



UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS EXACTAS Y

NATURALES

DEPARTAMENTO DE FÍSICA

**VESÍCULAS DE FOSFOLÍPIDO: PREPARACIÓN,
PROPIEDADES MECÁNICAS Y APLICACIONES**

Tesis

Que para obtener el grado de:

LICENCIADO EN FÍSICA

Presenta:

Natanael Robles Duarte

Hermosillo, Sonora. Diciembre 2005

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



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

Dedicatorias:

Dedico el siguiente trabajo de tesis a mi madre, que con su apoyo y dedicación logro soportar a pie firme durante el transcurso de mi carrera, que me apoyo en todo momento y que siempre estuvo al pendiente de mí. Gracias mama, te debo todo lo que soy. Padre y hermanos, también estoy muy agradecido con ustedes, ya que supieron creer en mí desde el principio y me dieron la fortaleza necesaria para poder terminar con esta etapa de mi vida. Esa fuerza de espíritu que me brindaron me sirvió mucho para enfocarme en terminar mis estudios.

A mis abuelas, Josefina y Maria del Rosario, que desde el cielo me resguardan, y a todos los que de una manera u otra hicieron posible este trabajo.

Gracias...

Agradecimientos:

A todo el personal docente del departamento de física, ya que gracias a su dedicación y empeño me guiaron, de una manera u otra, por un buen camino. Especialmente a la profesora Laura E. Neomans por su apoyo en los momentos más difíciles de mi carrera, también, me siento muy agradecido con el profesor Amir Maldonado, que durante toda la carrera fungió como mi tutor y estuvo apoyándome en toda mi preparación, y fue convirtiéndose en un buen amigo, y hoy que cumplimos esta meta, me siento satisfecho de contar con su amistad. A los profesores Heriberto Acuña, Rogelio Gámez, que fueron mis sinodales... Carlos Calcano, María Elena Tejeda, Angelina Uribe, Gracias a todos por su apoyo y su amistad.

A mis amigos...Emmanuel, Sergio, Maribel, Iván, Gracias por todas las aventuras que pasamos juntos, esos días serán inolvidables, gracias porque sin su apoyo y su calor de amigos quizá hubiera tomado un rumbo muy diferente. Jorge Pérez, Germán Sandoval, Renato Valarde, también gracias por su amistad. Lups, thanks for all, welcome back again.

A toda mi familia, tíos, primos, sobrina, cuñados, también gracias

A l Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado durante la realización de este trabajo de tesis, por medio del proyecto "Materiales Biomoleculares" . De esta manera agradezco a todos los que me apoyaron de una manera u otra.

Índice

Introducción	1
Capítulo 1.- Membranas Biológicas	3
1.1.- Introducción	3
1.2.- Componentes principales de las membranas celulares	4
1.2.1.-Proteínas	4
1.2.2.- Carbohidratos	6
1.2.3.- Fosfolípidos	7
1.2.3.1.- Nomenclatura de los fosfolípidos	10
1.2.3.2.-Parámetros estructurales de fosfolípidos	12
1.3.- Propiedades físicas de las membranas	15
1.3.1.-Impermeabilidad	15
1.3.2.- Elasticidad	16
1.3.3.- Resistencia	16
Capítulo 2.- Vesículas y métodos de formación	18
2.1. Nomenclatura	18
2.2. Parámetro de empaquetamiento	20
2.3. Tamaño y forma de las vesículas	24
2.4. Fabricación de vesículas por rehidratación	25
2.5. Fabricación de vesículas por Extrusión	27
2.5.1. Relación entre la presión y el radio de las vesículas	29
2.5.2. Tensión de lisis	30
2.6.- Método de sonicación para fabricar vesículas	32
2.7.- Fabricación de vesículas gigantes mediante electroformación	34
2.7.1.- Mecanismo de formación	37

Capítulo 3.- Propiedades mecánicas de la membrana	39
3.1.- Técnica de micropipetas	39
3.2.- Módulos principales de deformación	42
3.2.1.- Modulo de expansión	42
3.2.2.- Módulo de curvatura	44
3.3.- Relaciones mecánicas del sistema	44
3.3.1.- Expansión relativa	47
3.3.2.- Tensión en la membrana	49
Capítulo 4.- Aplicaciones de liposomas y micropipetas	51
4.1.- Aplicación de liposomas en ciencia	51
4.2.- Aplicación de liposomas en medicina	52
4.3.- Aplicación de liposomas en cosméticos	54
4.4.- Liposomas en bioingeniería	55
4.5.- Aplicación de liposomas en la industria de la comida	55
4.7.- Resultados analizados con micropipetas	56
Conclusiones	62
Apéndice	64
Bibliografía	68

INTRODUCCIÓN

Los liposomas, o vesículas son cuerpos esféricos por una o varias bicapas de fosfolípido, los cuales son considerados como los componentes principales de las membranas celulares. Estos agregados se forman debido a su comportamiento anfifílico, esto es, poseen una parte lipofílica que no le gusta estar en presencia de medios acuosos y una parte lipofóbica que puede sentirse cómoda en presencia del agua.

Es importante realizar estudios acerca de estas vesículas de fosfolípido debido a que sirven como modelos de membranas biológicas por lo que su estudio es importante para la comprensión de los procesos que lleva a cabo el organismo a nivel celular. Pero no solamente en biología tiene aplicaciones, si no que su rango está siendo expandido gracias a la nanotecnología.

Existe una variedad de tamaños relativamente amplia entre este tipo de agregados, van desde los 15 nm hasta los 200 μ m, lo que hace que también varíen las propiedades físicas de las membranas.

La técnica de manipulación mediante el uso de micropipetas permite estudiar con detalle los cambios que sufre la membrana ante un esfuerzo generado por la succión de las vesículas dentro de las micropipetas, con una diferencia de presión. Basándonos principalmente en el estudio del módulo de expansión de área y el módulo de curvatura. El estudio de las propiedades mecánicas de las vesículas de lípido juega un papel importante en el sentido de tratar de comprender la estabilidad de estas, así como de sus propiedades físicas como permeabilidad y deformación que son importantes en relación al estudio de las membranas celulares. También, estas propiedades son de gran importancia ya que el campo de los liposomas no está centralizado en biología, si no, más bien este es un subconjunto del ramo de las aplicaciones, ya que se aplican en farmacología, cosmetología, inclusive en bioingeniería, como transportadores de sustancias, o reservorios.

