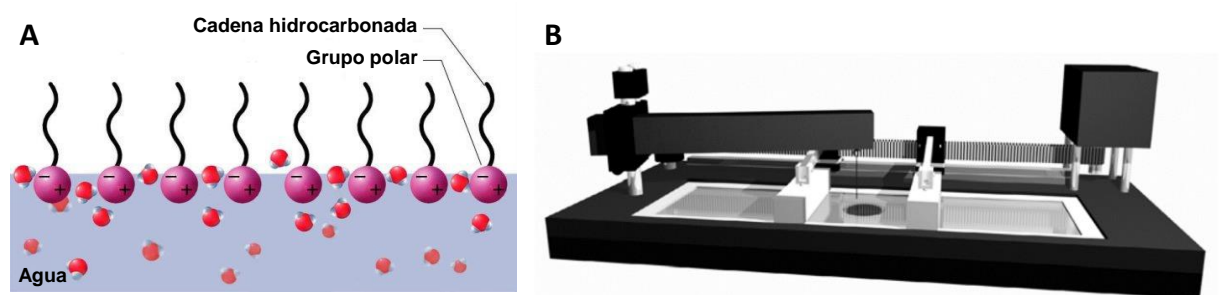


Figura 2.1. (A) Esquema de la orientación de lípidos anfipáticos en la interfase agua-aire. (B) Balanza de Langmuir utilizada para medir y controlar la presión superficial de una monocapa lipídica (adaptada de ref. 13).

En su configuración más básica, con la balanza se mide la presión superficial en función del área de subfase disponible para una cantidad conocida de moléculas de lípidos anfipáticos. La medición se realiza a temperatura constante, y el gráfico obtenido se conoce como isoterma de presión superficial-área. Usualmente, las isotermas se obtienen por compresión de la monocapa (reduciendo el área con las barreras) a velocidad constante mientras se monitorea la presión superficial. Durante la compresión, la isoterma puede presentar discontinuidades que indican transiciones de fases que difieren en su empaquetamiento lateral, como se explicó en el capítulo anterior, y se ejemplifica en la Figura 2.2. Así, existen cuatro estados diferentes: gaseoso (G), líquido expandido (L_1), y dos estados condensados de distinta compresibilidad, el líquido condensado, L_2 y el sólido, S. Los dos estados más frecuentemente observados en monocapas, L_1 y L_2 , que llamaremos desordenado y ordenado, son, con ciertas simplificaciones, homologables al líquido-cristalino y gel en bicapas, respectivamente.

El comienzo de las transiciones de fase es dependiente de la temperatura; a mayores temperaturas, la transición se produce a valores de presión superficial más altos.

Eventualmente, la monocapa alcanza un punto de colapso, en el que se forman estructuras tridimensionales, caracterizado por una rápida disminución de la presión superficial o un quiebre horizontal de la isoterma.^{17,40}

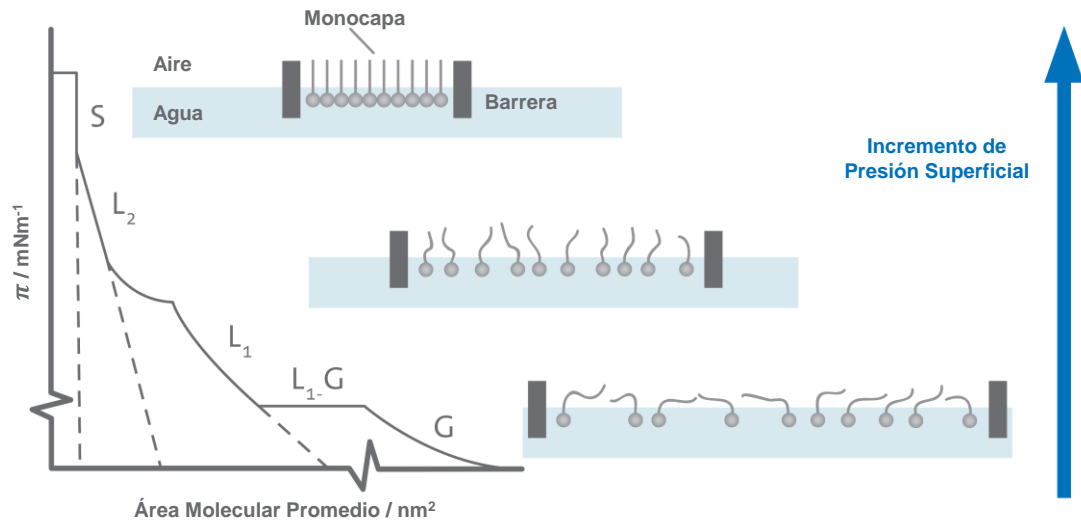


Figura 2.2. Isoterma de presión superficial vs. área molecular promedio. Se muestran distintos estados de fase conforme π aumenta: gaseoso, líquido-expandido, y líquido-condensado (adaptada de ref. 41).

Las isotermas de compresión realizadas en esta tesis se llevaron a cabo a (21 ± 1) °C sembrando la mezcla de interés en una cuba marca KSV minitrough (KSV NIMA) y utilizando velocidades de compresión entre $1-5 \text{ \AA}^2 \text{ molec}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Cada isoterma fue repetida al menos tres veces, siendo la diferencia en la presión superficial y área molecular promedio entre las isotermas de experimentos independientes menor a $0,5 \text{ mNm}^{-1}$ y 2 \AA^2 , respectivamente. En el caso de las monocapas visualizadas por microscopía de fluorescencia (ver sección 2.2.2), se utilizó una balanza de Langmuir marca Kibron, acoplada a la platina de un microscopio invertido.

2.1.1.A. Miscibilidad de componentes en monocapas.

Usualmente, se desean conocer las interacciones laterales en monocapas compuestas de más de una especie química. Si los componentes de la mezcla fueran completamente inmiscibles, podría considerarse que las propiedades de la monocapa resultante corresponden a una suma proporcional de las propiedades de los componentes individuales. Así, el área ocupada por la película debería ser equivalente a la adición ponderada de las áreas de cada monocapa por separado a una dada presión superficial:

$$A_{12} = x_1 a_1 + x_2 a_2 \quad \text{ec. 2.2}$$

donde A_{12} es el área promedio de la monocapa de la mezcla lipídica, x_1 y x_2 son las fracciones molares de cada componente, y a_1 y a_2 las respectivas áreas moleculares para monocapas de los componentes puros a la misma presión superficial.

Por otro lado, si los componentes se mezclaran idealmente (interacciones en la mezcla iguales a las que existen en los sistemas puros, y entropía de mezcla ideal), el área de mezcla también seguiría la ecuación 2.2. De esta manera, al graficar A_{12} en función de x_1 para una mezcla ideal o para un sistema que no se mezcla, deberíamos obtener una línea recta. Cualquier desviación de esta relación, indicaría inmiscibilidad de los componentes, o bien, mezcla parcial o total con interacciones no ideales.^{17,40,42}

2.1.2. Membranas Soportadas.

2.1.2.A. Monocapas y bicapas soportadas a partir de monocapas de Langmuir.

Las monocapas generadas en balanzas de Langmuir pueden ser transferidas a soportes sólidos mediante la utilización de técnicas para preparar multicapas altamente organizadas del anfífilo.

En 1920, Langmuir describió el proceso de transferencia de una monocapa a una superficie sólida, elevando verticalmente el soporte previamente sumergido a través de la interfase. No obstante, la primera descripción detallada de la transferencia secuencial de monocapas fue dada años después, por su asistente y colaboradora, Katherine Blodgett, y es así que, debido a sus contribuciones, estas monocapas ensambladas son conocidas como películas de Langmuir-Blodgett (LB).^{17,42}

Si la monocapa está bajo una presión superficial tal que las moléculas se encuentren lo suficientemente cercanas unas de otras, y el sólido se encuentra limpio y posee afinidad (“es mojado”) por la subfase, la monocapa se transfiere cuantitativamente al sólido, como se esquematiza en la Figura 2.3A. Debido a que el proceso posee alta dependencia con la presión superficial, es necesario mantenerla constante durante la transferencia del film. La técnica de Langmuir-Blodgett se aplica a sustratos hidrofílicos, y permite la obtención de monocapas soportadas (*SLMs*), que son estables en contacto con el aire.^{17,42} La cantidad y calidad de la monocapa depositada sobre un soporte sólido puede aproximarse mediante el cálculo de la relación de transferencia (R_t), que se define como el cociente entre la diferencia de área correspondiente a la transferencia (la altura del “escalón” en la curva de área, ver región entre flechas rojas en Figura 2.3C) y el área del sustrato. De esta manera, para una transferencia ideal, $R_t=1$.

En 1938, Vincent Schaefer modificó el método de Langmuir-Blodgett con el objetivo de transferir una monocapa a un sustrato hidrofóbico, el cual sólo difiere del anterior en que el

material hidrofóbico es deslizado horizontalmente hasta hacer contacto con la monocapa, y luego se lo hace atravesar la subfase, quedando sumergido. Debido a ello, este método se denomina transferencia de Langmuir-Schaefer (LS). Mediante la combinación de las técnicas de LB y LS, es posible obtener bicapas soportadas (SLBs), ya que la primera monocapa transferida por LB convierte al soporte en una superficie hidrofóbica, debido a la exposición de las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos hacia el aire, y posteriormente una transferencia por LS unirá a la segunda hemicapa con la inicial mediante sus cadenas hidrocarbonadas (ver Figura 2.3B), debiendo el sistema permanecer sumergido.^{17,42}

Se ha demostrado que existe una película de agua estructurada, de hasta 5 nm entre el sólido y los grupos polares de los fosfolípidos de la hemicapa proximal (la primera que se transfiere y está en contacto con el sólido), la cual varía en su espesor dependiendo de la naturaleza del soporte así como del tratamiento previo que se realice sobre el mismo (prelavados con solventes químicos, incubados, etc, los cuales modifican la rugosidad y la hidrofiliidad de la superficie del sólido).^{43–45}

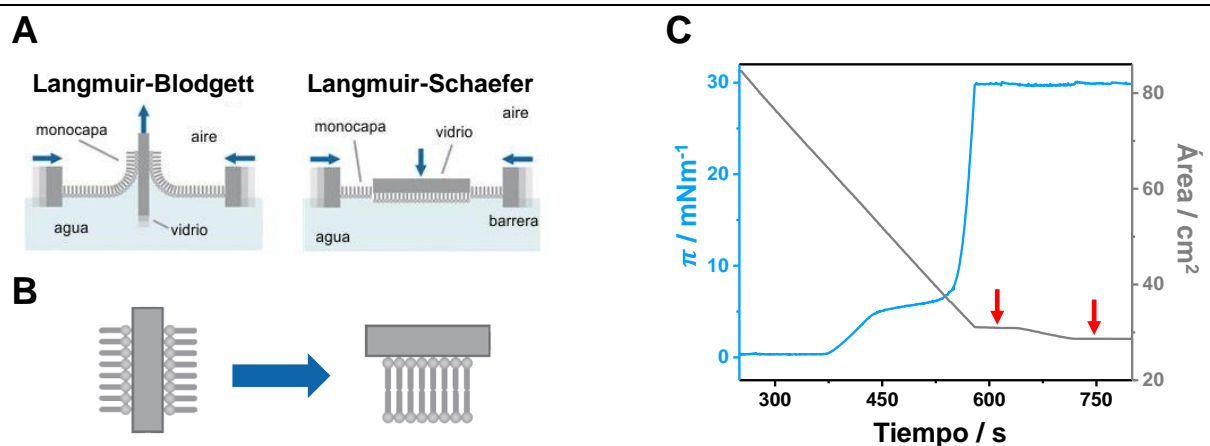


Figura 2.3. (A) Esquemática de los métodos de transferencia de Langmuir-Blodgett y Langmuir Schaefer. (B) Si LB-LS se llevan a cabo de forma sucesiva, es posible obtener bicapas soportadas. (C) La transferencia se lleva a cabo a presión constante. El ejemplo mostrado corresponde a los gráficos de compresión (azul), y de disminución del área (gris), en función del tiempo, para la transferencia de una monocapa de la mezcla DPPC:DLPC 75:25 a 30 mNm^{-1} sobre vidrio. A partir del cambio en área observado (se marca el área inicial y final con flechas) es posible calcular la eficiencia de la transferencia.

2.1.2.B. Bicapas soportadas formadas por la ruptura de vesículas (SVRs).

Otra manera de generar bicapas soportadas es mediante la ruptura de vesículas sobre sólidos (SVRs), como se esquematiza en la Figura 2.4. Al poner en contacto una suspensión de vesículas con un soporte hidrofílico las mismas se adsorben inicialmente al sólido, luego se rompen perdiendo su contenido, y finalmente forman una bicapa sobre la superficie. En trabajos teóricos, Seifert y Lipowsky^{46–48} postularon que la ruptura de una vesícula adsorbida depende de su tamaño: si la vesícula es más chica que un radio crítico, no se romperá. Dicho

radio crítico está determinado por el balance entre las interacciones favorables de adhesión y la energética desfavorable, provocada por la tensión de línea del disco de bicapa resultante. La escala temporal del proceso de fusión (unión de dos o más vesículas para formar una única vesícula) de vesículas unilamelares pequeñas (*SUVs*) se encuentra en el orden de horas ($k=0,0017 \text{ h}^{-1}$ para vesículas de DMPC a $36 \text{ }^\circ\text{C}$)⁴⁹. Sin embargo, se postula que la velocidad de fusión se ve incrementada por la adhesión al sustrato.⁴⁷ De esta manera, se espera que la formación de bicapas mediante la fusión de vesículas dependa del tamaño, y se propone que ocurre en cuatro pasos principalmente: adsorción de una vesícula, fusión de vesículas sobre la superficie para formar vesículas de mayor tamaño, ruptura de las vesículas para formar discos lamelares sobre la superficie, y la unión de diferentes discos.

El proceso de adsorción de las vesículas al sólido es esencialmente irreversible y está controlado por difusión.⁵⁰ Si la vesícula adsorbida posee un tamaño menor al radio crítico, permanecerá intacta sobre la superficie. El contacto con otra vesícula intacta permitirá la fusión de las mismas. Así, este proceso continuará hasta que la vesícula posea un tamaño mayor al radio crítico, punto en el cual se romperá y formará un disco de bicapa. Eventualmente, la unión entre distintos discos de bicapas resultará en el cubrimiento completo de la superficie.

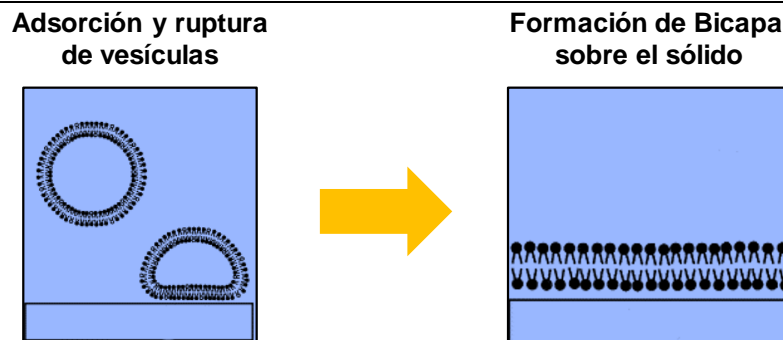


Figura 2.4. Ilustración del método de obtención de bicapas soportadas mediante la ruptura de vesículas.

2.1.3. Bicapas *free-standing*.

2.1.3.A. Vesículas unilamelares.

La formación de vesículas lipídicas artificiales por medio de la dispersión de lípidos en un medio acuoso, fue descrita inicialmente en 1965 en Cambridge, por Bangham y colaboradores.⁵¹ Debe tenerse en cuenta que si bien estas dispersiones acuosas pueden prepararse con distintos tipos de lípidos anfipáticos, como las fosfatidilcolinas por ejemplo, existen restricciones geométricas y termodinámicas que impiden que todos los lípidos formen esta mesofase esméctica lamelar.²

Existen diversos métodos para obtener vesículas formadas por una única bicapa lipídica (liposomas), y éstos varían según el tamaño. Los métodos de hidratación consisten fundamentalmente en partir de una solución de lípidos en solvente orgánico, y luego de una evaporación lenta y rotatoria de la cual se obtiene el lípido sólido en forma de una fina película adherida a las paredes del recipiente, se agrega agua o soluciones salinas, y se agita mecánicamente. La temperatura debe encontrarse por encima de la temperatura de transición del lípido o de la mezcla de lípidos que se esté utilizando.² Mediante la utilización de sistemas de extrusión, es posible generar vesículas de un dado tamaño promedio, generalmente entre 100-500 nm de diámetro, denominadas vesículas unilamelares grandes (*LUVs*). Mediante sonicación se pueden fragmentar los liposomas para formar vesículas muy pequeñas (*SUVs*) de 20-60 nm.

En la década de los 80' Angelova y Dimitrov⁵² lograron obtener vesículas unilamelares de gran tamaño (*GUVs*) 5-50 μm , mediante un método de electroformación consistente en la aplicación de un campo eléctrico continuo durante la hidratación de los lípidos. Años después, descubrieron que utilizando corriente alterna era posible obtener un rango más amplio de tamaños.⁵³ Hoy en día es uno de los modelos de membrana más populares y utilizados, debido a que su tamaño es similar al de una célula, y al ser visibles por microscopía óptica, permiten el estudio de propiedades mecánicas, de permeación, la segregación de fases de mezclas lipídicas, la textura de la bicapa, entre otros.

2.1.3.B. Bicapas planas sobre grillas de oro.

En 1972, Montal y Mueller idearon un método para obtener bicapas *free-standing* a partir de monocapas de Langmuir.⁵⁴ El mismo, consiste en un arreglo experimental que añade un tabique móvil a la cuba de Langmuir en el cual se ubica una lámina de teflón (u otro material hidrofóbico) con un orificio que suele variar entre 50-100 μm de diámetro, como muestra la Figura 2.5A. De esta manera, la monocapa de interés se forma previamente y es mantenida a presión constante a medida que se desplaza el tabique hacia abajo de forma perpendicular al plano de la monocapa. Una vez que el orificio se encuentra cercano a la subfase, las monocapas a ambos lados del tabique se transfieren al material hidrofóbico y se encuentran en la región del orificio dando lugar a la formación de una bicapa lipídica como se ilustra en la Figura 2.5B. Una vez formada la bicapa, permanece sumergida en la fase acuosa.

Esta técnica posee la ventaja de que permite evitar los efectos que pueda ocasionar la presencia de un soporte sólido, y en adición, posibilita la creación de bicapas asimétricas composicionalmente, la cual es una característica de la mayoría de las membranas celulares. Por otra parte, la principal crítica a este método se basa en que se requiere un

preacondicionamiento del tabique con un solvente orgánico, usualmente decano o hexadecano,⁵⁵ de manera de satisfacer las condiciones de contorno necesarias para que la transferencia sea efectiva.⁵⁶ No obstante, se ha demostrado que el solvente se excluye de la membrana debido a un gradiente de tensión superficial, formando un anillo alrededor de la bicapa, denominado anillo de Plateau-Gibbs.^{57,58}

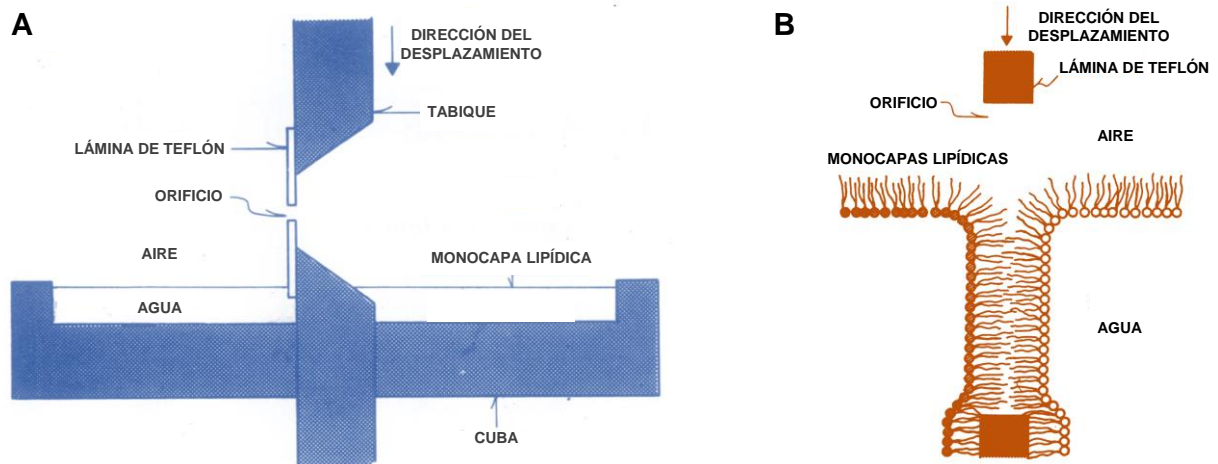


Figura 2.5. Ilustración del método de Montal y Mueller para la formación de bicapas *free-standing* a partir de monocapas lipídicas en la interfase agua-aire. **(A)** Arreglo experimental: el tabique puede moverse de forma normal al plano de la monocapa. **(B)** Esquematación de la formación de la bicapa en el orificio de la lámina de teflón. (Figura adaptada de la referencia 54).

Al principio del proceso de transferencia de las monocapas, las moléculas anfipáticas forman una monocapa en la interfase entre el solvente orgánico y el agua. Luego, las fuerzas de adhesión producen que el solvente migre hacia el sustrato hidrofóbico formando el anillo de Plateau-Gibbs. En consecuencia, el film comienza a disminuir su espesor, y por debajo de los 100 nm, las interacciones de Van der Waals comienzan a dominar la formación del film bimolecular.⁵⁸ El proceso de formación de la bicapa se muestra en la Figura 2.6. Es posible conectar electrodos a ambos lados del compartimiento conteniendo la membrana de manera de medir las propiedades eléctricas de la misma. De esta forma, mediante mediciones de capacitancia se puede calcular el espesor del film y su variación desde el momento inicial de su formación (ver Figura 2.6B).

Este modelo de membrana recibe el nombre de *black lipid membranes (BLMs)* debido a que al formarse el film bimolecular (bicapa lipídica) su espesor determina la interferencia destructiva de las ondas de luz, de manera de que si el sistema es observado desde un determinado ángulo, se ve opaco. Por otra parte, apenas se forma el film, y debido a su gran espesor, la luz se refracta en una variedad de colores al igual que los que se observan en una burbuja de jabón.⁵⁹

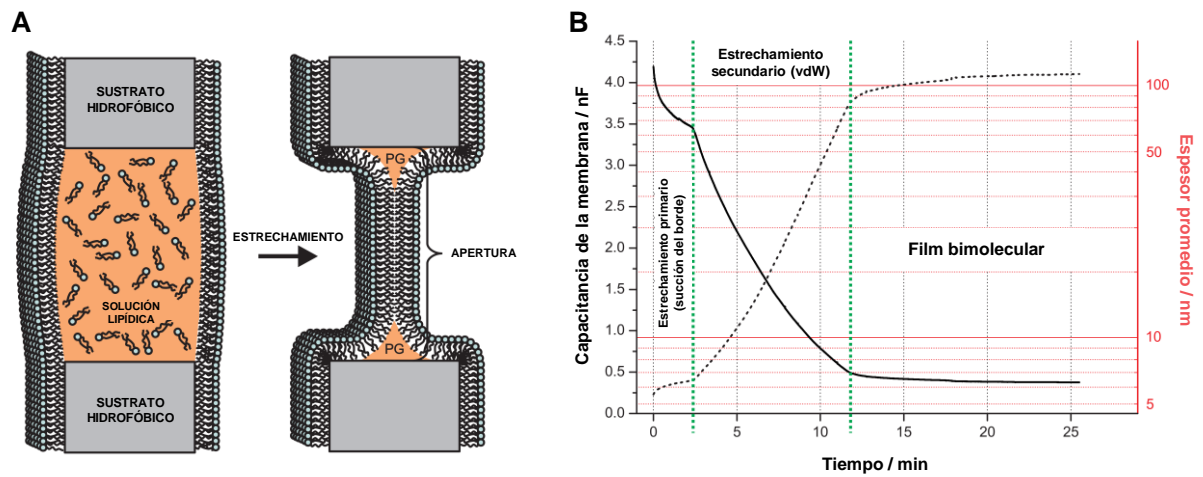


Figura 2.6. (A) Esquemática del proceso de disminución del espesor del film y formación del anillo de Plateau-Gibbs. (B) Mediciones de capacitancia (línea punteada) y del espesor del film (línea continua) vs tiempo, que muestran claramente el estrechamiento del film en dos regímenes, finalizando con la formación de la bicapa. (Figura adaptada de ref. 58).

En esta Tesis, se utilizó una variación de las *BLMs* ideada por Harland y col.⁶⁰, la cual consiste en reemplazar la lámina de teflón con un orificio, por una grilla de oro, comúnmente utilizada para microscopía electrónica de barrido, recubierta por alcanotioles. De esta manera, en un único experimento se obtienen varias bicapas, ya que las grillas poseen numerosas perforaciones, como se muestra en la Figura 2.7.

Debido a que se trata de bicapas planas, este modelo es ideal para estudiar la textura y las propiedades dinámicas de la membrana.

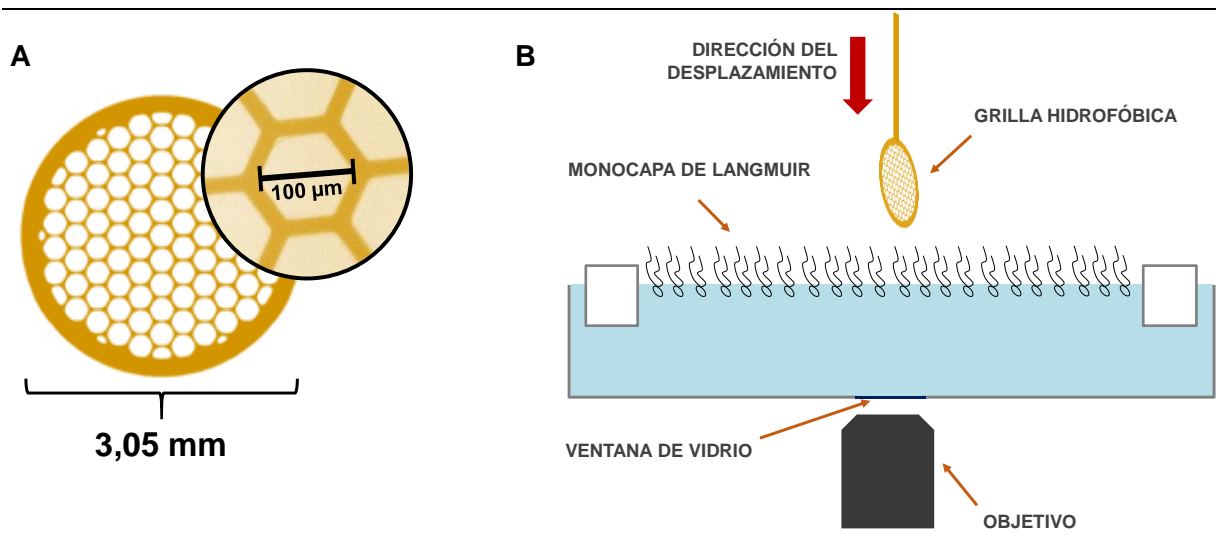


Figura 2.7. (A) Grillas de oro con perforaciones hexagonales utilizadas para la generación de bicapas planas *free-standing*. (B) Esquema del arreglo experimental utilizado que permite el ensamble y la observación *in-situ* de las bicapas formadas.

2.1.3.B.I Acoplamiento de dominios en bicapas planas.

La separación en fases ordenadas y desordenadas en un modelo simétrico de membrana, usualmente se produce con las regiones de fase segregadas en registro,⁶¹ lo que significa que los dominios se expanden ocupando las dos hemicapas⁶²⁻⁶⁵ (dominios acoplados, ver Figura 2.8). No obstante, se han observado dominios desacoplados bajo ciertas condiciones en bicapas *free-standing*⁶⁶ y como resultado de la interacción con el soporte en membranas inmovilizadas sobre sólidos.^{67,68} En el sistema de bicapas planas sobre grillas presentado aquí, generalmente los dominios aparecen acoplados, y permanecen en registro durante la duración de los experimentos. Sin embargo, en algunos casos aislados se observaron dominios desacoplados (probablemente debidos a errores experimentales) como se muestra en la Figura 2.8. El nivel de gris para dominios acoplados es homogéneo, pero al estar desacoplados, los dominios aparecen con diferentes intensidades de gris, siendo más claros al encontrarse en la hemicapa más distal respecto del objetivo del microscopio, y más oscuros en la hemicapa proximal. Al coincidir en una misma región, los dominios aparecen más oscuros, como puede observarse en la Figura 2.8.

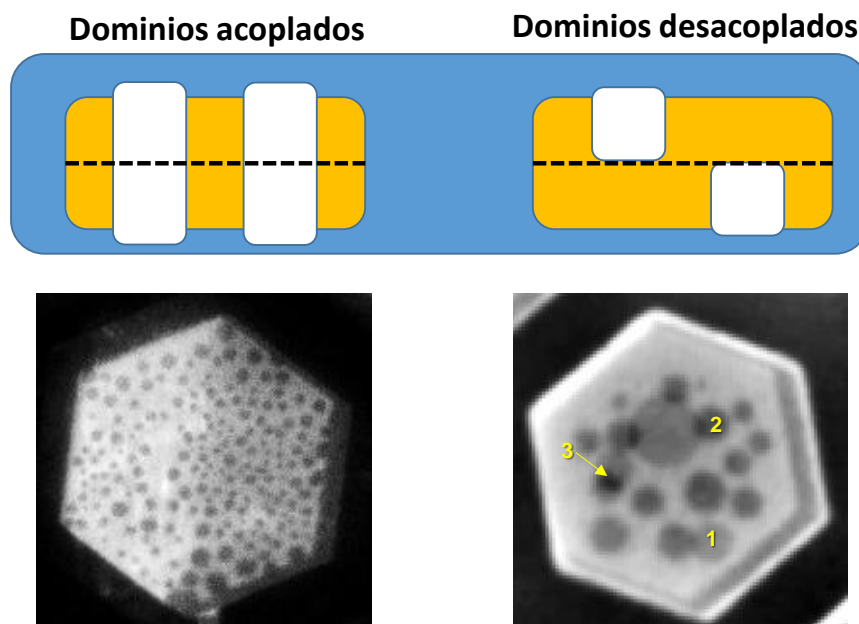


Figura 2.8. Izquierda: todos los dominios se encuentran acoplados, sólo se observan dos niveles de grises (fase ordenada y desordenada). Derecha: los dominios están desacoplados, se observan al menos tres niveles de grises. El gris más claro corresponde a la fase desordenada en ambas hemicapas, los dominios de la hemicapa distal respecto al objetivo aparecen de un gris ligeramente más oscuro (1), los dominios de la hemicapa proximal muestran un gris más oscuro que el anterior (2), y finalmente, el nivel de gris más oscuro corresponde a las regiones de contacto entre dos dominios (3) en las distintas hemicapas.

2.2 Técnicas de caracterización superficial y análisis de imágenes.

2.2.1. Microscopía de Ángulo de Brewster (BAM).

Esta técnica se basa en las propiedades de reflectividad de la luz en interfaces. Su empleo permite el estudio de películas monomoleculares muy delgadas, del orden de los nanómetros, y se pueden discriminar fases distintas en monocapas de Langmuir en función de su diferencia de espesor y/o índice de refracción.

Cuando un haz de luz incide en una interfase (I_0), una parte es reflejada (I_R). La reflectividad (R) es la relación entre la intensidad reflejada y la incidente:

$$R = \frac{I_R}{I_0} \quad \text{ec. 2.3}$$

Para una interfase de Fresnel, es decir una interfase entre dos medios isotrópicos en la cual el índice de refracción cambia abruptamente de n_1 (índice de refracción del medio incidente), a n_2 (el índice de refracción del segundo medio), la reflectividad está dada por las fórmulas de Fresnel⁶⁹; una, correspondiente a la polarización p del haz incidente (campo eléctrico en el plano de incidencia):

$$R_{P=}^F = \left(\frac{\tan(\theta_i - \theta_r)}{\tan(\theta_i + \theta_r)} \right)^2 \quad \text{ec. 2.4}$$

y la otra, dada para una polarización s del haz incidente (campo eléctrico perpendicular al plano de incidencia):

$$R_S^F = \left(\frac{\text{sen}(\theta_i - \theta_r)}{\text{sen}(\theta_i + \theta_r)} \right)^2 \quad \text{ec. 2.5}$$

donde θ_i y θ_r representan los ángulos de incidencia y refracción, respectivamente.

La Figura 2.9 muestra las reflectividades R_p^F y R_s^F como función del ángulo de incidencia, para $n_1 = 1$ (índice de refracción del aire) y $n_2 = 1,33$ (índice de refracción del agua). El ángulo en el que la reflectividad de la luz con polarización (p) cae a cero, es denominado ángulo de Brewster. Así, cuando la luz de polarización (p) incide con $\theta = 53^\circ$ sobre agua pura, no se produce reflexión del haz, y la imagen superficial que se observa es negra. Si existe una monocapa en la interfase, el índice de refracción local y el espesor se modifican, y una parte del haz es reflejada, dando lugar a una imagen que contendrá regiones con distinto brillo dependiendo de las moléculas presentes y de su densidad de empaquetamiento.⁶⁹ Generalmente, mientras más ordenada sea una fase, mayor reflectividad

tendrá, debido a su mayor espesor y menor índice de refracción, y en las imágenes tomadas por BAM, se visualizará dicha fase de un color gris claro (ver Figuras 1.7A y 3.2).

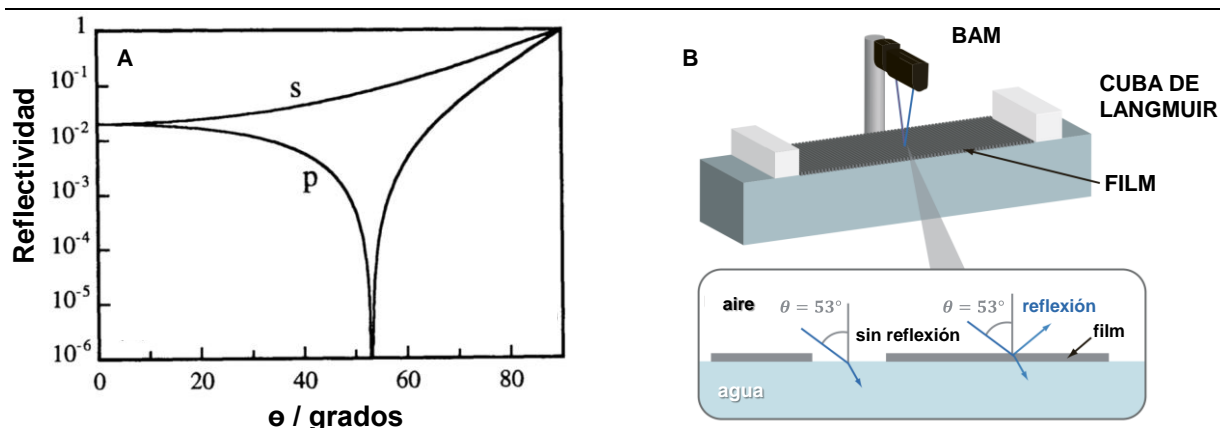


Figura 2.9. (A) Reflectividad en función del ángulo de incidencia para la interfase aire-agua. El ángulo de Brewster corresponde a $\theta=53^\circ$. (B) Esquema de la técnica.

Las monocapas de Langmuir fueron observadas por BAM utilizando un Elipsómetro EP3 (Accurion) con objetivo 20X. Mediante el uso de esta técnica, se controló que las sondas fluorescentes utilizadas para realizar los experimentos por microscopía de fluorescencia no modificaran el comportamiento de las fases en coexistencia, como se explica en el próximo capítulo.

2.2.2. Microscopía de Fluorescencia (FM).

Debido a que la técnica de BAM sólo permite visualizar sistemas confinados que posean un cambio abrupto en el índice de refracción de los medios que forman la interfase, sólo es útil para la observación de monocapas de Langmuir en la interfase agua-aire. Mediante la inclusión de una baja proporción (0,5-1 %mol) de un lípido que contiene un grupo fluoróforo en la mezcla de interés, es posible evidenciar la coexistencia de fases en todos los modelos de membrana utilizados en este trabajo. Estas sondas fluorescentes anfipáticas generalmente poseen grupos fluoróforos voluminosos (rodamina, o Dil, ver Figura 2.10) por lo que particionan preferencialmente en la fase menos compacta. De esta manera, la fase más desordenada será más brillante, mientras que la fase ordenada se visualizará oscura, en oposición al contraste que se observa por BAM (ver Figuras 1.7 B,C y 3.3 B,C). Una ventaja que posee esta técnica, es que permite tomar imágenes secuenciales durante un período de tiempo variable. Los videos obtenidos para esta tesis constan típicamente de 100-250 imágenes tomadas cada 0,1 segundos.

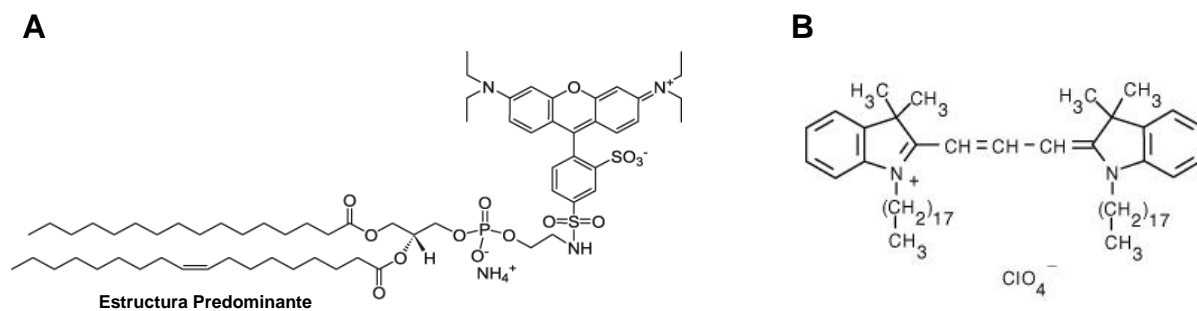


Figura 2.10. Lípidos fluorescentes utilizados: **(A)** L- α -fosfatidiletanolamina-N-(lisamina rodamina B sulfonil) (Sal de amonio) (Transfosforilada de huevo de gallina); PE-Rho. Al tratarse de una mezcla en las que el largo y la insaturación de las cadenas puede variar, se muestra la estructura que predomina mayoritariamente. **(B)** 1,1'- α -dioctadecil-3,3',3'-tetrametilindocarbocianina perclorato; DiI C18.

El microscopio de fluorescencia utilizado, un microscopio *Axiinvert 200* (Carl Zeiss), está equipado con una cámara de video *CCD iXON* (Andor) y objetivos de larga distancia 20X, 40X y 100X. Para observar las *GUVs*, se utilizó un microscopio confocal *Olympus FV 300*. Los mismos, forman parte del equipamiento perteneciente al Centro de Microscopía Óptica y Confocal de Avanzada, CONICET-Universidad Nacional de Córdoba.

2.2.3. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM).

Para superar la resolución óptica, se requieren técnicas de caracterización superficial de mayor complejidad, como es el caso de la microscopía de fuerza atómica. El microscopio de fuerza atómica posee un dispositivo denominado cantiléver que consta de una punta muy fina de alrededor de 10 nm de diámetro adherida a un soporte flexible de 100-200 μm de largo. A medida que la punta se mueve sobre la muestra, se generan fuerzas que hacen que el soporte se doble, lo cual se detecta mediante un haz de luz láser que ilumina el soporte, y se refleja sobre un detector de posición.⁷⁰ De esta manera, cuando se produce una deflexión del cantiléver por las irregularidades superficiales de la muestra, el haz de luz se desvía, y ese cambio se traduce en una imagen. Así, se puede obtener la topografía de una muestra con una resolución vertical nanométrica, mientras que la resolución horizontal dependerá del tamaño de la punta utilizada. En la Figura 2.11A se muestra un esquema de la técnica.