En este trabajo de tesis se presenta una recopilación bibliográfica de lo necesario

para llevar a cabo la formación de liposomas y el estudio de sus propiedades mecánicas mediante el uso de micropipetas. En el primer capítulo analizamos la composición de las membranas celulares, la función de sus constituyentes primarios, pero centrándonos en las características de los fosfolípidos, en este apartado veremos su estructura, nomenclatura y denotamos una clasificación de los lípidos basada en su comportamiento en soluciones acuosas. También observamos algunos parámetros estructurales de los fosfolípidos más usuales en las membranas, que también están relacionados con el cambio en las propiedades de las vesículas.

En el segundo capítulo nos familiarizaremos con las vesículas de fosfolípidos, que como puntualizamos anteriormente, están siendo utilizadas en distintas ramas de la ciencia, comentando la teoría de formación de vesículas, así como sus principales métodos de formación, ventajas, desventajas entre ellos y nomenclatura de las vesículas en base a su tamaño y número de capas de la cual esta formada, es decir, su lamellaridad.

Para el capítulo tres estudiamos las propiedades mecánicas de vesículas mediante el uso de micropipetas, deduciendo y recopilando las relaciones más importantes que existen en las publicaciones entre el cambio relativo en el área de las vesículas y la diferencia de presión en la pipeta, trabajando especialmente con vesículas gigantes ya que son bien observables con microscopio óptico. Las propiedades que estudiamos son en particular dos módulos relacionados con la deformación de la membrana, el primero es el módulo de expansión que nos permite observar la respuesta del cambio en el área con respecto a la tensión generada por la succión, y el segundo es el módulo de curvatura, que es el que está representado por el esfuerzo a curvarse una bicapa. Estas propiedades son las que definen bajo que circunstancias nos pueden servir las vesículas de fosfolípido.

El capítulo cuatro es de aplicaciones, tanto de los liposomas como de las micropipetas, aquí nos podemos dar cuenta del avance que existe hasta el momento, en cuestión de aplicación de liposomas y la relación que existe entre sus propiedades y la respuesta ante los estímulos externos. Vemos también algunos resultados publicados y los discutimos en base a lo contenido en este material

CAPÍTULO 1

Membranas Biológicas

Las membranas biológicas son esenciales para la vida, debido a sus funciones a nivel celular. Una membrana encierra a la célula, definiendo sus fronteras, y le sirve también como interfase con el ambiente extracelular. Dentro de la célula, la membrana de los organelos actúa de interfase con el citoplasma y lleva a cabo funciones específicas para cada organelo.

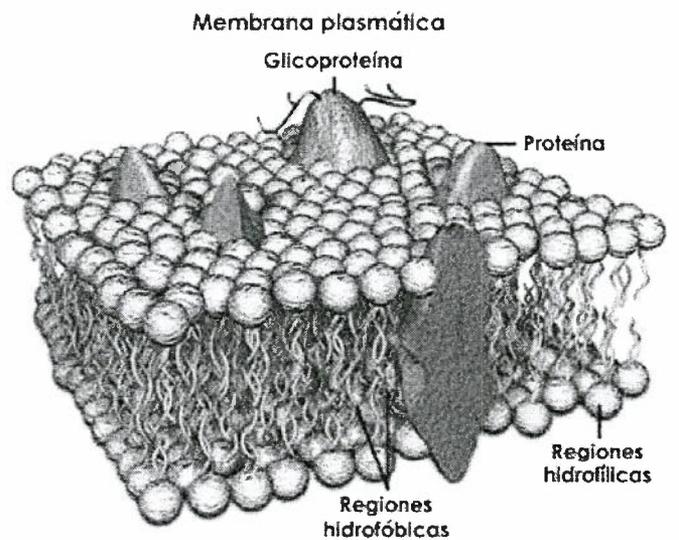
- Sirve de barrera, conteniendo las partes internas de la célula unidas, y permite que los nutrientes pasen a través de ella, manteniendo fuera a las sustancias dañinas
- La membrana sirve para retransmitir la información de los alrededores de la célula hacia el interior de ella
- Provee de espacios en los cuales las enzimas pueden acomodarse
- Sirve como convertidor de energía, ya que permite que la energía luminosa y química pueda ser convertida en formas más usuales de energía
- Sirve también para reconocer y diferenciar otros tipos de células, e interactuar de distintas maneras con ellas, como por ejemplo protegiendo y atacando a bacterias dañinas que se pueden encontrar en el cuerpo humano

A pesar de la variedad de procesos en los que se ven involucradas, las membranas biológicas tienen una estructura común: son una película muy delgada de moléculas de lípidos, proteínas y otros compuestos en menor proporción, unidas en su mayoría mediante interacciones no covalentes. En 1972^(Singer S.J. 1972), Singer y Nicolson propusieron un modelo el cual consiste de un mosaico fluido, (Fig. 1.1), el cual actualmente es aceptado como base para entender las membranas celulares. Dicho modelo se compone esencialmente de una bicapa de fosfolípidos, con proteínas,

colesterol, y otros tipos de moléculas insertadas entre ellos. Estas componentes están restringidas al plano de la bicapa pero pueden moverse lateralmente. La composición química es diferente a ambos lados de la membrana, por lo cual, la membrana usualmente es asimétrica.

En las secciones siguientes describiremos las componentes principales de las membranas biológicas. Sin embargo, dado que en esta tesis nos enfocaremos a vesículas de fosfolípido, dedicaremos una sección más amplia a estos últimos. En ella comentaremos las propiedades químicas, físicas, y características de aquellos lípidos que se encuentran más comúnmente en la membrana.

Fig. 1.1. Modelo de mosaico fluido para una membrana biológica, en el cual los componentes de la membrana se encuentran incrustados en una bicapa de lípidos.



<http://linux.ajusco.upn.mx/fotosintesis/membrana.html>

1.2.- Componentes principales de las membranas celulares

En este apartado analizaremos la composición de las membranas celulares. Los lípidos, en especial los fosfolípidos, son los componentes que se encuentran en mayor proporción en la membrana, pero también podemos encontrar proteínas, carbohidratos y colesterol entre otras. Veamos un poco de su función.