Un requisito indispensable para realizar experimentos con esta técnica, es que la muestra esté fija, por lo que en el caso de las membranas sólo servirá para estudiar membranas confinadas a un sólido, como puede observarse en el ejemplo de la Figura 2.11B. Cabe mencionar que, en contraste a la alta resolución espacial que esta técnica posee, su resolución temporal es baja, del orden de minutos.¹⁶

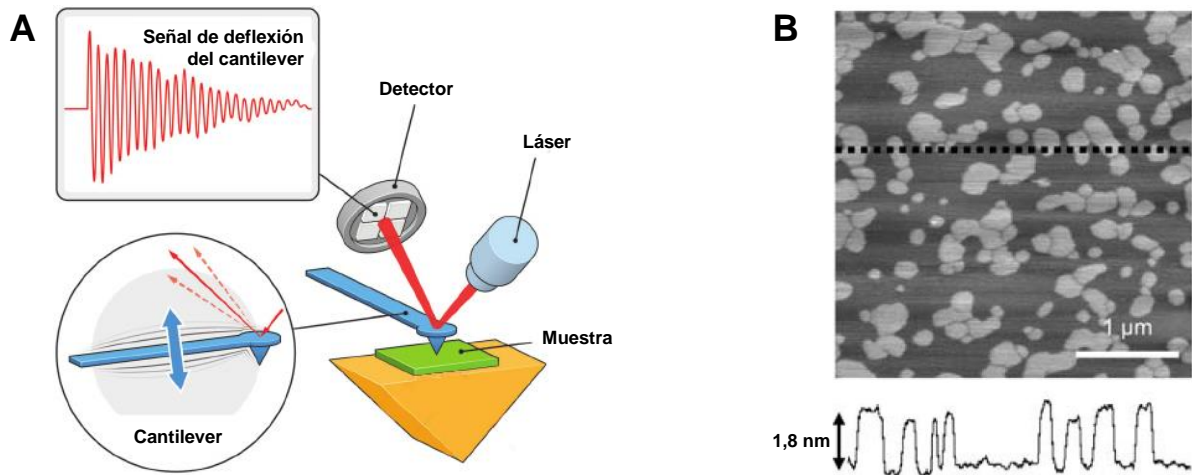


Figura 2.11. (A) Ilustración de los principios básicos de la microscopía de fuerza atómica. **(B)** Bicapa soportada de una mezcla de diesteroilfosfatidilcolina (DSPC) y dilauroilfosfatidilcolina (DLPC), formada a partir de la ruptura de *SUVs*. La imagen muestra dominios más claros con un espesor de aproximadamente 1,8 nm respecto de la fase desordenada. (Adaptada de ref. 35 y 36).

Se utilizó un microscopio *Innova* (Bruker) para la obtención de imágenes en modo *tapping* utilizando una punta de silicón con una constante de resorte de 40 Nm^{-1} y frecuencia de resonancia de 300 kHz. Este arreglo experimental, permite tomar imágenes en muestras secas en aire, por lo que sólo se analizaron *SLMs* mediante esta técnica, como se muestra en el capítulo siguiente. Los experimentos de AFM se realizaron en el Centro de Metrología (CEMETRO, UTN, Córdoba).

2.2.4. Segmentación y análisis de imágenes obtenidas por microscopía.

Para el trabajo con imágenes se utilizó el programa de libre distribución *Image J*. Tanto para imágenes adquiridas por BAM o FM, el tratamiento es similar. A continuación, se describirá y ejemplificará brevemente el procedimiento realizado para la segmentación de imágenes. Tomando como punto de partida la imagen original, lo primero que se realiza es la corrección del fondo utilizando un filtro de paso de banda, con el objetivo de “aplanarlo”, debido a que la iluminación de la muestra no es homogénea. Luego, se aplica un umbral de selección por defecto, que distingue entre los niveles de grises de las imágenes, permitiendo separar los dominios ordenados de la fase desordenada. La umbralización por defecto es útil, pero produce la fusión de algunos de los dominios, por lo cual una vez aplicado el umbral, y binarizada la imagen, se realiza una corrección con la herramienta *Watershead* para separar los dominios ligados. En este punto, las imágenes ya se encuentran optimizadas para la cuantificación de los parámetros deseados. La Figura 2.12 resume el procedimiento descrito hasta aquí.

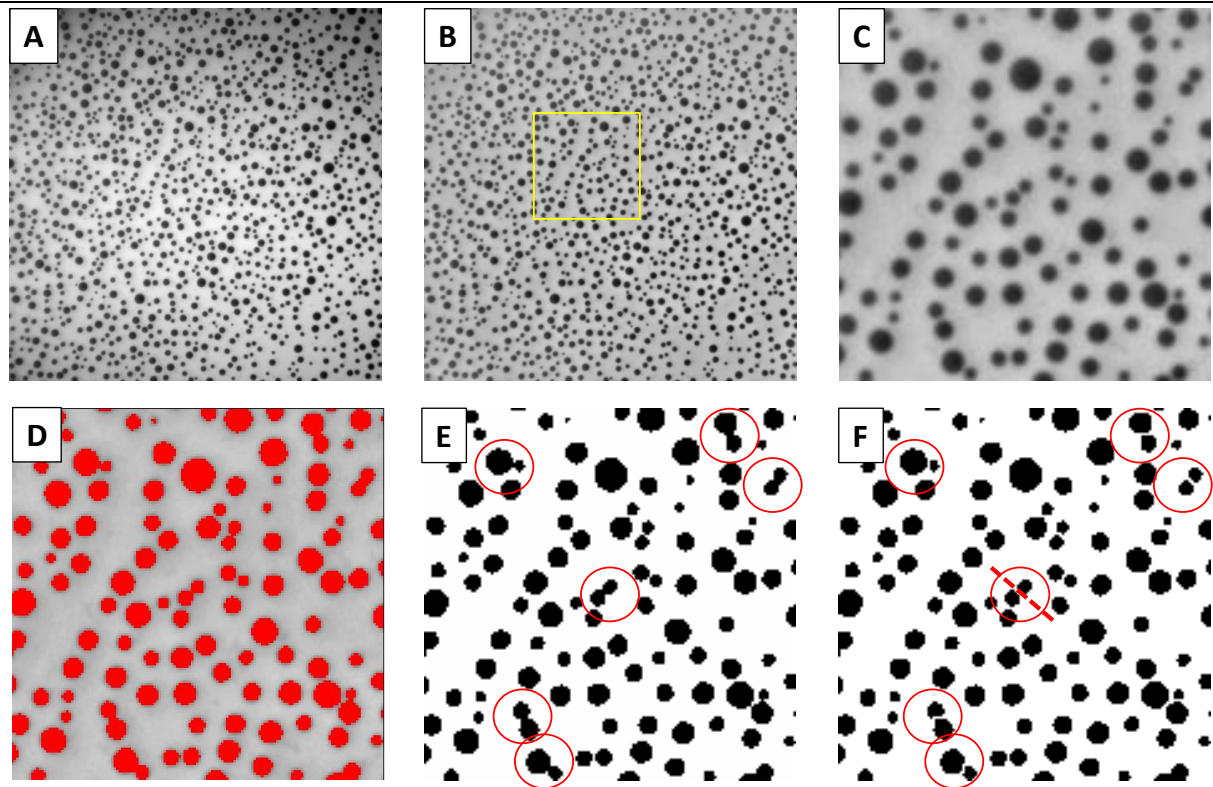


Figura 2.12. (A) Imagen original de una monocapa de Langmuir tomada por FM, exhibiendo segregación de fases. (B) Corrección del fondo. (C) Recorte de la región seleccionada en B. (D) Selección de dominios por umbral. (E) Imagen binaria y (F) Corrección de dominios ligados.

Cabe destacar que la mayor fuente de error en este tratamiento, deriva de la determinación del nivel de gris umbral, ya que se pueden sobreestimar o subestimar los tamaños, cambiando las áreas y formas de dominios. Debido a esto, el análisis se produce en constante comparación de las imágenes modificadas con las originales, y el error resultante para el porcentaje de área ocupado por dominios suele encontrarse entre 1-2 %, como se ha descrito en trabajos donde se realiza una segmentación similar.⁷³ Para las bicapas planas *free-standing*, el análisis fue similar, como se ilustra en la Figura 2.13.

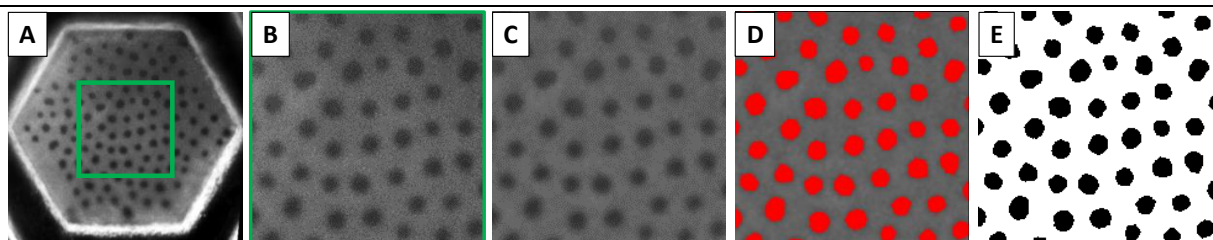


Figura 2.13. (A) Imagen original de una bicapa plana tomada por FM exhibiendo segregación de fases. (B) Recorte de la región seleccionada en A. (C) Corrección del fondo. (D) Selección de dominios por umbral. (E) Imagen binaria.

2.2.5. Determinación de área de captura y polígonos de Voronoi.

Con el objetivo de comprobar si la distribución y el tamaño de los dominios se corresponden con el área de captura representada por diagramas de Voronoi (ver Capítulo 6), se siguió el mismo procedimiento descrito en la sección anterior para el análisis de las imágenes, con la siguiente variación en la segmentación de las mismas: tomando como punto de partida la imagen binaria, se ejecuta el comando *Binary*→*Voronoi* que arroja como resultado la imagen B de la Figura 2.14. Para evitar los polígonos seccionados por los ejes, se realiza una selección circular y se aplica *Analyze Particles*→*Exclude on edges*, y se obtiene la máscara que se muestra en la Figura 2.14C. En este punto, obtenemos el área de cada polígono segmentado.

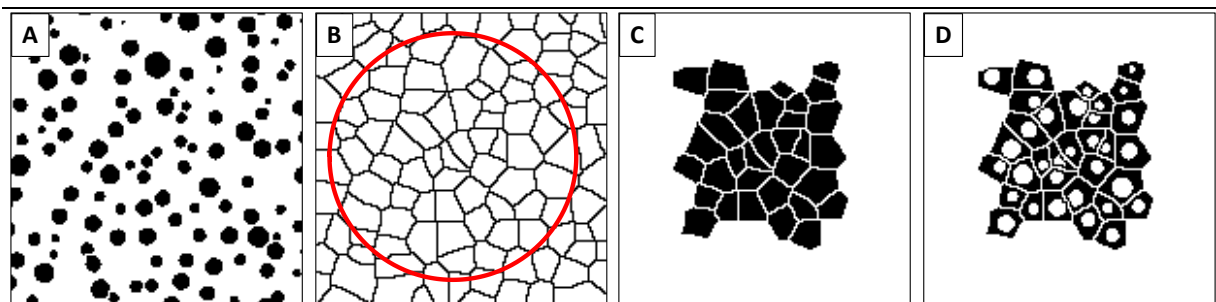


Figura 2.13. (A) Imagen binaria. (B) Polígonos de Voronoi a partir de A. (C) Selección de los polígonos incluidos dentro de la circunferencia en B. (D) Resultado de restar las imágenes A y C.

Como también necesitamos conocer el área de cada dominio correspondiente a su respectivo polígono, la estrategia que se emplea consiste en efectuar la resta de las imágenes A y C, obteniendo la imagen D, compuesta del área de los polígonos sin los dominios. Así, podemos obtener por diferencia el área correspondiente a los dominios: $\text{Área dominios} = \text{área imgC} - \text{área imgD}$.

2.3 Técnicas y metodologías complementarias utilizadas.

2.3.1. Dispersión dinámica de luz (DLS).

La dispersión dinámica de luz (DLS) permite medir la distribución de tamaño de partículas de una suspensión coloidal a partir de la autocorrelación de las fluctuaciones de intensidad de la luz dispersada por la muestra. En la Figura 2.15 se resumen los conceptos fundamentales de esta técnica. Brevemente, en un experimento de dispersión dinámica de luz, se irradia una muestra con un haz de luz monocromático polarizado, y la luz dispersada se recoge en un detector ubicado a un dado ángulo respecto del haz incidente. El movimiento Browniano de las partículas o moléculas en suspensión hace que la luz láser se disperse en diferentes intensidades. La velocidad de las fluctuaciones en la intensidad depende del

tamaño de las partículas (las pequeñas se moverán más rápidamente que las grandes) y mediante su análisis, es posible obtener el coeficiente de difusión traslacional (D), y finalmente el radio hidrodinámico (R_H) de la partícula a partir de la relación de Stokes-Einstein:

$$R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad \text{ec. 2.6}$$

donde k_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta del sistema, y η es la viscosidad del medio. Mediante DLS, se midió la distribución de tamaños de SUVs con un equipo *NICOMP 380* (PSS.NICOMP).

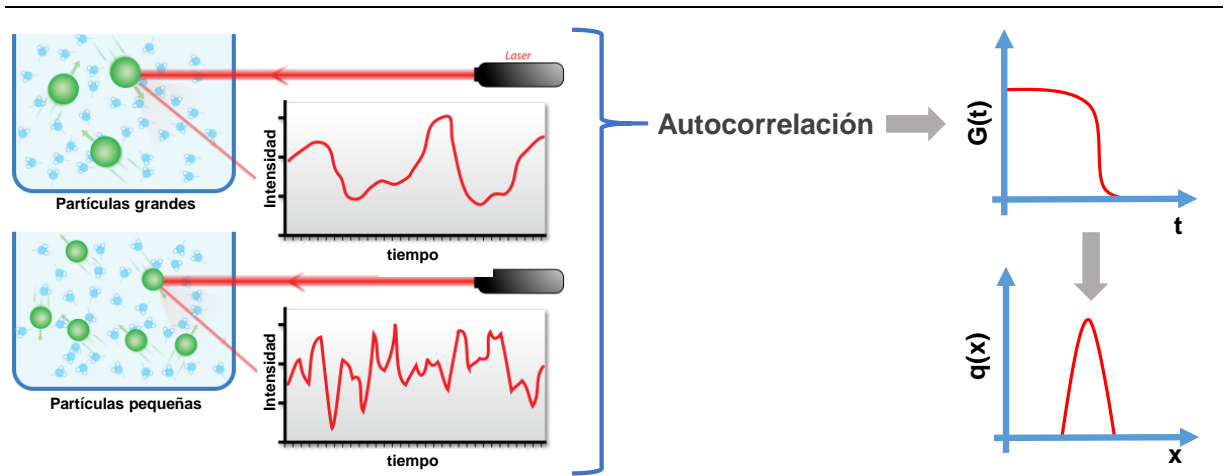


Figura 2.15. Esquemización del método de DLS. La fluctuación de la intensidad de luz dispersada por partículas grandes es menor que para partículas pequeñas. A partir del análisis de dichas fluctuaciones mediante una función de autocorrelación, es posible obtener la distribución de tamaños de las partículas dispersantes.

2.3.2. Seguimiento de dominios y determinación del coeficiente de difusión.

Luego de binarizar las 150-200 imágenes que componen un video, se utilizó el complemento de *Image J "Mosaic Suite"*⁷⁴ que permite el seguimiento automático de partículas en una secuencia temporal. El programa utiliza un algoritmo que captura el centro de masa de los dominios en cada imagen, posibilitando la obtención final de su trayectoria. Para la determinación del coeficiente de difusión, se seleccionaron las trayectorias de dominios de 1-3 μm de radio. En la Figura 2.16, las líneas de color muestran ejemplos de trayectorias para dominios en una monocapa de Langmuir. Se puede observar que el arrastre producido por convección es similar para dominios cercanos entre sí. Entonces, para monocapas, el análisis se realiza de a pares de dominios con el objetivo de descontar el movimiento producido por el arrastre. Para cada experimento se siguieron 10-15 pares de dominios, y los resultados mostrados corresponden al valor promedio de al menos tres experimentos independientes.

Considerando las posiciones relativas de dominios (\vec{X}) a diferentes intervalos temporales entre imágenes (δt), se puede calcular el desplazamiento cuadrático medio de un dominio relativo a otro (DCMr) utilizando $DCMr = |\vec{X}^{t+\delta t} - \vec{X}^t|^2$. Así, se grafica DCMr en función de δt para cada par de dominios, que son seleccionados por poseer un tamaño similar, por lo que el coeficiente de difusión será aproximadamente el mismo. En estas condiciones, $DCMr=8D\delta t$,^{73,75,76} y por lo tanto, el coeficiente de difusión se obtiene de la pendiente de la región lineal del gráfico. En general, dicha región corresponde a los primeros 2-3 segundos, como se muestra en la Figura 2.16B.

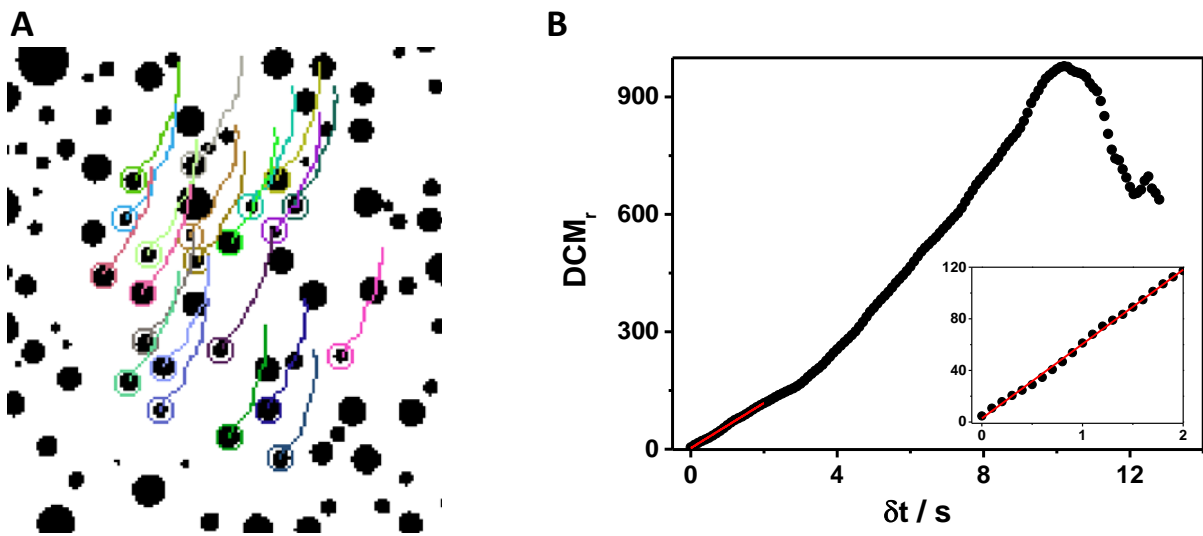


Figura 2.16. (A) Trayectoria de dominios calculada con el complemento *Mosaic Suite* para *Image J*. Aquellos dominios cercanos entre sí, muestran el mismo arrastre debido a la convección. **(B)** Desplazamiento cuadrático medio relativo entre dominios en función de δt . El ajuste lineal está realizado para los primeros segundos (ver inserto), y el coeficiente de difusión se obtiene de la pendiente de la recta.

En el caso de bicapas, al estar sumergidas en medio acuoso, no es necesario analizar los dominios de a pares, ya que no existe arrastre por convección. De hecho, para dicho sistema, se encontraron valores similares de coeficiente de difusión al analizar dominios individuales, o de a pares. En el caso del seguimiento de dominios individuales, se utilizó la relación $DCM=4D\delta t$.

2.3.3. Determinación de la función de distribución radial de dominios.

La función de distribución radial, $g(r)$, en un sistema de partículas, describe cómo varía la densidad de partículas en función de la distancia medida desde una partícula de referencia, como se muestra en la Figura 2.17. Para los sistemas empleados en esta Tesis, se utilizó $g(r)$ como una medida de la estructuración del sistema. De esta manera, si el sistema está estructurado, los dominios fluctuarán en un intervalo pequeño de distancias entre sí, lo que se

observará como un pico principal en la función. Al formarse superestructuras, puede observarse más de un pico, como muestra el ejemplo de la Figura 2.17. La ausencia de picos en el gráfico de $g(r)$ indica que el sistema no posee estructura en el plano.

Se calculó $g(r)$ para dominios en el plano de la membrana, en monocapas de Langmuir y bicapas *free-standing*, en función de la cantidad de dominios, cuantificada como el porcentaje de área ocupado por la fase ordenada (ver Capítulo 5). Para ello, videos de 150 imágenes fueron divididos en tres partes iguales, y se construyeron histogramas de la distancia entre los centros de los dominios (r), utilizando la información de 50 imágenes consecutivas. Los valores de $g(r)$ reportados, corresponden al resultado de promediar los tres histogramas.

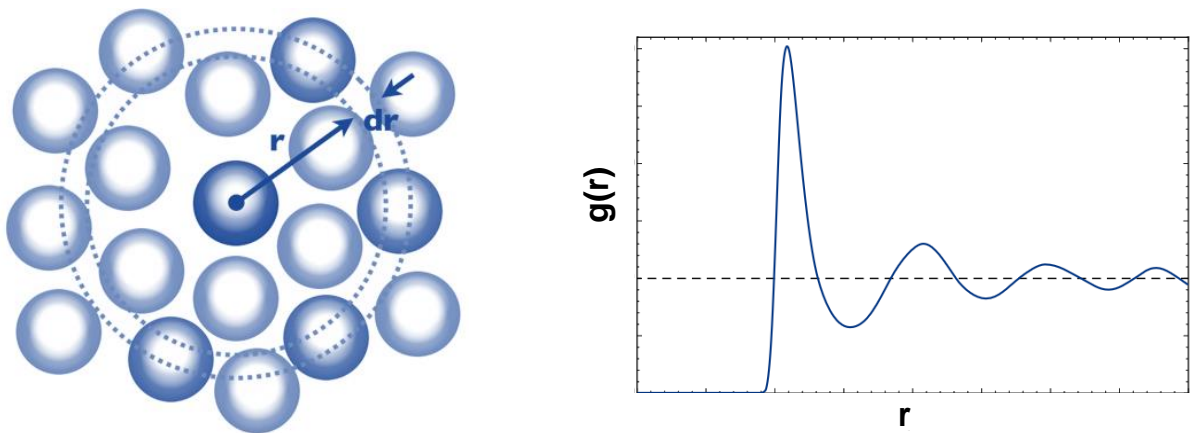


Figura 2.17. La función de distribución radial $g(r)$ muestra la probabilidad de encontrar una partícula a una dada distancia de otra tomada como referencia. Si en un dado sistema las partículas se ubican equidistantes entre sí, el gráfico de $g(r)$ será similar al que se muestra aquí.

2.3.4. Cantidad de dominios vs tiempo.

Con el objetivo de estudiar la cinética de fusión de dominios (ver Capítulo 5), se realizaron videos de monocapas de Langmuir y bicapas *free-standing* por el lapso de 15 minutos con un intervalo de 5 segundos entre imágenes. La cantidad de dominios en función del tiempo, se calculó en relación a la primera micrografía del conjunto, promediando 12 fotos para cada minuto. Los videos se registraron para membranas con 40% de fase ordenada para ambos sistemas, y a una presión superficial fija de 28 mNm^{-1} en el caso de monocapas de Langmuir. El tiempo cero se fijó en el momento de la aparición de dominios, en el caso de bicapas, y en el punto en el que se alcanza la presión superficial deseada, en el caso de monocapas.

2.3.5. Tamaño de dominios vs velocidad de enfriamiento.

Para incrementar la temperatura por encima del punto de desmezcla en bicapas, se enfocó un láser infrarrojo sobre la superficie de oro de las grillas. De esta manera, se logra un calentamiento local de la grilla y las bicapas más cercanas. En estas regiones, los dominios se “disuelven” y se alcanza una fase homogénea. Luego de calentar, se disminuye gradualmente la intensidad del láser, implementando dos velocidades de enfriamiento:

-Lenta: la intensidad del láser se redujo en un 2% cada 4 segundos (la nucleación de dominios se alcanza en 2 minutos).

-Rápida: la intensidad del láser se redujo en un 2% cada 2 segundos (la nucleación se alcanza en aproximadamente 1 minuto).

Este método permite obtener distintas densidades de dominios y tamaños en una misma bicapa, variando la velocidad de la perturbación. Para la cuantificación, se tomó un video por FM (0,1 s por imagen) durante el proceso de enfriamiento, y se utilizaron las imágenes de los primeros segundos luego de la nucleación. El proceso se repitió al menos tres veces para cada bicapa con cada protocolo, y los gráficos obtenidos corresponden a la cuantificación de 10 bicapas, de 3 experimentos independientes. Para monocapas de Langmuir se realizó el mismo procedimiento, enfocando el láser infrarrojo directamente sobre la interfase.

2.3.6. Modificación del porcentaje de fase ordenada en *LMs* y bicapas planas *free-standing*.

Los procedimientos descritos a continuación, corresponden a los experimentos detallados en el Capítulo 5. Como se explicó en la sección 2.1.3.B, las bicapas planas se obtuvieron mediante la transferencia de monocapas de Langmuir a grillas hidrofóbicas a una presión superficial de 28 mNm^{-1} . A esta presión, el área ocupada por dominios (%fo) en monocapas era del $(40 \pm 3) \%$. En el caso de las bicapas planas, cada grilla mostraba una distribución aleatoria de dominios, es decir que se obtienen diferentes %fo en cada bicapa luego de la transferencia, como puede observarse en la Figura 2.18. Al cuantificar el %fo para varias bicapas de una misma grilla, se obtienen valores entre 20-35%fo, indicando que el diagrama de fases cambia ligeramente entre monocapas y bicapas, tal como se describe también para una mezcla lipídica diferente en el Capítulo 1.

Los experimentos de difusión y la determinación de la función de distribución radial que se describen en el Capítulo 5, se llevaron a cabo a diferentes porcentajes de área ocupada

por la fase ordenada. En el caso de las bicapas, se aprovechó el hecho de que cada una muestra diferentes valores de $\%f_o$ dentro de una misma grilla, como se explicó anteriormente.

En el caso de las monocapas de Langmuir, se obtuvieron diferentes $\%f_o$ cambiando la presión superficial entre $15\text{-}30\text{ mNm}^{-1}$, como se muestra en la Figura 2.18, ya que se ha demostrado que cambios en la presión superficial no influyen marcadamente sobre el coeficiente de difusión (si no se producen transiciones de fase), al menos en este intervalo acotado.⁷⁶

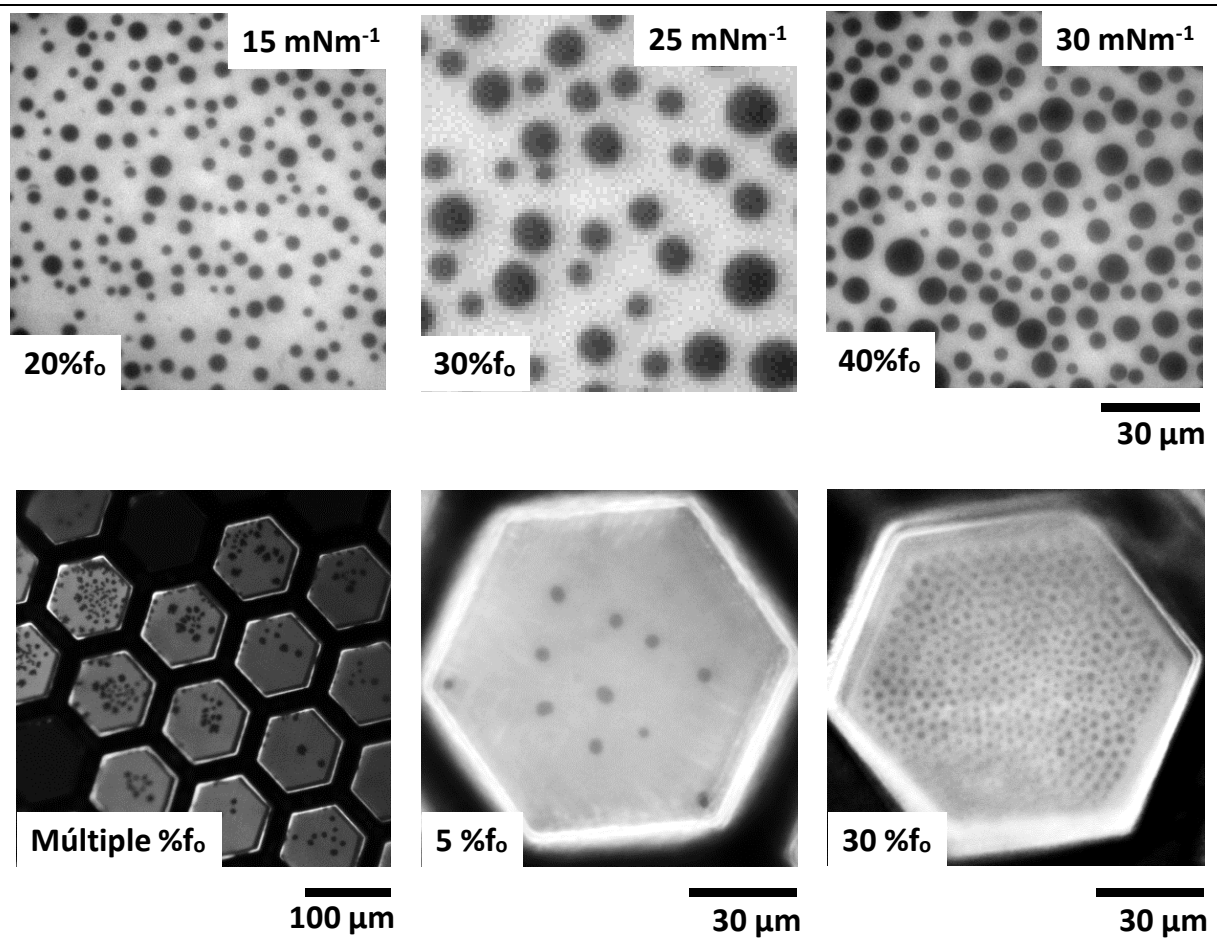


Figura 2.18. Arriba: monocapas a distintas presiones superficiales mostrando diferentes $\%f_o$, como se indica. La barra de escala es la misma para todas las imágenes. Abajo: una grilla conteniendo múltiples bicapas con diferente $\%f_o$, y bicapas individuales con bajo y alto $\%f_o$.

Por otra parte, la composición de las fases en coexistencia varía con la presión de acuerdo al diagrama de fases de la mezcla correspondiente. En este aspecto, a medida que la presión superficial se incrementa, las fases se vuelven más similares (el sistema se aproxima al punto de mezcla), lo que se traslada a menores repulsiones entre dominios. Por lo tanto, este método introduciría una subestimación de las interacciones entre dominios a medida que $\%f_o$ se incrementa (por un incremento en la presión) en monocapas.

Otra estrategia utilizada para obtener diferentes valores de $\%f_o$ en monocapas sin cambiar la composición de la mezcla, consiste en la aplicación de un campo eléctrico inhomogéneo sobre la interfase del film. Para ello, un alambre metálico se ubica a aproximadamente $200\ \mu\text{m}$ por encima de la interfase, un segundo electrodo se sumerge en la subfase, y se aplica una diferencia de potencial entre ellos. El electrodo superior se carga aplicando potenciales de hasta $300\ \text{V}$ respecto al electrodo de la subfase. Se ha demostrado previamente, que un potencial positivo produce la migración de los dominios hacia afuera de la región de la interfase que se encuentra debajo del electrodo, mientras que un potencial negativo produce atracción de los dominios, como consecuencia de la diferencia en la densidad dipolar de las fases en coexistencia.^{77,78} La migración de los dominios genera regiones definidas de alta (potenciales negativos) o baja (potenciales positivos) densidad de dominios,^{77,79} en donde las propiedades de la membrana bajo diferentes condiciones puede ser analizada.^{73,76} De esta manera, se obtuvieron bajos $\%f_o$ mediante la aplicación del campo eléctrico, como muestra la Figura 2.19. Una vez obtenida la densidad de dominios deseada, el campo se apagó, y se obtuvieron las imágenes mediante FM. En todos los casos, el tiempo de adquisición de imágenes es mucho menor que el tiempo en el cual la diferencia de densidad provocada por el campo se pierde (más de 1 minuto).

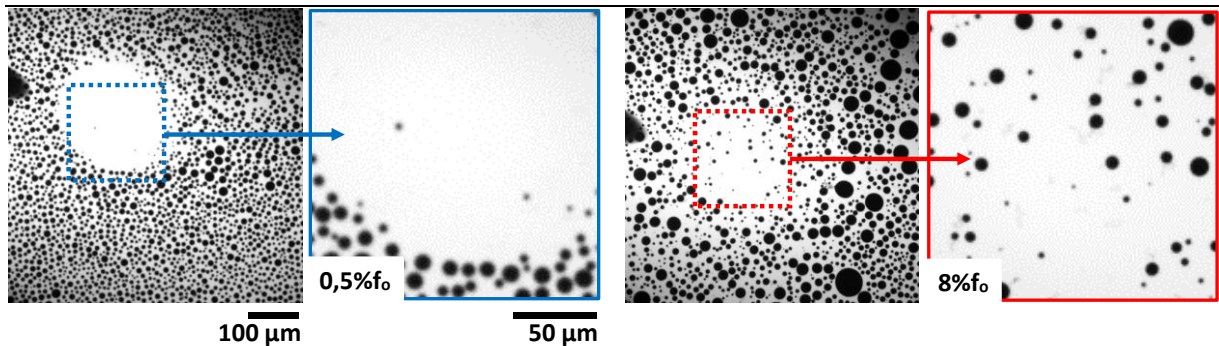


Figura 2.19. Monocapas de Langmuir bajo la influencia de un campo eléctrico repulsivo (nótese la punta del electrodo en la parte izquierda de las imágenes de campo completo). De esta manera, se obtuvieron regiones con una baja densidad de dominios como se indica en las magnificaciones.

2.4. Especificaciones técnicas. Reactivos.

2.4.1. Lípidos.

Las soluciones de lípidos puros y mezclas utilizadas en esta tesis se solubilizaron en cloroformo:metanol 2:1 a una concentración de aproximadamente $1\ \text{nmol}\mu\text{L}^{-1}$. Todos los lípidos se adquirieron de Avanti Polar Lipids.

La estructura de los lípidos utilizados, así como su nombre común y abreviación, se muestran en la Figura 2.20. En mayor parte, se utilizaron fosfolípidos cuyo grupo polar está

constituido por una fosfatidilcolina unida mediante un glicerol a dos cadenas hidrocarbonadas provenientes de ácidos grasos. Los primeros cinco lípidos, sólo difieren en el largo de la cadena hidrocarbonada. Por otra parte, dioleoilfosfatidilcolina (DOPC) es una fosfatidilcolina que posee dos cadenas de 18 carbonos con una insaturación cada una, como se señala en la Figura 2.20. Palmitoilesfingomielina (pSM) es un lípido más complejo, cuyo grupo polar también es una colina, pero está unida a una ceramida conjugada con un ácido palmítico. Dipalmitoilfosfatidilserina (DPPS) posee dos cadenas de palmítico unidas al glicerol, y un grupo serina como grupo polar, el cual posee una carga negativa. Finalmente, el colesterol (col) es un lípido esteroideo cuya región polar está constituida por un grupo hidroxilo y su porción hidrofóbica está formada por el carbociclo de núcleos condensados con sustituyentes alifáticos. Las principales diferencias estructurales mencionadas se señalan en color naranja en la Figura 2.20.

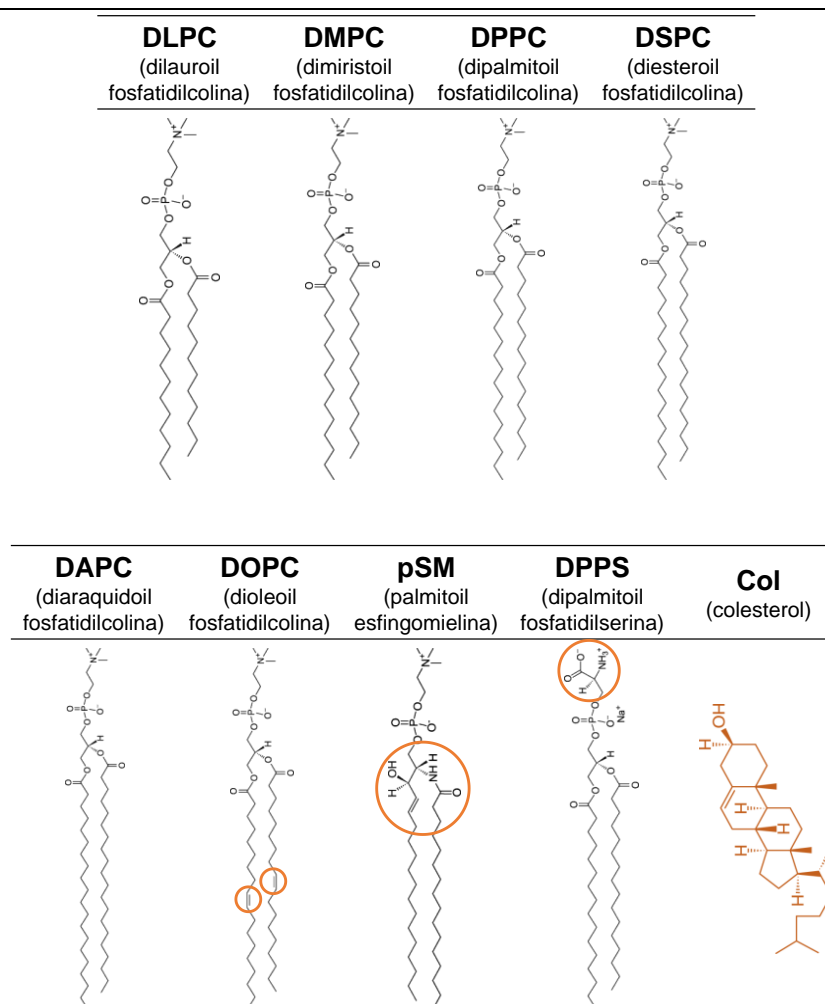


Figura 2.20. Estructura de los lípidos utilizados, orientados con su región polar hacia arriba. Se destacan las principales diferencias estructurales entre ellos.

El medio acuoso empleado para todos los sistemas estuvo compuesto de agua deionizada con resistividad de 18MΩ obtenida de un purificador Milli-Q (Millipore), utilizada

pura o en solución con NaCl 0,145 mM. Todos los solventes y reactivos utilizados fueron de la pureza más alta disponible comercialmente (Merck, Bruker).

2.4.2. Membranas soportadas.

Para realizar membranas soportadas, se utilizaron vidrios cubre objetos de 12 mm de diámetro adquiridos de Marienfeld GmbH & Co. Kg como soporte. Con el objetivo de limpiarlos e incrementar su hidrofiliidad, los vidrios se trataron con una solución “piraña” ($H_2SO_4:H_2O_2$ 3:1 v/v) a 90 °C por 60 minutos y se lavaron con agua MilliQ. De esta manera, se eliminan residuos orgánicos y la superficie se vuelve rugosa y altamente hidrofílica. Para formar las membranas soportadas la presión se mantuvo constante a 30 mNm^{-1} durante la transferencia, y la velocidad utilizada fue de 5 mmmin^{-1} .

Todas las bicapas soportadas transferidas desde monocapas eran asimétricas, conteniendo la mezcla de interés con una baja proporción de sonda fluorescente en una de las hemicapas, y en la hemicapa restante, solamente el lípido de mayor largo de cadena que constituyera la mezcla en cuestión (sin sonda fluorescente). Así por ejemplo, para la mezcla DPPC:DLPC, una de las hemicapas se formó con DPPC pura, y la otra con la mezcla lipídica a la composición de interés y la sonda fluorescente. Por lo tanto, se estudiaron dos tipos de *SLBs*: dSLBs , en las cuales la mezcla de interés con la sonda fluorescente se ubica en la hemicapa distal respecto del soporte, y pSLBs en el cual la mezcla se transfiere en primer lugar quedando próxima al soporte. Independientemente de cuál fuera la ubicación de la hemicapa de interés, los resultados obtenidos fueron similares (ver Capítulos 3 y 4), indicando que no existen interacciones específicas entre el soporte y los lípidos de la hemicapa proximal. Por otra parte, el diagrama de fases tampoco cambia significativamente entre *SLMs* y *SLBs*, mostrando que las interacciones inter-hemicapa no afectan el comportamiento de fases de las mezclas analizadas. Esto se esquematiza en la Figura 2.21, y se discute en detalle en los Capítulos 3 y 4.

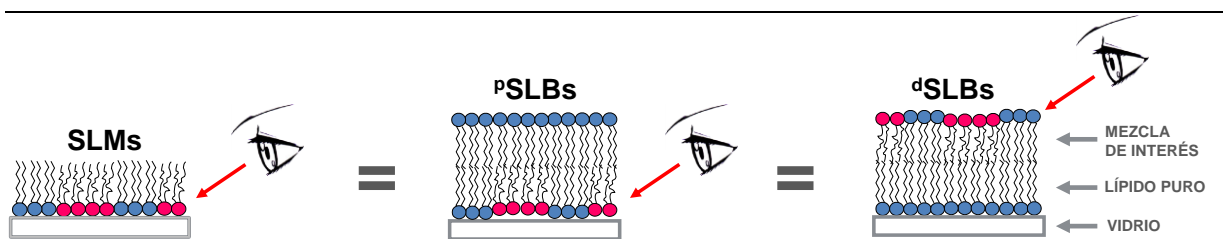


Figura 2.21. Los diagramas de fases no varían significativamente entre los sistemas mostrados: cuando se analizan monocapas soportadas (*SLMs*), o la hemicapa proximal (pSLBs) o distal (dSLBs) de bicapas soportadas, se obtienen resultados similares para todas las mezclas estudiadas. Así, se descarta la influencia de interacciones específicas de corto alcance con el soporte e interacciones inter-hemicapa sobre el diagrama de fases de las mezclas analizadas. Para mayor detalle ver Caps. 3 y 4.

2.4.3. Bicapas planas *free-standing*.

En el caso de las bicapas planas *free-standing* se utilizaron grillas de oro para TEM adquiridas de *SPI Supplies*. Las grillas son pre-incubadas con octadecano-1-tiol (ODT) que se une covalentemente al oro convirtiendo a las grillas en un sustrato hidrofóbico, condición necesaria para la transferencia. Por otra parte, antes de la deposición, la grilla se recubre con una gota de hexadecano en hexano 4% v/v. Una vez que el hexano se evapora, el hexadecano remanente forma el borde de Plateau-Gibbs apropiado para que la transferencia sea efectiva.^{56,80,81}

2.4.4. Vesículas unilamelares pequeñas y gigantes.

Para realizar las *SUVs* las mezclas de lípidos en cloroformo:metanol se secaron mediante flujo de nitrógeno, y posteriormente mediante vacío. Luego, se resuspendieron en agua MilliQ hasta una concentración final de 0,5 mgmL⁻¹. La suspensión se incubó a 50 °C en baño por 5 minutos con intervalos de 30 segundos de agitación utilizando un vortex. Finalmente, la suspensión se fragmentó en vesículas pequeñas utilizando un sonicador de punta marca *Ultrasonic Homogenizer 4710 Series* (Cole-Parmer Instruments Co.).

En el caso de las *GUVs*, se sintetizaron en una cuba de teflón que contiene dos electrodos de platino, utilizando el método de electroformación descrito por Angelova et al.⁵³ Brevemente, una solución de la mezcla de lípidos conteniendo 1% de PE-Rho se sembró sobre los electrodos, y se procedió a remover el solvente en una cámara de vacío. Luego los lípidos se hidrataron utilizando una solución acuosa 300 mM de sacarosa a 50 °C seguido de la aplicación de una onda sinusoidal utilizando un generador de funciones *UNI-T UTG9002C* (Uni-Trend Group Limited) de amplitud 1,3 V y frecuencia de 10 Hz. La electroformación se llevó a cabo durante 15 minutos, y posteriormente una pequeña alícuota de la suspensión de *GUVs* se colocó en una cuba *Lab-Tek* conteniendo una solución de glucosa isoosmótica. El *Lab-Tek* se trató previamente con albúmina sérica bovina a fin de prevenir la ruptura de las *GUVs* por el contacto con las paredes del recipiente, y permitiendo que las mismas se depositen sobre el fondo de la cuba debido al gradiente de densidad de sacarosa/glucosa, facilitando así su observación por microscopía confocal.

“No importa cuántas conexiones tomemos en consideración para describir un fenómeno, siempre estaremos obligados a excluir otras.”
Fritjof Capra, La trama de la vida.

Capítulo 3: Comparación de modelos experimentales de membranas lipídicas.

Resumen

En ciencia, es fundamental comprender las ventajas y limitaciones del modelo que se desea emplear para un dado estudio, a fin de poder interpretar correctamente los resultados obtenidos, más aún si se desea extrapolarlos a lo que pueda ocurrir en otros modelos o en un sistema más complejo. En este sentido, para comprender procesos que ocurren en membranas celulares, se utilizan indistintamente diferentes modelos experimentales de membranas lipídicas. Sin embargo, existen pocos estudios que comparen los resultados obtenidos con distintos modelos.

En esta primera parte, se utilizó una mezcla binaria de lípidos y se realizó una comparación del diagrama fases de la mezcla en distintos modelos de membranas. Para ello, se seleccionaron dos fosfatidilcolinas que difieren en el largo de la cadena: DPPC (16C) y DLPC (12C). Estos componentes se utilizaron debido a que ya se habían descrito algunas propiedades de su mezcla en sistemas soportados^{82,83} así como el diagrama de fases en *GUVs*⁸⁴. En este capítulo, se informan los resultados obtenidos con cada modelo, se realiza la comparación entre los mismos, y finalmente se interpretan y discuten los resultados.

3.1 Monocapas de Langmuir - Isotermas y Diagrama de Fases.

En la Figura 3.1A se muestran las isotermas de compresión de monocapas en la interfase agua-aire compuestas de DPPC, DLPC y sus mezclas a $T=(21\pm 1)$ °C. La isoterma de DPPC pura, graficada en color negro, muestra un *plateau* a $\pi \approx 5$ mNm⁻¹ que corresponde a una transición de fase LE-LC⁸⁵. Por otro lado, para DLPC (línea discontinua en rojo) se observa una isoterma característica de un estado expandido, debido a que la temperatura de trabajo se encuentra por encima de la temperatura de fusión de sus cadenas (-1 °C)⁸⁶. Las presiones de colapso de los films de lípidos puros obtenidas bajo las condiciones experimentales fueron de (67 ± 3) mNm⁻¹ para DPPC, y (49 ± 3) mNm⁻¹ para DLPC. Para una mejor visualización, sólo se incluyeron a modo representativo algunas isotermas de las mezclas binarias estudiadas.

A partir de las isotermas, tomando como referencia $\pi = 30$ mN/m, se obtuvo el gráfico de área molecular promedio en función de la fracción molar de DPPC representado en la Figura 3.1B. Se puede observar cómo a medida que incrementa la fracción molar de DPPC, el área ocupada por la monocapa disminuye (para la misma presión superficial). A modo de

comparación, se incluye la recta teórica correspondiente a la regla de las aditividades (ver ecuación 2.2 en Cap. 2), tomando como referencia los valores del área molecular que ocupan a 30 mNm^{-1} los lípidos puros: $0,41 \text{ nm}^2$ para DPPC y $0,58 \text{ nm}^2$ para DLPC. La desviación que presentan los valores experimentales respecto del comportamiento ideal, sumado a la variación observada de las presiones de transición y de colapso con la composición, indican la existencia de miscibilidad no ideal entre DPPC y DLPC.¹⁷

Nótese que en las mezclas con $X_{\text{DPPC}} < 0,5$ la presión de transición ($\pi_{\text{LE-LC}}$) se hace indetectable. Todos los resultados obtenidos hasta aquí, están de acuerdo con lo reportado por Sánchez y col.⁸²

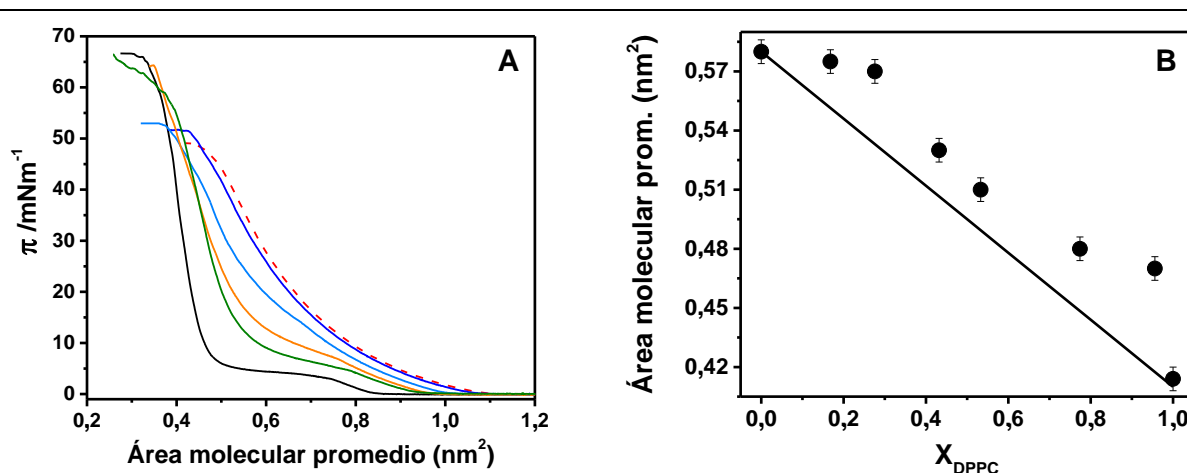


Figura 3.1. (A) Isotermas de compresión de DPPC (—), DLPC (- -) y mezclas binarias representativas: DPPC:DLPC 25:75 (—), 50:50 (—), 75:25 (—), 90:10 (—). (B) Valores experimentales de área molecular promedio a $\pi=30 \text{ mNm}^{-1}$, en función de la composición de la mezcla. La línea continua representa el valor teórico correspondiente a una mezcla ideal.

Las monocapas se observaron mediante el uso de distintas microscopías ópticas al mismo tiempo que se registraba la isoterma de compresión para cada composición de la mezcla estudiada. En la Figura 3.2 se muestran algunas de las imágenes obtenidas por BAM a modo ilustrativo. La coexistencia de fases, se evidencia mediante la aparición de dominios lipídicos grises, más claros que la fase continua, los cuales varían en forma, tamaño y cantidad a diferentes presiones superficiales. Estos dominios corresponden a lípidos en fase ordenada y están rodeados por lípidos en fase desordenada, que se observa como gris más oscuro.

Por otra parte, mediante la incorporación de un lípido que contiene un grupo fluoróforo (PE-Rho) fue posible seguir el comportamiento de fases de las mezclas por FM. A diferencia de BAM, como la sonda fluorescente posee un grupo polar voluminoso, particiona preferentemente a la fase desordenada, la cual se ve más brillante, mientras que los dominios de fo se ven oscuros debido a la menor concentración de la sonda. Se realizaron controles utilizando mezclas de igual composición, que arrojaron resultados similares al ser visualizadas independientemente mediante las dos técnicas: de esta manera se comprobó que la sonda fluorescente utilizada en FM no altera las propiedades termodinámicas del sistema.

Utilizando la información extraída de las isothermas de compresión, así como las imágenes obtenidas por FM y BAM, se construyó un diagrama de fases (π vs X_{DPPC}) para la mezcla DPPC:DLPC, que se muestra en la Figura 3.3.

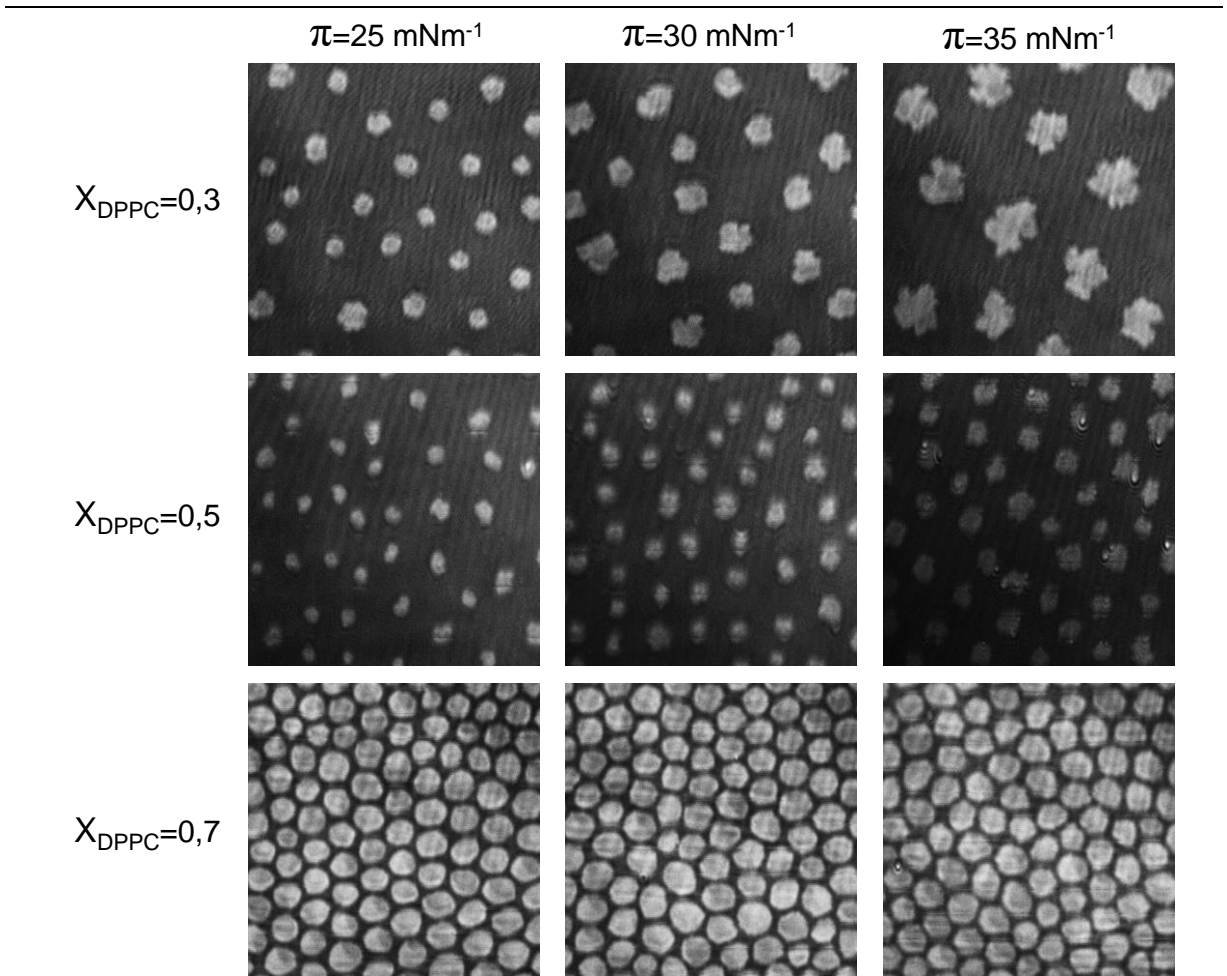


Figura 3.2. Micrografías obtenidas por BAM de monocapas de la mezcla DPPC:DLPC mostrando coexistencia de fases LE-LC. En las filas se indican las composiciones, y en las columnas los valores de presión superficial correspondientes.

Los círculos llenos y vacíos delimitan el área en la cual se observó coexistencia de fases por BAM y FM, respectivamente, y dichos puntos coinciden con la presión de transición determinada a partir de las isothermas de compresión (triángulos azules) para $X_{\text{DPPC}} > 0,5$. Como se discutió anteriormente, y puede observarse en el diagrama, los datos obtenidos por BAM se corresponden con la información obtenida por FM, indicando que el comportamiento de las fases no es modificado por la sonda fluorescente. Es importante remarcar este aspecto, ya que sólo las monocapas en la interfase agua-aire pueden visualizarse por BAM y prescindir de la sonda fluorescente para su caracterización superficial, mientras que, para el resto de los sistemas, se utilizó microscopía de fluorescencia.

Particularmente, en el intervalo de composiciones comprendidas entre $0,75 < X_{\text{DPPC}} < 0,85$ (triángulos rojos en Fig. 3.3A) se observó la aparición de un nivel de gris intermedio en el borde de los dominios de fase LC a presiones de $20\text{-}25 \text{ mNm}^{-1}$, dando lugar

a imágenes con 3 niveles de grises (fase LE, fase LC, y gris intermedio) tanto en micrografías tomadas por BAM (Figura 3.3 D), como por FM (ver Figura 3.4). Debido a que no se había reportado este fenómeno para la mezcla DPPC-DLPC, y a fin de evaluar si se trataba de un efecto cinético, dichas estructuras se observaron a velocidades usuales de compresión, así como también utilizando la mínima velocidad permitida por el equipo ($0,7 \text{ \AA}^2 \text{ molec}^{-1} \text{ min}^{-1}$). Adicionalmente, una vez observados los tres niveles de gris, se continuó comprimiendo de manera escalonada, esperando 1 min por cada punto de presión incrementada, permitiendo que el sistema se equilibre. Sin embargo, la textura final observada era similar a la obtenida a velocidades normales de compresión.

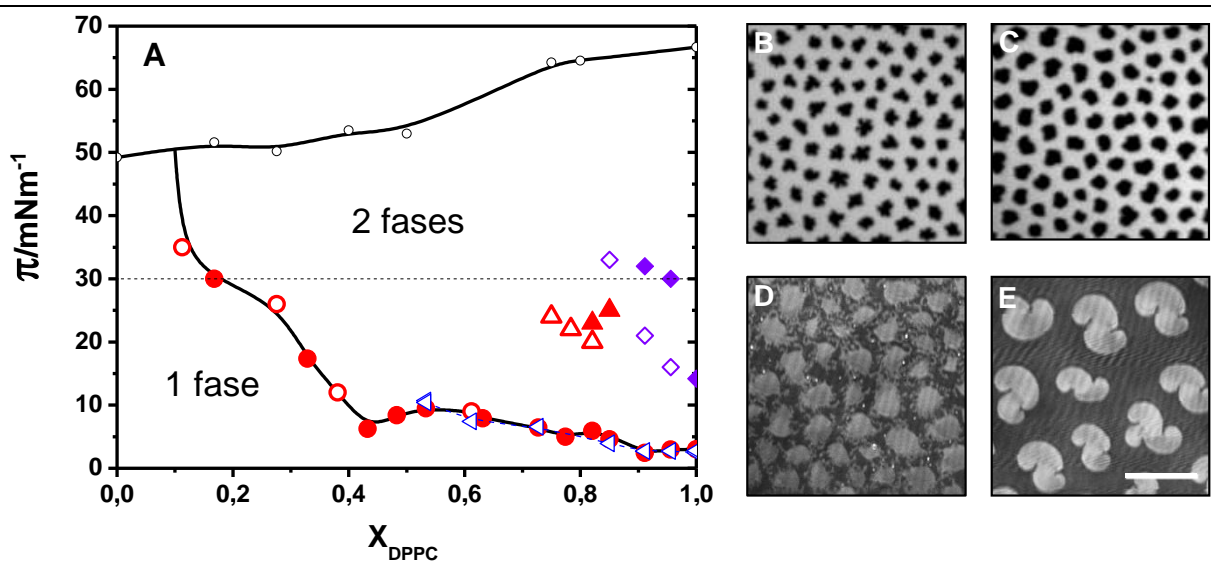


Figura 3.3. (A) Diagrama de fases para monocapas de DPPC:DLPC a $(21 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$. Presión superficial a la cual aparecen los dominios, determinada mediante observación por BAM (\bullet) o FM (\circ). Regiones en las cuales se observaron 3 niveles de grises determinadas por BAM (\blacktriangle) o FM (\triangle). Presión de colapso (\circ), presión de transición de DPPC (\blacktriangleleft) extraídas de las isotermas de compresión, y desaparición de dominios obtenida por compresión (\blacklozenge), o expansión (\blacktriangleright). La línea punteada indica la presión a la cual se compararon los diferentes modelos de membrana (30 mNm^{-1}). Imágenes representativas tomadas con FM (B y C) o BAM (D y E) en regiones de coexistencia de fases: (B) $X_{\text{DPPC}}=0,5$, $\pi=30 \text{ mNm}^{-1}$; (C) $X_{\text{DPPC}}=0,8$, $\pi=15 \text{ mNm}^{-1}$; (D) $X_{\text{DPPC}}=0,8$, $\pi=30 \text{ mNm}^{-1}$ (región con tres niveles de gris); (E) $X_{\text{DPPC}}=0,95$, $\pi=4 \text{ mNm}^{-1}$. Tamaño de las imágenes: $150 \times 150 \text{ } \mu\text{m}^2$, barra de escala: $50 \text{ } \mu\text{m}$.

Por otra parte, se realizaron experimentos con mayor resolución utilizando monocapas soportadas (modelo que se discutirá en detalle en la próxima sección) y los resultados mostraron que el nivel de gris intermedio observado se debía a la presencia de estructuras pequeñas, similares a ramificaciones en el borde de los dominios, que no se podían resolver con la magnificación utilizada, y que por dicha razón aparecían borrosas. Esto puede observarse claramente en la Figura 3.4, en donde se comparan imágenes tomadas con microscopía de fluorescencia, con objetivos 20X (Fig. 3.4A) y 100X (Fig. 3.4B).

Otra curiosidad respecto de los dominios observados en esta región del diagrama de fases de la muestra, es que al utilizar una sonda fluorescente diferente, DiIC18, se continuaron

observando tres niveles de gris, aunque con un cambio notable en el contraste, como se ilustra en la Figura 3.5. Como discutimos anteriormente, debido a las ramificaciones de los dominios que se encuentran por debajo de la resolución óptica al utilizar el objetivo 20X, los mismos se visualizan con los bordes difusos y un halo de un color gris intermedio entre el dominio y la fase continua (Fig. 3.5). A la derecha de la figura se incluyen los gráficos del nivel de gris en función de la distancia a lo largo del segmento rojo incluido en cada imagen.

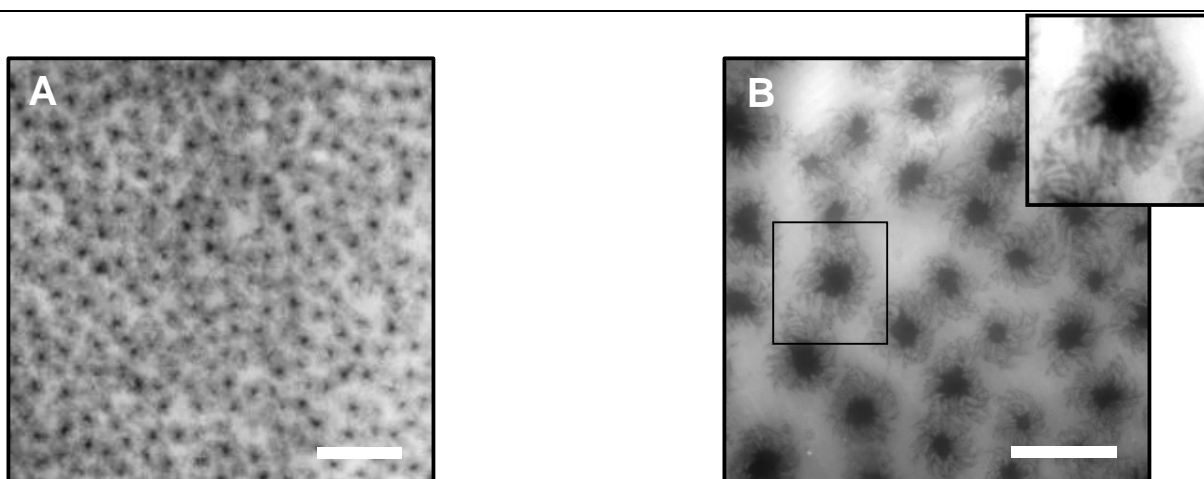


Figura 3.4. Imágenes tomadas con FM de *SMLs* de la mezcla DPPC:DLPC con composición $X_{DPPC}=0,60$ y utilizando un 0,5% mol de PE-Rho. (A) Imagen tomada con objetivo 20X, se observan tres niveles de gris. Tamaño: $250 \times 250 \mu\text{m}^2$. Barra: $50 \mu\text{m}$. (B) Imagen tomada con objetivo 100X. El nivel de gris intermedio observado corresponde a estructuras delgadas por debajo de la resolución de la imagen A. Tamaño: $100 \times 100 \mu\text{m}^2$. Barra: $25 \mu\text{m}$. Nótese que en *SMLs* la composición a la cual se observan los tres niveles de gris es menor que para *LMS*.

Nótese que la diferencia reside en que al utilizar DiIC18 (Fig. 3.5B), el halo alrededor del dominio presenta mayor brillo que la fase continua, indicando que la sonda se acumula en el borde de los dominios. Este resultado es explicado en un trabajo en colaboración con Andrea Bischof,⁸⁷ en el que se demostró que DiIC18 es un compuesto linactante (se acumula en el borde del dominio), que actúa disminuyendo la tensión de línea entre las fases en coexistencia en un orden de magnitud. Un efecto similar había sido observado por Crane y col.⁶⁷ utilizando DiIC18 en mezclas con fosfolípidos, esfingomielina y colesterol; sin embargo en su trabajo no se realiza una discusión al respecto. Ellos observaron un nivel gris claro en bicapas soportadas al utilizar 5% de colesterol y DiIC18 como sonda fluorescente, y dicho halo está ausente cuando se utilizan otras cuatro sondas. Si bien al variar la cantidad de colesterol en la mezcla con DiIC18 el halo desaparece, esto no implica la ausencia de acumulación de la sonda en el borde de los dominios, ya que la resolución de la microscopía óptica utilizada está en el rango de los micrómetros. En este sentido, si cada anillo de moléculas alrededor de un dominio tiene aproximadamente 1nm de espesor, sólo cuando se acumulen más de 1000 anillos de moléculas será posible observarlo por microscopía óptica. El hecho de que en el sistema DPPC:DLPC se pueda observar claramente el halo brillante,

se debe a la ramificación que presentan los dominios, lo que convierte a los bordes de los mismos en una región amplia en la que se concentra la sonda.

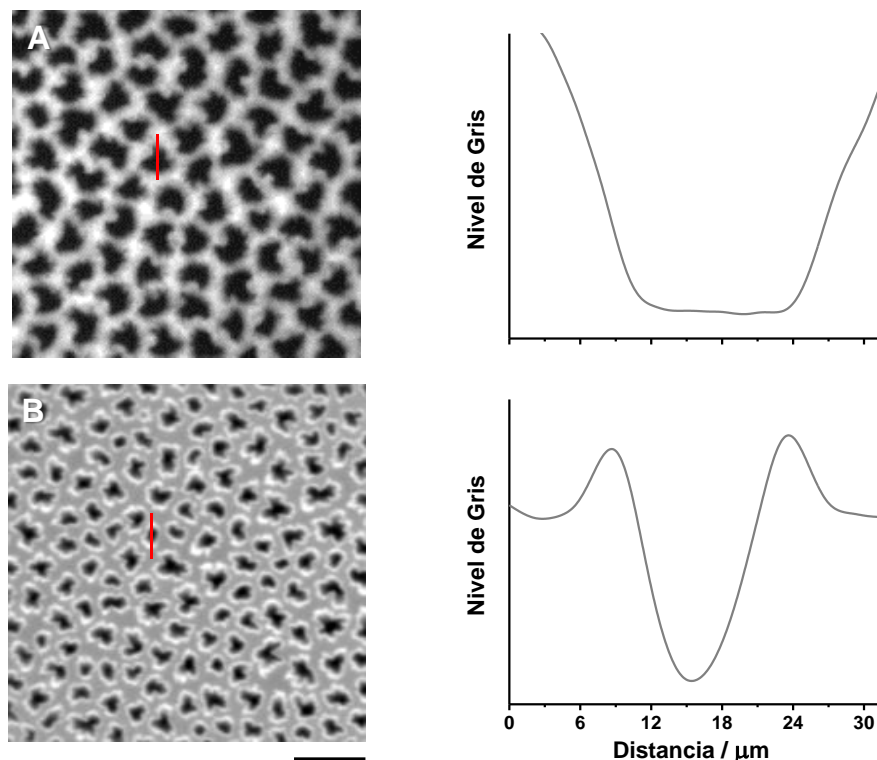


Figura 3.5. Monocapas de Langmuir de la mezcla DPPC:DLPC [$X_{\text{DPPC}}=0,80$, 30 mNm^{-1} a $(21\pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$] en la interfase agua-aire observadas por FM, y sus respectivos gráficos de intensidad en función de la distancia a lo largo del segmento trazado en rojo. (A) Conteniendo 1% mol de PE-Rho; el máximo de intensidad se ubica en la fase continua. (B) Conteniendo 1% mol de DiIc18; el máximo de intensidad se ubica en el borde de los dominios (interfase LE-LC). Ambas imágenes fueron tomadas con objetivo 20X. Tamaño: $250 \times 250 \mu\text{m}^2$. Barra: $50 \mu\text{m}$.

Finalmente, en la región del diagrama de fases correspondiente a composiciones $X_{\text{DPPC}} > 0,85$ las imágenes obtenidas se tornaban borrosas, y si bien los dominios desaparecían y se formaba una fase homogénea antes del colapso del film, se dificultó la determinación del valor de presión superficial al cual las fases se tornaban indistinguibles. Debido a esto, en algunos puntos se determinó la presión superficial de aparición y desaparición de la fase ordenada por expansión y compresión, respectivamente, y no se indica un límite definido para la coalescencia de las fases en dicha región del diagrama.

3.2 Membranas soportadas.

3.2.1. Transferidas desde monocapas.

Mediante los métodos de Langmuir-Blodgett y Langmuir-Schaeffer (ver Sección 2.1.2) se obtuvieron monocapas (SLMs) y bicapas (SLBs) sobre soportes sólidos a partir de

monocapas de Langmuir en la interfase agua-aire. Utilizando vidrios cubreobjetos circulares como soporte, se realizaron las transferencias de films que contenían PE-Rho a 30 mNm^{-1} y se observaron los sistemas utilizando microscopía de fluorescencia. La Figura 3.6 muestra imágenes representativas de estos sistemas a $(21 \pm 1)^\circ\text{C}$. En *SLMs* se observó coexistencia de fases en el intervalo de composiciones comprendido entre $0,4 < X_{\text{DPPC}} < 0,9$, y la presencia de tres niveles de gris se observó para composiciones de $X_{\text{DPPC}} > 0,6$ con un patrón similar que el de las monocapas de Langmuir. Para *SLBs*, se observaron dos fases entre $0,35 < X_{\text{DPPC}} < 0,9$ y la aparición del tercer nivel de gris en composiciones de $X_{\text{DPPC}} > 0,7$. Cabe destacar que en el caso de las bicapas, el diagrama de fases no cambiaba al intercambiar la proximidad al soporte de la hemicapa observada, es decir que al observar la hemicapa distal (^dSBL) o la proximal (^pSBL) respecto del soporte, se obtuvieron resultados similares. Todos los films soportados son estables en el tiempo, y sus texturas permanecen inalteradas hasta 24 h después de llevado a cabo experimento.

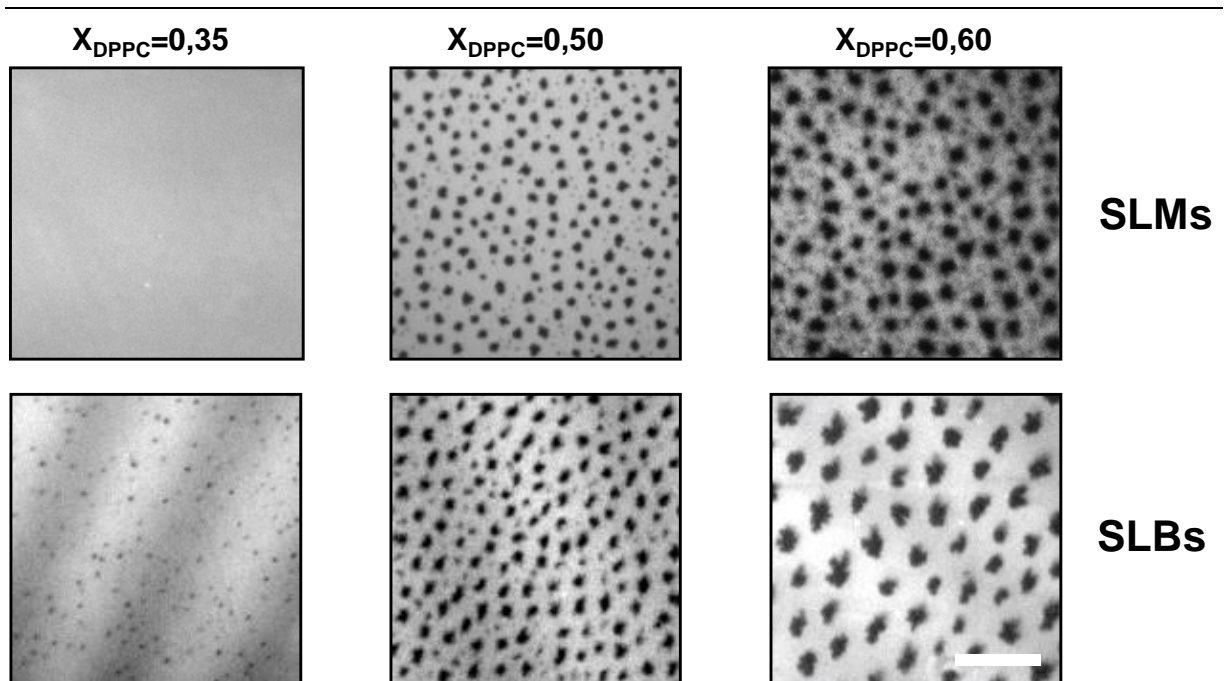


Figura 3.6. Micrografías de monocapas (*SLMs*), o bicapas (*SLBs*) soportadas sobre vidrio, tomadas con objetivo 20X. Tamaño: $168 \times 168 \mu\text{m}^2$. Barra: $50 \mu\text{m}$.

3.2.2. Transferidas desde SUVs.

Se obtuvieron vesículas unilamelares pequeñas (SUVs) para las composiciones de mezcla DPPC:DLPC: $X_{\text{DPPC}} = 0,25$; $0,5$; y $0,75$, con una población mayoritaria de $\sim 30 \text{ nm}$ de diámetro (Figura 3.7). Dichas vesículas se incubaron sobre vidrios circulares, y se comprobó su ruptura y transferencia al soporte mediante FM, sin embargo, no se observaron dominios microscópicos, como se muestra en la Figura 3.7.

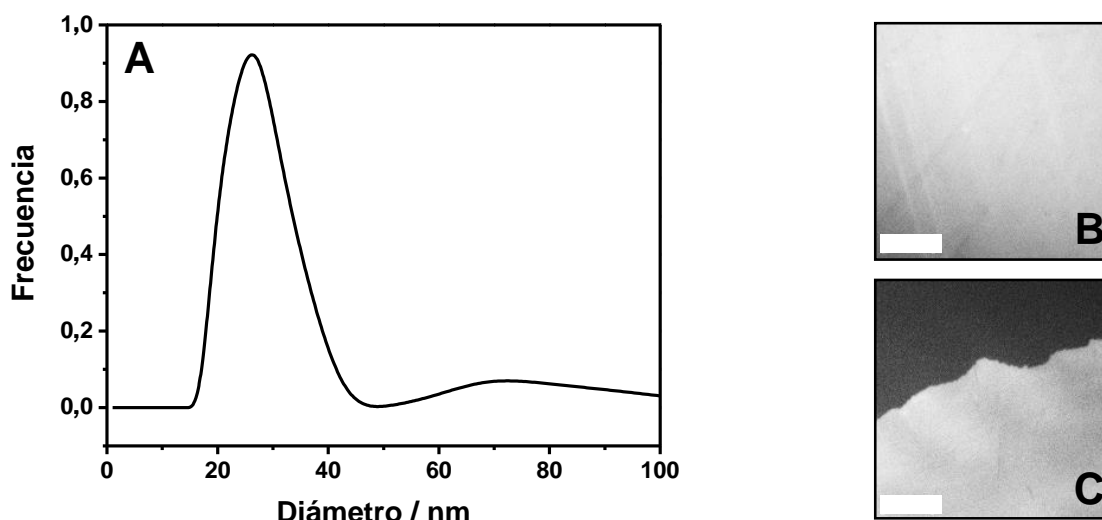


Figura 3.7. (A) Distribución de tamaños de las SUVs obtenido por DLS. El máximo corresponde a 26 nm. (B) y (C) Micrografías de bicapas soportadas transferidas desde SUVs. Las regiones claras corresponden a zonas donde la transferencia fue efectiva (se observa fluorescencia). En (C) se muestra la interfase entre una región en donde la transferencia no fue efectiva en contacto con una región en la que se puede visualizar fluorescencia. No se observaron dominios microscópicos. Barras: 50 μm .

En trabajos previos, se estudiaron vesículas multilamelares de esta mezcla mediante calorimetría diferencial de barrido, y a 20 °C se observó segregación en fases en el rango $0,25 < X_{\text{DPPC}} < 0,8$ ⁸⁶. Por otra parte, Ipsen y col.⁸⁸ calcularon el diagrama de fases para bicapas de esta mezcla y propusieron la presencia de coexistencia de fases en el intervalo $0,22 < X_{\text{DPPC}} < 0,81$ a 20 °C. Por lo tanto, se espera la presencia de coexistencia de fases en SUVs, implicando la presencia de una población de SUVs en fase LE y otra en fase LC, o SUVs con presencia de las dos fases. Cuando SUVs de 30 nm de diámetro se rompen sobre el vidrio para formar bicapas soportadas, se formarían dominios de aproximadamente 0,03 μm^2 o más pequeños, por lo que si no existiera reorganización del film en la superficie, dichos dominios deberían permanecer con tamaños menores al micrómetro. La presencia de dominios submicrométricos no puede detectarse mediante FM, y se requieren técnicas de caracterización superficial de mayor resolución como microscopía de fuerza atómica (AFM). Debido a que las bicapas soportadas deben permanecer en un ambiente acuoso, no fue posible realizar AFM sobre dicho sistema para comprobar la presencia/ausencia de dominios nanoscópicos, ya que el *set-up* disponible no permitía medir en medio líquido. Sin embargo, se ha reportado la observación de nanodominios visualizados por AFM para bicapas de DPPC:DLPC generada por la ruptura de vesículas unilamelares grandes (LUVs) sobre mica⁸³, por lo que es posible que en este sistema existan dominios por debajo de la resolución óptica.

Debido a que se ha reportado nucleación de dominios en films soportados al enfriarlos luego de incrementar la temperatura por encima de su temperatura de transición⁸⁹⁻⁹¹, se realizó el experimento de calentar el sistema para constatar si la reorganización lipídica generada durante el ciclo de calentamiento-enfriamiento podía resultar en la formación de

dominios microscópicos. Sin embargo, luego de enfriar la muestra hasta la temperatura de trabajo inicial no se observaron cambios.

En el próximo capítulo, se discutirá la influencia del método de transferencia y del soporte utilizado sobre las propiedades observadas en estos sistemas.

3.3 Bicapas no soportadas (*free-standing*).

3.3.1. GUVs.

El diagrama de fases de la mezcla DPPC:DLPC en GUVs fue reportado por Fidorra y col.⁸⁴ junto a una cuantificación precisa del área ocupada por cada fase en la región de coexistencia de fases. Con el objetivo de comparar los resultados obtenidos hasta aquí con los datos reportados para GUVs, y debido a que estos autores utilizaron una sonda fluorescente distinta, se realizaron experimentos control a fin de corroborar que los bordes del diagrama de fases en GUVs utilizando PE-Rho fueran similares a los informados en la ref 3 (ver detalles en Anexo). El porcentaje de cada fase en coexistencia (fd=fase desordenada; fo=fase ordenada) obtenido para GUVs preparadas con PE-Rho a composiciones $X_{DPPC}=0,2$ y $X_{DPPC}=0,5$, fue similar a los reportados: $A^{fd}/A^{fo}=(3\pm 1)$ para $X_{DPPC}=0,2$ y $A^{fd}/A^{fo}=(0,5\pm 0,2)$ para $X_{DPPC}=0,5$ (ver sección siguiente).

Tomando en cuenta estos controles, se puede asumir que la sonda PE-Rho no altera el diagrama de fases de las GUVs, y los resultados publicados por Fidorra y col.⁸⁴ pueden utilizarse para establecer una comparación con los datos obtenidos en este trabajo.

3.4 Comparación de los modelos de membrana

Con el objetivo de realizar una comparación termodinámica entre los diferentes modelos de membrana, se calculó el área total ocupada por cada fase para todas las composiciones de la mezcla DPPC:DLPC en cada uno de los modelos estudiados, a partir de las micrografías obtenidas. Las regiones que presentaron tres niveles de gris fueron excluidas del análisis, debido a que la cuantificación en dichos sistemas se torna dificultosa, y es por lo tanto menos precisa. Si se considera la regla de la palanca que proporciona las cantidades relativas de cada fase en equilibrio, y se expresa como cocientes de áreas⁸⁴, se obtiene:

$$\left[\frac{A^{fd}}{A^{fo}} \right] (x) = \frac{a^{fd} x^{fo} - x}{a^{fo} x - x^{fd}} \quad \text{ec. 3.1}$$

donde A^{fd} y A^{fo} representan el área total ocupada por las fases desordenada y ordenada, a^{fd} y a^{fo} corresponden a las áreas moleculares de los lípidos en cada fase, x^{fo} y x^{fd} son los

intervalos de fracciones molares entre los cuales se observa coexistencia de fases, y x representa la composición de la mezcla expresada en fracción molar. Así, cambios en el gráfico del cociente de áreas A^{fd}/A^{fo} en función de la composición de la mezcla x , corresponderán a diferencias entre los diagrama de fases^{84,92}.