1.2.1.- Proteínas

Las proteínas son tal vez las estructuras más complicadas que hay en las células. Están formadas por la unión de 20 unidades diferentes, los aminoácidos, los cuales están ligados químicamente mediante enlaces tipo peptídico¹. A partir de estas unidades se forman moléculas más grandes, unidas siempre de acuerdo a un orden definido para cada proteína específica.

Puesto que cada aminoácido tiene características especiales de tamaño, número de cargas, hidrofobicidad, etc., al formarse cadenas, se produce una organización especial que se traduce en estructuras de gran complejidad, cuyo papel dentro de las células es realizar funciones complicadas. Por ejemplo, si en una proteína existen aminoácidos de características hidrofóbicas, estos tenderán a unirse evitando el contacto con el agua. Dicha proteína podrá ser soluble en agua si los aminoácidos hidrofóbicos quedan en el centro de la molécula rodeados de aminoácidos polares. En cambio, si los aminoácidos hidrofóbicos quedan en la superficie externa de la proteína, esta tendrá una tendencia a incorporarse a las membranas, dejando expuesta al agua solamente su parte polar.

Las proteínas son en realidad lo que podríamos considerar como el motor de la célula, y las que se encargan de la energía necesaria para dar lugar al funcionamiento de las células. Por ejemplo, cada transformación química de una sustancia en otra es llevada a cabo por una proteína, llamada enzima, y hay miles diferentes de ellas.

Una de las membranas que tiene mayor contenido de proteínas es la mitocondrial, y es explicable, pues este organelo celular tiene a su cargo entre otras cosas, la función de proveer de energía al resto de la célula.

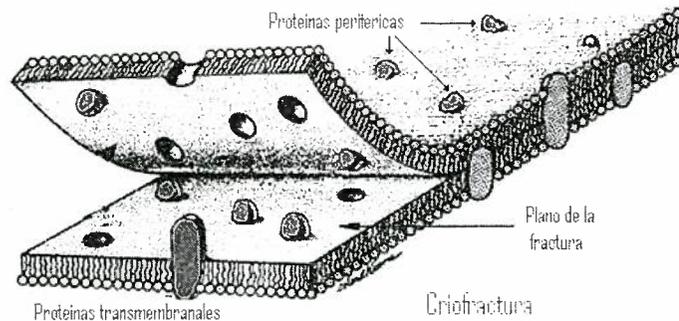
Las proteínas alcanzan un grado de complejidad suficiente para realizar tan delicadas funciones como, por ejemplo, introducir glucosa a la célula aún en contra de un gradiente de concentraciones. Esta tarea es compleja puesto que la glucosa se encuentra en el exterior celular disuelta junto con otras miles de sustancias diferentes.

Hay dos tipos de moléculas de proteínas membranales (Fig. 1.2), las cuales se clasifican en periféricas e intrínsecas, las proteínas periféricas son las proteínas que se encuentran en las afueras de la membrana, pero unida a ella mediante enlaces iónicos, en

¹ El enlace peptídico es un enlace covalente y se establece entre el grupo carboxilo (-COOH) de un aminoácido y el grupo amino (-NH₂) del aminoácido contiguo inmediato, con el consiguiente desprendimiento de una molécula de agua.

cambio, las proteínas intrínsecas se encuentran alojadas en el ambiente hidrofóbico de la bicapa y algunas de ellas se extienden a lo ancho de la membrana incluso atravesando la bicapa, estas proteínas son conocidas también como transmembranales. Las proteínas incrustadas en la bicapa de lípido llevan a cabo la mayor parte de las otras funciones de la membrana, es decir, transporte, síntesis de ATP, etc.

Fig. 1.2. Diagrama de una bicapa seccionada por el método de criofractura. Podemos observar las proteínas periféricas y las transmembranales.



http://cellbio.utmb.edu/cellbio/membrane_intro.htm

1.2.2.- Carbohidratos

Son numerosas las membranas celulares que contienen carbohidratos (azúcares). En la mayoría de los casos se trata de cadenas de azúcares simples o sus derivados, llamados polisacáridos, que llegan a ser extremadamente complejos. Se encuentran en la parte exterior de la bicapa de lípido, formando macromoléculas donde la mitad es un carbohidrato y la otra mitad un fosfolípido o una proteína. Estas macromoléculas reciben el nombre de glicolípidos y glicoproteínas respectivamente. Una de las funciones importantes de estas sustancias parece consistir en servir de elementos de reconocimiento por parte de otras células u organismos. Tal vez el caso más conocido sea el de los polisacáridos de los glóbulos rojos, que por la presencia en sus membranas dan lugar a los grupos sanguíneos. La cuestión es muy simple, hay dos polisacáridos, el A y el B; la presencia de ninguno, uno o ambos puede dar lugar a los tipos sanguíneos O, A, B, y AB, con las consecuencias que ello tiene para las transfusiones sanguíneas. Al administrar un tipo de glóbulos rojos diferente a los que tiene un individuo, su organismo los desconoce y los destruye, y el mecanismo de reconocimiento tiene como

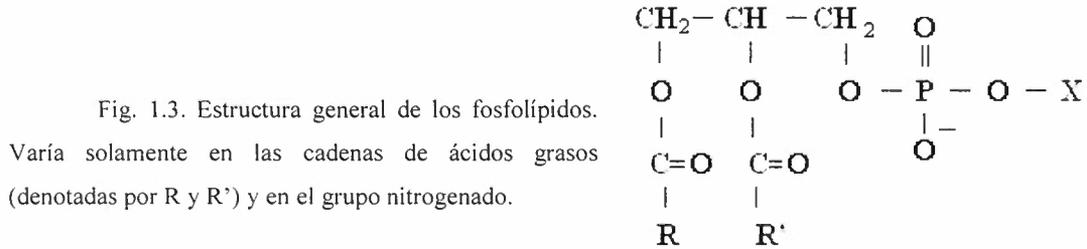
base la presencia de estos polisacáridos.