A diferencia de las monocapas de Langmuir, en bicapas (ya sean membranas soportadas o sistemas *free-standing*), no es posible controlar el área molecular. Por lo tanto, a fin de analizar y comparar las propiedades de cada sistema se hace necesario fijar una presión superficial a la cual se evaluarán los distintos modelos. En este sentido, se ha postulado que entre 30-35 mNm^{-1} , el área molecular en monocapas es equivalente al área observada en bicapas.^{93,94} No obstante, también se ha demostrado que las fluctuaciones térmicas en bicapas pueden generar variaciones de presión lateral de al menos 15 mNm^{-1} .⁹⁵ Si se grafica cómo varía el diagrama de fases de monocapas con la presión superficial y se compara con el de *GUVs* reportado por Fidorra y col.⁸⁴ como muestra la Figura 3.8, se puede concluir que para este sistema lipídico, es válido realizar la comparación entre cualquier valor de presión comprendido en el intervalo 25-40 mNm^{-1} , dentro del error experimental. De esta manera, la presión superficial seleccionada para realizar la comparación entre los sistemas fue de 30 mNm^{-1} (que corresponde a la presión a la cual se realizaron las transferencias en el caso de las membranas soportadas).

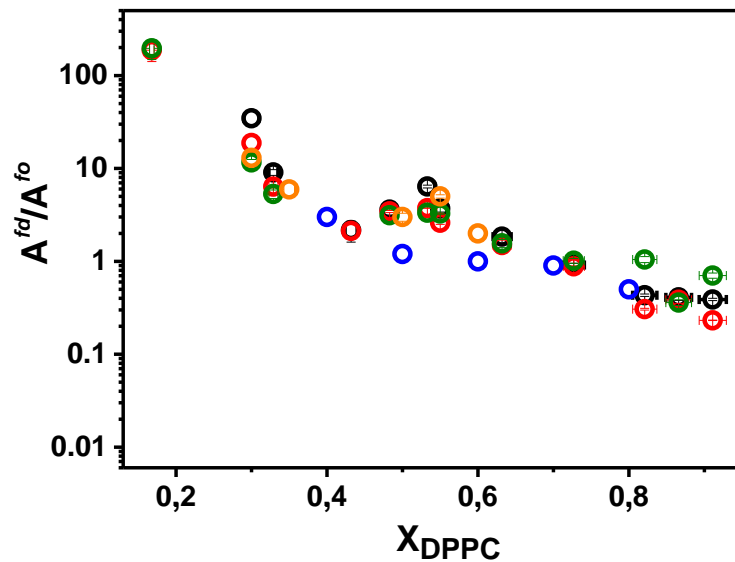


Figura 3.8. Fracción de área ocupada por la fase desordenada A^{fd} respecto de la fase ordenada A^{fo} , en función de la composición de la mezcla DPPC:DLPC para monocapas de Langmuir en la interfase agua-aire a diferentes presiones superficiales: (○) 25 mNm^{-1} ; (◐) 30 mNm^{-1} ; (◑) 35 mNm^{-1} ; (◒) 40 mNm^{-1} ; y (◓) *GUVs* (datos extraídos de la referencia 84).

En la Tabla 3.1 se resumen los valores obtenidos de las composiciones de los bordes del diagrama de fases para cada sistema, junto con valores reportados por otros autores.

Tabla 3.1. Composiciones de las fases en coexistencia en los modelos analizados

	LMS	SLMs	SLBs	SVRs	GUVs
x^{fd}	0,17 ^a	0,4 ^a	0,35 ^a	0,46 ^b	>0,15 y <0,2 ^a 0,28 ^b ; 0,18 ^c
x^{fo}	0,95 ^a	0,9 ^a	0,9 ^a	0,89 ^b	0,87 ^b ; 0,84 ^c

Fracción molar de DPPC en la fase desordenada (x^{fd}), fracción molar de DPPC en la fase ordenada (x^{fo}). ^aResultados de este trabajo, o tomados de ^bTokumasu y col. o ^cFidorra y col.

La Figura 3.9.A muestra la comparación de la relación entre las áreas de cada fase en función de la fracción molar de la mezcla para los sistemas estudiados que presentaron segregación de fases. Puede observarse que los valores obtenidos para *LMS* fueron ligeramente mayores que para *GUVs*. Este resultado no se relaciona con la presión escogida ya que como puede verse en la Figura 3.8. al comparar los datos publicados para *GUVs* con los resultados de *LMS* a distintas presiones superficiales, las relaciones de área son siempre ligeramente mayores para *LMS* respecto de *GUVs*, para las presiones analizadas. Por otra parte, en contraste con los resultados de *GUVs* y *LMS*, los valores obtenidos para los films soportados poseen una tendencia diferente, presentando una menor cantidad de fase *fo* para algunas composiciones de la mezcla. Este resultado indica que tanto en ^d*SLBs* como *SLMs*, el número de dominios es menor que en *LMS*. Una posible explicación podría ser que algunos dominios desaparezcan al transferirse al soporte, o bien los dominios de fase *fo* son más pequeños en los sistemas soportados.

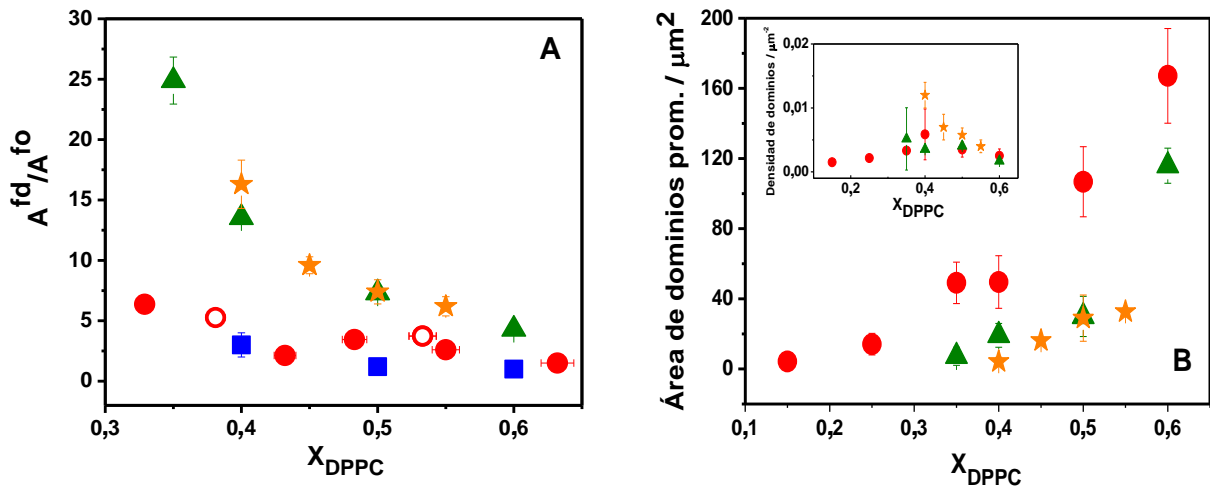


Figura 3.9. (A) Relación de área ocupada por las fases en coexistencia, A^{fd}/A^{fo} vs. fracción molar de DPPC para los diferentes modelos de membrana con dominios micrométricos. Los datos de GUVs fueron extraídos de la ref. 9. (B) Área promedio de dominios (μm^2) vs. fracción molar de DPPC. Inserto: Densidad de dominios (μm^{-2}) vs. fracción molar de DPPC. Símbolos: *LMS* observadas por BAM (●) o FM (○); *GUVs* (■); ^d*SLBs* (▲); *SLMs* (★).

La Figura 3.9B muestra el tamaño promedio de dominios (en área) y el número promedio de dominios por unidad de área (densidad de dominios) para *LMS*, *SLBs* y *SLMs* en

función de la fracción molar de DPPC. Se puede observar que mientras la densidad de dominios es similar para todos los sistemas analizados, los dominios poseen mayor tamaño en *L*Ms que en los sistemas soportados, lo que indica que al transferir la monocapa al soporte, los dominios se reducen. Como se mencionó anteriormente, tanto en sistemas soportados, formados a partir de la ruptura de vesículas,⁸³ como así también en monocapas transferidas mediante Langmuir-Schaefer sobre soportes modificados con C₁₄SH-Au,⁸² se reportó la presencia de nanodominios. Estos resultados, junto con la reducción de los dominios observada en la Figura 3.9B, sugieren una posible reorganización de las fases al transferir el film, en la cual los microdominios observados podrían coexistir con nanodominios que no pueden ser resueltos por FM. A fin de investigar esta posibilidad, se caracterizaron distintas muestras de *SL*Ms por AFM. Como se explicó anteriormente, el equipamiento disponible sólo permite explorar la topografía de superficies en aire, y no en soluciones acuosas. Debido a esto, los films *SL*Bs y *SV*Rs fueron excluidos de este análisis, ya que para conservar su estructura de bicapa, deben permanecer en medio líquido. La Figura 3.10. muestra una imagen representativa de contraste de fases de *SL*Ms determinada por AFM, en la que puede observarse la ausencia de dominios nanoscópicos, por lo que las diferencias en la relación de áreas mostradas en la Figura 3.9A, se debe a la diferencia en la composición de las fases en coexistencia, y no a un reordenamiento del film lipídico.

Como se indicó anteriormente, se ha reportado la presencia de nanodominios en *SV*Rs generadas sobre mica⁸³, por lo que podrían existir en las *SV*Rs generadas en este trabajo. En el caso de las bicapas sobre vidrio, no hay reportes de estudios con AFM para la mezcla analizada, y teniendo en cuenta que las imágenes obtenidas mediante FM de *SL*Bs y *SL*Ms fueron similares, se puede asumir la ausencia de dominios nanoscópicos en *SL*Bs, y de esta forma concluir que las composiciones de las fases en *SL*Bs y *SL*Ms son similares y difieren de las halladas para *GUV*s y *L*Ms.

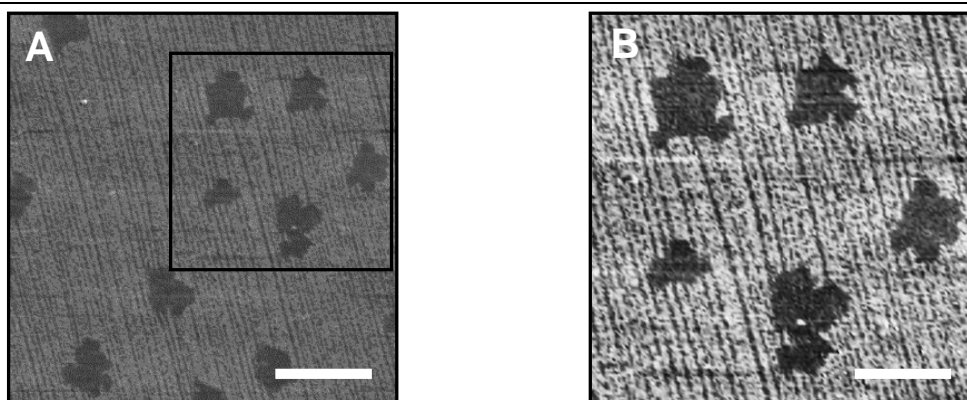


Figura 3.10. (A) Imágenes de *SL*Ms de composición $X_{\text{DPPC}}=0,5$ adquiridas por AFM. (A) Tamaño de la imagen: $20 \times 20 \mu\text{m}^2$, la barra de escala corresponde a $5 \mu\text{m}$. (B) Magnificación de la región delimitada en (A), tamaño: $12 \times 12 \mu\text{m}^2$, la barra corresponde a $3 \mu\text{m}$. No se observan dominios nanoscópicos.

Se obtuvo la misma relación entre las áreas de las fases para *SLMs* por FM y por AFM, como puede observarse en la Tabla 3.2 para la composición $X_{DPPC}=0,5$. Además, se incluyen las relaciones de área obtenidas para *SLBs*, en donde puede observarse que en promedio el valor de A^{fd}/A^{fo} en dSLBs (la hemicapa de interés se transfiere distal respecto del soporte) es similar al obtenido en pSLBs (la hemicapa de interés se transfiere próxima al soporte). De esta manera, la composición de las fases no cambia, independientemente del orden en el que se transfieran las monocapas. Este resultado descarta efectos que pudieran surgir como consecuencia de *flip-flop* entre las hemicapas, como se describió previamente en films soportados⁹⁶. Adicionalmente, dichos resultados sugieren que las interacciones de corto alcance entre la hemicapa proximal y el soporte, no influyen en el diagrama de fases del film transferido. Así, las diferencias observadas entre los modelos de membranas *free-standing* y soportadas, que indican que el soporte modifica el diagrama de fases de las membranas, podrían deberse a la pérdida de grados de libertad por el confinamiento del sistema. En este sentido, se han reportado efectos similares derivados de la supresión entrópica para films de DPPC:DLPC:colesterol en mica⁸³, e incluso se ha observado la desaparición de la fase ondulada (*ripple phase*) en bicapas soportadas de DPPC pura.⁹⁷

Tabla 3.2. Relaciones de área para las membranas soportadas a $X_{DPPC}=0,5$.

Sistema	A^{fd}/A^{fo}
SLMs	7±1 (FM)
	9±1 (AFM)
dSLBs	7,3±0,4 (FM)
pSLBs	7,4±0,8 (FM)

Otro corolario importante de los resultados obtenidos, es que las interacciones inter-hemicapa parecen no alterar el diagrama de fases del film de esta mezcla, ya que, por un lado, los resultados para *GUVs* y *LMs* son similares, y por otra parte, se observan sólo pequeñas diferencias entre *SLMs* y *SLBs*. Al comparar las imágenes de *LMs*, *SLMs* y *SLBs* (por ejemplo las mostradas en la Figura 3.3 B y C, con las de la Figura 3.6.) se puede observar que los niveles de gris son diferentes al variar el modelo de membrana (efecto más notorio en la fase continua), lo cual implica que la concentración de la sonda fluorescente en cada fase varía de un sistema a otro. Por ello, calculamos el coeficiente de distribución (o partición) de la sonda fluorescente (P) en cada fase como la siguiente relación:

$$P = \frac{C_{fo}}{C_{fd}} = \frac{NG_{fo}-BG}{NG_{fd}-BG} \quad \text{ec 3.2.}$$

donde C_{fo} y C_{fd} corresponden a la concentración de la sonda en las fo y fd respectivamente; NG_{fo} y NG_{fd} son los niveles de gris en cada fase, y BG corresponde a la señal oscura, es decir, la señal que llega al detector en ausencia de sonda. Para que la ecuación 3.2 sea válida, el rendimiento cuántico de PE-Rho debe ser independiente del estado de la fase en la cual está inserta. Dicho control fue realizado previamente en el laboratorio, midiendo el nivel de gris de imágenes de monocapas en distinto estado de fase incluyendo cantidades crecientes de la sonda fluorescente. Para ello, se realizaron monocapas de un fosfolípido en fase LE y el mismo fosfolípido en mezclas con colesterol (fase líquido-ordenada). Como resultado se obtuvieron gráficos lineales de nivel de gris (descontando la señal oscura) en función de la concentración de PE-Rho, cuyas pendientes fueron de $32 \pm 3 \times 10^2 \text{ nm}^2/\text{mol}\%$ ($R^2 = 0.979$) para las monocapas en fase LE y $30 \pm 1 \times 10^2 \text{ nm}^2/\text{mol}\%$ ($R^2 = 0.996$) para las monocapas en fase LO (datos no mostrados), lo cual indica que el rendimiento cuántico de la sonda no varía en los distintos estados de fase. De esta manera, para calcular P, se determinó el nivel de gris dentro de un dominio y en la fd que lo rodea para diferentes regiones de las imágenes, y los valores reportados corresponden al promedio calculado para diferentes regiones de 5 o más imágenes. P se calculó sobre imágenes con composición $X_{DPPC}=0,5$ y conteniendo 0,5 y 1% mol de PE-Rho, obteniendo valores similares con ambas concentraciones de la sonda en cada sistema. La Figura 3.11 muestra los resultados promedio obtenidos, en donde puede verse que P incrementa en el orden $GUVs < LMs < {}^pSLBs \approx {}^dSLBs < SLMs$.

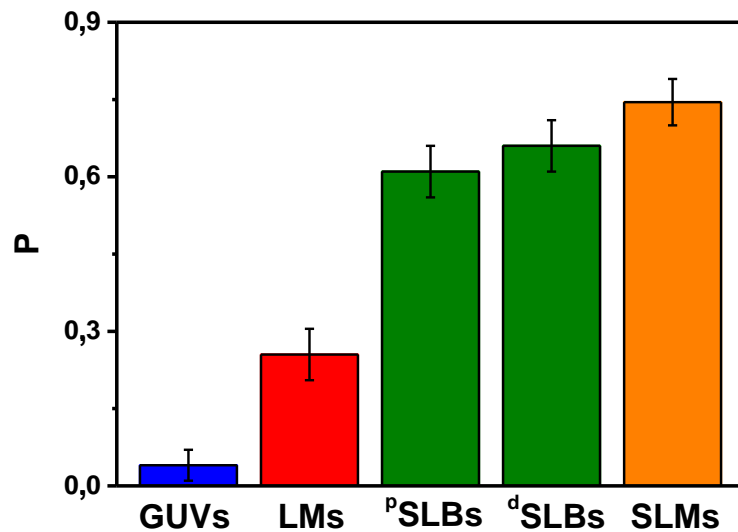


Figura 3.11. Coeficiente de distribución promedio (P) de la sonda fluorescente PE-Rho en los diferentes modelos analizados que mostraron dominios micrométricos. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los valores de P determinados individualmente, y son similares a la diferencia entre los valores obtenidos al utilizar 0,5 % o 1 % mol de PE-Rho.

Las diferencias en el valor de P entre los distintos sistemas, indican que las propiedades de cada fase no son las mismas al cambiar el modelo de membrana (probablemente la densidad, la rigidez en la estructuración de los lípidos y/u otro parámetro

de orden de las fases cambia). A medida que el valor de P se aproxima a la unidad, las fases coexistentes se vuelven más similares entre sí, por lo que la fd se vuelve más ordenada y/o la fo se expande. La composición de las fases en coexistencia en films soportados difiere de las de *GUVs* y *LMs*. Como muestra la Tabla 3.1, en las membranas soportadas, la fase desordenada está enriquecida en DPPC respecto de los films *free-standing* ($X_{\text{DPPC}} \sim 0,2$ para *LMs* y *GUVs* y $X_{\text{DPPC}} \sim 0,4$ para los films soportados), lo que podría relacionarse a un incremento en el orden de las cadenas hidrocarbonadas que devendría en una mayor similitud entre las propiedades de fd y fo. Sin embargo, *GUVs* y *LMs* mostraron valores similares de composición de las fases, pero el valor de P difiere, por lo que las diferencias observadas en el valor de P no derivan solamente del cambio en dicha composición.

3.5 Conclusiones

En este capítulo, se analizó el diagrama de fases de films compuestos por la mezcla DPPC:DLPC, utilizando diferentes modelos de membrana con el objetivo de comparar sus propiedades termodinámicas. Los resultados mostraron que la composición de las fases coexistentes a (21 ± 1) °C en *LMs* y *GUVs* fue ligeramente diferente entre los modelos, mientras que para sistemas soportados los bordes del diagrama de fases se corrieron hacia mayores proporciones de DPPC, indicando que en dichos sistemas la fase desordenada está enriquecida en DPPC (ver Tabla 3.1). Las diferencias observadas en la composición de las fases en coexistencia entre los modelos *free-standing* y soportados no se deben a interacciones específicas de corto alcance entre el vidrio y la membrana lipídica, ya que se encontraron resultados similares al analizar la hemicapa proximal al vidrio o la distal (ver Tabla 3.2). Debido a esto, las diferencias que surgen al comparar los sistemas soportados con los *free-standing* podrían ser consecuencia de la supresión entrópica generada por la presencia del soporte rígido, como se reportó anteriormente para films lipídicos sobre mica⁸³.

Tanto el diagrama de fases como la distribución de la sonda fluorescente entre las fases fd y fo, indican que éstas se vuelven más similares entre sí en sistemas soportados, probablemente debido a que la fase desordenada se torna más rígida, producto del confinamiento.

Las bicapas formadas por ruptura de vesículas sobre vidrio, no mostraron segregación de fases, sin embargo, con la técnica de visualización utilizada (FM) no es posible descartar la presencia de dominios de tamaño nanométrico. Asumiendo que existe segregación de fases en este sistema, se puede concluir que la textura del film (distribución de las fases coexistentes en el plano de la membrana) depende del modelo y el método de preparación del film.

Las diferencias encontradas para la composición de las fases en coexistencia entre monocapas y bicapas fueron pequeñas (*LMs* comparadas con *GUVs* y *SLMs* comparadas con *SLBs*), indicando que las interacciones inter-hemicapa no afectan marcadamente el diagrama de fases de la mezcla estudiada.

La tendencia observada para el coeficiente de distribución de la sonda, fue: $GUVs < LMs < {}^dSLBs \approx {}^pSLBs < SLMs$, que correlaciona con los grados de libertad que posee cada sistema: en *GUVs* la membrana puede fluctuar libremente fuera del plano, mientras que en *LMs* dichas fluctuaciones se encuentran más restringidas y en los films soportados se suprimen debido a la presencia del sólido. Esto sugiere que la pérdida de entropía promueve que las fases f_o y f_d sean más parecidas entre sí en el orden: $GUVs < LMs < {}^dSLBs \approx {}^pSLBs \approx SLMs$.

Es importante comprender las limitaciones de cada modelo experimental, de manera de poder determinar la validez de los parámetros medidos, y en qué manera las tendencias generales observadas pueden extrapolarse a otros modelos o a sistemas complejos como las membranas celulares. En este Capítulo, se realizó una comparación de modelos de membranas lipídicas *free-standing* y soportadas, y se encontraron características similares en la mayoría de los sistemas analizados. No obstante, un análisis más cuantitativo lleva a la conclusión de que las propiedades de las fases en coexistencia son diferentes de un modelo a otro. Es remarcable, que incluso con una simple mezcla binaria de fosfolípidos, que no muestra interacciones específicas fuertes con el soporte, las propiedades de las fases cambien de un sistema a otro.

“...el que quiera tener aciertos sin error, orden sin desorden,
es que no entiende los principios del Cielo y de la Tierra.
No sabe cómo encajan las cosas”.

Chuang Tzu, Grande y pequeño.

Capítulo 4: Transiciones de fase de lípidos puros en films *free-standing* y soportados.

Resumen

En este capítulo se compara el comportamiento termodinámico de films soportados y *free-standing* constituidos por fosfolípidos con distinto largo de cadena hidrocarbonada. Se demuestra que el cambio de energía libre necesario para la transición de fase a un estado ordenado es mayor en sistemas *free-standing* que en soportados, siendo los resultados observados independientes del largo de la cadena del lípido. Así, la presencia del soporte produce un efecto de largo alcance que afecta a ambas hemicapas y disminuye la diferencia energética entre las fases coexistentes en $1,7 \text{ kJmol}^{-1}$. Este fenómeno probablemente esté relacionado con el impedimento del movimiento fuera del plano del film debido a la superficie sólida.

Introducción

En las últimas décadas, a partir del desarrollo de biosensores y la implementación de técnicas de alta resolución, el modelo de bicapas soportadas (*SLBs*) ha ganado creciente interés.^{98,99} Una de las ventajas de este modelo es que permite reproducir la asimetría composicional de las membranas biológicas, así como también la inclusión de sólidos inorgánicos, y materiales poliméricos que permiten desacoplar la membrana del soporte.^{72,96,100,101} Sin embargo, hasta el día de hoy, no se posee un entendimiento completo de la influencia que el método de preparación de las membranas soportadas, y la naturaleza del sólido que sirve como soporte, tienen sobre las propiedades del sistema.

En el capítulo anterior, se realizó una comparación sistemática de las propiedades termodinámicas de diferentes modelos de membrana de la mezcla DPPC:DLPC, y los resultados indicaron que las propiedades de las fases en coexistencia se vuelven más similares al confinar el sistema sobre un soporte de vidrio. Con el objetivo de investigar las posibles causas del comportamiento observado, en este Capítulo se analiza la diferencia energética de la transición de fase, utilizando monocapas de Langmuir como modelo de membranas *free-standing* y bicapas soportadas como modelo de membranas soportadas, para cinco fosfatidilcolinas con diferente largo de cadena.

Inicialmente, se muestran los resultados obtenidos, y al final se realiza una discusión sobre los factores que influyen en la transición de fase de los lípidos en los modelos de membrana estudiados.

4.1 Diagramas de fase y composición de las fases en coexistencia.

Para este trabajo, se utilizaron mezclas binarias de lípidos que presentan segregación en fases en un intervalo determinado de composiciones. Para monocapas de Langmuir (*LMs*) la coexistencia de fases se registró utilizando BAM y FM, permitiendo la construcción de un diagrama de fases para cada mezcla lipídica. De esta manera, se determinó la composición de las fases en coexistencia (x^{fo} y x^{fd}) en todo el rango de presiones superficiales, al igual que se realizó para la mezcla DPPC:DLPC en el capítulo anterior. A modo de ejemplo, la Figura 4.1 muestra el diagrama de fases de monocapas compuestas de DSPC:DLPC, junto a micrografías obtenidas por FM ($X_{\text{DSPC}}=0,03$ y $0,2$) y BAM ($X_{\text{DSPC}}=0,8$ y $0,97$) a 30 mNm^{-1} . Los círculos llenos (●) indican la presión superficial que delimita las regiones con coexistencia de fases fd/fo y el film homogéneo en fase desordenada, y los círculos vacíos (○) corresponden a la presión de colapso del film. La línea de puntos indica la presión a la cual se realizó la comparación entre monocapas y bicapas soportadas, es decir, la transferencia al sólido fue realizada a 30 mNm^{-1} . Los valores obtenidos de x^{fd} y x^{fo} (composiciones de las fases desordenada y ordenada) a 30 mNm^{-1} fueron $0,03$ y $0,97$ respectivamente para monocapas compuestas de DSPC:DLPC. Como muestra la Figura 4.1B estos límites cambian para *SLBs*, siendo $x^{fd} = 0,04$ y $x^{fo} = 0,75$. Nótese que para determinar la composición a la cual el film forma una fase homogénea fo , en *LMs* se utilizó BAM que permite una clara detección de la coalescencia de las fases, mientras que para *SLBs* sólo FM puede utilizarse. La incorporación de la sonda fluorescente impidió la visualización de la composición en la que el film soportado se encontraba completamente en fo , debido a que la sonda se localiza preferentemente en la fase fd . Así, cuando un estado totalmente condensado era alcanzado, las imágenes de FM eran inhomogéneas debido a acumulaciones de la sonda que es excluida de la fo (ver micrografías de $X_{\text{DSPC}}=0,75$ y $0,90$). Debido a esto, para *SLBs* se tomó como límite a la proporción de lípido a la cual tanto la apariencia de la imagen como el área ocupada por las regiones brillantes no cambiaban al variar la composición de la mezcla.

Como se explicó en el capítulo anterior, la relación entre los porcentajes de área fd y fo para una dada composición lipídica en un sistema que se segrega en fases, se relaciona con el diagrama de fases de dicha mezcla mediante la regla de la palanca: la composición y las propiedades generales de las fases en coexistencia no cambian en todo el rango de coexistencia de fases para una dada presión y temperatura. Todas las mezclas utilizadas

siguen la regla de la palanca como se ejemplifica en la Figura 4.1C para DSPC:DLPC en sistemas *free-standing* y soportados.

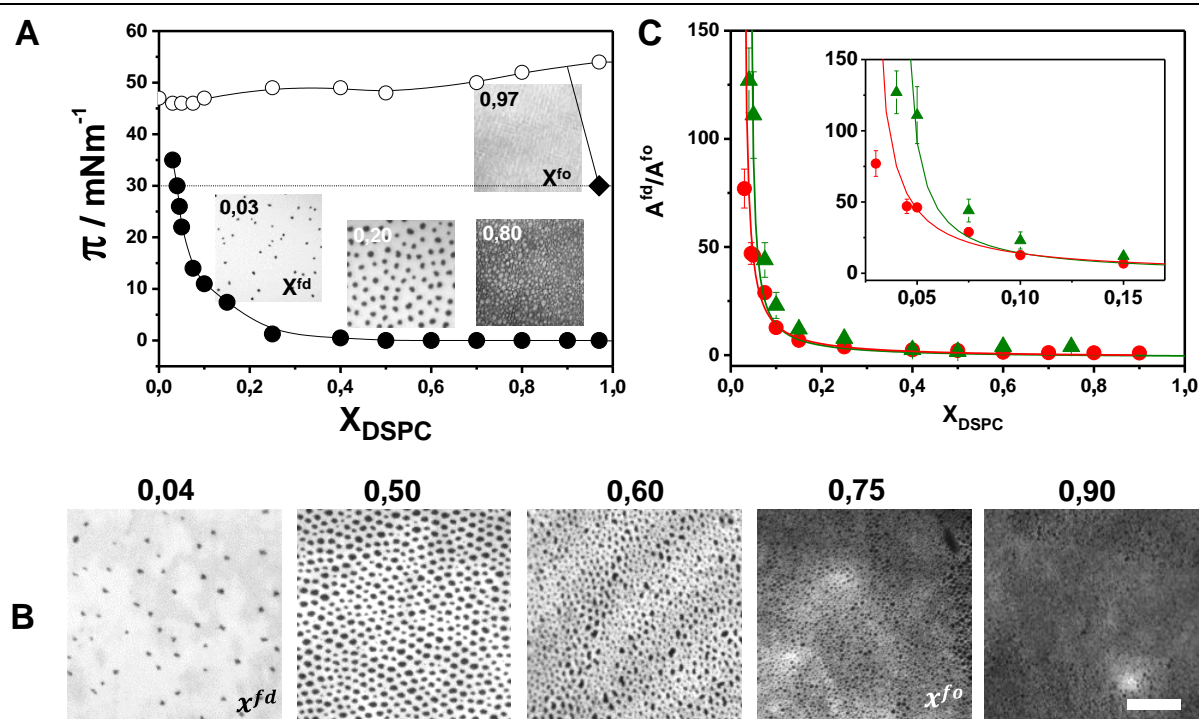


Figura 4.1. (A) Diagrama de fases (Presión superficial, π vs. fracción molar de DSPC, X_{DSPC}) para monocapas de Langmuir de la mezcla DSPC:DLPC a (22 ± 1) °C. Límite entre regiones de coexistencia de fases determinado con BAM o FM: límite entre fo/fd y fd (\bullet); límite entre fo/fd y fo (\blacklozenge); y presión de colapso del film (\circ). La línea punteada indica la presión superficial de transferencia, a la cual se realizó la comparación entre films soportados y *free-standing* ($\pi = 30$ mNm $^{-1}$). Insertos: micrografías representativas registradas por FM ($X_{\text{DSPC}} = 0,03$ y $0,20$, $400 \times 400 \mu\text{m}^2$) y BAM ($X_{\text{DSPC}} = 0,80$ y $0,97$, $150 \times 150 \mu\text{m}^2$). (B) Imágenes de bicapas soportadas de la mezcla DSPC/DLPC transferidas por el método LB-LS tomadas con FM en agua (Tamaño: $400 \times 400 \mu\text{m}^2$, la barra corresponde a: $100 \mu\text{m}$). Para los dos sistemas se indican los valores de X_{DSPC} , x^{fd} y de x^{fo} . (C) Relación de áreas (A^{fd}/A^{fo}) vs X_{DSPC} para LMs (\bullet) y SLBs (\blacktriangle) junto con las curvas calculadas a partir de la regla de la palanca (ver ec. 3.1). Inserto: magnificación de la escala resaltando las diferencias entre los sistemas.

Anteriormente, se mostró que la composición de las fases en SLBs de la mezcla DPPC:DLPC era la misma para la hemicapa distal o proximal respecto del soporte, indicando que las posibles interacciones de corto alcance entre el vidrio no modifican la segregación de fases de dicha mezcla¹⁰². Además, al comparar los límites de las fases de monocapas con bicapas tanto en modelos *free-standing* o soportados (LMs vs GUVs y SLMs vs SLBs) se encontró que eran similares, sugiriendo que las interacciones inter-hemicapa tampoco alteraban el diagrama de fases de la mezcla¹⁰².

Con el objetivo de comprobar si este comportamiento se reproducía para otros films de fosfolípidos adsorbidos sobre vidrio, se analizaron las áreas ocupadas por las fases fo y fd de otras dos mezclas. La Tabla 4.1 proporciona un resumen de los resultados obtenidos para las mezclas DAPC:DMPC (diferencia de 4 carbonos) y DSPC:DLPC (diferencia de 6 carbonos). Las relaciones entre las áreas fd y fo para SLBs son similares cuando la hemicapa

que contiene la mezcla se transfiere primero (próxima al soporte) o cuando es la más distante al soporte, indicando que las composiciones observadas no se afectan por la difusión transversal de lípidos (*flip-flop*), y que los resultados observados pueden considerarse válidos para ambas hemicapas, descartando por lo tanto interacciones de corto alcance entre el grupo polar y el vidrio. Incluso, en ausencia de una segunda hemicapa (monocapas soportadas, *SLMs*) las relaciones entre áreas obtenidas permanecen iguales, por lo que las interacciones inter-hemicapa no modifican el diagrama de fases de las mezclas utilizadas en este trabajo.

Tabla 4.1. Fracciones de área para diferentes mezclas en la hemicapa distal (^dSLBs) o proximal (^pSLBs) de bicapas y monocapas soportadas (SLMs)^a

SISTEMA	A ^{fd} /A ^{fo}	
	DAPC:DMPC	DSPC:DLPC
	X _{DAPC} =0,07	X _{DSPC} =0,25
^d SLBs	38±7	7±1
^p SLBs	35±5	5±2
SLMs	33±5	6±1

^aDAPC y DSPC puros forman la hemicapa proximal en ^dSLBs, y la hemicapa distal en ^pSLBs. SLMs fueron observadas en aire y SLBs bajo agua.

Como se explicó previamente, se determinó la composición de las fases en coexistencia para cinco mezclas binarias de lípidos. Los valores obtenidos se proporcionan en la Tabla 4.2, donde puede observarse que el intervalo de coexistencia de fases siempre se reduce al confinar el sistema, es decir, los lípidos son más miscibles en presencia del soporte sólido.

Tabla 4.2. Composición de las fases en coexistencia en mezclas binarias de fosfolípidos para sistemas *free-standing* y soportados.

Mezcla lipídica	LMs		SLBs	
	X ^{fd}	X ^{fo}	X ^{fd}	X ^{fo}
DPPC:DLPC	0,170 ± 0,007	0,95 ± 0,04	0,35 ± 0,01	0,90 ± 0,04
DSPC:DMPC	0,080 ± 0,003	0,92 ± 0,04	0,120 ± 0,005	0,80 ± 0,03
DSPC:DLPC	0,030 ± 0,001	0,90 ± 0,04	0,040 ± 0,002	0,75 ± 0,03
DPPC:DMPC	0,40 ± 0,02	0,85 ± 0,03	0,45 ± 0,02	0,80 ± 0,03
DAPC:DMPC	(50±2)10 ⁻⁴	0,96 ± 0,04	(100±4)10 ⁻⁴	0,87 ± 0,03

Los valores indicados para X^{fd} y X^{fo} corresponden a la proporción del lípido de cadena más larga de cada mezcla.

Sin embargo, no puede describirse una tendencia cuantitativa general, debido a que los límites entre las fases se corren en diferentes proporciones dependiendo de la mezcla, y

por lo tanto debe analizarse otro parámetro para realizar una comparación más cuantitativa entre los sistemas, el cual será discutido en la siguiente sección.

4.2 Cálculo de la energía libre para la transición de fase.

En las regiones en donde coexisten las fases *fd* y *fo* en equilibrio, el potencial químico de cada lípido *i* en cada fase es el mismo, es decir:

$$\mu_i(fo) = \mu_i(fd) \quad \text{ec. 4.1}$$

Si asumimos mezclas con comportamiento ideal:

$$\mu_i(fo) = \mu_i^\emptyset(fo) + RT \ln(x_i^{fo}) \quad \text{ec. 4.2}$$

$$\mu_i(fd) = \mu_i^\emptyset(fd) + RT \ln(x_i^{fd}) \quad \text{ec. 4.3}$$

Así, combinando las ecuaciones 4.1, 4.2 y 4.3:

$$\mu_i^\emptyset(fo) + RT \ln(x_i^{fo}) = \mu_i^\emptyset(fd) + RT \ln(x_i^{fd})$$

$$\Delta\mu_i^{\emptyset,fo-fd} = RT \ln\left(\frac{x_i^{fd}}{x_i^{fo}}\right) \quad \text{ec. 4.4}$$

La ecuación 4.4 indica que la diferencia de potencial químico para la transición de fase *fd*→*fo* de un lípido puro ($\Delta\mu^\emptyset$ de aquí en más) puede estimarse conociendo las composiciones de las fases en coexistencia en una dada mezcla binaria. Este cálculo es válido para mezclas ideales, y si bien nuestros sistemas no se mezclan idealmente (de hecho, se segregan en fases), cada fase posee una muy baja proporción de uno de los componentes, por lo que cada fase puede aproximarse como una mezcla diluida y por lo tanto, con bajas desviaciones de la idealidad.

La ventaja del método propuesto para el cálculo de $\Delta\mu^\emptyset$, radica en que las composiciones de las fases coexistentes en membranas pueden determinarse fácilmente mediante la visualización de la presencia o ausencia de dominios utilizando técnicas de microscopía, como se realizó en esta Tesis.

Utilizando la ec. 4.4 y las composiciones mostradas en la Tabla 4.2, se calculó la diferencia de potencial químico para la transición de fase *fd*→*fo* para fosfatidilcolinas con diferente largo de cadena (de 12 a 20 carbonos) en sistemas *free-standing* (*LMs*) y soportados (*SBLs*) a una temperatura de (22±1) °C, y a 30 mNm⁻¹ de presión superficial. Para cada mezcla binaria se obtuvieron dos valores de $\Delta\mu^\emptyset$, correspondientes a la transición de fase de los

lípidos puros que la componen. Para un dado lípido, en algunos casos se obtuvo más de un valor de $\Delta\mu^\ominus$ (tanto en *LMs* como en *SLBs*) dado que formaba parte de más de una mezcla binaria, como se indica en la Tabla 4.3. Es importante remarcar que para dichos lípidos, los valores de $\Delta\mu^\ominus$ obtenidos fueron similares, independientemente de la mezcla utilizada para su determinación. Esto indicaría que la aproximación de que cada fase se comporta como una mezcla ideal es válida. Como era predecible, para lípidos con cadena menor a 16 carbonos el cambio de energía para la transición fue positivo dado que dichos lípidos son estables en fase *fd* a 22 °C y 30 mNm⁻¹. Por otra parte, se observó el comportamiento inverso en el caso de lípidos de cadenas con 16 carbonos o más. Particularmente en el caso de DPPC, los resultados obtenidos concuerdan con los valores reportados de energía libre de Gibbs para monocapas utilizando un método diferente de cuantificación, que utiliza la mecánica estadística para la deconvolución de la transición de fase de la isoterma.¹⁰³

Tabla 4.3. Diferencia de potencial químico para la transición de *fd* a *fo* en modelos *free-standing* y soportados.

Lípido	mezclado con	<i>LMs</i> $\Delta\mu^\ominus$ (kJmol ⁻¹)	<i>SLBs</i> $\Delta\mu^\ominus$ (kJmol ⁻¹)
DLPC	DPPC	6,9±0,5	4,6±0,5
	DSPC	5,6±0,5	3,3±0,5
DMPC	DPPC	3,4±0,5	2,5±0,5
	DSPC	6,0±0,5	3,6±0,5
	DAPC	7,9±0,5	5,0±0,5
DPPC	DLPC	-4,2±0,5	-2,3±0,5
	DMPC	-1,8±0,5	-1,4±0,5
DSPC	DLPC	-8,3±0,5	-7,2±0,5
	DMPC	-6,0±0,5	-4,7±0,5
DAPC	DMPC	-12,9±0,5	-11,0±0,5

Se asignó un error máximo de 0,5 para los valores de $\Delta\mu^\ominus$, derivado del error en la concentración de las soluciones de las mezclas lipídicas y de los experimentos independientes para la determinación de los valores de x^{fd} y x^{fo} .

En la Figura 4.2A se grafica la información mostrada en la Tabla 4.3 en función del largo de la cadena hidrocarbonada de las diferentes fosfatidilcolinas utilizadas. A partir de este gráfico, pueden obtenerse dos conclusiones principales: en primer lugar, existe una correlación entre el largo de la cadena y los valores de $\Delta\mu$ obtenidos para lípidos con más de

16 carbonos, haciéndose más negativos a medida que el largo de cadena incrementa. Por el contrario, para lípidos más cortos, la contribución de la cadena hidrocarbonada a la energética de la transición de fase es despreciable, sugiriendo que en dicho caso intervienen otros factores que dominan el proceso de transición, como por ejemplo, el grupo polar y/o el agua de hidratación. En segundo lugar, en todos los casos el $\Delta\mu^\theta$ para la transición es menor en sistemas soportados que en *free-standing*; nótese que las columnas negras son más cercanas a cero que las respectivas columnas grises para cada lípido. En otras palabras, las fases se vuelven energéticamente más parecidas cuando el film se encuentra confinado, para todos los lípidos analizados. Curiosamente, la diferencia en el costo energético para la transición de fase en *SLBs* y *LMs* es independiente del lípido. En la Figura 4.2B se muestra el valor absoluto de la diferencia entre los valores de $\Delta\mu^\theta$ de *LMs* y *SLBs*. Se puede observar que todos los valores obtenidos son similares dentro del error, y en promedio, la transición de fase en films soportados cuesta (1.7 ± 0.8) kJ.mol⁻¹ menos que para modelos *free-standing*.

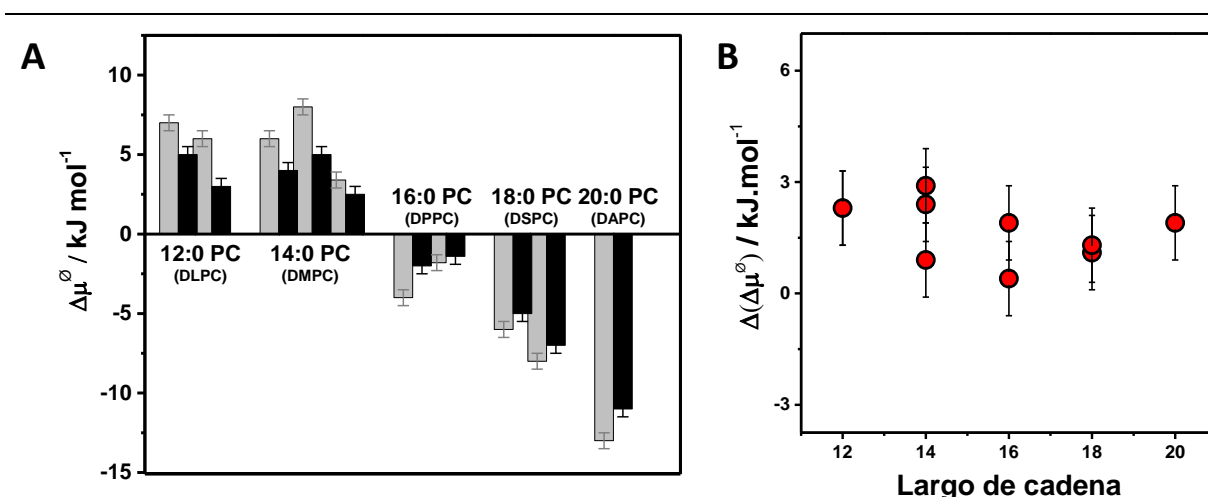


Figure 4.2. (A) Diferencia de potencial químico para la transición de fase del estado desordenado al ordenado en monocapas de Langmuir (barras grises), y bicapas soportadas (barras negras), para fosfatidilcolinas con distinto largo de cadena a (22 ± 1) °C y 30 mNm^{-1} . (B) Valor absoluto de la diferencia entre los valores de $\Delta\mu$ para films en *LMs* y *SLBs* en función del largo de la cadena.

4.3 Resumen y discusión de los parámetros que modifican la transición de fase.

Hasta aquí se demostró que conociendo el diagrama de fases de las mezclas es posible calcular el cambio de potencial químico involucrado en el proceso de la transición de fase de lípidos puros, permitiendo así comparar las propiedades de los modelos de membrana.

En todas las mezclas analizadas, el intervalo de composiciones en el cual se observó coexistencia de fases disminuía cuando el sistema era confinado sobre un sólido. A partir de

la determinación de la composición de las fases en coexistencia se calculó el costo energético de la transición de fase de lípidos puros con distinto largo de cadena. El principal resultado muestra que en bicapas soportadas la energía requerida para cambiar de fase es menor que en sistemas *free-standing*, y por lo tanto, en *SLBs* las fases son más similares entre sí que en *LMs*. Este resultado, explica el incremento en la miscibilidad de los lípidos en las distintas mezclas analizadas. Notablemente, la reducción energética observada es independiente del largo de la cadena hidrocarbonada, lo que sugiere que el efecto no se relaciona con la disminución en los grados de libertad de la cadena. La disminución en el cambio de energía libre aquí descrita, respalda los resultados del Capítulo 3 para mezclas de DPPC:DLPC, que mostraban que en membranas soportadas el diagrama de fases difería respecto a sistemas *free-standing*, con la fase expandida enriquecida en DPPC al confinar la membrana.^{83,102}

Se encontraron valores similares para las relaciones de área ocupada por las fases coexistentes cuando se observó la hemicapa proximal en lugar de la distal, lo que de acuerdo a la regla de la palanca indica que la composición de las fases en coexistencia es similar. Así, el cambio de energía para la transición de fase de los lípidos puros también será similar (ver Tabla 4.1 para DAPC, DMPC, DSPC, y DLPC, y la Tabla 3.2 para DPPC). Por lo tanto, la superficie del vidrio no promueve efectos de corto-alcance relacionados a interacciones específicas con el film lipídico. Las observaciones parecen ser consecuencia de efectos de largo alcance a través de la bicapa. Asimismo, cuando una única monocapa es transferida sobre el soporte, los resultados obtenidos son similares a los observados en bicapas soportadas, descartando de esta manera la influencia de interacciones inter-hemicapa sobre diagrama de fases, al igual que se concluyó anteriormente para la mezcla DPPC:DLPC (ver Cap. 3).

En membranas *free-standing*, es posible observar fluctuaciones fuera del plano, con amplitudes que dependen del módulo de flexión.¹⁰⁴ En el caso de monocapas lipídicas en la interfase aceite-agua, se ha demostrado que el valor promedio del módulo de flexión es similar al de bicapas.¹⁰⁵ Esto se puede concluir ya que, si bien se observa una geometría plana de la interfase en escala micrométrica, a escala nanométrica ocurren ondulaciones térmicas, con amplitud creciente a medida que se disminuye la tensión superficial.¹⁰⁶ Estas ondulaciones producen un cambio en los perfiles de densidad obtenidos por rayos x con estructuras de 0,4 nm¹⁰⁷, mayores que la rugosidad observada para la interfase agua-aire limpia (0,32 nm¹⁰⁸) y comparable con lo que reportado para bicapas.¹⁰⁹

Para films soportados, se ha determinado que existe una capa de agua de 0,5-2 nm de espesor entre los grupos polares de los lípidos y la superficie del sólido.^{43,45,110} Esta capa de agua confinada posee mayor estructuración que el agua líquida, mostrando picos similares a hielo en el espectro infrarrojo.⁴⁵ Además, se ha demostrado que debido a la presencia del sólido, existe un aumento de la viscosidad efectiva del fluido en esta capa.¹¹¹ Por lo tanto, es

esperable que las ondulaciones fuera del plano se vean reducidas al confinar el sistema lipídico sobre un soporte sólido. Esto, se ha reportado mediante simulaciones computacionales de *SLBs*, las cuales muestran cambios en compresibilidad respecto a sistemas *free-standing*, junto con un aumento en la localización de las moléculas de lípidos.¹¹² Las consecuencias del movimiento restringido del film probablemente tengan un mayor efecto sobre la fase desordenada que la ordenada, ya que esa fase presenta mayores ondulaciones fuera del plano, y de esta manera se reduzca la diferencia energética entre ambas fases. En este sentido, se ha reportado que en bicapas dobles soportadas de DPPC pura, la bicapa superior está desacoplada del efecto del soporte y se observa la presencia de la fase ondulada (*ripple phase*). Por otra parte, para dicho sistema, en la bicapa cercana al soporte no se observan ondulaciones.⁹⁷ Adicionalmente, resultados recientes del laboratorio muestran que no se observan cambios entre los diagramas de fases de membranas *free-standing* y soportadas conteniendo lípidos cargados. Este resultado se ha atribuido a que las membranas cargadas fluctúan menos,^{113,114} por lo que la presencia del soporte no posee una influencia marcada sobre el comportamiento de fases de estas mezclas.

De esta manera, se ha propuesto que la pérdida de entropía debida a la restricción del movimiento de las moléculas de lípido fuera del plano de la membrana en *SLBs* contribuyen de manera importante a la diferencia energética existente entre los films *free-standing* y soportados.^{83,115-118} Sin embargo, la reducción en energía libre aquí descrita podría relacionarse no sólo a una disminución de entropía, sino también a una disminución de entalpía dada por la diferencia en las interacciones intermoleculares en sistemas *free-standing* comparados con los soportados. En este sentido, el valor de la temperatura de fusión de las cadenas hidrocarbonadas ($T_m = \Delta H / \Delta S$ en el punto de fusión) debería aumentar si la entropía disminuye, mientras que la entalpía debería permanecer constante en el proceso de transición de fase. Desde que los primeros experimentos en *SLBs* se realizaron, los valores de T_m para DPPC y DMPC se determinaron utilizando distintas técnicas bajo diferentes condiciones experimentales, debido a que estos lípidos poseen valores de T_m experimentalmente accesibles ($T_m=23,5$ °C para DMPC y 41,4 °C para DPPC, en vesículas multilamelares, *MLVs*). La Tabla 4.4 presenta una compilación de los datos reportados en bibliografía para bicapas soportadas sobre diferentes sólidos, utilizando LB-LS o ruptura de vesículas como métodos de formación del film sobre el soporte.

Como se espera para una disminución entrópica, la mayoría de los valores experimentales de T_m para bicapas soportadas son mayores a los de *MLVs* (ver Tabla 4.4). No obstante, este comportamiento no se observa en todos los casos y existe una gran variabilidad en las mediciones de T_m que puede explicarse si se tiene en cuenta la extrema sensibilidad de la dinámica de la bicapa a múltiples parámetros como: (i) la naturaleza química del soporte (vidrio, mica, óxido de silicio, etc), así como sus propiedades químicas, que derivan

del pre-tratamiento del sólido, y generan cambios en la rugosidad, hidrofobicidad y mojabilidad; (ii) la manera en la cual el film se forma sobre el soporte (LB-LS o ruptura de vesículas)^{119,120} que probablemente produce films con distinta densidad, y/o espesor de la capa de agua subyacente; y (iii) la temperatura y la fuerza iónica del sistema durante el proceso de transferencia^{96,121,122}

Para bicapas sobre mica, se ha reportado un desacoplamiento de las hemicapas, con la medición de dos valores diferentes de T_m y diferentes coeficientes de difusión para cada hemicapa.^{119,121-124} Esta transición de fase desacoplada, se propone como resultado de la fuerte interacción entre la hemicapa proximal y el soporte, debido a la estabilización de la fase condensada a través de interacciones electrostáticas con la mica que deviene en la deshidratación de los grupos polares de los fosfolípidos próximos al sólido.¹²³ Por otra parte, se ha demostrado que la transición de fase en mica puede acoplarse mediante cambios en la fuerza iónica del medio acuoso.¹²² A diferencia con lo reportado para superficies de mica, en este trabajo y en otras publicaciones de diferentes autores^{117,119,125} se ha encontrado que en vidrio y en óxido de silicio no hay distinción entre las hemicapas, lo que sugiere una interacción más débil entre el film lipídico y estas superficies, probablemente relacionada a una mayor rugosidad de estos sólidos.

Con respecto a la manera en la cual ocurre el proceso de transición de fase, se conoce que la transición principal de suspensiones de lípidos en agua pura es un proceso endotérmico altamente cooperativo con amplitudes de pico $<0,1$ °C a velocidades de barrido bajas.¹²⁶ En cambio, en *SLBs* las transiciones de fase son menos cooperativas, con intervalos de temperatura que oscilan entre los 2-10 °C (ver Tabla 4.4), siendo poco claras las causas de este comportamiento. Adicionalmente, se ha reportado que en liposomas unilamelares (que son más comparables a las *SLBs* que las *MLVs*) la cooperatividad decrece respecto de multicapas.¹²⁷⁻¹²⁹ En el caso de bicapas *free-standing*, se conoce que la transición de fase gel a fluida ocurre a presión superficial constante con incremento de las áreas moleculares de los lípidos. Por otra parte, para *SLBs*, aún no se ha respondido a la pregunta de si la transición ocurre a presión superficial constante con expansión del área molecular, o a área constante con variaciones en la presión, o de ninguna de estas maneras. Charrier y Thibaudau,¹¹⁵ propusieron un modelo que concuerda con una transición de fase a área cuasi-constante, sin embargo esta asunción ha sido cuestionada por Ramkaran y Badia¹²¹.

En monocapas de Langmuir, es posible fijar uno de los parámetros (área o presión superficial) mientras se varía la temperatura del film. De esta manera, se evaluó la transición de fases de monocapas de DPPC y DMPC en cada condición y se encontró que el rango de temperatura a la cual ocurre la transición es mayor cuando el parámetro fijado es el área (~ 14 °C) que cuando se fija la presión superficial (~ 6 °C).

Tabla 4.4. Resumen de los valores de T_m publicados para DMPC y DPPC.
DMPC

Técnica Empleada	Soporte/Met. Prep.	T_m (°C)	Amplitud (°C)	ΔT_m (°C) ($T_m^{SLB} - T_m^{MLV}$)	Año	Referencia
AFM (TM)	Mica/VR	28,5	5	5	2002	[118]
AFM (TM)	Mica/VR	26	8	0,5	2002	[130]
AFM (TM)	Mica/VR	28,5	9	3	2003	[131]
AFM (CM)	Mica/VR	23,5	2	0	2004	[132]
AFM (CM)	Mica/VR	~27,6	5,5	4,1	2005	[133]
		~34,4	6,2	10,9		
AFM (TM)	Mica/VR	~24,5	3	1	2005	[124]
		~30	4	6,5		
		31,5	6	8		
AFM (TM)	Mica/VR	42	5	18,5	2005	[115]
FRAP	Vidrio/LB-LS	18	5	-5.5	2009	[119]
	Mica/LB-LS	23,6	5	0,1		
AFM (TM)	Mica/LB-LS	16,8	-	-6.7	2014	[121]
		32,8	5	9,3		

DPPC

Técnica Empleada	Soporte/Met. Prep.	T_m (°C)	Amplitud (°C)	ΔT_m (°C) ($T_m^{SLB} - T_m^{MLV}$)	Año	Referencia
FRAP	Óxido de silicio/LB-LS	41,4	6,5	0	1985	[125]
DSC	Sílica/VR	39,6	3	-1,8	1992	[134]
DSC	Mica chips/VR	42,4	2	1	2000	[135]
		44,8	2	3.4		
AFM (TM)	Mica/VR	~47	10	5,6	2004	[127]
		~56,5	7	15,1		
AFM (TM)	Mica/VR	~43,3	4,5	1,9	2005	[124]
		~47,8	2,5	6,4		
AFM (CM)	Mica/VR	~48,1	6,6	6,7	2005	[133]
		~55,5	7	14,1		
FRAP	Vidrio/LB-LS	38	6	-3,4	2009	[119]
	Mica/LB-LS	41,3	5	-0,1		
AFM (CM)	Mica/VR	~45	4	3,6	2011	[136]
AFM (TM)	Mica/LB-LS	38,1	-	-3,3	2014	[121]
		47,2	9,1	5,8		

Para experimentos de AFM se indica modo contacto (CM) o tapping (TM). La técnica FRAP (del inglés: *Fluorescence Recovery After Photobleaching*) corresponde a la medición de recuperación de fluorescencia después de fotoblanqueo. Se indica el método de preparación, ya sea Langmuir-Blodgett/Langmuir-Schaeffer (LB-LS) o Ruptura de Vesículas (VR). ΔT_m se calculó considerando T_m^{MLV} =23,5 °C para DMPC y 41,4 °C para DPPC.¹³⁷ En aquellos casos en los que el valor de T_m no se informó en el trabajo original, pero donde fue informado el rango de temperatura para la transición de fase, se obtuvo el valor medio y el mismo se informa en la tabla precedido del símbolo “~”.

En este último caso el rango es similar al de los valores que se reportan en la Tabla 4.4, respaldando la idea de una transición de fase en la que varía el área molecular como proponen Ramkaran y Badía.¹²¹ Por otra parte, esto está de acuerdo con lo observado mediante AFM al analizar la topografía de *SLBs*, en donde se observa expansión del film y cubrimiento de defectos en la membrana al incrementar la temperatura. Además, éstas observaciones también concuerdan con experimentos de difusión en *SLBs* que demuestran que las moléculas lipídicas no se encuentran ancladas a la superficie sino que pueden trasladarse a través de la misma.^{119,123,125,130,131,136}

4.4 Conclusiones.

En este capítulo se presentó un método original para la determinación de la diferencia de potencial químico para la transición de fases de lípidos puros, que puede aplicarse a diferentes modelos de membranas. Utilizando esta aproximación, se estimó el cambio de energía libre para la transición de fase de cinco fosfolípidos con distinto largo de cadena hidrocarbonada en *LMs* y *SLBs*, y se realizó una comparación del costo energético del proceso de condensación (transición de un estado desordenado a ordenado) en presencia y ausencia de un soporte sólido. Los resultados mostraron que la energía libre involucrada en la transición de lípidos arreglados en films soportados es menor que para films *free-standing*, y por lo tanto, las fases se vuelven más similares energéticamente al confinar el sistema.

Este efecto puede deberse a un cambio en la entropía del proceso, la entalpía, o en ambos parámetros termodinámicos. De cualquier manera, el cambio energético no se relaciona con un efecto de ordenamiento de la cadena hidrocarbonada, y es un efecto de largo alcance, probablemente relacionado con las restricciones de movimientos fuera del plano del film promovidas por la superficie del sólido.

En resumen, incluso en ausencia de interacciones fuertes entre el film lipídico y el sólido, los resultados obtenidos indican que el confinamiento del sistema induce reducción de la diferencia energética entre los distintos estados de fase, que se traduce en cambios en el diagrama de fases de membranas de más de un componente.

"It can only be our familiarity with soap bubbles from our earliest recollections, causing us to accept their existence as a matter of course, that prevents most of us from being seriously puzzled as to why they can be blown at all."

C. V. Boys.

Capítulo 5: Interacciones electrostáticas en bicapas lipídicas.

Resumen

Durante décadas, se ha asumido que las interacciones electrostáticas de largo alcance (distancias micrométricas) en bicapas lipídicas son despreciables debido al apantallamiento promovido por el medio acuoso en el que se encuentran, y a la cancelación de las repulsiones de una hemicapa con la otra en el caso de dominios acoplados. Este concepto, que deriva principalmente de cálculos a partir de modelados, es ampliamente aceptado en la comunidad biofísica. En este capítulo, se presenta evidencia experimental demostrando que las repulsiones electrostáticas entre dominios tanto en bicapas neutras como cargadas, regulan la difusión, la estructuración en el plano y la fusión de dominios en la escala micrométrica, contradiciendo por lo tanto lo aceptado hasta el momento. Todos los experimentos fueron realizados tanto en monocapas como en bicapas lipídicas, y la remarcable similitud en los resultados encontrados entre los sistemas sugiere que las repulsiones entre dominios ocurren principalmente en el plano de la membrana.

Introducción

Uno de los aspectos más estudiados de las membranas, es la formación de dominios lipídicos como resultado de la segregación de fases. La importancia de estas heterogeneidades radica en que estas estructuras han sido asociadas con el reclutamiento de proteínas,^{138–140} el tráfico celular,¹⁴¹ la regulación de canales iónicos,¹⁴² la señalización,^{143,144} entre otras funciones celulares.

La observación de fases separadas en membranas lipídicas, se describió inicialmente en monocapas de Langmuir en la interfase agua-aire utilizando sondas fluorescentes con mayor afinidad por una de las fases coexistentes.¹⁴⁵ Bajo ciertas condiciones, estos films presentan fases moduladas, termodinámicamente estables o meta-estables (atrapadas cinéticamente). Las fuerzas que producen un patrón específico de la membrana se han estudiado analizando redes estructuradas formadas por los dominios, y actualmente se puede predecir e incluso modificar la textura de la membrana variando diferentes parámetros, como la composición lipídica,^{31,90,146–149} la composición de las soluciones acuosas,^{150,151} la velocidad de nucleación,^{30,31,152–154} la presencia de compuestos linactantes (*lineactants*),^{87,155} entre otras.

En monocapas de Langmuir, la formación de patrones y fases mesoscópicas moduladas se ha explicado como producto de la competencia entre la tensión de línea e

interacciones electrostáticas de largo alcance debidas a la repulsión dipolar entre las fases.^{33,156–158}

Por otra parte, numerosos investigadores han postulado que en bicapas que dichas interacciones solo serían importantes en la escala nanoscópica, debido a que la membrana se encuentra inmersa en un ambiente acuoso y el apantallamiento de los iones reduciría el alcance de las interacciones dipolares. Al respecto, en algunos trabajos se han desarrollado cálculos a partir de modelos de bicapa,^{159–161} mientras que en otros simplemente se asume dicho comportamiento.^{32,156,162–165} No obstante, existe una falta de evidencia experimental que respalde estos postulados.

Es necesario remarcar que tanto las bicapas como las monocapas son sistemas muy interesantes desde el punto de vista de la electrostática, ya que constituyen arreglos cuasi-bidimensionales con una constante dieléctrica que varía desde 2 (cadenas hidrocarbonadas), hasta 80 (agua líquida), en pocos nanómetros. De esta manera, la pregunta de cuál es el papel que juega la electrostática en estos sistemas es desafiante, y por lo tanto en este trabajo se realizan una variedad de experimentos con el objetivo de evaluar las interacciones dominio-dominio en bicapas. Para ello, se emplean bicapas planas *free-standing*, una versión de los films de Montal y Mueller obtenidos desde monocapas,^{54,60} que posibilitan estudiar la organización y dinámica de la membrana debido a que permiten visualizar en el microscopio en tiempo real una gran cantidad de bicapas conteniendo múltiples dominios. Adicionalmente, con el objetivo de comparar los resultados obtenidos para bicapas, se utilizaron las monocapas de Langmuir como modelo de referencia, ya que estas últimas constituyen un sistema ampliamente estudiado en el cual las interacciones entre dominios han sido descritas.^{33,156–158}

A continuación, se muestra el análisis del movimiento Browniano, la fluctuación de las posiciones relativas, y la fusión de dominios en films neutros y cargados. Los resultados obtenidos son muy concluyentes, y aportan un nuevo enfoque sobre las interacciones intramembrana, expandiendo la comprensión del complejo comportamiento de las bicapas.¹⁶⁶

5.1 Coeficiente de difusión de dominios de fase ordenada.

Se midió el coeficiente de difusión (D) de dominios pequeños en bicapas planas *free-standing* compuestas de DOPC:pSM (1:1) + 25% colesterol (sistema con dominios neutros) y DOPC:DPPE (1:2) + 20% colesterol (sistema con dominios cargados) con el objetivo de analizar el efecto que tienen las interacciones entre dominios sobre la dinámica del film. En monocapas de Langmuir, la determinación de D ha sido utilizada como una medida indirecta de las repulsiones entre dominios. En este sentido, se ha demostrado que las interacciones

hidrodinámicas y electrostáticas (dipolares o Coulombicas en el caso de dominios cargados) bloquean el movimiento de dominios a medida que la distancia entre los mismos disminuyen, produciendo una viscosidad aparente mayor.^{73,76} Por lo tanto, se utilizó este modelo para comparar los valores de D obtenidos para dominios acoplados (ver Cap. 2, sección 2.1.3) en bicapas lipídicas a diferentes porcentajes del área ocupada por la fase ordenada (%fo), es decir, por los dominios en este caso. Para ello, se siguió la trayectoria de los dominios en entornos con diferente %fo en una ventana de tiempo de 100-200 s. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5.1, donde puede observarse que los valores de difusión para bicapas (símbolos rojos) son siempre menores a los obtenidos para monocapas (símbolos negros). Esto se debe a que los dominios en bicapas se encuentran en contacto con un medio viscoso (agua) por encima y por debajo, mientras que las monocapas se forman en la interfase agua-aire.

De acuerdo a Hughes et al.¹⁶⁷ para dominios aislados insertos en una fase desordenada en el caso límite de $(R \times \eta_w)/\eta_m > 10$ (que corresponde a las condiciones de nuestros sistemas experimentales) el coeficiente de difusión (D_t) puede calcularse como:

$$D_t = (\beta 8 \eta_w R)^{-1} \text{ para monocapas} \quad \text{ec. 5.1}$$

$$D_t = (\beta 16 \eta_w R)^{-1} \text{ para bicapas} \quad \text{ec. 5.2}$$

donde $\eta_w = 0,001 \text{ Nsm}^{-2}$ corresponde a la viscosidad del agua, η_m es la viscosidad bidimensional de la membrana que se estima⁷⁵ en $10 \times 10^{-10} \text{ Nsm}^{-1}$, $\beta = (kT)^{-1}$, y R es el radio de los dominios analizados. En el caso de las bicapas, se incluye un factor 2 en el denominador, ya que el agua se encuentra presente en ambos lados de la membrana.¹⁶⁷

En la Figura 5.1 se grafican los valores de D_t como un intervalo delimitado por líneas punteadas para bicapas (rojas) y monocapas (negras) calculados tomando en cuenta el tamaño mínimo y máximo de los dominios utilizados para el análisis (1-3 μm de radio). En general, ambos modelos de membrana muestran una tendencia similar. Cuando %fo es bajo (distancias grandes entre dominios), las interacciones inter-dominios son despreciables, y los valores experimentales son similares a los teóricos (ec. 5.1 y 5.2), dentro del error experimental.

Los altos valores observados para monocapas a bajos %fo (mayores que el límite superior de D_t) pueden deberse a una cancelación incompleta del arrastre generado por el agua durante el experimento (que se evita considerando el desplazamiento cuadrático medio de un dominio respecto de un dominio adyacente, ver Sección 2.3.2). Por otra parte, los valores bajos en el caso de bicapas (en el límite inferior de D_t), pueden relacionarse a la mayor viscosidad del agua cerca de la superficie de la membrana. Sin embargo, en general hay una buena concordancia entre los coeficientes calculados y obtenidos experimentalmente en cada

sistema para bajos valores de %fo. Esto era de esperarse, debido a que cuando los dominios se encuentran distantes entre sí, difunden como partículas aisladas. Adicionalmente, el hecho de que coincidan los valores calculados con los datos experimentales, indica que los valores obtenidos son precisos, y se valida el método de seguimiento de la trayectoria de dominios y determinación del coeficiente de difusión.

Por otra parte, para altos %fo, los valores experimentales se desvían de los teóricos como resultado de las fuerzas repulsivas entre dominios. Nótese que para dominios cargados (círculos en la Figura 5.1), el coeficiente de difusión disminuye a valores menores de %fo y con una pendiente más pronunciada comparados con dominios neutros (símbolos cuadrados), lo que significa que las interacciones son más fuertes en presencia de cargas netas tanto para monocapas como para bicapas.

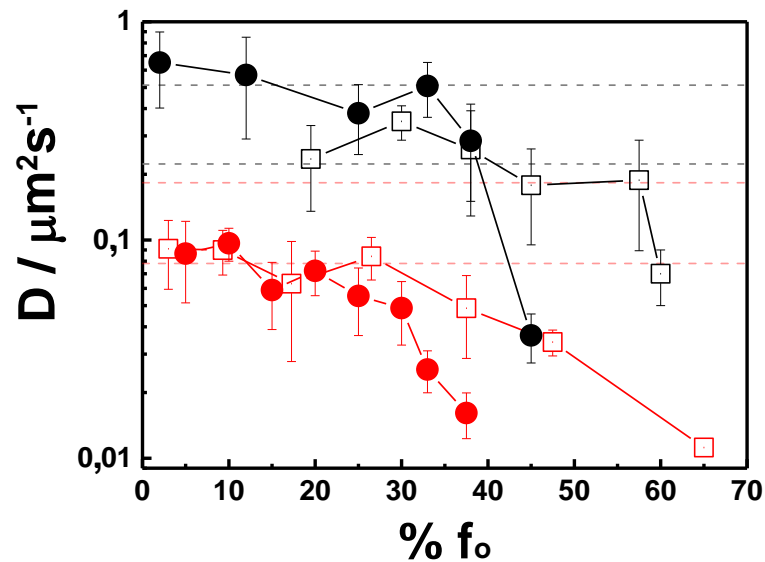


Figura 5.1. Valores experimentales obtenidos para el coeficiente de difusión (D) de dominios pequeños (1-3 μm) en función del porcentaje de área ocupado por la fase ordenada. Los cuadrados representan los sistemas neutros, y los círculos los cargados. Los símbolos negros corresponden a monocapas, mientras que los rojos a bicapas. Las líneas punteadas corresponden a los valores de D_i calculados para el intervalo de tamaños de dominios utilizados utilizando las ecuaciones 5.1 y 5.2.

Anteriormente, se ha demostrado que en monocapas las interacciones repulsivas entre dominios que afectan la difusión a distancias micrométricas son las interacciones dipolares o carga-carga (para dominios neutros y cargados, respectivamente), y no las hidrodinámicas.⁷³ Esto se debe a que existe una buena correlación entre la difusión de dominios y el potencial repulsivo calculado mediante la distribución de dominios en equilibrio. Incluso, se ha demostrado que las interacciones dipolares son determinantes de la distribución de dominios en el plano de la membrana en monocapas.¹⁶⁸

Si en bicapas las interacciones entre dominios fueran despreciables, los valores del coeficiente de difusión de dominios microscópicos deberían estar siempre entre los límites de las líneas punteadas rojas en la Figura 5.1, incluso para 30-40%fo. La disminución del

movimiento de dominios que se observa a altos %fo, indica que existe una marcada influencia de las interacciones entre dominios, ya sean de naturaleza electrostática o hidrodinámica. En este sentido, dada la alta similitud que existe entre los resultados de D obtenidos en monocapas y bicapas, es esperable que el efecto sea el mismo para ambos sistemas. Más aún, la marcada diferencia entre el comportamiento observado para dominios neutros *versus* cargados también sugiere que las repulsiones se deben a electrostática y no a hidrodinámica, siendo la última muy probablemente similar para ambas mezclas lipídicas.

En este punto, se puede anticipar que las interacciones electrostáticas entre los dominios en bicapas no se encuentran totalmente atenuadas por el medio acuoso como se ha propuesto,¹⁵⁹⁻¹⁶¹ siendo las fuerzas dipolares y carga-carga apreciables no sólo a nivel nanométrico sino también micrométrico. Dichas repulsiones, promueven la disminución del coeficiente de difusión de dominios micrométricos a altos %fo.

Con el objetivo de continuar evaluando la predominancia de la electrostática sobre las fuerzas hidrodinámicas en bicapas, en la próxima sección se analiza la distribución de posiciones de dominios en el equilibrio.

5.2 Función de distribución radial de los dominios en el plano de la membrana.

Para monocapas en la interfase agua-aire existe un valor crítico del área ocupada por dominios (%fo) en la cual las repulsiones dipolares producen un patrón ordenado de dominios con distancias fijas entre ellos. Incluso, pueden observarse arreglos hexagonales en el caso de redes altamente estructuradas.^{73,75,147,163} En este aspecto, la función de distribución radial $g(r)$ proporciona una idea de la disposición de los dominios en el plano de la membrana tanto en monocapas^{73,75,168} como en bicapas.¹⁶³⁻¹⁶⁵

A valores bajos de %fo, la función $g(r)$ toma la forma similar a la de un gas (no posee estructura). A mayores porcentajes de área de fase ordenada, el film comienza a estructurarse, y en consecuencia, aparece un pico correspondiente a la probabilidad de encontrar otro dominio a una distancia fija (primer vecino). Si el valor de la distancia (r) a la cual aparece el primer pico excede el radio promedio de los dominios por un factor de 3, la interacción que promueve el ordenamiento no se debe simplemente a la repulsión estérica entre los dominios.¹⁶⁴ Además, al tratarse de una distribución de posiciones, no constituye una medida dinámica, por lo que las contribuciones hidrodinámicas no influyen sobre los resultados obtenidos. De esta manera, $g(r)$ permite obtener una medida indirecta de las interacciones repulsivas que modifican las distancias entre dominios y evitan que se posicionen al azar en el plano de la membrana.^{73,164}

Para mezclas de lípidos neutros y cargados en monocapas y bicapas, se calculó $g(r)$ incrementando el porcentaje de fase ordenada. De esta manera, se determinó el %fo mínimo al cual existe una estructura ordenada en cada film. Interesantemente, se encontró que tanto en monocapas como bicapas los dominios adquieren estructuración en el plano a valores similares de %fo: entre 20-23 % en sistemas neutros (Figura 5.2A) y 16-19 % en sistemas cargados (Figura 5.2B). Por debajo de estos porcentajes no se observó estructuración en los films (función $g(r)$ sin picos), y a %fo mayores el primer pico se vuelve cada vez más agudo (ver Anexo). Nótese que como consecuencia de la diferencia en el tamaño de los dominios en cada sistema, los picos se corren al comparar monocapas con bicapas. La distribución de áreas de los dominios para cada modelo de membrana se incluye junto a imágenes de fluorescencia representativas de los arreglos de microdominios. Los dominios presentan tamaños entre 1-2 μm de diámetro y las distancias entre ellos (correspondientes a los picos en la función $g(r)$) oscilan en general entre 4-7,5 μm para ambos sistemas.

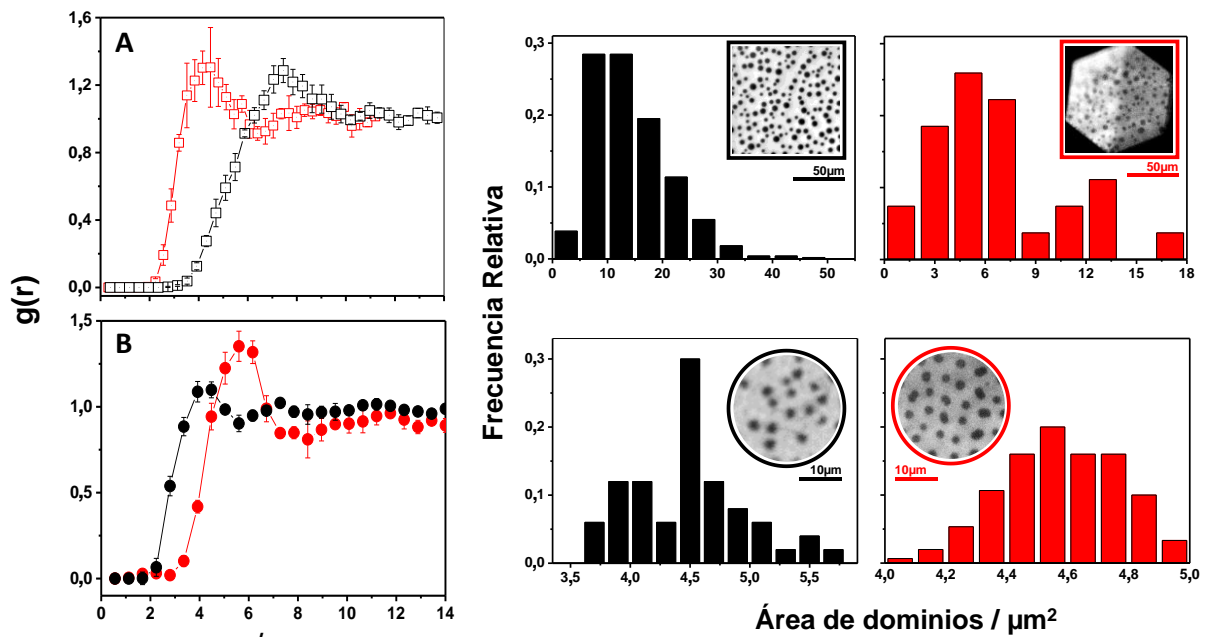


Figura 5.2. Función de distribución radial para dominios neutros (A) y cargados (B) con sus respectivas distribuciones de área de dominios. Los resultados obtenidos para bicapas se muestran en rojo y para monocapas en negro. El %fo en (A) corresponde a 20-23 % y en (B) a 16-19 %. Insertos: imágenes representativas de microscopía de fluorescencia de los films lipídicos.

El hecho de que los dominios adquieran un arreglo estructurado a valores similares de %fo al comparar monocapas con bicapas, sugiere que las interacciones entre los dominios que promueven el ordenamiento son similares en los dos sistemas. Sumado a esto, para sistemas cargados, la estructuración se produce a valores menores del área ocupada por la fase ordenada tanto en monocapas como en bicapas, lo que indica que las fuerzas repulsivas son mayores en presencia de una carga neta, incluso en un medio iónico (NaCl 145 mM). Este

fenómeno también indica que las interacciones entre dominios son de naturaleza electrostática.

En conclusión, el efecto de las interacciones electrostáticas en bicapas a distancias micrométricas no es despreciable, indicando una importante contribución de las repulsiones dentro del plano de la membrana, que explica la influencia similar de las fuerzas en monocapas y bicapas. En este sentido, en el grupo se demostró previamente que las interacciones carga-carga en monocapas pueden ser reducidas, pero no completamente canceladas cuando se disminuye la longitud de Debye-Hückel a 0,55 nm, valor que se encuentra muy por debajo de las distancias entre dominios analizadas.⁷³

5.3 Potencial de campo medio entre dominios en bicapas lipídicas.

Con el objetivo de obtener una estimación de las repulsiones electrostáticas que promueven la estructuración de los dominios y alteran su movilidad, se calculó el potencial de campo medio a partir de las funciones de distribución radial obtenidas en la sección anterior de acuerdo a la siguiente expresión:

$$w(r) = -\beta^{-1} \ln g(r) \quad \text{ec. 5.3}$$

donde β es $(kT)^{-1}$ y $w(r)$ representa el potencial de campo medio entre dominios.¹⁶⁹ La Figura 5.3A muestra un ejemplo del cálculo del potencial de campo medio entre dominios para el arreglo de bicapas a 20%fo en el caso de dominios neutros (cuadrados) y cargados (círculos). En este último caso, puede observarse un segundo valle correspondiente al segundo vecino cercano, debido a la alta estructuración del film. Nótese que las curvas obtenidas poseen la forma de una función de interacción entre pares (similar al Potencial de Lennard-Jones). Asumiendo un potencial armónico alrededor del mínimo, se obtuvo la constante de resorte (k) como medida de la fuerza media entre dominios, mediante el ajuste del primer valle de cada curva con una función cuadrática (ver inserto en Figura 5.3A). En la Figura 5.3B se comparan los valores de k obtenidos en bicapas neutras y cargadas a 20%fo y 30%fo. La constante de interacción aumenta 3-4 veces para dominios cargados en comparación con los neutros, y se incrementa 1,5-2 veces al aumentar el %fo.

Estos resultados se correlacionan con los obtenidos para las medidas de difusión, ya que al incrementar %fo, la interacción entre dominios es mayor (k aumenta), disminuyendo la movilidad de los dominios. Los valores de k obtenidos son similares a los reportados anteriormente para monocapas cargadas compuestas de DPPG a una fuerza iónica similar,⁷³ y para bicapas neutras de DSPC y DMPC.¹⁶⁴ En dichos trabajos, los valores de k se calcularon mediante el seguimiento de la posición de un dominio central respecto al centro de masa de

un arreglo de 7 dominios, asumiendo una distribución de Boltzmann, y equilibrio local. Las similitudes entre los valores encontrados aquí y los de bibliografía, indican que el potencial de campo medio de un dominio en un arreglo está determinado fundamentalmente por la interacción de cada dominio con su vecino más cercano.

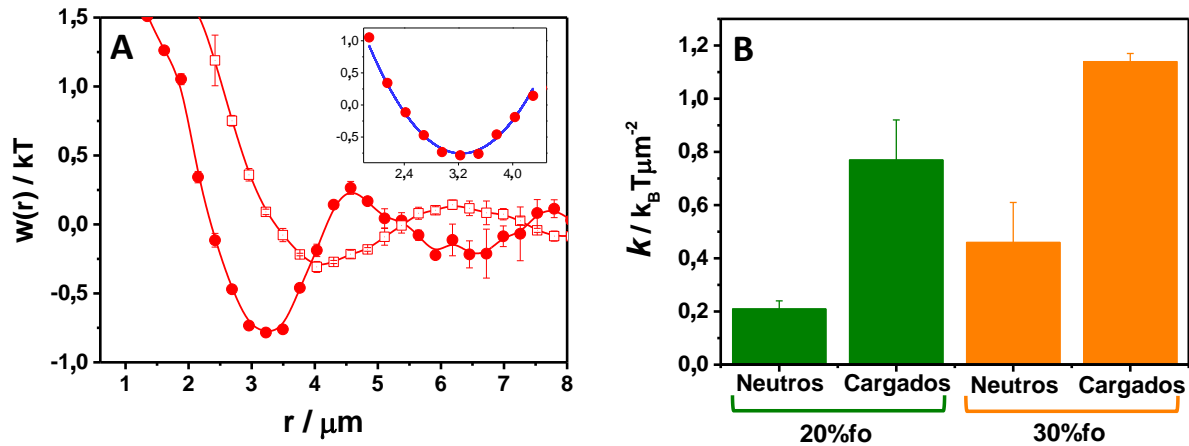


Figura 5.3. (A) Potencial de campo medio entre dominios $w(r)$ obtenido del análisis de imágenes de bicapas con 20%fo formadas por dominios cargados (círculos) o neutros (cuadrados). Inserto: ejemplo del ajuste de los datos experimentales (curva azul) correspondiente a dominios cargados a 20%fo. (B) Constante de resorte de potencial armónico, obtenida del ajuste de una función cuadrática al primer valle en la función $w(r)$ (ver inserto en A) para bicapas neutras y cargadas, a los porcentajes de área ocupada por la fase ordenada indicados.