1.2.3.- Fosfolípidos

Desde 1925, los investigadores Gorter y Grendel^(Gorter 1925) propusieron que las membranas de las células están formadas por una capa doble de fosfolípidos. La propuesta resultó de un experimento muy sencillo: estos autores aislaron los fosfolípidos de una cantidad conocida de glóbulos rojos (eritrocitos) y los colocaron sobre la superficie del agua, de manera que formaran una capa de una sola molécula de grueso, y midieron el área. Tomando en cuenta la forma y las dimensiones de los glóbulos rojos, calcularon el área de la superficie de los eritrocitos de donde provenían los fosfolípidos y encontraron que el área de los fosfolípidos dispersos era el doble de la calculada para las células. Con este sencillo experimento y una serie de consideraciones teóricas, basadas en las propiedades de las moléculas, estos investigadores propusieron entonces que los fosfolípidos deberían estar formando una capa doble en la membrana, además, con las porciones apolares opuestas y alejadas del agua,

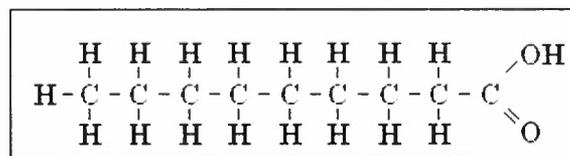
Los fosfolípidos son los componentes primarios de las membranas celulares. Forman parte de la bicapa de lípido. Estas moléculas están formadas por diglicéridos que son unidos por medio de un enlace covalente a un grupo fosfato mediante una unión tipo éster. El diglicérido está compuesto por un glicerol que es esterificado a dos ácidos grasos. Además del grupo fosfato, unido a este se encuentra una base. La mayoría de los fosfolípidos pertenece a los fosfoglicéridos, debido a la molécula de glicerol que contienen. Los grupos polares pueden variar desde los fosfolípidos zwitterionicos como la fosfatidilcolina, hasta moléculas cargadas, como el fosfatidilinositol, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol y el ácido fosfático. La representación general de los fosfolípidos la podemos observar en la figura 1.3. En esta figura distinguimos como R y R' como las cadenas de hidrocarburos, mientras que X representa la base nitrogenada, o la parte principal del fosfolípido. Una de las características de los fosfolípidos es que son anfipáticos, esto es: una parte de su estructura es soluble en agua (hidrofílica), mientras que la otra, es soluble en lípidos (hidrofóbica). En la parte hidrofílica (la cabeza del fosfolípido) se encuentra una base nitrogenada. Esta característica estructural hace

posible que los fosfolípidos participen en el intercambio de sustancias entre un sistema acuoso y un sistema lipídico, separando y aislando a los dos sistemas, a la vez que los mantiene juntos.



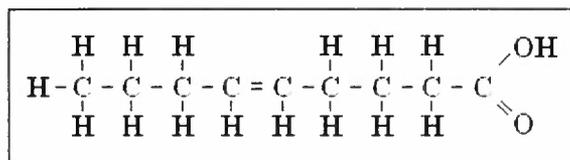
Los ácidos grasos, los cuales forman parte de la cola hidrofóbica, son compuestos por un grupo carboxílico (COOH, COO⁻) unido a una cadena de hidrocarbonos. Su estructura general es escrita como COOH-(CH₂)_n-CH₃, donde la n varía generalmente de 14-24 átomos de carbono, dependiendo del fosfolípido.

Los ácidos grasos, en los fosfolípidos son generalmente dos cadenas, usualmente una de ellas es saturada y la otra es no saturada, también se pueden encontrar fosfolípidos con ambas colas saturadas como es el caso de dipalmitoil lecitina. Esto determina en gran medida su solubilidad en agua^(Hicks 1999). Una cadena saturada es aquella en la cual cada átomo de carbono de la cadena de hidrocarburo es enlazado a dos átomos de carbono y dos átomos de hidrógeno, por medio de enlaces sencillos y obtiene el máximo de posibles hidrógenos que pueda albergar. En cambio, las cadenas de ácidos grasos no saturadas son aquellas en las cuales no se alberga el máximo número de hidrógenos, en cambio uno o varios átomos de carbono se unen entre si mediante enlaces dobles (Fig. 1.4).



Cadenas saturadas

Fig. 1.4. Ejemplos de cadenas de hidrocarbonos. Podemos observar que las cadenas saturadas contienen el máximo de átomos de hidrogeno,



Cadenas no saturadas

mientras que las cadenas no saturadas no.

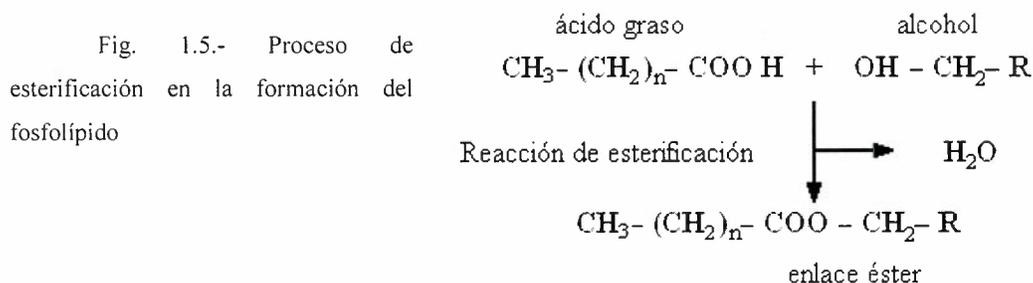
Ácido graso	Estructura	Abreviación taquigráfica ²
SATURADOS		
Ácido Butírico	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_2 \text{COOH}$	4:0
Ácido Caproico	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_4 \text{COOH}$	6:0
Ácido Cáprico	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_8 \text{COOH}$	10:0
Ácido Láurico	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_{10} \text{COOH}$	12:0
Ácido Mirístico	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_{12} \text{COOH}$	14:0
Ácido Palmítico	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_{14} \text{COOH}$	16:0
Ácido Esteárico	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_{16} \text{COOH}$	18:0
NO SATURADOS		
Ácido Palmitoleico	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_5 \text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7 \text{COOH}$	16:1n-7
Ácido Oleico	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_7 \text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7 \text{COOH}$	18:1n-9
Ácido Linoleico	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_4 \text{CH}=\text{CHCH}_2 \text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7 \text{COOH}$	18:2n-6
Ácido Linolénico	$\text{CH}_3 \text{CH}_2 \text{CH}=\text{CHCH}_2 \text{CH}=\text{CH}_2 \text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7 \text{COOH}$	18:3n-3
Ácido Araquidónico	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_4 \text{CH}=\text{CHCH}_2 \text{CH}=\text{CHCH}_2 \text{CH}=\text{CHCH}_2 \text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3 \text{COOH}$	20:4n-6
Ácido Eicosapentaenoico	$\text{CH}_3 \text{CH}_2 \text{CH}=\text{CHCH}_2 \text{CH}=\text{CHCH}_2 \text{CH}=\text{CHCH}_2 \text{CH}=\text{CHCH}_2 \text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3 \text{COOH}$	20:5n-3
Ácido Docosahexaenoico	$\text{CH}_3 \text{CH}_2 \text{CH}=\text{CHCH}_2 \text{CH}=\text{CHCH}_2 \text{CH}=\text{CHCH}_2 \text{CH}=\text{CHCH}_2 \text{CH}=\text{CHCH}_2 \text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_2 \text{COOH}$	22:6n-3

² Número de átomos de carbono (C): número de dobles ligaduras y posición de la primer doble ligadura, contada a partir del grupo metilo (CH_3) terminal, en el ácido graso

Tabla 1.1. Ejemplos de ácidos grasos comunes en los fosfolípidos.