5.4 Fusión de dominios.

A fin de evaluar los posibles efectos de las repulsiones entre dominios en membranas modelo (además de la dinámica mostrada en la sección 5.1) se estudió la cinética con la que los dominios se funden en cada sistema. La fuerza impulsora de la fusión de dominios es la tensión de línea,¹⁷⁰ pero la velocidad a la que un dominio se acerca a un vecino también influye en la cinética de fusión.

Debido al movimiento Browniano, los dominios tienen la posibilidad de colisionar y fundirse, sin embargo, como se mostró en la Sección 5.1, el movimiento se ve impedido a distancias cortas entre dominios por las repulsiones entre ellos. De esta manera, la fusión de los dominios depende de la tensión de línea, el movimiento de los dominios y las repulsiones entre ellos,¹⁷¹ y así la velocidad de fusión de los dominios constituye una medida indirecta de las interacciones entre ellos. Por lo tanto, se registró la cantidad de dominios en función del tiempo tanto en bicapas como en monocapas de lípidos neutros y cargados a 40%fo. En estas condiciones, los dominios se encuentran lo suficientemente cercanos entre sí como para permitir la fusión en tiempos accesibles experimentalmente. La Figura 5.4 muestra una clara diferencia en la velocidad de fusión de dominios neutros y cargados, y una vez más, los

resultados obtenidos son similares para monocapas y bicapas. Cuando los dominios están cargados, no se observa fusión en el intervalo de tiempo analizado, por lo que la cantidad de dominios se mantiene constante. Por el contrario, cuando las membranas están formadas por lípidos neutros, la cantidad de dominios decrece en el tiempo como consecuencia de la fusión entre ellos, siguiendo la misma tendencia en monocapas que en bicapas: el número de dominios se reduce a la mitad del valor inicial en siete minutos.

Semrau y col. observaron la fusión de dominios en vesículas neutras e indujeron repulsiones por curvatura para prevenir la fusión. Concluyeron que los dominios deben curvarse respecto de la otra fase para generar interacciones repulsivas.¹⁶⁴ Sin embargo, como se indicó anteriormente, la fusión de los dominios depende de la tensión de línea, el movimiento de dominios y las repulsiones entre ellos. Todos estos factores dependen por lo tanto de la mezcla analizada, y dada una misma mezcla, dependerán de la composición de las fases coexistentes (del diagrama de fases de la mezcla) por lo que la velocidad de fusión cambiará de una mezcla a otra.

Particularmente, para membranas cercanas a un punto crítico, la diferencia en la densidad dipolar entre las fases se vuelve pequeña.¹⁷² Este es el caso de los sistemas estudiados, sin embargo, los dominios neutros se funden luego de decenas de minutos. Para dominios cargados las repulsiones electrostáticas impiden su fusión y producen la formación de una red altamente organizada con las distancias entre dominios casi fijas entre sí (ver imágenes de bicapas cargadas en Figura 5.4).

Una estimación del tiempo requerido para que dos dominios se encuentren, puede realizarse teniendo en cuenta el coeficiente de difusión de dominios aislados ($0,1 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$, ver Figura 5.1). Este valor indica que los dominios se mueven en promedio $1 \mu\text{m}$ en casi 1 s , por lo que dos dominios ubicados a $10 \mu\text{m}$ entre sí (que es la distancia promedio entre dominios a 40%fo), deberían colisionar en decenas de segundos en lugar de decenas de minutos como se observa experimentalmente en el caso de los sistemas neutros. Por lo tanto, los resultados mostrados en esta sección constituyen una evidencia más de la importancia de las interacciones electrostáticas en bicapas, que poseen un efecto medible en la microescala y son suficientemente fuertes como para prevenir o impedir la fusión de dominios durante tiempos en el orden de los minutos.

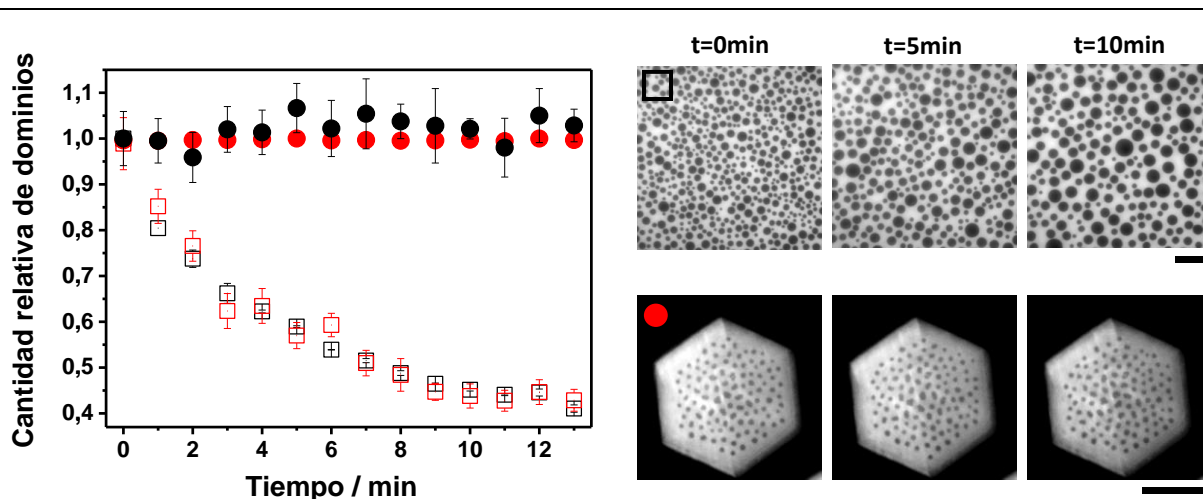


Figura 5.4. Cantidad relativa de dominios vs. tiempo para bicapas (rojo) y monocapas (negro). Los dominios son neutros (cuadrados) o cargados (círculos). Las imágenes son ejemplos de una monocapa neutra (arriba) y una bicapa cargada (abajo) a los tiempos indicados. Los símbolos incluidos en las imágenes se corresponden con los del gráfico. Las barras de escala corresponden a 50 μm .

La similitud entre la tasa de fusión de los dominios en monocapas y bicapas sugiere que las interacciones entre dominios son parecidas. No obstante, cabe destacar que dicha comparación no es trivial, dado que el movimiento de los dominios es diferente de un modelo de membrana a otro (ver Figura 5.1) y la tensión de línea puede variar también entre los sistemas. En este aspecto, el valor estimado de la tensión de línea en monocapas compuestas de DOPC:pSM (1:1) + 25% colesterol se encuentra en el orden de 10^{-1} pN, mientras que en bicapas es un orden de magnitud menor. Esta estimación se realizó considerando el tiempo en el cual dos dominios fundidos recobran la forma circular (ver Anexo). La diferencia en la tensión de línea puede deberse a un corrimiento en el diagrama de fases de monocapas comparadas con bicapas como se observó previamente para otras mezclas (ver Cap. 3),¹⁰² encontrándose las bicapas más cercanas a un punto crítico, y por lo tanto con un valor de tensión de línea menor.

5.5 Síntesis y Conclusiones.

En este capítulo, se mostró el efecto de las interacciones entre dominios sobre las propiedades de bicapas planas en escala micrométrica, utilizando diferentes métodos experimentales para dominios neutros y cargados. Por una parte, se realizaron medidas dinámicas, como experimentos de difusión y fusión de dominios. Los primeros demostraron que cuando el área ocupada por la fase ordenada es alta, el movimiento de los dominios se ve impedido debido a las interacciones repulsivas entre ellos, y se observó un efecto más marcado al estar cargados. Con respecto a la fusión de dominios, se mostró que en membranas neutras los dominios se funden a una tasa en el orden de minutos, mientras que

en sistemas cargados las interacciones son más fuertes, e impiden su fusión durante el intervalo de tiempo analizado. Por otra parte, se realizaron medidas estáticas, permitiendo el estudio de la estructuración de los dominios en el plano de la bicapa, y la estimación de la constante de la interacción entre ellos. Se encontró que en promedio, los dominios forman una red ordenada a 22% ϕ_0 para films neutros, y 18% ϕ_0 en el caso de membranas cargadas. El potencial de campo medio, que da cuenta de la interacción entre dominios, es mayor para dominios cargados que neutros, y la tendencia a medida que ϕ_0 se incrementa correlaciona con el comportamiento observado para el coeficiente de difusión.

Todos los experimentos fueron llevados a cabo también en monocapas compuestas por la misma composición lipídica y utilizando soluciones de igual fuerza iónica. Los resultados encontrados para bicapas son remarcablemente similares a los de monocapas. Esta es una observación importante, ya que en monocapas las repulsiones electrostáticas se encuentran ampliamente descritas,^{18,22,33,73,157,158,168,173} y su influencia es aceptada en la comunidad científica. Por lo tanto, la similitud en el comportamiento de los dominios en bicapas sugiere que las interacciones electrostáticas no son despreciables en la escala micrométrica, y por lo tanto no son completamente apantalladas por el medio iónico. A su vez, las interacciones repulsivas descritas aquí están presentes para dominios acoplados a través de la bicapa, indicando que la densidad dipolar no se cancela en nuestro sistema, contrariamente a lo propuesto para dominios simétricos por Travesset y col.¹⁷⁴ De hecho, los resultados obtenidos apuntan a una importante contribución de las interacciones repulsivas en el plano de la membrana.

En conclusión, lejos de ser despreciables, se demostró que las interacciones electrostáticas entre dominios en bicapas no sólo están presentes, sino que poseen un papel fundamental en el movimiento difusivo, la estructuración interfacial y la fusión de dominios en la microescala. Por ello, las interacciones electrostáticas pueden constituir una manera de regular las propiedades de las membranas y la comunicación entre moléculas insertas en ella. Adicionalmente, cabe destacar que los resultados aquí reportados pueden ser relevantes para otros tipos de films delgados que presenten estructuración mesoscópica y especies dipolares o cargadas.¹⁶⁶

Capítulo 6: Nucleación de dominios en bicapas lipídicas. Influencia de la velocidad de perturbación y la dinámica del film.

Resumen

En este capítulo se muestran resultados de la nucleación de dominios en bicapas comparadas con monocapas lipídicas *free-standing*, al variar la temperatura del medio a distintas velocidades. A pesar de tratarse de diferentes modelos de membrana, los procesos físico-químicos que gobiernan las transiciones de fases son los mismos. Por ello, en ambos sistemas la nucleación depende de la distancia al punto de transición, y la relación existente entre la velocidad de la perturbación y las propiedades dinámicas de la membrana. En bicapas, la densidad de dominios determina el tamaño y la forma de los mismos, y el área de los dominios correlaciona con el área de captura estimada mediante la utilización de polígonos de Voronoi, como ya se había reportado para monocapas de Langmuir. De esta manera, la topografía de la membrana puede ser regulada mediante la variación de aquellos parámetros que influyen en el proceso de nucleación de dominios.

Introducción

La transición de fase de primer orden hacia un estado más denso involucra distintas etapas: en primer lugar, se generan gérmenes de la nueva fase (etapa de nucleación), luego los gérmenes crecen y aparecen regiones más grandes de la fase densa debido al crecimiento independiente, la maduración de Ostwald, y la fusión de los mismos.

Un germen de la nueva fase constituye un *cluster* generado por fluctuaciones de densidad o concentración. Dicho *cluster* es inestable; puede disolverse, o bien crecer y volverse estable una vez superada la energía de activación. En la medida en la que un germen de la nueva fase crece, su energía por molécula E disminuye, debido al aumento de interacciones favorables, las cuales exceden el costo energético que significa crear una interfase unidimensional. El germen se vuelve estable una vez superado un radio crítico r_c , en el cual E posee un valor máximo:¹⁷⁰

$$\frac{dE}{dr}(r = r_c) = 0; r_c = \frac{a\lambda}{\Delta\mu} \quad \text{ec. 6.1}$$

donde a es el área molecular promedio, λ es la tensión de línea, y $\Delta\mu$ es la diferencia de potencial químico entre el valor real que posee el sistema y el que corresponde a condiciones de equilibrio. Así, el valor de r_c es directamente proporcional a la tensión de línea e inversamente proporcional a la sobresaturación del sistema (distancia al punto de transición).

A medida que crecen, los *clusters* formados pueden colisionar y unirse para formar un *cluster* más grande, o alternativamente, puede ocurrir un proceso de coalescencia, denominado maduración de Ostwald. Este último constituye un proceso de cuasi-equilibrio de

maduración, redistribución y crecimiento de gran importancia en varios campos. A lo largo de esta maduración, los *clusters* más grandes crecen a expensas de los más pequeños y menos estables, que eventualmente se disuelven completamente.

La fusión, la maduración de Ostwald y el crecimiento independiente de dominios pueden ocurrir simultáneamente con diferentes cinéticas. En sistemas que poseen una distribución de tamaños de dominios fuera del equilibrio, la velocidad relativa de cada uno de estos procesos adquiere importancia.

En las siguientes secciones, se analiza cómo varía el tamaño de dominios en función de la velocidad de perturbación y el área de captura en bicapas lipídicas comparado con monocapas.

6.1 Tamaño de dominios vs velocidad de perturbación.

Se ha observado que el tamaño y la morfología de dominios dependen de parámetros fuera del equilibrio, como la velocidad de perturbación. En un proceso de nucleación, una vez que la región de coexistencia de fases es alcanzada, los gérmenes se vuelven estables y aparecen núcleos. Mientras mayor sea la sobresaturación del sistema (mayor exceso en el potencial químico) menor será el r_c , como indica la ecuación 6.1, y los gérmenes de menor tamaño se volverán estables. Por lo tanto, si el punto de transición de fases es alcanzado de manera abrupta, muchos gérmenes se volverán estables al mismo tiempo. En contraste, si el sistema se perturba lentamente, la transición será suave y los gérmenes se irán estabilizando a medida que crecen.

Un punto particular en un diagrama de fases puede alcanzarse mediante diferentes perturbaciones, como por ejemplo variando la composición, la temperatura, la compresión del film, o el pH. En el grupo de investigación se ha demostrado previamente que en monocapas de Langmuir de la mezcla ácido esteárico y DMPC cuando un mismo punto en el diagrama de fases es alcanzado mediante una rápida acidificación de la subfase o compresión lenta, la distribución de las fases obtenidas es marcadamente distinta. Al llegar al punto de transición de manera abrupta, una mayor cantidad de gérmenes se vuelven estables, y el futuro de la textura del film queda determinado, debido a que dichos gérmenes crecen y no ocurre una redistribución apreciable en el sistema (al menos por el término de periodos del orden de las horas). Por otra parte, mediante la compresión lenta, son menos los gérmenes que se vuelven estables, por lo que la cantidad de núcleos es menor y su tamaño es más grande.³¹

En el caso de bicapas soportadas, se ha reportado una relación lineal entre la velocidad a la que se enfría el film luego de llevarlo por encima de su temperatura de transición y el número de dominios obtenidos.¹⁷⁵ Teniendo en cuenta estos antecedentes, se evaluó la

nucleación de dominios en monocapas y bicapas con segregación de fases mediante cambios abruptos o lentos en la temperatura del sistema (ver Cap.2, sección 2.3.5).

La Figura 6.1 muestra monocapas de Langmuir y bicapas *free-standing* compuestas de DOPC:pSM:Coolesterol (3:3:2) que se enfriaron rápidamente o muy lentamente luego de elevar la temperatura por encima de su temperatura de mezcla (film homogéneo). Puede observarse que para los dos modelos de membrana, la cantidad de dominios disminuye al disminuir la velocidad de la perturbación, y se incrementa el tamaño promedio de dominios, como puede observarse en los histogramas. Las imágenes corresponden a los primeros 5-10 s luego de la disminución rápida o lenta de la temperatura. Cabe destacar en este punto que la redistribución de las fases debido a la fusión entre dominios ocurre en el orden de los minutos, tanto para monocapas como bicapas, como se demostró en el Capítulo 5.

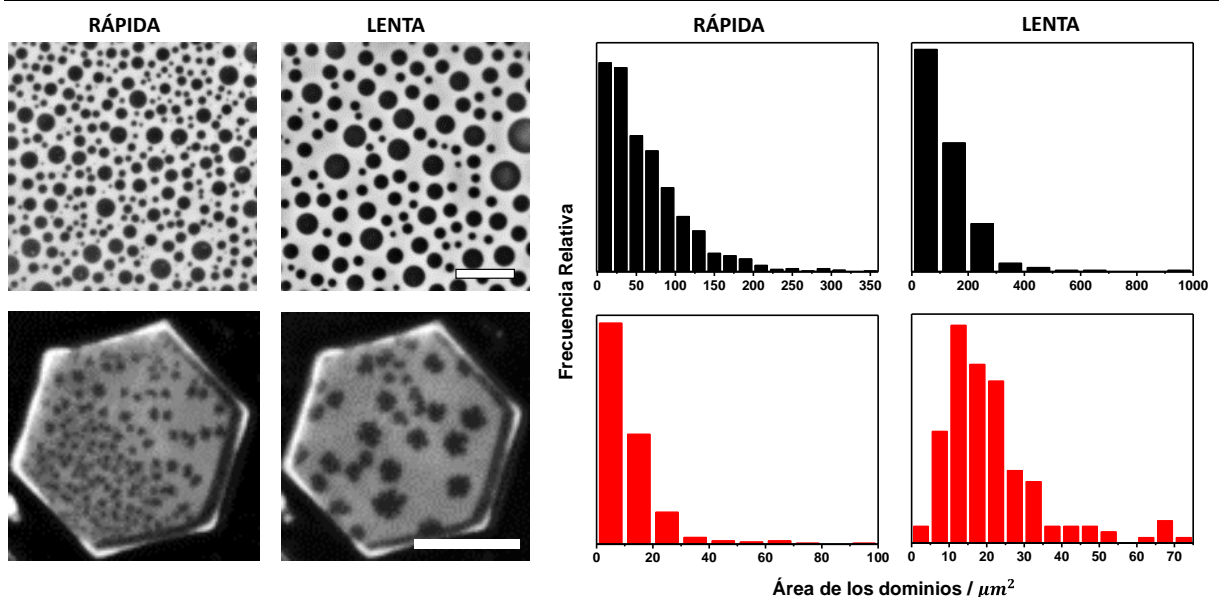


Figura 6.1. Imágenes: micrografías representativas de monocapas de Langmuir (arriba) y bicapas planas *free-standing* (abajo) compuestas de DOPC:pSM:Coolesterol (3:3:2), luego de enfriar el sistema por debajo de la temperatura de transición de la mezcla de forma abrupta o lentamente, como se indica. Las barras de escala equivalen a 50 μm . Gráficos: Área de los dominios en función de la velocidad de nucleación en monocapas de Langmuir (panel superior), y bicapas formadas sobre grillas huecas (panel inferior) a las respectivas velocidades de perturbación.

Por otra parte, en el laboratorio también se realizó otra variante de estos experimentos en los cuales se mantuvo la velocidad de perturbación constante, y se modificaron las propiedades dinámicas del film mediante la variación de la composición de la subfase. Así, Camara y col. mostraron que en monocapas en la interfase agua-aire y en presencia de una subcapa de un polímero catiónico (dietilaminoetil-dextrano, DEAE), films de DMPG se vuelven más viscosos, lo que deviene en un incremento en la cantidad de dominios y una disminución en el tamaño de los mismos, comparados con un film sin el polímero a la misma velocidad de perturbación.¹⁷⁶

Una vez generados los dominios, su crecimiento independiente requiere de la migración de moléculas al núcleo más cercano, lo que define un parámetro importante denominado área de captura, que se discutirá en la siguiente sección.

6.2 Tamaño de dominios vs área de captura.

El área de captura se define como la región del film desde la cual es más probable que las moléculas difundan hacia un dado dominio que a otro. Una estimación de dicha región se realiza mediante el uso del polígono de Voronoi,^{31,175} que corresponde a la región que contiene todos los puntos más cercanos a un dado punto de nucleación que a cualquier otro. Un ejemplo se muestra en la Figura 6.2 para un sistema de partículas.

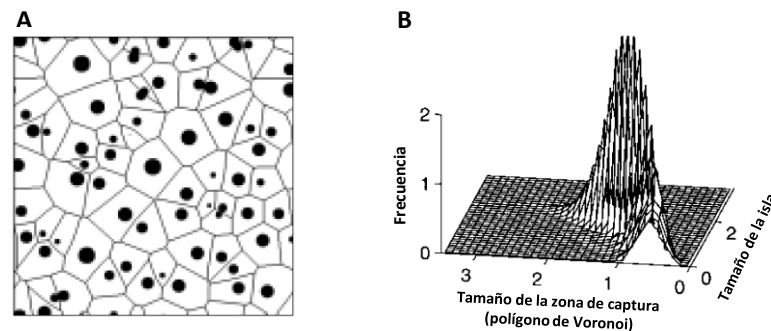


Figura 6.2. (A) Se muestra una imagen de "islas" (círculos negros) junto con sus áreas de captura tipo Voronoi (regiones definidas por las líneas). (B) Gráfico 3D que correlaciona el tamaño de las islas con el tamaño del área de captura. (Adaptado de ref. 177).

A medida que la cantidad de núcleos incrementa, el tamaño de los polígonos de Voronoi (y por lo tanto el área de captura) disminuye, y así se espera que correlacione con la velocidad de perturbación, el número de dominios, el tamaño de la región de captura, y el tamaño final de los dominios.¹⁷⁷ De esta manera, a partir de las imágenes obtenidas para los distintos sistemas en función de la velocidad de disminución de la temperatura mostrada anteriormente, se calculó el área de cada dominio junto a su polígono de Voronoi correspondiente (ver Cap. 2, sección 2.2.5). La Figura 6.3 muestra que existe correlación entre el tamaño de los dominios y el área de los polígonos de Voronoi para monocapas y bicapas compuestas de DOPC:pSM:Coolesterol (3:3:2), con coeficientes de correlación de Pearson entre 0,9-0,98. Resultados similares fueron obtenidos en bicapas soportadas por Bernchou y col.¹⁷⁵

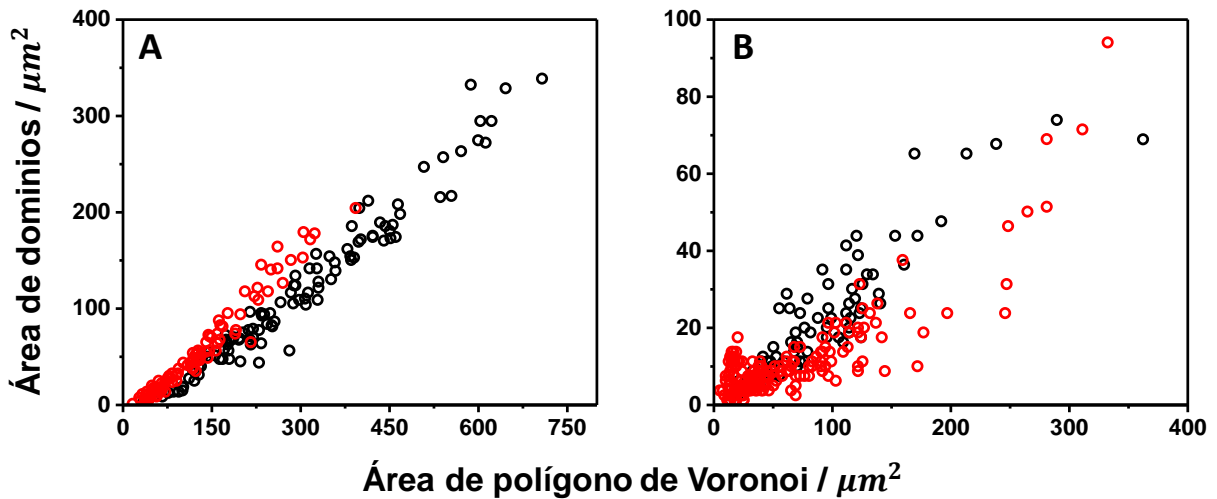


Figura 6.3. Área de dominios vs área del polígono de Voronoi para monocapas de Langmuir (A) y bicapas *free-standing* (B) compuestas de DOPC:pSM:Coolesterol (3:3:2) para velocidades de perturbación lenta (negro) y rápida (rojo).

6.3 Conclusiones.

Las fuerzas impulsoras que gobiernan los distintos procesos, como las transiciones de fases y la nucleación de dominios, son las mismas en los distintos sistemas (ya sea que se trate de modelos experimentales o reales). Los resultados mostrados en este Capítulo junto a reportes anteriores, indican que, para un sistema que se segrega en fases (lejos del punto crítico), y a tiempos cortos (de segundos a minutos dependiendo el sistema), el tamaño promedio de dominios se correlaciona con el área de captura, la cual disminuye a medida que se incrementa la densidad de núcleos, tanto en membranas *free-standing* como soportadas. La densidad de núcleos es determinada por la sobresaturación del sistema y por la forma en la cual se alcanza dicho punto. En este sentido, no sólo la velocidad de perturbación es importante sino también el tiempo de respuesta de la membrana, reflejado en sus propiedades dinámicas. Así, el parámetro relevante a analizar estaría constituido por la relación entre la velocidad de perturbación y la dinámica de la membrana. En este sentido, y como se ha visto en capítulos anteriores, las monocapas de Langmuir constituyen un sistema modelo en el cual muchos parámetros pueden ser controlados, por lo que se puede estudiar de manera precisa este tipo de procesos, así como los comportamientos generales que se esperan, aún con un sistema tan simple como una mezcla binaria de lípidos y en ausencia de una segunda hemicapa. Este, constituye otro ejemplo de cómo la utilización de un sistema modelo nos permite comprender los parámetros físico-químicos que gobiernan procesos que ocurren en sistemas reales.

Capítulo 7: Conclusiones Generales.

Para estudiar procesos que ocurren en las membranas biológicas desde una perspectiva biofísica, se utilizan modelos experimentales como las monocapas de Langmuir, vesículas multilamelares o unilamelares pequeñas, medianas y grandes, monocapas y bicapas soportadas sobre sólidos y bicapas planas no soportadas (*free-standing*) del tipo *black lipid membranes*. Estos modelos permiten, por ejemplo, estudiar la textura y propiedades mecánicas de las membranas, interacciones membrana-proteína, penetración de fármacos, entre otros.

A pesar de que se cuenta con una gran cantidad de información proveniente de la utilización de dichos modelos, existían pocos estudios en los cuales los resultados obtenidos utilizando diferentes sistemas se comparen. En este trabajo de Tesis analizamos diagramas de fases de mezclas de lípidos en modelos de monocapas, y bicapas soportadas y no soportadas. Como resultado, observamos que los diagramas de fases de monocapas de Langmuir y vesículas unilamelares gigantes son similares, mientras que los sistemas soportados poseen una composición de fases diferente. Dicha diferencia se debe a que la energía necesaria para realizar la transición de fase de los componentes puros es mayor en sistemas *free-standing* que en los soportados. La presencia del soporte promueve una disminución de la diferencia energética entre las fases coexistentes, que probablemente se deba a las restricciones de movimientos del film fuera del plano del sólido.

Respecto a la textura de la membrana y las interacciones en el plano, nuestros resultados experimentales en bicapas demuestran que las repulsiones electrostáticas entre dominios en los sistemas cargados, así como en los neutros, regulan la difusión, la estructuración y la fusión de dominios lipídicos en el rango micrométrico, al igual que se ha descrito para las monocapas de Langmuir.

En conclusión, el comportamiento de las fases en los distintos modelos de membrana es similar cualitativamente; sin embargo, un análisis cuantitativo demuestra que existen diferencias entre los sistemas.

Hemos visto que el estudio de las propiedades físico-químicas de membranas lipídicas modelo permite comprender en términos moleculares los fenómenos que ocurren en la membrana celular, así como también describir características generales de comportamiento y topología bajo condiciones controladas. De esta manera, mediante el análisis y cuantificación de fenómenos como la difusión, la segregación en fases y puntos críticos, podremos interpretar cada vez mejor el rol de los lípidos en sistemas más complejos como las membranas biológicas.

Capítulo 8: Perspectivas.

Resumen

En este capítulo se muestran resultados preliminares de experimentos que actualmente siguen en curso en el laboratorio. Los resultados corresponden a una comparación sistemática del efecto que diferentes esteroides y un hopanoide, compuesto que se propone como análogo funcional de los esteroides en bacterias, poseen sobre las propiedades de monocapas en la interfase agua-aire, y de bicapas *free-standing* de una mezcla ternaria.

Introducción

El colesterol es un lípido particular, que posee un anillo esteroideo sustituido por una cadena corta alifática ramificada, y con un grupo hidroxilo como único sustituyente polar. Se encuentra presente en la membrana plasmática de las células de todos los animales, mientras que en otros organismos existen esteroides análogos, como ergosterol en hongos, y estigmasterol y sitosterol en plantas, en cantidades que van desde el 20 al 50% del total de lípidos.¹⁶ Como se explicó en el Capítulo 1, estos compuestos modifican las propiedades de las membranas, debido a que se incorporan orientando su grupo -OH hacia la interfase de la membrana y ensamblando su esqueleto esterano en la región de las cadenas hidrocarbonadas, ocupando el espesor de una hemicapa. Uno de los efectos más notorios, es la formación de una fase líquido-ordenada en mezclas con fosfolípidos, propuesta por J. H. Ipsen en 1987⁸⁸, que posee alta movilidad lateral y un grado sustancial de orden conformacional. Se propone que la emergencia de estos compuestos que surgen a partir de la oxigenación de la atmósfera, constituye un paso crucial en la evolución de membranas biológicas, permitiendo el control de la fluidez y permeabilidad sin comprometer la integridad de la membrana, así como un medio para compartimentalizarlas mediante la formación de dominios.^{16,178,179} Los organismos procariotas, por otra parte, no poseen esteroides, pero producen hopanoides^{180,181} que son moléculas estructuralmente similares¹⁸² (ver Figura 8.1) y cuya ciclación es catalizada por enzimas relacionadas a las de las vías sintéticas de esteroides en eucariotas.¹⁸³ Estas similitudes, han inspirado la hipótesis propuesta por el químico francés Guy Ourisson¹⁸⁴ que postula a los hopanoides como análogos funcionales de los esteroides en bacterias. No obstante, hoy en día se conoce poco de la influencia de estas moléculas sobre las propiedades físicas de las membranas.

Recientemente, Saenz y col.^{185,186} evaluaron el efecto de incremento en la compactación de membranas lipídicas provocado por el diplopterol, uno de los hopanoides más abundantes en bacterias (ver Figura 8.1), comparado con el colesterol en monocapas de Langmuir, mostrando que en mezclas con esfingomiélin (SM) el efecto es menor, pero comparable al producido por el colesterol. Por otra parte, mediante experimentos con GUVs

de DOPC y SM, concluyen que el diplopterol posee la capacidad de formar fase líquido-ordenada al igual que los esteroides. Estos resultados conducen a la hipótesis de que la capacidad de estabilizar las membranas puede haber surgido antes de la oxigenación de la tierra.¹⁸⁵

Por otra parte, si bien existen estudios en el cual se evalúa el efecto de esteroides de plantas,^{187,188} y ergosterol,¹⁸⁹⁻¹⁹² de levaduras por separado, no se han realizado estudios sistemáticos en donde se comparen las propiedades de estos compuestos con las mismas mezclas lipídicas y en un mismo sistema. Es por ello que tomando esto en consideración, sumado al conocimiento de cómo varían las propiedades termodinámicas y dinámicas entre los diferentes sistemas adquirido durante esta Tesis, nos propusimos realizar una comparación de las propiedades de diferentes esteroides y el hopanoide diplopterol en monocapas y bicapas.

En este Capítulo se mostrarán los primeros resultados obtenidos para monocapas de los compuestos puros y mezclas ternarias. Actualmente en el laboratorio se está avanzando con el estudio del diagrama de fases y las propiedades dinámicas de estas mezclas en bicapas planas *free-standing*.

8.1 Monocapas de compuestos puros.

Con el objetivo de comparar el efecto de diferentes esteroides y el hopanoide diplopterol (la Figura 8.1 muestra las estructuras de los compuestos utilizados) sobre las propiedades de membranas organizadas en monocapas, se realizaron isotermas de compresión de los compuestos puros a (22 ± 1) °C.

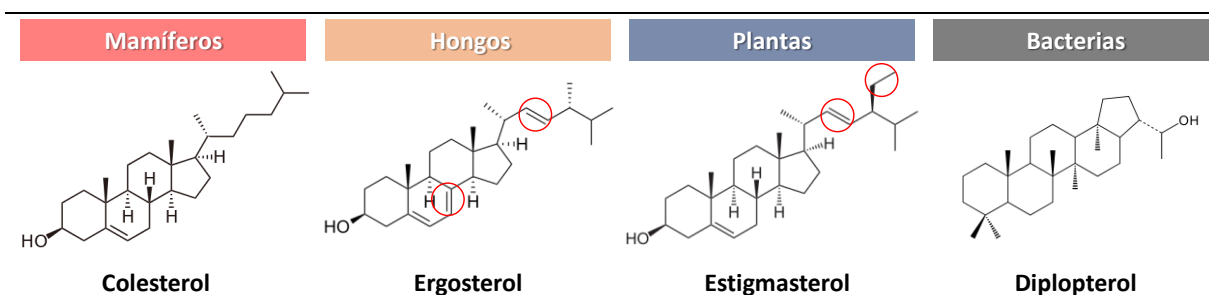


Figura 8.1. Estructuras de los compuestos a comparar. Se señalan las principales diferencias entre los esteroides y el colesterol. Nótese que en el caso del hopanoide de bacteria, la estructura cíclica es diferente; posee menor rigidez, no posee una cara alfa (sin sustituyentes) y la polaridad de la molécula se encuentra invertida respecto de los esteroides.

En la Figura 8.2A se muestra el comportamiento en la interfase agua-aire de los compuestos. Los esteroides exhiben características interfaciales similares, con estados poco compresibles, y presiones de colapso entre $35-40 \text{ mNm}^{-1}$ a áreas moleculares bajas $0,35-0,40 \text{ nm}^2$. Por otra parte, la isoterma de diplopterol también exhibe un estado condensado y poco

compresible a altas presiones, sin embargo a presiones menores a 15 mNm^{-1} muestra un comportamiento más expandido, y su presión de colapso es menor, entre $27\text{-}32 \text{ mNm}^{-1}$ aproximadamente. Probablemente las diferencias observadas entre las isothermas de los esteroides y el hopanoide se deba a que la molécula de diplopterol difiere de los esteroides en que posee sustituyentes normales al esqueleto cíclico sobre ambas caras, mientras que los esteroides poseen sustituyentes en una sola de sus caras (se denomina cara alfa a la cara “plana” de los esteroides, y beta a la sustituida). Esto produciría que la molécula de diplopterol posea mayor volumen molecular, como se ilustra en la Figura 8.2B, que podría traducirse en menor empaquetamiento molecular a bajas presiones.

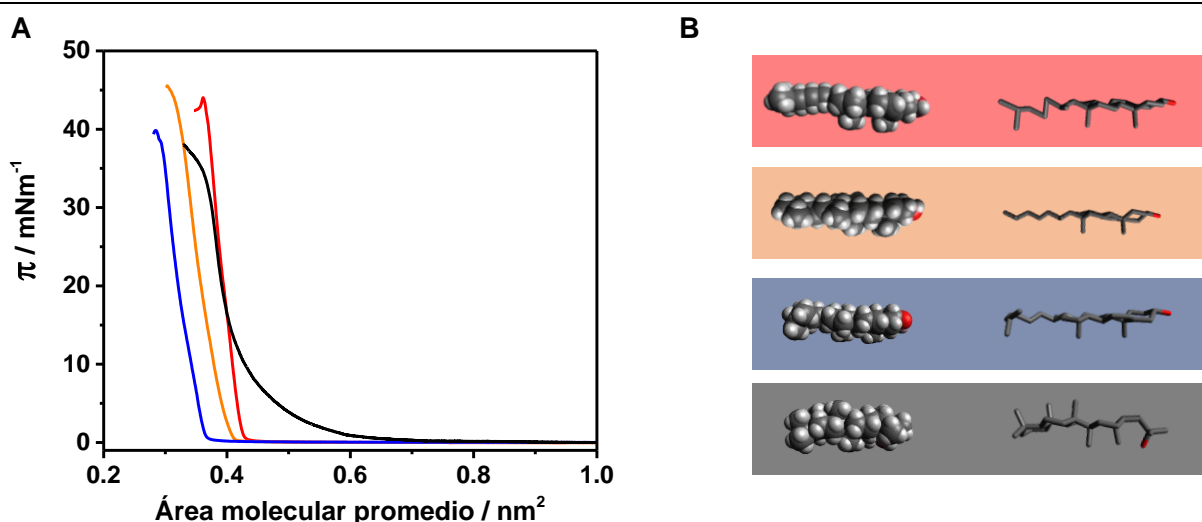


Figura 8.2. (A) Isothermas de Langmuir de los compuestos puros: colesterol (—), ergosterol (—), stigmasterol (—) y diplopterol (—). (B) Representaciones de los compuestos considerando el mismo patrón de colores que en el punto (A). Nótese que mientras que los esteroides poseen una cara plana libre de sustituyentes, el diplopterol posee sustituyentes en sus dos caras, confiriéndole un mayor volumen molecular.

A medida que se realizó la compresión de las monocapas, se observó la topografía mediante BAM. Los films de esteroides son homogéneos en todo el intervalo de presiones superficiales, mientras que para diplopterol se observan “islas” a presión 0 mNm^{-1} , que corresponden a estructuras que se forman en la fase gaseosa cuando aún el film no es coherente (ver Figura 8.3A), y luego el film se observa homogéneo hasta el colapso. Mediante la calibración del equipo es posible obtener una medida de la reflectividad de la interfase que se relaciona con su índice de refracción e indirectamente con el espesor del film.⁶⁹ De esta manera, mediante el análisis de las imágenes obtenidas por BAM se realizó la cuantificación de la reflectividad promedio del film a diferentes presiones superficiales, como se grafica en la Figura 8.3B. Puede observarse que los esteroides poseen un comportamiento similar, con reflectividades entre $(0,5\text{-}1,5)\times 10^{-6}$, mientras que diplopterol muestra reflectividades mayores, de hasta 3×10^{-6} .

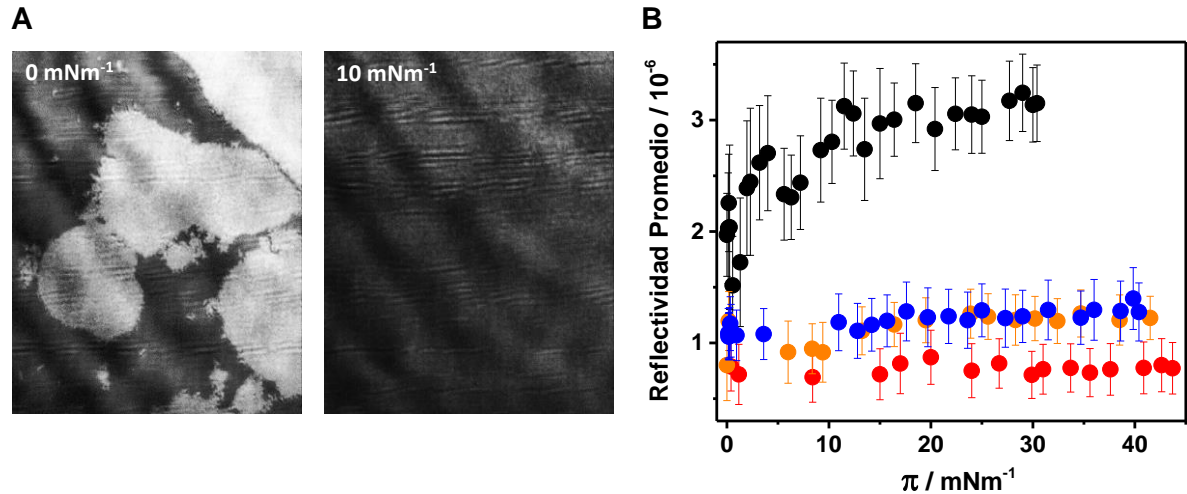


Figura 8.3. (A) Imágenes de monocapas de Diplopterol puro adquiridas por BAM a las presiones superficiales indicadas. (B) Reflectividad promedio vs presión superficial obtenida a partir de las imágenes de BAM de los compuestos puros: colesterol (●), ergosterol (●), stigmasterol (●) y diplopterol (●).