En la tabla 1.1 se mencionan algunos ejemplos de ácidos grasos saturados y no saturados.

La molécula de glicerol se une al ácido graso mediante uniones tipo éster, al igual que al grupo fosfato, de manera que cada grupo hidroxilo (OH) del radical del glicerol se sustituye por la cadena -COO del ácido graso. El H sobrante del grupo carboxilo se une al grupo OH para formar una molécula de agua (Fig. 5).



1.2.3.1.- Nomenclatura de los fosfolípidos

Generalmente, la nomenclatura de los fosfolípidos se divide en dos partes, la primera de ellas describe la parte hidrofóbica, y la segunda nos da información de la parte polar.

La mayoría de los fosfolípidos que forman las estructuras biológicas están compuestos de dos combinaciones de sus partes apolares, una de ellas es la molécula de glicerol, que se une a una o dos cadenas de cadenas de ácidos grasos. Virtualmente en todos los fosfolípidos biológicos el grupo principal de los fosfolípidos (cabeza polar) es unido a la molécula de glicerol en la tercera posición.

El nombre sistemático que se les da a las cadenas hidrocarbonadas es derivado del ácido graso del cual proviene, sin nombrar ácido y la terminación cambia de -ico, -leico a -oil (Ej. Ácido palmítico por palmitoil).

Los mas sencillos de nombrar son los que tienen sus dos cadenas iguales, los lípidos de este tipo son llamados formalmente derivados fosfodiéster de 1,2-diacil-sn-

glicero-3-fosfato donde el grupo acil es llamado como describimos anteriormente.

Debido al hecho que los fosfolípido más importantes, en cuanto a su presencia en membranas biológicas, son los que tienen un grupo de átomos que generalmente tienen nitrógeno, vamos a dirigir más nuestra atención hacia ellos, especialmente son 3 fosfolípidos:

- Fosfatidilcolina (PC)
- Fosfatidilserina (PS)
- Fosfatidiletanolamina (PE)

La estructura química de estos fosfolípidos aparece en la figura 1.6.

La fosfatidilcolina es uno de los fosfolípidos más abundantes en los tejidos humanos. Contiene usualmente ácido palmítico o esteárico en la posición sn-1 y un ácido graso no saturado de 18 carbonos, oleico, linoleico y linolénico en el carbono sn-2. En el tejido nervioso, se halla en concentraciones relativamente elevadas en el cerebro.

La fosfatidiletanolamina es uno de los fosfoglicéridos más frecuentes en las membranas. Contiene ácido palmítico y oleico en sn-1, pero en sn-2 contiene uno de los ácidos grasos de cadena más larga, es decir, araquidónico. La fosfatidiletanolamina predomina en la capa lipídica interna de la membrana.

Como los dos fosfolípidos anteriores, la fosfatidilserina es un fosfolípido que es un componente estructural de membranas biológicas de plantas, de animales y de otras formas de la vida. La fosfatidilserina se obtuvo primero del aislamiento en los lípidos del cerebro llamados cefalinas. Las cefalinas más importantes son fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina.

La fosfatidilserina es una molécula anfifílica porque se compone de las colas lipofílicas del ácido graso en un lado y el grupo principal hidrofílico que contiene el fosfato y la serina en el otro lado de la molécula. La fosfatidilserina está situada en las capas internas de membranas biológicas, haciendo frente al citoplasma con su grupo principal polar. Químicamente es conocido como 1,2-diacyl-sn-glycerol-(3)-L-fosfoserina.

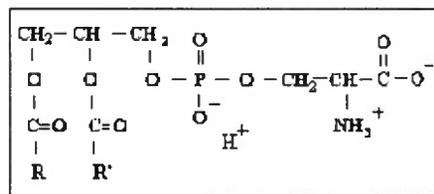
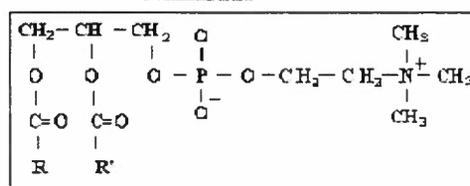
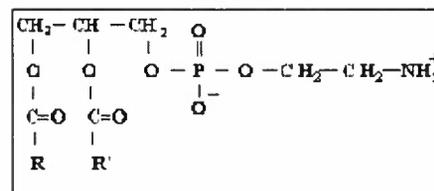


Fig. 1.6.- Representación química de los fosfolípidos más importantes. En el primer cuadro vemos la estructura química de la fosfatidilserina, cuya carga es neutra, al igual que la fosfatidiletanolamina, representada en el tercer cuadro. En medio tenemos a la fosfatidilcolina.