Generalmente, las fases de lípidos más laxas poseen menor espesor y valores de reflectividad pequeños, mientras que films más compactos poseen mayor espesor y una reflectividad más alta.^{69,193,194} Es por ello que de los resultados observados hasta aquí podría inferirse que diplopterol posee un estado de fase más rígido que los esteroides cuando se forman monocapas de los compuestos puros. Sin embargo, el módulo de compresibilidad de las monocapas, que es otra medida de la rigidez de las mismas (rigidez ante cambios de área) es menor para el diplopterol que para los esteroides a bajas presiones e incrementa desde 15mNm⁻¹, como se muestra en la Figura 8.4.

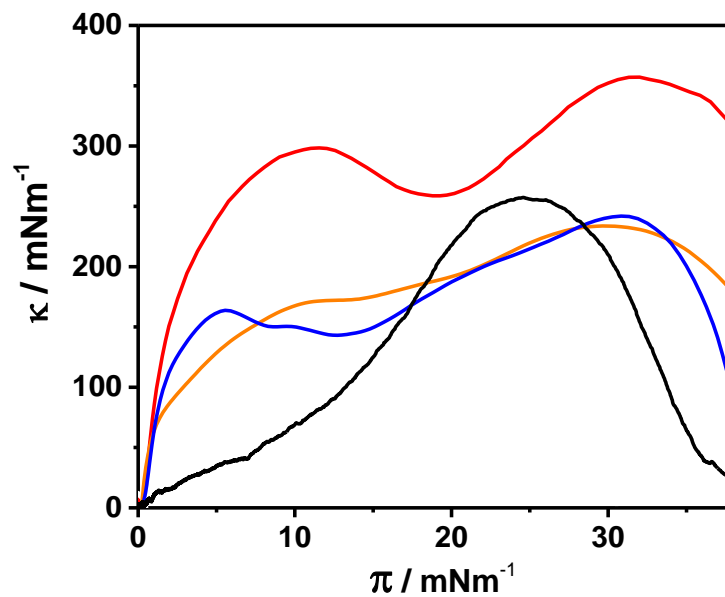


Figura 8.4. Módulo de la compresibilidad calculado a partir de las isotermas de compresión como $\kappa = -MMA \left(\frac{\delta\pi}{\delta MMA} \right)_T$ donde MMA corresponde al área molecular promedio y π es la presión superficial. Se muestra κ para colesterol (—), ergosterol (—), stigmasterol (—) y diplopterol (—).

Nótese que los esteroides muestran dos máximos de compresibilidad, mientras que el diplopterol uno sólo.

8.2 Monocapas mezcla. Diagramas de fases.

Para estudiar el efecto de los esteroides/hopanoideos sobre membranas de fosfolípidos, se estudiaron mezclas ternarias de DOPC:DPPC 1:2 conteniendo 10, 20 o 30% del esteroide/hopanoide. Mediante la realización de isothermas en la interfase agua-aire y su visualización por microscopía de ángulo de Brewster se construyó un diagrama de fases para cada mezcla de lípidos variando cada composición de esteroide/hopanoide, como se muestra en la Figura 8.5.

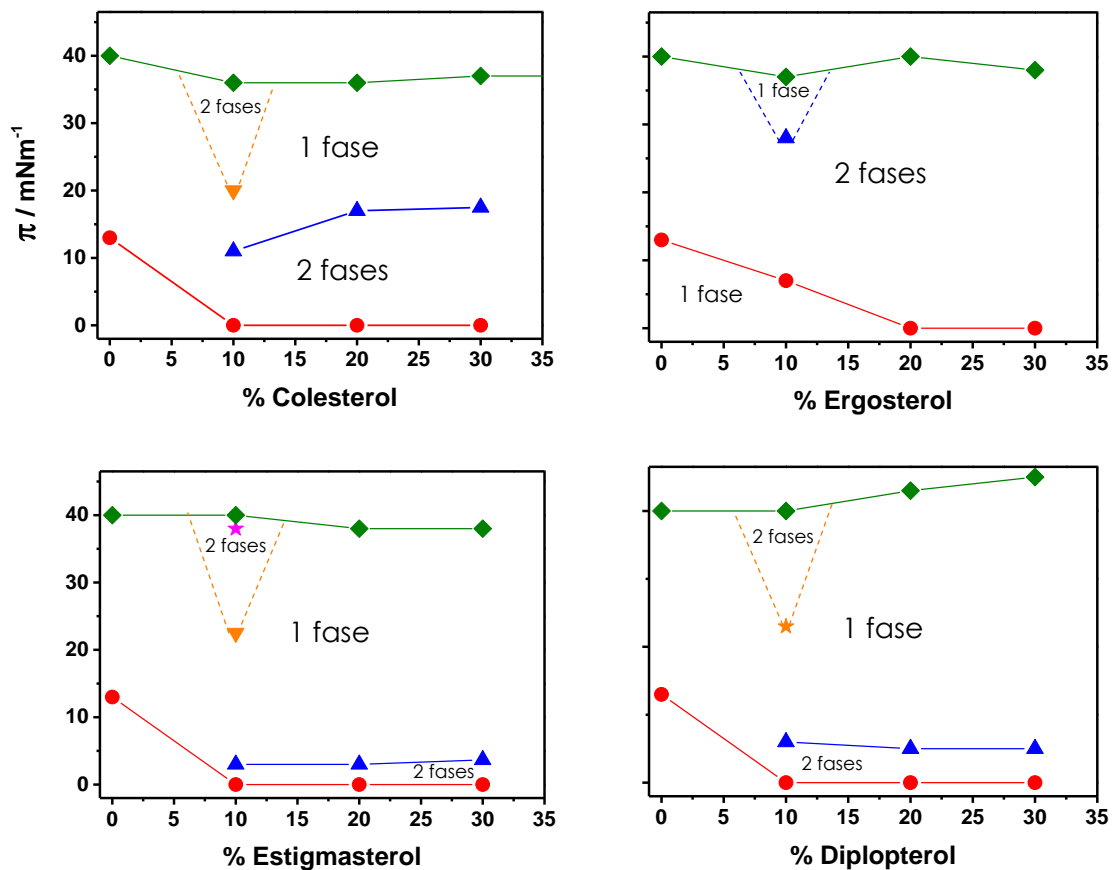


Figura 8.5. Diagrama de fases para la mezcla DOPC:DPPC 1:2 conteniendo diferentes proporciones de esteroides o diplopterol realizados con información obtenida a partir de isothermas de compresión e imágenes tomadas por BAM a $(22\pm 1)^\circ\text{C}$. Se indica la presión de colapso ($-\diamond-$), y las regiones de coexistencia de fd con fo-fd ($-\bullet-$), fo-fd con fo ($-\triangle-$), fo con fo-so ($-\nabla-$), y fo-so con so ($-\ast-$). Las líneas punteadas se incluyen para diferenciar las regiones, pero no corresponden a mediciones realizadas.

Los diagramas de fase obtenidos, muestran segregación en fases para todos los sistemas, variando los intervalos de presiones en los que se observan. La mezcla que contiene ergosterol es la que posee mayor intervalo de presiones en las que se observa segregación

en fases, mientras que estigmasterol y diplopterol poseen segregación en un intervalo muy acotado a bajas presiones superficiales. Por su parte, las mezclas con colesterol exhiben coexistencia de fases hasta los $10\text{-}15\text{ mNm}^{-1}$ en las composiciones analizadas. Así, los diagramas de fase obtenidos son similares a los obtenidos para bicapas con diferentes mezclas ternarias.¹⁹⁵ Interesantemente, para las mezclas que contienen 10% de colesterol, estigmasterol y diplopterol, se observó la aparición de una nueva fase a altas presiones, que podría corresponder a una fase sólida, diferente de la fase líquida que se observa a bajas presiones, como se ha propuesto previamente para otras mezclas con colesterol.¹⁹⁶ La forma de los dominios puede constituir un indicio de que la fase es sólida, debido a que se observan dominios con bordes rectos a altas presiones (ver Figura 8.6), diferentes de los típicos dominios circulares líquidos (ver Figura 8.7A). Además, se analizó la reflectividad de los dominios observados a bajas y a altas presiones superficiales para la mezcla conteniendo 10% de estigmasterol. Las mezclas con 10% de colesterol y diplopterol, presentan dominios demasiado pequeños, que dificultan la determinación precisa de este parámetro, por lo que no se muestra la cuantificación en estos sistemas, encontrándose valores similares a los de estigmasterol (dentro del error).

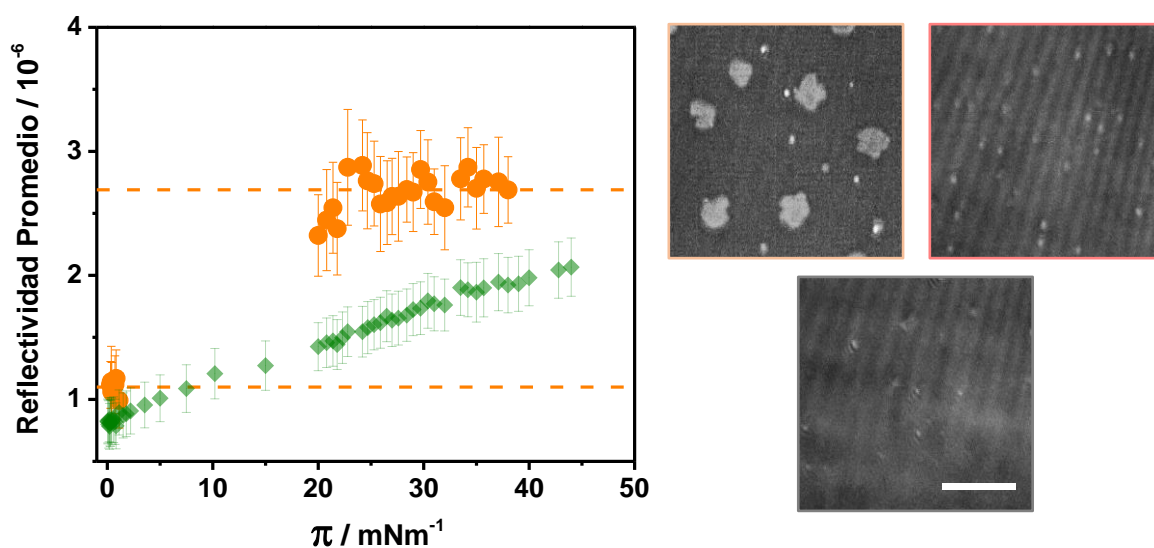


Figura 8.6. Reflectividad promedio vs presión superficial calculada a partir de las imágenes de BAM de la mezcla conteniendo 10% de estigmasterol. Se muestra la reflectividad de los dominios (●) y de la fase continua (◆). Las líneas punteadas indican los valores promedio de los puntos correspondientes para cada tipo de dominio, correspondiendo a $1,1 \times 10^{-6}$ y $2,7 \times 10^{-6}$, respectivamente. Las imágenes corresponden a los dominios a 23 mNm^{-1} para las mezclas de DOPC:DPPC 1:2 conteniendo: estigmasterol 10% (borde naranja), colesterol 10% (borde rojo) y diplopterol 10% (borde gris). La barra corresponde a $30\text{ }\mu\text{m}$.

De esta manera, se puede observar que la reflectividad es considerablemente mayor para los dominios que aparecen a presiones superficiales altas. Debido a esto, a la forma de los dominios y a lo propuesto previamente en bibliografía,¹⁹⁶ concluimos que probablemente

se trate de una fase más condensada, diferente de las observadas a menores presiones, y que no se observa para mayores porcentajes de colesterol/estigmasterol/diplopterol.

En el caso de las mezclas con diplopterol, se observa una textura particular de la membrana en la región de coexistencia de fases a bajas presiones, que difiere mucho de lo que se observa para esteroides, como ilustra la Figura 8.7. Mientras que los esteroides presentan dominios circulares típicos de la segregación de fases líquidas, el diplopterol muestra dominios estriados, similares a los observados para mezclas que contienen fosfolípidos de cadena larga como DAPC y DBPC.⁹²

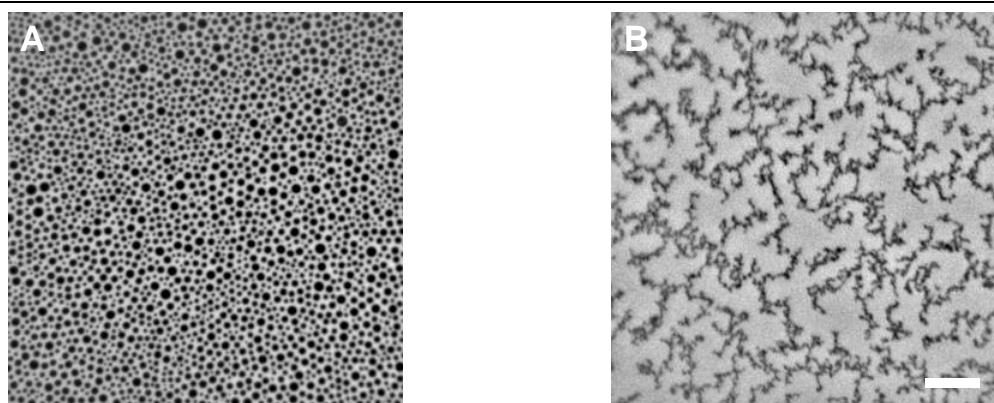


Figura 8.7. Micrografías obtenidas por FM representando a modo de ejemplo la textura observada en la región de coexistencia de fases para las mezclas con los diferentes esteroides (A) y con el hopanoide (B). La barra corresponde a 50 μm .

8.3 Propiedades dinámicas de los films en la interfase agua-aire.

Para medir las propiedades dinámicas de las mezclas conteniendo los diferentes esteroides/hopanoide, se realizó el mismo procedimiento descrito en la sección 2.3.2 del Capítulo 2, con la diferencia de que en lugar de seguir dominios, se siguió el movimiento de microesferas de látex de $\sim 3 \mu\text{m}$ de diámetro incluidas en la interfase. De esta manera se calculó el coeficiente de difusión para las mezclas conteniendo 30 % de esteroide/hopanoide a una presión de 25 mNm^{-1} . Nótese que excepto para ergosterol, todos los sistemas poseen una fase homogénea bajo estas condiciones. No obstante, la presencia de dominios en las monocapas de ergosterol no afectó la medición de la trayectoria de las partículas presentes en la fase continua.

La Figura 8.8 muestra los resultados obtenidos para los coeficientes de difusión de monocapas de los compuestos puros (8.8A), de las mezclas conteniendo esteroides/hopanoide (8.8B) y un resumen de los resultados obtenidos (8.8C). Puede observarse que tanto los films de compuestos puros como las mezclas conteniendo los diferentes esteroides/hopanoide, presentan coeficientes de difusión bastante similares entre sí, cuyo promedio se representa con la línea punteada verde en cada gráfico. En el caso de las mezclas, la presencia del

esterol/hopanoide disminuye el coeficiente de difusión respecto de la mezcla de fosfolípidos sin la incorporación de dichos compuestos (se representa el D para DOPC:DPPC 1:2 con una línea punteada negra en 8.8B). En promedio, el valor de D para los compuestos puros es de $(0,21 \pm 0,06) \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$, para las mezclas de fosfolípidos con esteroides/hopanoide es de $(0,31 \pm 0,05) \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ y para la mezcla de fosfolípidos es de $(0,7 \pm 0,1) \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$. Estos resultados están en el orden de los obtenidos para colesterol puro, y fosfolípidos puros que forman fases desordenadas, mediante el mismo método experimental,¹⁹⁷ y muy por debajo del que se encontró en monocapas de fosfolípidos que forman fases muy compactas ($<10^{-2}$)⁷⁵.

De esta manera, podemos concluir que tanto la textura observada de las mezclas con diplopterol, así como la reflectividad del compuesto puro difieren de lo observado para los esteroides. Sin embargo, el análisis de las propiedades dinámicas de las monocapas tanto de los compuestos puros como de las mezclas, indican que el diplopterol formaría una fase similar a la promovida por los esteroides en mezclas con fosfolípidos.

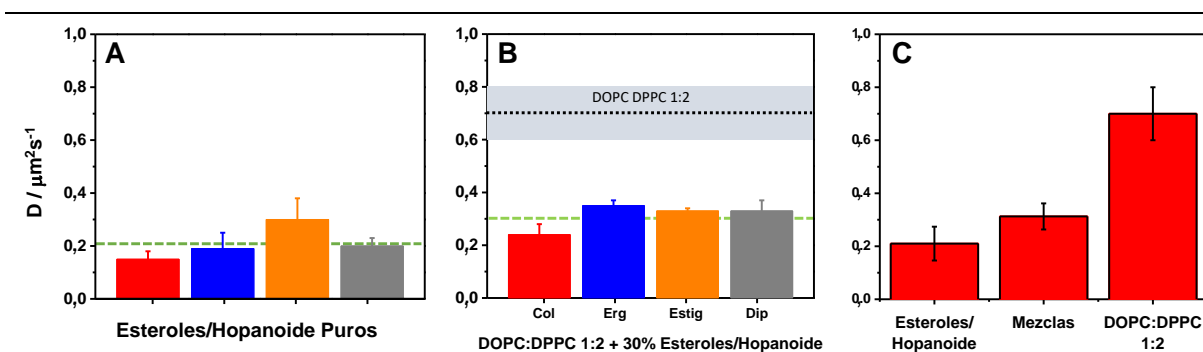


Figura 8.8. Coeficiente de difusión (D) calculado a partir de la inclusión de microesferas de látex en las monocapas, medido a una presión superficial de 25 mNm^{-1} . **(A)** Resultados obtenidos para monocapas de los compuestos puros. **(B)** Resultados correspondientes a la mezcla lipídica conteniendo un 30% del esteroide u hopanoide indicado. En la parte superior se muestra el valor de D obtenido para la mezcla de DOPC:DPPC sin el agregado de esteroides u hopanoide, con la región sombreada correspondiente a la desviación estándar. La línea punteada en verde en (A) y (B) corresponde al promedio de los valores obtenidos para los diferentes sistemas, que se grafican a modo de resumen en **(C)**.

8.4 Conclusiones.

Los esteroides son lípidos constituyentes de membranas en eucariotas, mientras que en procariontes se encuentran los hopanoideos, compuestos pentacíclicos propuestos como análogos a los esteroides. En membranas de diferentes grupos filogenéticos existen diferentes esteroides, colesterol en vertebrados, fitoesteroides en plantas y ergosterol en hongos. Todos ellos inducen la formación de una fase líquido-ordenada. En este Capítulo se analizó el efecto que los esteroides colesterol, ergosterol, estigmasterol, y el hopanoide diplopterol, poseen sobre las propiedades de monocapas en la interfase agua-aire. Los resultados muestran que los esteroides puros poseen un comportamiento interfacial bastante similar entre sí, mientras

que el diplopterol muestra una isoterma más expandida a presiones bajas y presenta alta reflectividad del film. Sin embargo, las propiedades dinámicas de las membranas, tanto puras como mezcla, son similares para los esteroides y el hopanoide. Actualmente, se continúa con esta línea de investigación, abarcando medidas de fluidez en bicapas planas, potencial de superficie en monocapas, y permeabilidad de vesículas.

Anexo

Capítulo 3: Control del diagrama de fases de GUVs con PE-Rho.

Con el objetivo de utilizar los datos reportados por Fidorra y col.⁸⁴ e incluirlos en la comparación realizada entre los diferentes modelos de membrana, se realizó un control para comprobar que los resultados obtenidos utilizando la sonda fluorescente PE-Rho fueran comparables con los publicados, en donde se utilizaron sondas diferentes. Para ello, se prepararon GUVs de DPPC:DLPC con 1 % mol de PE-Rho por el método de electroformación, y se observaron por microscopía confocal de fluorescencia. Las composiciones empleadas fueron $X_{\text{DPPC}} = 0,15$; 0,2 y 0,5, y se analizaron al menos 40 GUVs de cada composición. La Figura A.1 muestra que para $X_{\text{DPPC}} = 0,15$ el 75% de las GUVs observadas no mostraron coexistencia de fases mientras que para $X_{\text{DPPC}} = 0,2$ y $X_{\text{DPPC}} = 0,25$ el 93% de las GUVs mostraron dominios. Por lo tanto, el borde inferior del diagrama de fases utilizando PE-Rho se ubica en el intervalo de composiciones comprendido entre $0,15 < X_{\text{DPPC}} < 0,2$; lo cual está de acuerdo con el valor informado por Fidorra y col. ($X_{\text{DPPC}} = 0,18$). Cabe aclarar, que no se espera que el 100% de la población de GUVs muestre un mismo comportamiento de fases ya que la composición en estos sistemas varía de una vesícula a otra.¹⁹⁸

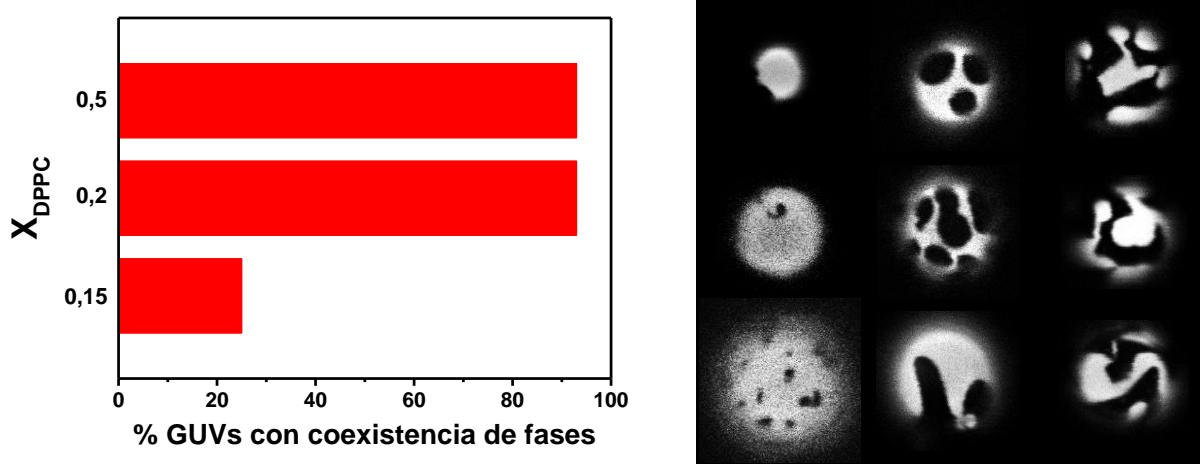


Figura A.1. Gráfico del porcentaje de GUVs que presentaron coexistencia de fases a partir del análisis de 40 vesículas de cada composición. Se muestran imágenes representativas de las GUVs obtenidas observadas por microscopía confocal de fluorescencia.

Capítulo 4: Transición de fase de DPPC y DMPC a área/presión superficial constante.

Para la determinación del intervalo en el cual ocurre la transición de fase (ΔT_m) para los lípidos puros DPPC y DMPC, se disminuyó o incrementó la temperatura de los films sobre la interfase agua-aire desde 33 °C y 17 °C, respectivamente mediante la utilización de un de baño térmico de circulación de agua. A dichas temperaturas, ambos films muestran coexistencia de fases a 30 mNm⁻¹. Bajo estas condiciones iniciales de temperatura, presión superficial y área molecular, se modificó la temperatura hasta la desaparición de dominios, manteniendo la presión o el área de la cuba constante. La región de coexistencia de fases de los sistemas se siguió mediante microscopía de ángulo de Brewster, como se ejemplifica en la Figura A.2, mientras se registraba la temperatura de la subfase y la presión superficial o el área molecular promedio. Para los dos lípidos, el intervalo de transición es menor cuando el experimento se lleva a cabo a presión constante, mientras que aumenta casi el doble cuando se produce manteniendo el área constante.

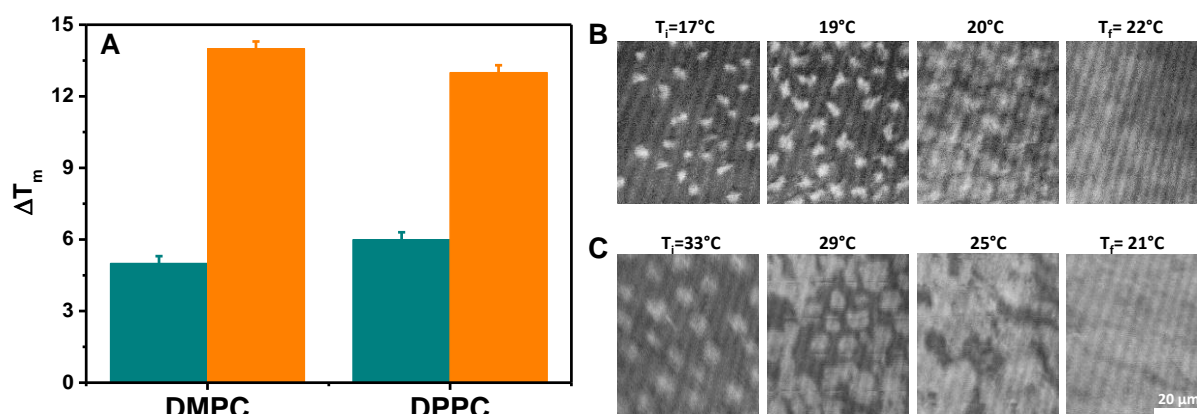


Figura A.2. (A) Gráfico mostrando el ΔT_m para films de DMPC y DPPC en la interfase agua-aire manteniendo el área (■) o la presión (■) constante. (B) Ejemplo de experimento llevado a cabo a presión superficial constante para DMPC. (C) Ejemplo de experimento manteniendo el área constante para DPPC. En ambos casos se indican las temperaturas iniciales y finales. El gráfico obtenido en (A) es el promedio de tres experimentos independientes para cada condición.

Capítulo 5: Función de distribución radial.

Se calculó la función de distribución radial para monocapas de Langmuir y bicapas planas *free-standing* a distintos porcentajes de área ocupada por dominios. La Figura A.3 muestra que para porcentajes por debajo de 20%fo en sistemas neutros, y debajo de 16%fo en sistemas cargados la función de distribución radial oscila, y comienza a visualizarse estructuración a partir de dichos valores (aparecen picos). En general, las determinaciones en monocapas de Langmuir poseen menor ruido debido a que el sistema abarca todo el campo

de visualización, ya que no solamente los dominios se mueven con movimiento Browniano, permitiendo realizar una estadística temporal de las posiciones, sino que además la monocapa fluye, permitiendo realizar una estadística espacial en gran parte de la monocapa. Por el contrario, las bicapas se encuentran confinadas en aberturas de $100\ \mu\text{m}$ de diámetro cada una. Dado que el área que se utiliza para la cuantificación corresponde a una porción central de menor tamaño, las determinaciones poseen más ruido en este sistema, ya que el sistema de partículas es mucho menor. La estadística en este caso es solamente temporal, y no espacial.

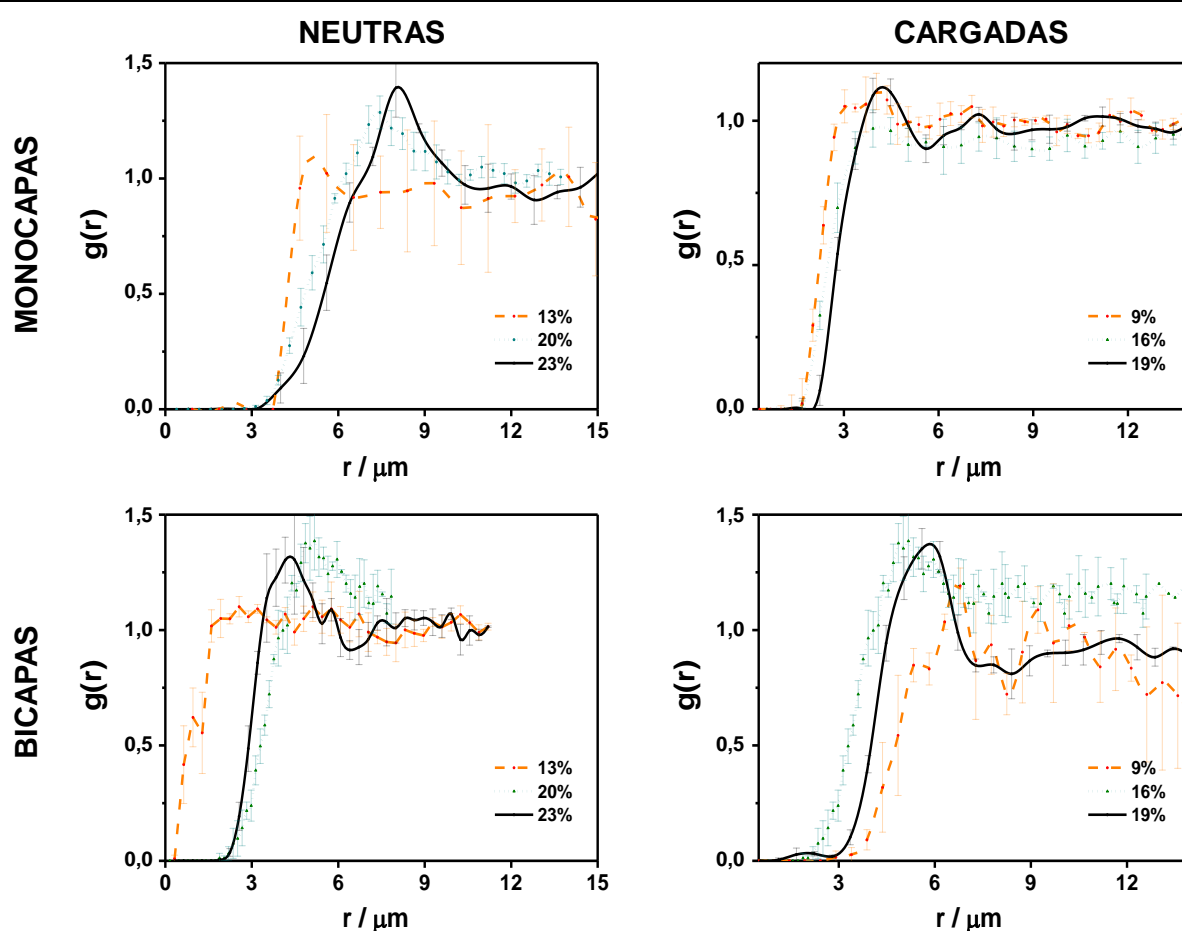


Figura A.3. Función de distribución radial $g(r)$ para monocapas (arriba) y bicapas (abajo) neutras (izquierda) y cargadas (derecha). Los sistemas neutros adquieren estructura entre 20-23 % y los cargados entre 16-19 %.

Capítulo 5: Estimación de la tensión de línea en monocapas y bicapas.

Al unirse dos dominios, la forma elipsoidal que adquiere el nuevo dominio en primera instancia se relaja a una forma circular, minimizando la energía libre relacionada a la región de contacto entre las dos fases diferentes (tensión de línea). Las viscosidades de la subfase y del film se oponen a dicha relajación con una escala de tiempo característica. Dicho proceso,

puede ser utilizado para estimar la tensión de línea experimentalmente, siendo este el caso de pequeñas deformaciones.^{199,200} Cuando la viscosidad de la subfase domina sobre la de la membrana, esto es en el caso de $\eta \ll \eta' R_0$ (donde η corresponde a la viscosidad de la membrana, η' es la viscosidad del agua $-0,001 \text{ kg m}^{-1}\text{s}^{-1}$ y R_0 corresponde al radio del dominio), la tensión de línea puede calcularse según:

$$\lambda = \frac{5\pi \eta' R_0^2}{16 T_C} \quad \text{ec. A1}$$

donde T_C es el tiempo característico que puede obtenerse a partir del cambio en la distorsión (θ) del dominio en el tiempo, ya que $\theta \propto \exp\left(-\frac{t}{T_C}\right)$.^{199,201} Dicha distorsión se calcula a partir de la relación $\theta = \frac{L}{A} - 1$ (ver Figura A.4). De esta manera, a partir de los cambios en la elipse formada por la unión de dos dominios, hasta que se alcanza una forma circular invariable (Figura A.4), es posible realizar una estimación de la tensión de línea.

Para dominios que se fusionan en monocapas, la tensión de línea estimada es de 0,2 pN; mientras que para bicapas es diez veces menor, 0,02 pN. Estos valores están en concordancia con los resultados esperados de tensión de línea para estos sistemas, y coinciden con valores medidos en el laboratorio para distintos fosfolípidos puros y mezclas mediante otro método que analiza deformaciones grandes.^{87,202}

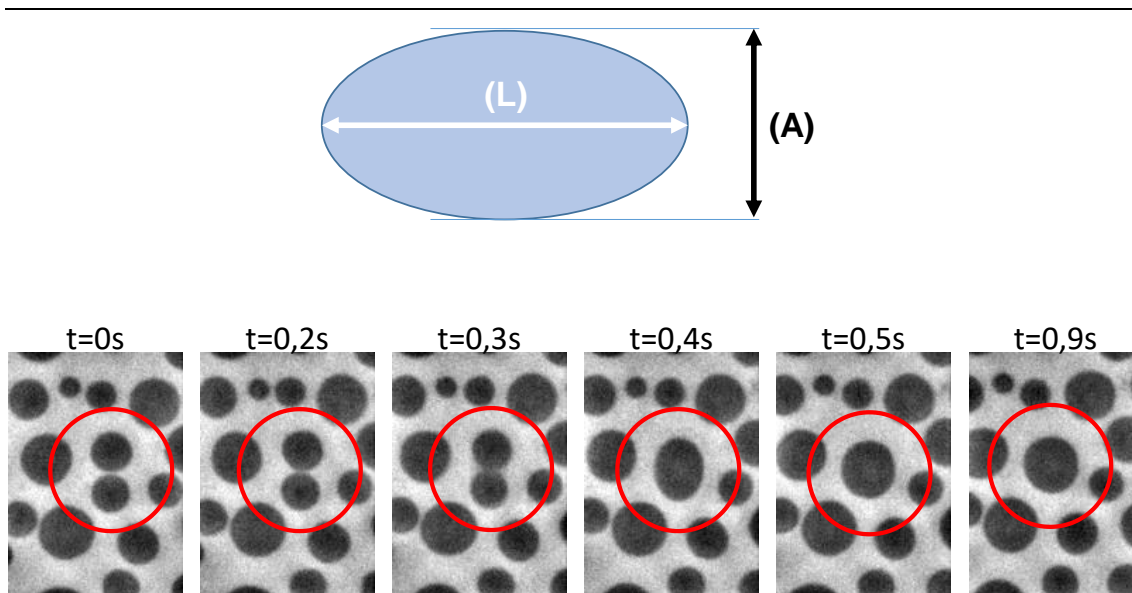


Figura A.4. A partir de la elipse formada por la unión de dos dominios se calcula el parámetro de distorsión θ mediante el largo y el alto de la elipse (relación de aspecto). La secuencia de imágenes ejemplifica la fusión de dos dominios en monocapas, y se muestra como a partir de t=0,5 segundos la forma elipsoidal se relaja permaneciendo invariable.

Referencias

- (1) Hancock, J. R. Todos los mapas que conoces están mal, Verne-Diario El País, Abril de **2015**. http://verne.elpais.com/verne/2015/04/14/articulo/1429016086_681676.html.
- (2) Maggio, B. *Introducción a La Biofísico-Química*; Editorial Gonzales Truccone, **1988**.
- (3) Tien, H. T.; Ottova, A. L. The Lipid Bilayer Concept and Its Experimental Realization: From Soap Bubbles, Kitchen Sink, to Bilayer Lipid Membranes. *J. Memb. Sci.* **2001**, *189* (1), 83–117.
- (4) Eichman, P. From the Lipid Bilayer to the Fluid Mosaic: A Brief History of Membrane Models. *Resour. Cent. Sociol. Hist. Phylosophy Sci.* **1999**, *9* (2), 5–8.
- (5) Ti Tien, H.; Ottova-Leitmannova, A. *Membrane Biophysics as Viewed from Experimental Lipid Membranes*, 1st ed.; Elsevier Science B.V.: Amsterdam, **2000**.
- (6) Singer, S. J.; Nicolson, G. L. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science (80-)*. **1972**, *175* (4023), 720 LP-731.
- (7) Nicolson, G. L. The Fluid - Mosaic Model of Membrane Structure: Still Relevant to Understanding the Structure, Function and Dynamics of Biological Membranes after More than 40 Years. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2014**, *1838*, 1451–1466.
- (8) Israelachvili, J. N. Refinement of the Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure. *BBA - Biomembr.* **1977**, *469* (2), 221–225.
- (9) Mouritsen, O. G.; Bloom, M. Mattress Model of Lipid-Protein Interactions in Membranes. *Biophys. J.* **1984**, *46* (2), 141–153.
- (10) Sackmann, E. Physical Basis of Self-Organization and Function of Membranes: Physics of Vesicles. In *Structure and Dynamics of Membranes: From Cells to Vesicles*; Lipowsky, R., Sackmann, E., Eds.; Elsevier: Amsterdam, **1995**; pp 213–304.
- (11) Rosetti, C. M.; Mangiarotti, A.; Wilke, N. Sizes of Lipid Domains: What Do We Know from Artificial Lipid Membranes? What Are the Possible Shared Features with Membrane Rafts in Cells? *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2017**, *1859* (5), 789–802.
- (12) Aplin, J. D.; Hughes, R. C. Complex Carbohydrates of the Extracellular Matrix Structures, Interactions and Biological Roles. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* **1982**, *694* (4), 375–418.
- (13) Heimburg, T. *Thermal Biophysics of Membranes*; Wiley-VCH: Weinheim, **2007**.
- (14) McIntosh, T. J. Differences in Hydrocarbon Chain Tilt between Hydrated Phosphatidylethanolamine and Phosphatidylcholine Bilayers. A Molecular Packing Model. *Biophys. J.* **1980**, *29* (2), 237–245.
- (15) Janiak, M. J.; Small, D. M.; Shipley, G. G. Temperature and Compositional Dependence of the Structure of Hydrated Dimyristoyl Lecithin . Temperature and Compositional Hydrated Dimyristoyl Lecithin * Dependence Structure. *J. Biol. Chem.* **1979**, *254* (13), 6068–6078.
- (16) Mouritsen, O. G.; Bagatolli, L. A. *Life as a Matter of Fat*, 2nd ed.; Springer International Publishing, **2016**.