Fosfatidilserina



Fosfatidilcolina



Fosfatidiletanolamina

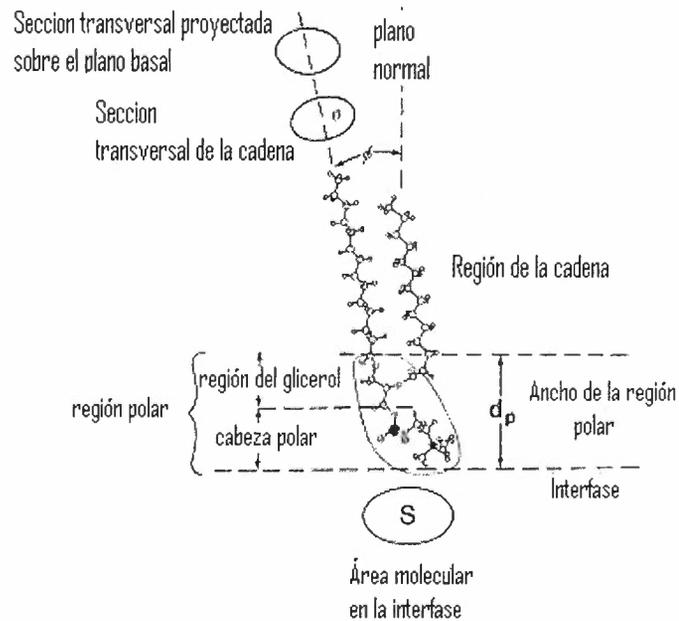
1.2.3.2.-Parámetros estructurales de fosfolípidos

Los parámetros geométricos de los componentes de los fosfolípidos están representados por el tamaño de sus componentes y vamos a considerar una la configuración de DMPC, en estado cristalino hidratado³ orientado hacia el plano de la bicapa, como se muestra en la figura 1.7, para ilustrarlos. En el diagrama se puede identificar el área transversal media de la cadena perpendicular al eje de la cadena σ , el ángulo de la cadena con respecto al plano de la bicapa Θ , el grosor de la región polar d_p , el ancho de la región del grupo principal, y el área superficial sobre el plano de la bicapa que ocupa la molécula S . De los datos de la celda unitaria de Bravais^(Cevc 1993) podemos calcular el ancho de la bicapa, el volumen molecular, el volumen de la región

³ Se considera con hidratos de carbono con dos moléculas de agua

polar, la subcelda o el modo de empaquetamiento de las cadenas de hidrocarburos y el volumen medio por grupo $-\text{CH}_2-$ a lo largo de la cadena. La gran diversidad de estructuras y configuraciones de los diferentes fosfolípidos es ilustrado por las configuraciones moleculares de cuatro fosfolípidos conocidos mostrados en la figura 1.8. Los datos derivados de estas estructuras son tabulados en la tabla 1.2

Fig. 1.7. Notación estructural. La estructura de 1,2-dimyristoil-3-fosfatidilcolina cristalizada nos sirve de referencia para definir varias distancias, ángulos y regiones de los fosfolípidos.



(Cevc 1993)

Características como el ancho de la bicapa varían mucho. Esta variación es parcialmente atribuida a la pequeña diferencia que existe entre la longitud de las cadenas. Pero la razón principal de la variación del grosor de la bicapa es que el ángulo de inclinación de las colas varía desde casi nada en 1,2-dilauroil-DL-glicerol-3-fosfatidiletanolamina (DLPE) hasta una inclinación extrema de 57.5° en 1-palmitoil-DL-glicerol-3-fosfatidiletanolamina (LPPE) (Figura 1.8). Entonces, la bicapa es considerablemente más delgada en LPPE debido al alto grado de inclinación de la cadena de hidrocarburos.

El ángulo de inclinación de la molécula es reflejado también en S , el área sobre el plano de la bicapa, así que S incrementa conforme la desviación incrementa. Es actualmente el grupo de la cabeza polar el que determina el ángulo de inclinación.

Veremos mas adelante estados específicos y como se dan los cambios de estado con las modificaciones en el grupo polar en fosfolípidos específicos.

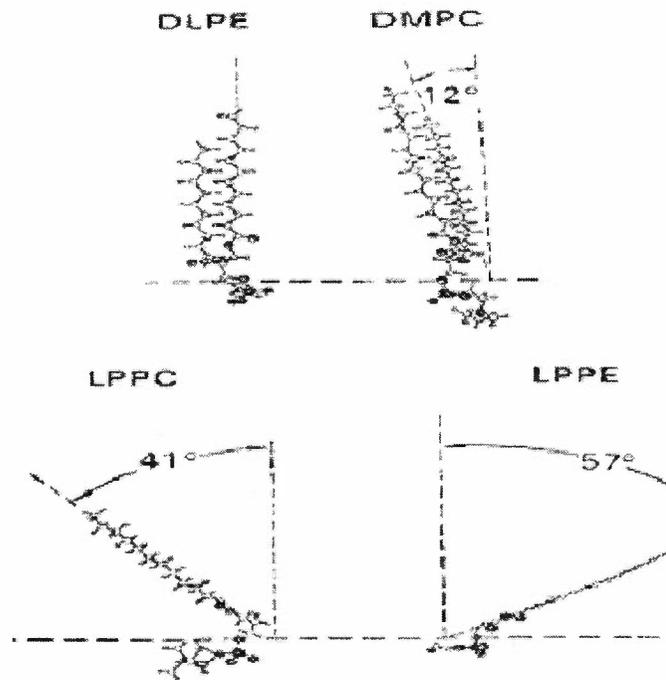
Parámetros	Unidades	DLPE)HAc ^(Hauser 1981)	DMPC)2H ₂ O ^(Hauser 1981)	LPPC)2H ₂ O ^(Hauser 1981)	LPPE ^(Pascher 1981)
Sistema cristal		Monoclónico ⁴	Monoclónico	Monoclónico	Monoclónico
Celda unitaria a	(Å)	47.7	8.72	24.82	7.66
b	(Å)	7.77	8.92	9.53	9.08
c	(Å)	9.95	55.4	10.94	37.08
β	(°)	92.00	97.40	99.70	90.2
Grosor de la bicapa	(Å)	47.7	54.9	24.5 ^c	37.1
Grosor de la región polar (d _p)	(Å)	7.9	10.4	7.3	7.1
S, área molecular proyectada en el plano	(Å ²)	38.6	38.9	52.1	34.8
Área molecular por cadena proyectada en el plano	(Å ²)	19.3	19.5	26	34.8
Volumen de la región polar (V _{pol})	(Å ³)	304.9	404.6	380.33	247.1
V _{pol} -Vol _{solvente} ^d	(Å ³)	209.9	344.8	350.4	--
Subcelda					
Sección transversal de la cadena de hidrocarbonos	(Å ²)	19.3	19.0	19.7	18.7
Volumen medio/-CH ₂ -	(Å ³)	24.3	23.9	24.8	23.6
Inclinación de la cadena de hidrocarbonos	(°)	0	12	41	57.5

Tabla 1.2. Parametros estructurales de ,2-dilauroil-DL-glicerol-3-fosfatidiletanolamina (DLPE), 1,2-dimyristoil-DL-glicerol-3-fosfatidilcolina (DMPC), 1-palmitoil-DL-

⁴ La celda monoclinica es aquella en la cual los tres bordes pueden ser diferentes, dos de sus ángulos deben medir 90° y el otro varia.

glicerol-3-fosfatidilcolina (LPPC), 1-palmitoil-DL-glicerol-3-fosfatidiletanolamina (LPPE).