- (17) Gaines, G. L. *Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces*; Interscience Publishers: New York, **1966**.
- (18) Härtel, S.; Fanani, M. L.; Maggio, B. Shape Transitions and Lattice Structuring of Ceramide-Enriched Domains Generated by Sphingomyelinase in Lipid Monolayers. *Biophys. J.* **2005**, *88* (January), 287–304.
- (19) Iatan, I.; Bailey, D.; Ruel, I.; Hafiane, A.; Campbell, S.; Krimbou, L.; Genest, J. Membrane Microdomains Modulate Oligomeric ABCA1 Function: Impact on apoAI-Mediated Lipid Removal and Phosphatidylcholine Biosynthesis. *J. Lipid Res.* **2011**, *52* (11), 2043–2055.
- (20) Zendejas, F. J.; Meagher, R. J.; Stachowiak, J. C.; Hayden, C. C.; Sasaki, D. Y. Orienting Lipid Domains in Giant Vesicles Using an Electric Field. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (26), 7320–7322.
- (21) Murray, D.; Ben-Tal, N.; Honig, B.; McLaughlin, S. Electrostatic Interaction of Myristoylated Proteins with Membranes: Simple Physics, Complicated Biology. *Structure* **1997**, *5* (8), 985–989.
- (22) Wilke, N.; Maggio, B. Electrostatic Field Effects on Membrane Domain Segregation and on Lateral Diffusion. *Biophys. Rev.* **2011**, *3* (4), 185–192.
- (23) Saxton, M. J. Lateral Diffusion and Aggregation. A Monte Carlo Study. *Biophys. J.* **1992**, *61* (1), 119–128.
- (24) Saxton, M. J. Lateral Diffusion in an Archipelago. Single-Particle Diffusion. *Biophys. J.* **1993**, *64* (6), 1766–1780.
- (25) Saxton, M. J. Lateral Diffusion in an Archipelago. Dependence on Tracer Size. *Biophys. J.* **1993**, *64* (4), 1053–1062.
- (26) Selle, C.; Ruckerl, F.; Martin, D. S.; Forstner, M. B.; Kas, J. A. Measurement of Diffusion in Langmuir Monolayers by Single-Particle Tracking. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2004**, *6* (24), 5535–5542.
- (27) Ruckerl, F.; Käs, J. a.; Selle, C. Diffusion of Nanoparticles in Monolayers Is Modulated by Domain Size. *Langmuir* **2008**, *24* (26), 3365–3369.
- (28) Forstner, M. B.; Martin, D. S.; Ruckerl, F.; Käs, J. a.; Selle, C. Attractive Membrane Domains Control Lateral Diffusion. *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.* **2008**, *77* (5), 1–7.
- (29) Thompson, T. E.; Sankaram, M. B.; Biltonen, R. L.; Marsh, D.; Vaz, W. L. C. Effects of Domain Structure on in-Plane Reactions and Interactions. *Mol. Membr. Biol.* **1995**, *12* (1), 157–162.
- (30) Bernchou, U.; Brewer, J.; Midtby, H. S.; Ipsen, J. H.; Bagatolli, L. A.; Simonsen, A. C. Texture of Lipid Bilayer Domains. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (40), 14130–14131.
- (31) Vega Mercado, F.; Maggio, B.; Wilke, N. Modulation of the Domain Topography of Biphasic Monolayers of Stearic Acid and Dimyristoyl Phosphatidylcholine. *Chem. Phys. Lipids* **2012**, *165* (2), 232–237.
- (32) Groves, J. T. Bending Mechanics and Molecular Organization in Biological Membranes. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2007**, *58*, 697–717.
- (33) McConnell, H. Structures And Transitions In Lipid Monolayers At The Air-Water Interface. *Annu.*

- Rev. Phys. Chem.* **1991**, *42*, 171–195.
- (34) Bruinsma, R.; Rondelez, F.; Levine, A. Flow-Controlled Growth in Langmuir Monolayers. *Eur. Phys. J. E* **2001**, *6* (3), 191–200.
- (35) Gutierrez-Campos, A.; Diaz-Leines, G.; Castillo, R. Domain Growth, Pattern Formation, and Morphology Transitions in Langmuir Monolayers. A New Growth Instability. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114* (15), 5034–5046.
- (36) Stottrup, B. L.; Stevens, D. S.; Keller, S. L. Miscibility of Ternary Mixtures of Phospholipids and Cholesterol in Monolayers, and Application to Bilayer Systems. *Biophys. J.* **2005**, *88* (January), 269–276.
- (37) Veatch, S. L.; Keller, S. L. Organization in Lipid Membranes Containing Cholesterol. *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *89*, 268101.
- (38) Merino, S.; Domènech, Ò.; Díez-Pérez, I.; Sanz, F.; Montero, M. T.; Hernández-Borrell, J. Surface Thermodynamic Properties of Monolayers versus Reconstitution of a Membrane Protein in Solid-Supported Bilayers. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2005**, *44*, 93–98.
- (39) Pockels, A. Surface Tension. *Nature* **1891**, *43*, 437–439.
- (40) Brown, R. E.; Brockman, H. L. Using Monomolecular Films to Characterize Lipid Lateral Interactions. In *Lipid Rafts*; McIntosh, T. J., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, **2007**; pp 41–58.
- (41) Biolins-Scientific KSV-Nima <http://www.biolinscientific.com/ksvnima/>.
- (42) Petty, M. C. *Langmuir-Blodgett Films: An Introduction*; **1996**.
- (43) Bayerl, T. M.; Bloom, M. Physical Properties of Single Phospholipid Bilayers Adsorbed to Micro Glass Beads. A New Vesicular Model System Studied by ²H-Nuclear Magnetic Resonance. *Biophys. J.* **1990**, *58* (August), 357–362.
- (44) Johnson, S. J.; Bayerl, T. M.; McDermott, D. C.; Adam, G. W.; Rennie, a R.; Thomas, R. K.; Sackmann, E. Structure of an Adsorbed Dimyristoylphosphatidylcholine Bilayer Measured with Specular Reflection of Neutrons. *Biophys. J.* **1991**, *59* (2), 289–294.
- (45) Kim, J.; Kim, G.; Cremer, P. S. Investigations of Water Structure at the Solid/liquid Interface in the Presence of Supported Lipid Bilayers by Vibrational Sum Frequency Spectroscopy. *Langmuir* **2001**, *17* (23), 7255–7260.
- (46) Seifert, U.; Lipowsky, R. Adhesion of Vesicles. *Phys. Rev. A* **1990**, *42* (8), 4768–4771.
- (47) Lipowsky, R.; Seifert, U. Adhesion of Vesicles and Membranes. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **1991**, *202* (1), 17–25.
- (48) Seifert, U. Configurations of Fluid Membranes and Vesicles. *Adv. Phys.* **1997**, *46* (1), 13–137.
- (49) Lentz, B. R.; Carpenter, T. J.; Alford, D. R. Spontaneous Fusion of Phosphatidylcholine Small Unilamellar Vesicles in the Fluid Phase. *Biochemistry* **1987**, *26* (17), 5389–5397.
- (50) Kam, L.; Boxer, S. G. Formation of Supported Lipid Bilayer Composition Arrays by Controlled Mixing and Surface Capture. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (51), 12901–12902.

- (51) Bangham, A. D. The Discovery of Liposomes. *BioEssays* **1995**, *17* (12), 1081–1088.
- (52) Angelova, M. I.; Dimitrov, D. S. Liposome Electroformation. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **1986**, *81* (0), 303–311.
- (53) Angelova, M.; Soleau, S.; Méléard, P. Preparation of Giant Vesicles by External AC Electric Fields. Kinetics and Applications. *Trends Colloid ...* **1992**, *89* (899), 127–131.
- (54) Montal, M.; Mueller, P. Formation of Bimolecular Membranes from Lipid Monolayers and a Study of Their Electrical Properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1972**, *69* (12), 3561–3566.
- (55) Fettiplace, R.; Andrews, D. M.; Haydon, D. A. The Thickness, Composition and Structure of Some Lipid Bilayers and Natural Membranes. *J. Membr. Biol.* **1971**, *5* (3), 277–296.
- (56) White, S. H.; Petersen, D. C.; Simon, S.; Yafuso, M. Formation of Planar Bilayer Membranes from Lipid Monolayers. A Critique. *Biophys. J.* **1976**, *16* (5), 481–489.
- (57) White, S. H. Formation Of “solvent-free” black Lipid Bilayer Membranes from Glycerol Monooleate Dispersed in Squalene. *Biophys. J.* **1978**, *23*, 337–347.
- (58) Beerlink, A. *Black Lipid Membranes Studied by X-Ray Phase Contrast Imaging*; **2011**.
- (59) Mueller, P.; Rudin, D. O.; Tien, H. T.; Wescott, W. C. Reconstitution of Excitable Cell Membrane Structure in Vitro. *Circulation* **1962**, *26* (5), 1167–1171.
- (60) Harland, C. W.; Bradley, M. J.; Parthasarathy, R. Phospholipid Bilayers Are Viscoelastic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107* (45), 19146–19150.
- (61) May, S. Trans-Monolayer Coupling of Fluid Domains in Lipid Bilayers. *Soft Matter* **2009**, *5* (April), 3148.
- (62) Shao, C.; Kendall, E. L.; DeVoe, D. L. Electro-Optical BLM Chips Enabling Dynamic Imaging of Ordered Lipid Domains. *Lab Chip* **2012**, *12* (17), 3142–3149.
- (63) Veatch, S. L.; Keller, S. L. Seeing Spots: Complex Phase Behavior in Simple Membranes. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **2005**, *1746*, 172–185.
- (64) Korlach, J.; Schwille, P.; Webb, W. W.; Feigenson, G. W. Characterization of Lipid Bilayer Phases by Confocal Microscopy and Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96* (15), 8461–8466.
- (65) Dietrich, C.; Bagatolli, L. a; Volovyk, Z. N.; Thompson, N. L.; Levi, M.; Jacobson, K.; Gratton, E. Lipid Rafts Reconstituted in Model Membranes. *Biophys. J.* **2001**, *80* (3), 1417–1428.
- (66) Collins, M. D.; Keller, S. L. Tuning Lipid Mixtures to Induce or Suppress Domain Formation across Leaflets of Unsupported Asymmetric Bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105* (1), 124–128.
- (67) Crane, J. M.; Tamm, L. K. Role of Cholesterol in the Formation and Nature of Lipid Rafts in Planar and Spherical Model Membranes. *Biophys. J.* **2004**, *86* (5), 2965–2979.
- (68) Stottrup, B. L.; Veatch, S. L.; Keller, S. L. Nonequilibrium Behavior in Supported Lipid Membranes Containing Cholesterol. *Biophys. J.* **2004**, *86* (5), 2942–2950.

- (69) Lheveder, C. Meunier, J. Hénon, S. Brewster Angle Microscopy. In *Physical Chemistry of Biological Interfaces*; Baszkin, A., Norde, W., Eds.; Marcel Dekker, Inc., **2000**; pp 560–574.
- (70) El Kirat, K.; Morandat, S.; Dufrière, Y. F. Nanoscale Analysis of Supported Lipid Bilayers Using Atomic Force Microscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1798* (4), 750–765.
- (71) Gruszecki, W. I.; Kulik, A. J.; Janik, E.; Bednarska, J.; Luchowski, R.; Grudzinski, W.; Dietler, G. Nanoscale Resolution in Infrared Imaging of Protein-Containing Lipid Membranes. *Nanoscale* **2015**, *7* (35), 14659–14662.
- (72) Lin, W.-C.; Blanchette, C. D.; Ratto, T. V; Longo, M. L. Lipid Asymmetry in DLPC/DSPC-Supported Lipid Bilayers: A Combined AFM and Fluorescence Microscopy Study. *Biophys. J.* **2006**, *90* (1), 228–237.
- (73) Caruso, B.; Villarreal, M.; Reinaudi, L.; Wilke, N. Inter-Domain Interactions in Charged Lipid Monolayers. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118* (2), 519–529.
- (74) Sbalzarini, I. F.; Koumoutsakos, P. Feature Point Tracking and Trajectory Analysis for Video Imaging in Cell Biology. *J. Struct. Biol.* **2005**, *151* (2), 182–195.
- (75) Wilke, N.; Vega Mercado, F.; Maggio, B. Rheological Properties of a Two Phase Lipid Monolayer at the Air/water Interface: Effect of the Composition of the Mixture. *Langmuir* **2010**, *26* (8), 11050–11059.
- (76) Wilke, N.; Maggio, B. The Influence of Domain Crowding on the Lateral Diffusion of Ceramide-Enriched Domains in a Sphingomyelin Monolayer. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 12844–12851.
- (77) Wilke, N.; Dassie, S. A.; Leiva, E. P. M.; and B. Maggio. Externally Applied Electric Fields on Immiscible Lipid Monolayers: Repulsion between Condensed Domains Precludes Domain Migration. *Langmuir* **2006**, *22* (23), 9664–9670.
- (78) Miller, A.; Möhwald, H. Diffusion Limited Growth of Crystalline Domains in Phospholipid Monolayers. *J. Chem. Phys.* **1987**, *86* (7).
- (79) Wilke, N.; Maggio, B. Effect of Externally Applied Electrostatic Fields on the Surface Topography of Ceramide-Enriched Domains in Mixed Monolayers with Sphingomyelin. *Biophys. Chem.* **2006**, *122*, 36–42.
- (80) Samsonov, A. V.; Mihalyov, I.; Cohen, F. S. Characterization of Cholesterol-Sphingomyelin Domains and Their Dynamics in Bilayer Membranes. *Biophys. J.* **2001**, *81* (3), 1486–1500.
- (81) Beerlink, A.; Thutupalli, S.; Mell, M.; Bartels, M.; Cloetens, P.; Herminghaus, S.; Salditt, T. X-Ray Propagation Imaging of a Lipid Bilayer in Solution. *Soft Matter* **2012**, *8* (17), 4595.
- (82) Sanchez, J.; Badia, A. Atomic Force Microscopy Studies of Lateral Phase Separation in Mixed Monolayers of Dipalmitoylphosphatidylcholine and Dilauroylphosphatidylcholine. *Thin Solid Films* **2003**, *440*, 223–239.
- (83) Tokumasu, F.; Jin, A. J.; Feigenson, G. W.; Dvorak, J. a. Nanoscopic Lipid Domain Dynamics Revealed by Atomic Force Microscopy. *Biophys. J.* **2003**, *84* (4), 2609–2618.
- (84) Fidorra, M.; Garcia, a.; Ipsen, J. H.; Härtel, S.; Bagatolli, L. a. Lipid Domains in Giant Unilamellar Vesicles and Their Correspondence with Equilibrium Thermodynamic Phases: A Quantitative

- Fluorescence Microscopy Imaging Approach. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2009**, *1788* (10), 2142–2149.
- (85) Fischer, A.; Lösche, M.; Möhwald, H.; Sackmann, E. On the Nature of the Lipid Monolayer Phase Transition. *J. Phys. Lettres* **1984**, *45* (16), 785–791.
- (86) Van Dijck, P. W. M.; Kaper, A. J.; Oonk, H. A. J.; De Gier, J. Miscibility Properties of Binary Phosphatidylcholine Mixtures. A Calorimetric Study. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1977**, *470* (1), 58–69.
- (87) Bischof, A. A.; Mangiarotti, A.; Wilke, N. Searching for Line Active Molecules on Biphasic Lipid Monolayers. *Soft Matter* **2015**, *11*, 2147–2156.
- (88) Hjort Ipsen, J.; Karlström, G.; Mouritsen, O. G.; Wennerström, H.; Zuckermann, M. J. Phase Equilibria in the Phosphatidylcholine-Cholesterol System. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1987**, *905* (1), 162–172.
- (89) Blanchette, C. D.; Lin, W.-C.; Orme, C. a; Ratto, T. V; Longo, M. L. Domain Nucleation Rates and Interfacial Line Tensions in Supported Bilayers of Ternary Mixtures Containing Galactosylceramide. *Biophys. J.* **2008**, *94* (7), 2691–2697.
- (90) Garcia-Saez, A. J.; Chiantia, S.; Schwille, P. Effect of Line Tension on the Lateral Organization of Lipid Membranes. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (46), 33537–33544.
- (91) Iimura, K.; Shiraku, T.; Kato, T. Micro-Phase Separation in Binary Mixed Langmuir Monolayers of N -Alkyl Fatty Acids and a Perfluoropolyether Derivative. **2002**, No. 20, 10183–10190.
- (92) Caruso, B.; Mangiarotti, A.; Wilke, N. Stiffness of Lipid Monolayers with Phase Coexistence. *Langmuir* **2013**, *29* (34), 10807–10816.
- (93) Demel, R. A.; Geurts van Kessel, W. S. M.; Zwaal, R. F. A.; Roelofsen, B.; van Deenen, L. L. M. Relation between Various Phospholipase Actions on Human Red Cell Membranes and the Interfacial Phospholipid Pressure in Monolayers. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1975**, *406* (1), 97–107.
- (94) Marsh, D. Lateral Pressure in Membranes. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* **1996**, *1286*, 183–223.
- (95) Phillips, M. C.; Graham, D. E.; Hauser, H. Lateral Compressibility and Penetration into Phospholipid Monolayers and Bilayer Membranes. *Nature* **1975**, *254* (5496), 154–156.
- (96) Wacklin, H. P. Composition and Asymmetry in Supported Membranes Formed by Vesicle Fusion. *Langmuir* **2011**, *27*, 7698–7707.
- (97) Leidy, C.; Kaasgaard, T.; Crowe, J. H.; Mouritsen, O. G.; Jørgensen, K. Ripples and the Formation of Anisotropic Lipid Domains: Imaging Two-Component Supported Double Bilayers by Atomic Force Microscopy. *Biophys. J.* **2002**, *83* (5), 2625–2633.
- (98) Sackmann, E. Supported Membranes: Scientific and Practical Applications. *Science* **1996**, *271* (January), 43–48.
- (99) Castellana, E. T.; Cremer, P. S. Solid Supported Lipid Bilayers: From Biophysical Studies to Sensor Design. *Surf. Sci. Rep.* **2006**, *61*, 429–444.

- (100) Kalb, E.; Frey, S.; Tamm, L. K. Formation of Supported Planar Bilayers by Fusion of Vesicles to Supported Phospholipid Monolayers. *BBA - Biomembr.* **1992**, *1103* (2), 307–316.
- (101) Crane, J. M.; Kiessling, V.; Tamm, L. K. Measuring Lipid Asymmetry in Planar Supported Bilayers by Fluorescence Interference Contrast Microscopy. *Langmuir* **2005**, *21* (15), 1377–1388.
- (102) Mangiarotti, A.; Caruso, B.; Wilke, N. Phase Coexistence in Films Composed of DLPC and DPPC: A Comparison between Different Model Membrane Systems. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2014**, *1838* (7), 1823–1831.
- (103) Rosetti, C. M.; Wilke, N.; Maggio, B. Thermodynamic Distribution Functions Associated to the Isothermal Phase Transition in Langmuir Monolayers. *Chem. Phys. Lett.* **2006**, *422*, 240–245.
- (104) Xing, C.; Faller, R. *What Is the Difference between a Supported and a Free Bilayer? Insights from Molecular Modeling on Different Scales*, 1st ed.; Elsevier Inc., **2010**; Vol. 11.
- (105) Barneveld, P. a; Scheutjens, J. M. H. M.; Lyklema, J. Bending Moduli and Spontaneous Curvature. 1. Bilayers and Monolayers of Pure and Mixed Nonionic Surfaatants. *Langmuir* **1992**, *8* (7), 3122–3130.
- (106) Baoukina, S.; Monticelli, L.; Risselada, H. J.; Marrink, S. J.; Tieleman, D. P. The Molecular Mechanism of Lipid Monolayer Collapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105* (31), 10803–10808.
- (107) Helm, C. a; Möhwald, H.; Kjær, K.; Als-Nielsen, J. Phospholipid Monolayer Density Distribution Perpendicular to the Water Surface. A Synchrotron X-Ray Reflectivity Study. *Europhys. Lett.* **1987**, *4*, 697–703.
- (108) Braslau, a.; Deutsch, M.; Pershan, P. S.; Weiss, a. H.; Als-Nielsen, J.; Bohr, J. Surface Roughness of Water Measured by X-Ray Reflectivity. *Phys. Rev. Lett.* **1985**, *54* (2), 114–117.
- (109) Heberle, F. a.; Pan, J.; Standaert, R. F.; Drazba, P.; Kucerka, N.; Katsaras, J. Model-Based Approaches for the Determination of Lipid Bilayer Structure from Small-Angle Neutron and X-Ray Scattering Data. *Eur. Biophys. J.* **2012**, *41*, 875–890.
- (110) Johnson, S. J.; Bayerl, T. M.; McDermott, D. C.; Adam, G. W.; Rennie, a R.; Thomas, R. K.; Sackmann, E. Structure of an Adsorbed Dimyristoylphosphatidylcholine Bilayer Measured with Specular Reflection of Neutrons. *Biophys. J.* **1991**, *59* (2), 289–294.
- (111) Gov, N.; Zilman, a. G.; Safran, S. Hydrodynamics of Confined Membranes. *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.* **2004**, *70* (October 2003), 1–10.
- (112) Hoopes, M. I.; Deserno, M.; Longo, M. L.; Faller, R. Coarse-Grained Modeling of Interactions of Lipid Bilayers with Supports. *J. Chem. Phys.* **2008**, *129* (2008).
- (113) Vitkova, V.; Genova, J.; Finogenova, O.; Mitov, M. .; Ermakov, Y.; Bivas, I. Surface Charge Effect on the Bending Elasticity of Lipid Bilayers. *Comptes rendus l'Académie Bulg. des Sci.* **2004**, *57* (11), 25–30.
- (114) Mertins, O.; Dimova, R. Insights on the Interactions of Chitosan with Phospholipid Vesicles . Part II : Membrane Sti Ff Ening and Pore Formation. **2013**.
- (115) Charrier, A.; Thibaudau, F. Main Phase Transitions in Supported Lipid Single-Bilayer. *Biophys. J.*

- 2005**, *89* (August), 1094–1101.
- (116) Xing, C.; Faller, R. Interactions of Lipid Bilayers with Supports: A Coarse-Grained Molecular Simulation Study. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 7086–7094.
- (117) Seeger, H. M.; Cerbo, A. D.; Alessandrini, A.; Facci, P. Supported Lipid Bilayers on Mica and Silicon Oxide: Comparison of the Main Phase Transition Behavior. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 8926–8933.
- (118) Tokumasu, F.; Jin, A. J.; Dvorak, J. a. Lipid Membrane Phase Behaviour Elucidated in Real Time by Controlled Environment Atomic Force Microscopy. *J. Electron Microsc. (Tokyo)*. **2002**, *51* (1), 1–9.
- (119) Scomparin, C.; Lecuyer, S.; Ferreira, M.; Charitat, T.; Tinland, B. Diffusion in Supported Lipid Bilayers: Influence of Substrate and Preparation Technique on the Internal Dynamics. *Eur. Phys. J. E* **2009**, *28*, 211–220.
- (120) Richter, R. P.; Bérat, R.; Brisson, A. R. Formation of Solid-Supported Lipid Bilayers: An Integrated View. *Langmuir* **2006**, *22* (12), 3497–3505.
- (121) Ramkaran, M.; Badia, A. Gel-to-Fluid Phase Transformations in Solid-Supported Phospholipid Bilayers Assembled by the Langmuir-Blodgett Technique: Effect of the Langmuir Monolayer Phase State and Molecular Density. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 9708–9721.
- (122) Seeger, H. M.; Marino, G.; Alessandrini, a.; Facci, P. Effect of Physical Parameters on the Main Phase Transition of Supported Lipid Bilayers. *Biophys. J.* **2009**, *97* (4), 1067–1076.
- (123) Keller, D.; Larsen, N. B.; Møller, I. M.; Mouritsen, O. G. Decoupled Phase Transitions and Grain-Boundary Melting in Supported Phospholipid Bilayers. *Phys. Rev. Lett.* **2005**, *94* (January), 1–4.
- (124) Feng, Z. V.; Spurlin, T. a; Gewirth, A. a. Direct Visualization of Asymmetric Behavior in Supported Lipid Bilayers at the Gel-Fluid Phase Transition. *Biophys. J.* **2005**, *88* (3), 2154–2164.
- (125) Tamm, L. K.; McConnell, H. M. Supported Phospholipid Bilayers. *Biophys. J.* **1985**, *47* (1), 105–113.
- (126) Knoll, W. Calorimetric Investigations of Lipid Phase Transitions. I. The Width of Transition. *Thermochim. Acta* **1984**, *77*, 35–47.
- (127) Leonenko, Z. V; Finot, E.; Ma, H.; Dahms, T. E. S.; Cramb, D. T. Investigation of Temperature-Induced Phase Transitions in DOPC and DPPC Phospholipid Bilayers Using Temperature-Controlled Scanning Force Microscopy. *Biophys. J.* **2004**, *86* (June), 3783–3793.
- (128) Biltonen, R. L.; Lichtenberg, D. The Use of Differential Scanning Calorimetry as a Tool to Characterize Liposome Preparations. *Chem. Phys. Lipids* **1993**, *64*, 129–142.
- (129) Carnini, A.; Phillips, H. a; Shamrakov, L. G.; Cramb, D. T. Revisiting Lipid – General Anesthetic Interactions (II): Halothane Location and Changes in Lipid Bilayer Microenvironment Monitored by Fluorescence. *Can. J. Chem.* **2004**, *82* (ii), 1139–1149.
- (130) Xie, A. F.; Yamada, R.; Gewirth, A. a; Granick, S. Materials Science of the Gel to Fluid Phase Transition in a Supported Phospholipid Bilayer. *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *89*, 246103.

- (131) Tokumasu, F.; Jin, A. J.; Feigenson, G. W.; Dvorak, J. a. Atomic Force Microscopy of Nanometric Liposome Adsorption and Nanoscopic Membrane Domain Formation. *Ultramicroscopy* **2003**, *97*, 217–227.
- (132) Enders, O.; Ngezahayo, a; Wiechmann, M.; Leisten, F.; Kolb, H. Structural Calorimetry of Main Transition of Supported DMPC Bilayers by Temperature-Controlled AFM. *Biophys. J.* **2004**, *87* (4), 2522–2531.
- (133) Garcia-Manyes, S.; Oncins, G.; Sanz, F. Effect of Temperature on the Nanomechanics of Lipid Bilayers Studied by Force Spectroscopy. *Biophys. J.* **2005**, *89* (6), 4261–4274.
- (134) Naumann, C.; Brumm, T.; Bayerl, T. M. Phase Transition Behavior of Single Phosphatidylcholine Bilayers on a Solid Spherical Support Studied by DSC, NMR and FT-IR. *Biophys. J.* **1992**, *63* (5), 1314–1319.
- (135) Yang, J.; Appleyard, J. The Main Phase Transition of Mica-Supported Phosphatidylcholine Membranes. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 8097–8100.
- (136) Yarrow, F.; Kuipers, B. W. M. AFM Study of the Thermotropic Behaviour of Supported DPPC Bilayers with and without the Model Peptide WALP23. *Chem. Phys. Lipids* **2011**, *164* (1), 9–15.
- (137) Marsh, D. *Handbook of Lipid Bilayers*; CRC Press: Boca Raton, FL, **1990**.
- (138) Lingwood, D.; Simons, K. Lipid Rafts As a Membrane-Organizing Principle. *Science (80-.)*. **2009**, *327* (5961), 46–50.
- (139) Mellman, I.; Nelson, W. J. Coordinated Protein Sorting, Targeting and Distribution in Polarized Cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2008**, *9* (11), 833–845.
- (140) Stöckl, M.; Nikolaus, J.; Herrmann, A. Visualization of Lipid Domain-Specific Protein Sorting in Giant Unilamellar Vesicles. In *Liposomes: Methods and Protocols, Volume 2: Biological Membrane Models*; Weissig, V., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, **2010**; pp 115–126.
- (141) Hanzal-Bayer, M. F.; Hancock, J. F. Lipid Rafts and Membrane Traffic. *FEBS Lett.* **2007**, *581* (11), 2098–2104.
- (142) Dart, C. Lipid Microdomains and the Regulation of Ion Channel Function. *J. Physiol.* **2010**, *588* (Pt 17), 3169–3178.
- (143) Simons, K.; Toomre, D. Lipid Rafts and Signal Transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2000**, *1* (1), 31–39.
- (144) Quest, A. F. G.; Gutierrez-Pajares, J. L.; Torres, V. A. Caveolin-1: An Ambiguous Partner in Cell Signalling and Cancer. *J. Cell. Mol. Med.* **2008**, *12* (4), 1130–1150.
- (145) McConnell, H. M.; Tamm, L. K.; Weis, R. M. Periodic Structures in Lipid Monolayer Phase Transitions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1984**, *81* (May), 3249–3253.
- (146) Karttunen, M.; Haataja, M. P.; Saily, M.; Vattulainen, I.; Holopainen, J. M. Lipid Domain Morphologies in Phosphatidylcholine-Ceramide Monolayers. *Langmuir* **2009**, *25* (8), 4595–4600.
- (147) Härtel, S.; Fanani, M. L.; Maggio, B. Shape Transitions and Lattice Structuring of Ceramide-

- Enriched Domains Generated by Sphingomyelinase in Lipid Monolayers. *Biophys. J.* **2005**, *88* (1), 287–304.
- (148) Heberle, F. A.; Petruzielo, R. S.; Pan, J.; Drazba, P.; Kucerka, N.; Standaert, R. F.; Feigenson, G. W.; Katsaras, J. Bilayer Thickness Mismatch Controls Domain Size in Model Membranes. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (18), 6853–6859.
- (149) Holopainen, J. M.; Brockman, H. L.; Brown, R. E.; Kinnunen, P. K. Interfacial Interactions of Ceramide with Dimyristoylphosphatidylcholine: Impact of the N-Acyl Chain. *Biophys. J.* **2001**, *80* (2), 765–775.
- (150) Mercado, F. V.; Maggio, B.; Wilke, N. Phase Diagram of Mixed Monolayers of Stearic Acid and Dimyristoylphosphatidylcholine. Effect of the Acid Ionization. *Chem. Phys. Lipids* **2011**, *164* (5), 386–392.
- (151) Aroti, A.; Leontidis, E.; Maltseva, E.; Brezesinski, G. Effects of Hofmeister Anions on DPPC Langmuir Monolayers at the Air-Water Interface. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108* (39), 15238–15245.
- (152) Longo, M. L.; Blanchette, C. D. Imaging Cerebroside-Rich Domains for Phase and Shape Characterization in Binary and Ternary Mixtures. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2010**, *1798* (7), 1357–1367.
- (153) McKiernan, a E.; Ratto, T. V.; Longo, M. L. Domain Growth, Shapes, and Topology in Cationic Lipid Bilayers on Mica by Fluorescence and Atomic Force Microscopy. *Biophys. J.* **2000**, *79* (November 1999), 2605–2615.
- (154) Fanani, M. L.; De Tullio, L.; Hartel, S.; Jara, J.; Maggio, B. Sphingomyelinase-Induced Domain Shape Relaxation Driven by out-of-Equilibrium Changes of Composition. *Biophys. J.* **2009**, *96* (1), 67–76.
- (155) Krüger, P.; Lösche, M. Molecular Chirality and Domain Shapes in Lipid Monolayers on Aqueous Surfaces. *Phys. Rev. E. Stat. Phys. Plasmas. Fluids. Relat. Interdiscip. Topics* **2000**, *62* (5 Pt B), 7031–7043.
- (156) Fischer, T. M.; Mathias, L. Pattern Formation in Langmuir Monolayers Due to Long-Range Electrostatic Interactions. **2004**, *394*, 383–394.
- (157) Seul, M.; Andelman, D. Domain Shapes and Patterns: The Phenomenology of Modulated Phases. *Science* **1995**, *267* (5197), 476–483.
- (158) Andelman, D. Modulated Phases in Amphiphilic Monolayers at the Water/Air Interface. *MRS Proc.* **1989**, *177*, 337–344.
- (159) Liu, J.; Qi, S.; Groves, J. T.; Chakraborty, A. K. Phase Segregation on Different Length Scales in a Model Cell Membrane System. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109* (42), 19960–19969.
- (160) Konyakhina, T. M.; Goh, S. L.; Amazon, J.; Heberle, F. A.; Wu, J.; Feigenson, G. W. Control of a Nanoscopic-to-Macroscopic Transition: Modulated Phases in Four-Component DSPC/DOPC/POPC/Chol Giant Unilamellar Vesicles. *Biophys. J.* **2011**, *101* (2), L8–L10.
- (161) Amazon, J. J.; Goh, S. L.; Feigenson, G. W. Competition between Line Tension and Curvature Stabilizes Modulated Phase Patterns on the Surface of Giant Unilamellar Vesicles: A Simulation Study. *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.* **2013**, *87* (2), 1–10.

- (162) McConnell, H. M.; Radhakrishnan, A. Condensed Complexes of Cholesterol and Phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2003**, *1610* (2), 159–173.
- (163) Rozovsky, S.; Kaizuka, Y.; Groves, J. T. Formation and Spatio-Temporal Evolution of Periodic Structures in Lipid Bilayers. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (1), 36–37.
- (164) Semrau, S.; Idema, T.; Schmidt, T.; Storm, C. Membrane-Mediated Interactions Measured Using Membrane Domains. *Biophys. J.* **2009**, *96* (12), 4906–4915.
- (165) Ursell, T. S.; Klug, W. S.; Phillips, R. Morphology and Interaction between Lipid Domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106* (32), 13301–13306.
- (166) Mangiarotti, A.; Wilke, N. Electrostatic Interactions at the Microscale Modulate Dynamics and Distribution of Lipids in Bilayers. *Soft Matter* **2016**.
- (167) Hughes, B. D.; Pailthorpe, B. A.; White, L. R. The Translational and Rotational Drag on a Cylinder Moving in a Membrane. *J. Fluid Mech.* **1981**, *110*, 349–372.
- (168) Rufeil-Fiori, E.; Wilke, N.; Banchio, A. J. Dipolar Interactions between Domains in Lipid Monolayers at the Air-Water Interface. *Soft Matter* **2016**, *12* (21), 4769–4777.
- (169) Belloni, L. Colloidal Interactions. *J. Phys. Condens. Matter* **2000**, *12* (46), R549–R587.
- (170) Frolov, V. A. J.; Chizmadzhev, Y. A.; Cohen, F. S.; Zimmerberg, J. “Entropic Traps” in the Kinetics of Phase Separation in Multicomponent Membranes Stabilize Nanodomains. *Biophys. J.* **2006**, *91* (1), 189–205.
- (171) Kuzmin, P. I.; Akimov, S. A.; Chizmadzhev, Y. A.; Zimmerberg, J.; Cohen, F. S. Line Tension and Interaction Energies of Membrane Rafts Calculated from Lipid Splay and Tilt. *Biophys. J.* **2005**, *88* (2), 1120–1133.
- (172) Keller, S.; McConnell, H. Stripe Phases in Lipid Monolayers near a Miscibility Critical Point. *Phys. Rev. Lett.* **1999**, *82* (7), 1602–1605.
- (173) Andelman, D.; Broçhard, F.; Joanny, J. Phase Transitions in Langmuir Monolayers of Polar Molecules. *J. Chem. Phys.* **1987**, *86* (6).
- (174) Travasset, A. Effect of Dipolar Moments in Domain Sizes of Lipid Bilayers and Monolayers. *J. Chem. Phys.* **2006**, *125* (8), 0–12.
- (175) Bernchou, U.; Ipsen, J. H.; Simonsen, A. C. Growth of Solid Domains in Model Membranes: Quantitative Image Analysis Reveals a Strong Correlation between Domain Shape and Spatial Position. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 7170–7177.
- (176) Cámara, C. I.; Wilke, N. Interaction of Dextran Derivatives with Lipid Monolayers and the Consequential Modulation of the Film Properties. *Chem. Phys. Lipids* **2017**, *204*, 34–42.
- (177) Mulheran, P. A.; Robbie, D. A. Theory of the Island and Capture Zone Size. **2000**, 617.
- (178) Xu, X.; Bittman, R.; Duportail, G.; Heissler, D.; Vilcheze, C.; London, E. Effect of the Structure of Natural Sterols and Sphingolipids on the Formation of Ordered Sphingolipid/sterol Domains (Rafts). Comparison of Cholesterol to Plant, Fungal, and Disease-Associated Sterols and Comparison of Sphingomyelin, Cerebrosides, and Cer. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (36), 33540–

- 33546.
- (179) Lingwood, D.; Simons, K. Lipid Rafts As a Membrane- Organizing Principle. **2010**, No. January, 46–51.
- (180) Pearson, A.; Flood Page, S. R.; Jorgenson, T. L.; Fischer, W. W.; Higgins, M. B. Novel Hopanoid Cyclases from the Environment. *Environ. Microbiol.* **2007**, *9* (9), 2175–2188.
- (181) Rohmer, M.; Bouvier-Nave, P.; Ourisson, G. Distribution of Hopanoid Triterpenes in Prokaryotes. *Microbiology* **1984**, *130* (5), 1137–1150.
- (182) Rohmer, M.; Bouvier, P.; Ourisson, G. Molecular Evolution of Biomembranes: Structural Equivalents and Phylogenetic Precursors of Sterols. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1979**, *76* (2), 847–851.
- (183) Wendt, K. U.; Poralla, K.; Schulz, G. E. Structure and Function of a Squalene Cyclase. *Science* (80- .). **1997**, *277* (5333), 1811 LP-1815.
- (184) Ourisson, G.; Neurochimie, C. De; Pascal, B.; Rohmer, M.; Nationale, E.; Chimie, S. De; Werner, A.; I, I. B.; Tiibingen, U.; Morgenstelle, A. Der. PROI (ARYOTIC HOPANOIDS AND OTHER POL YTERPENOID STEROL SUR : ROGATES Republic of Germany. **1987**.
- (185) Saenz, J. P.; Sezgin, E.; Schwille, P.; Simons, K. Functional Convergence of Hopanoids and Sterols in Membrane Ordering. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109* (35), 14236–14240.
- (186) Sáenz, J. P.; Grosser, D.; Bradley, A. S.; Lagny, T. J.; Lavrynenko, O.; Broda, M.; Simons, K. Hopanoids as Functional Analogues of Cholesterol in Bacterial Membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, *112* (38), 11971–11976.
- (187) Hodzic, A.; Rappolt, M.; Amenitsch, H.; Laggner, P.; Pabst, G. Differential Modulation of Membrane Structure and Fluctuations by Plant Sterols and Cholesterol. *Biophys. J.* **2008**, *94* (10), 3935–3944.
- (188) Halling, K. K.; Slotte, J. P. Membrane Properties of Plant Sterols in Phospholipid Bilayers as Determined by Differential Scanning Calorimetry, Resonance Energy Transfer and Detergent-Induced Solubilization. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1664*, 161–171.
- (189) Urbina, J. A.; Pekerar, S.; Le, H.; Patterson, J.; Montez, B.; Oldfield, E. Molecular Order and Dynamics of Phosphatidylcholine Bilayer Membranes in the Presence of Cholesterol, Ergosterol and Lanosterol: A Comparative Study Using ²H-, ¹³C- and ³¹P-NMR Spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1995**, *1238* (2), 163–176.
- (190) Stottrup, B. L.; Keller, S. Phase Behavior of Lipid Monolayers Containing DPPC and Cholesterol Analogs. *Biophys. J.* **2006**, *90* (9), 3176–3183.
- (191) Beattie, M. E.; Veatch, S. L.; Stottrup, B. L.; Keller, S. L. Sterol Structure Determines Miscibility versus Melting Transitions in Lipid Vesicles. *Biophys. J.* **2005**, *89* (3), 1760–1768.
- (192) Toulmay, A.; Prinz, W. A. Direct Imaging Reveals Stable, Micrometer-Scale Lipid Domains That Segregate Proteins in Live Cells. *J. Cell Biol.* **2013**, *202* (1), 35–44.
- (193) Ale, E. C.; Maggio, B.; Fanani, M. L. Ordered-Disordered Domain Coexistence in Ternary Lipid Monolayers Activates Sphingomyelinase by Clearing Ceramide from the Active Phase. *Biochim.*

- Biophys. Acta - Biomembr.* **2012**, 1818 (11), 2767–2776.
- (194) Vollhardt, D. Brewster Angle Microscopy: A Preferential Method for Mesoscopic Characterization of Monolayers at the Air/water Interface. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2014**, 19 (3), 183–197.
- (195) de Almeida, R. F. M.; Joly, E. Crystallization around Solid-like Nanosized Docks Can Explain the Specificity, Diversity, and Stability of Membrane Microdomains. *Front. Plant Sci.* **2014**, 5 (March), 72.
- (196) Radhakrishnan, A.; McConnell, H. M. Critical Points in Charged Membranes Containing Cholesterol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, 99 (21), 13391–13396.
- (197) Zulueta Díaz, Y. D. L. M.; Mottola, M.; Vico, R. V.; Wilke, N.; Fanani, M. L. The Rheological Properties of Lipid Monolayers Modulate the Incorporation of L -Ascorbic Acid Alkyl Esters. *Langmuir* **2016**, 32 (2), 587–595.
- (198) Larsen, J.; Hatzakis, N. S.; Stamou, D. Observation of Inhomogeneity in the Lipid Composition of Individual Nanoscale Liposomes. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 10685–10687.
- (199) Mann, E. K.; Hénon, S.; Langevin, D.; Meunier, J.; Léger, L. Hydrodynamics of Domain Relaxation in a Polymer Monolayer. *Phys. Rev. E* **1995**, 51 (6), 5708–5720.
- (200) Zou, L. Hydrodynamics and Line Tension of Langmuir Films at the Air-Water Interface, Kent State University, **2007**.
- (201) Lauger, J.; Robertson, C. R.; Frank, C. W.; Fuller, G. G. Deformation and Relaxation Processes of Mono- and Bilayer Domains of Liquid Crystalline Langmuir Films on Water. *Langmuir* **1996**, 12 (23), 5630–5635.
- (202) Bischof, A. A.; Wilke, N. Molecular Determinants for the Line Tension of Coexisting Liquid Phases in Monolayers. *Chem. Phys. Lipids* **2012**, 165 (7), 737–744.

Listado de publicaciones realizadas:

- 1) “*Stiffness of lipid monolayers with phase coexistence*”. B. Caruso, **A. Mangiarotti**, N. Wilke. *Langmuir*, (2013) 29, 10807-10816.
- 2) “*Phase coexistence in films composed of DLPC and DPPC: a comparison between different model membrane systems*”. **A. Mangiarotti**, B. Caruso, N. Wilke. *BBA Biomembranes* (2014) 1838, 1823–1831.
- 3) “*Searching for line active molecules on biphasic lipid monolayers*”. A. A. Bischof, **A. Mangiarotti**, N. Wilke. *Soft Matter* (2015) 1838, 1823–1831.
- 4) “*Energetics of the phase transition in free-standing vs. supported lipid membranes*”. **A. Mangiarotti**, N. Wilke. *Journal of Physical Chemistry B* (2015) 119, 8718–8724.
- 5) “*Electrostatic interactions at the microscale modulate dynamics and distribution of lipids in bilayers*” **A. Mangiarotti**, N. Wilke. *Soft Matter* (2017), 13, 686-694.
- 6) “*Sizes of lipid domains: what do we know from artificial lipid membranes? What are the possible shared features with membrane rafts in cells?*” C. Rosetti, **A. Mangiarotti**, N. Wilke. *BBA - Biomembranes* (2017) 1859, 789-802.

*“Hay en todo, algo inexplorado,
porque estamos habituados a no servirnos de nuestros ojos,
sino con el recuerdo de lo que se ha pensado antes que nosotros
sobre aquello que contemplamos.”*

Guy de Maupassant