Fig. 1.8. Ángulo que forman los fosfolípidos con referencia al plano de la bicapa. Como podemos observar, pesa más el ángulo de inclinación que la longitud de las colas en el grosor de las membranas.



1.3.- Propiedades físicas de las membranas

Es importante conocer las propiedades de las membranas ya que estas se encuentran íntimamente ligadas a las funciones de la célula, por ejemplo, nuestra primera propiedad analizada, la impermeabilidad. Hay solventes tóxicos que lesionan las membranas, como el tolueno, que vuelve más permeable a la célula, dañándola.

1.3.1.- Permeabilidad

Dado que la más importante de las funciones de las membranas es tal vez la de formar una capa protectora alrededor de las células, la impermeabilidad es una de las principales propiedades de las bicapas. No sólo ha sido posible demostrar la

impermeabilidad, sino también algo que debía esperarse a partir de la composición grasosa o lipídica de la membrana. A finales de la década de los cuarentas, Collander, haciendo investigaciones, encontró que las sustancias pueden pasar a través de la membrana en muy estrecha relación con su solubilidad en las grasas. Esto es precisamente lo que debía esperarse si la membrana equivale en cierta forma a una capa de grasa que rodea a la célula.

Sin embargo, en el mismo experimento realizado por Collander fue muy claro que el agua difiere del comportamiento general de otras sustancias. Siendo poco soluble en aceite, entra con gran velocidad a las células. Este comportamiento no tiene una explicación clara hasta ahora, pero sí es un hecho que tanto las membranas biológicas como las bicapas artificiales tienen una gran permeabilidad al agua. En los organismos animales, por ejemplo, no hay membrana celular alguna que el agua no pueda atravesar; inclusive hay algunas que además tienen mecanismos para aumentar esta permeabilidad; como en el caso, por ejemplo, de la piel de la rana o de algunas células de riñón en las cuales los movimientos del agua además se pueden regular por medio de hormonas.

1.3.2.- Elasticidad

Otra propiedad importante de las membranas es la elasticidad. Las células y otras estructuras membranosas contenidas en ellas deben ser elásticas. Por numerosas razones sería inconveniente tener membranas rígidas, que impedirían el movimiento o al acomodo de las células.

La elasticidad de la membrana parece deberse a una razón muy simple: sucede que las cadenas de átomos de carbono de los fosfolípidos que se encuentran en el centro de la doble capa se comportan como las moléculas de cadenas libres, y tienen una gran movilidad, como si se encontraran en estado líquido. Esto, por otra parte, se puede demostrar por medio de diversos procedimientos; además, es posible ver que esta "fluidez" o estado físico de las membranas, como para cualquier sistema, depende de la temperatura.

1.3.3.- Resistencia

Aunque pudiera pensarse que las membranas celulares son frágiles, éste no es el caso; su resistencia es considerable; esto es cierto inclusive para las membranas

formadas artificialmente por un sólo tipo de fosfolípido, como la fosfatidiletanolamina. Pero hay otros elementos que pueden agregar resistencia a la bicapa, como pueden ser, por ejemplo, las fuerzas de atracción entre las cabezas de los fosfolípidos con diferente signo en su carga. Tal es el caso de las moléculas de lecitina, que tienen una carga positiva y una negativa en la porción polar y se atraen entre sí. Aún en el caso de moléculas con un solo signo en la carga, como la fosfatidiletanolamina, que lógicamente presentan repulsión de sus cabezas, cuando se encuentran en presencia de Ca^{2+} o de Mg^{2+} , estos cationes, no sólo neutralizan las cargas, sino que forman además puentes entre ellas, transformando la condición desfavorable para aumentar la atracción y con ello la resistencia de la membrana.

CAPÍTULO 2

Vesículas y métodos de formación

Las vesículas, o liposomas se pueden definir como una o varias bicapas de fosfolípido encerrando un volumen de algún solvente. Esto hace que una de sus aplicaciones principales sea como agentes encapsuladores de sustancias químicas (medicamentos, alimentos, cosméticos)⁵. Sin embargo, también se utilizan como modelos para estudiar membranas celulares. Hay una variedad de métodos para la fabricación de ese tipo de agregados. Cada método arroja un resultado diferente (tamaño, forma, distribución de agregados) debido al diferente protocolo experimental. En este capítulo describiremos las vesículas de fosfolípido, así como los diferentes métodos de fabricación.

2.1. Nomenclatura

De acuerdo a IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), los términos vesícula y liposoma se pueden usar como sinónimos. Con relación a las propiedades morfológicas de las vesículas se utiliza frecuentemente un conjunto de letras que diferencian los distintos tamaños que pueden alcanzar estas, (S) para distinguir las vesículas pequeñas, (L) para las grandes y, (G) para las gigantes. También, las vesículas se distinguen entre si por el número de bicapas que contienen, esto es, una vesícula que es encerrada por una bicapa es llamada unilamelar [U], tenemos también las vesículas oligolamelares, [OL] que se componen de aproximadamente 5 bicapas de lípidos y, por último, tenemos las vesículas multilamelares [ML] que varían de 5 a 20 bicapas de lípido. Con este conjunto de letras, usamos las abreviaciones más comunes de

⁵ Vease capítulo 4

los nombres de las vesículas, como SUV, LUV, LOV, GOV. En el caso cuando las vesículas encapsuladas no son concéntricas, se definen los liposomas multivesiculares (MVL).

Tipo de Vesícula	Abreviación	Tamaño del diámetro	Número de bicapas de lípido
Vesículas pequeñas unilamelares	SUV	30 - 100nm	1
Vesículas unilamelares grandes	LUG	100 – 200nm	1
Vesículas multilamelares	MLV	> 0.5µm	5-20
Vesículas oligolamelares	OLV	0.1 – 1µm	~5
Vesículas gigantes unilamelares	GUV	50 – 200µm	1

Tabla 2.1. Nomenclatura base para distinguir cada tipo de vesículas

Un parámetro importante a considerar al formarse las vesículas es la rigidez de la bicapa, la cual puede estar en fase gel o fase fluida (líquido-cristalina)^(ver Apéndice). Incrementando la temperatura, la fase gel se funde y se convierte en una fase líquida. Esto ocurre a una temperatura fija para cada fosfolípido, conocida como temperatura de transición (T_c). La temperatura de transición en una bicapa depende de:

1. Longitud de las cadenas de carbonos.
2. grado de saturación.
3. Grupo polar.

La temperatura de transición puede variar entre los 15°C para la fosfatidilcolina obtenida a partir de huevo hasta arriba de los 50°C para DSPC completamente saturada.

2.2. Parámetro de empaquetamiento

La formación de vesículas puede verse como un proceso que se descompone en dos partes, una es en la cual, los fosfolípidos forman una bicapa, y como segundo paso, esta se cierra para formar una vesícula.

Las moléculas anfifílicas pueden asociarse en estructuras que pueden transformarse al variar su medio ambiente como por ejemplo, la concentración electrolítica o el pH.

El área óptima de la cabeza polar en una bicapa es de gran importancia, ya que se toma en consideración para calcular la forma geométrica que pueden formar los lípidos en solución. Analicemos a grandes rasgos las fuerzas que están envueltas en la agregación de moléculas anfifílicas: cuando tenemos una monocapa de fosfolípidos en una superficie acuosa, este, a causa de las fuerzas hidrofóbicas tendera a unirse con los otros fosfolípidos en la superficie del agua, la tensión superficial tambien las mantiene unida y las repulsiones hidrofílicas, iónicas o estéricas de las cabezas polares que tiende a separarlas y a mantenerlas en contacto con el agua, en el caso de fosfolípidos neutros.

Afortunadamente, no necesitamos conocer explícitamente estas contribuciones por separado. Esto es porque se espera que dependan de manera inversamente proporcional al área ocupada por la cabeza de la molécula $\sim \frac{C}{a}$

Así, la energía libre interfacial total por molécula en una estructura de agregación puede escribirse, a primer orden, como

$$\mu_N^0 = \gamma a + \frac{C}{a} \quad (2.1)$$

donde C es una constante. El mínimo en la energía es dado por $\frac{\partial \mu_N^0}{\partial a} = 0$, esto es:

$$\frac{\partial \mu_N^0}{\partial a} = \gamma - \frac{C}{a^2}$$

igualando a cero y despejando para a_0

$$a_0 = \sqrt{\frac{C}{\lambda}}$$

donde a_0 es el área óptima por molécula, sustituyendo en (2.1) obtenemos el valor de la energía en el punto mínimo

$$\mu_N^0 \left(\sqrt{K/\gamma} \right) = 2\gamma a_0 \quad (2.2)$$

así, podemos describir la energía interfacial por molécula como

$$\mu_N^0 = 2\gamma a_0 + \frac{\gamma}{a} (a - a_0)^2 \quad (2.3)$$

donde nos hemos deshecho de la constante K , así que la energía libre queda ahora en términos de parámetros medibles.

Podemos observar que el concepto de fuerzas opuestas nos brinda un área óptima para la cual la energía por molécula de lípido es un mínimo. (Fig. 2.1)

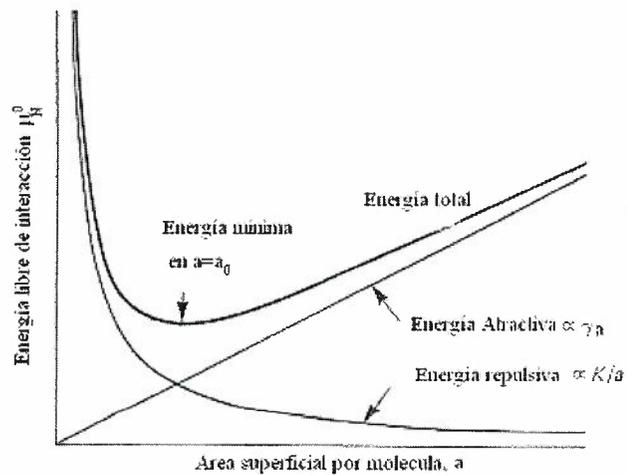


Fig. 2.1. Área óptima a_0 para la cual las fuerzas opuestas se encuentran en balance

La ecuación (2.3) contiene las contribuciones principales de las interacciones entre lípidos. Esta ecuación nos muestra que, a primer orden, la energía de interacción entre lípidos tiene un mínimo en cierta área a_0 , alrededor del cual la energía varía oscilatoriamente.

Ya que establecimos la ecuación que describe la interacción entre moléculas anfifílicas cuando se agregan, un siguiente paso es tratar de entender el tipo de estructuras que se favorecen al alterar las diferentes variables. La geometría, o las

propiedades de empaquetamiento dependen de otros parámetros importantes como el volumen v de las cadenas de hidrocarburos y la longitud máxima efectiva que pueden obtener las cadenas hidrofóbicas, la cual se llama longitud de cadena crítica l_c . Esta longitud nos dice el límite al cual una cadena puede estirarse.

Se ha demostrado^(Markus Antonietti 2003) que para lípidos de área optima a_0 , volumen de los hidrocarburos v , y longitud de cadena crítica l_c , el valor del parámetro de empaquetamiento, v/a_0l_c , nos ayuda a visualizar geoméricamente el tipo de estructuras que se formaran. Para que los agregados formen micelas $v/a_0l_c < \frac{1}{2}$, bicapas o vesículas $\frac{1}{2} < v/a_0l_c < 1$, o estructuras inversas $v/a_0l_c > 1$, como vemos en la tabla 2.2.

La teoría basada en el parámetro de empaquetamiento considera la organización de moléculas anfifílicas mediante consideraciones meramente geométricas. Es una primera aproximación para describir la formación de los diferentes agregados.

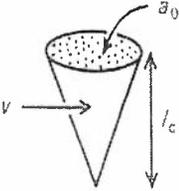
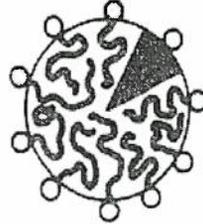
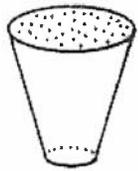
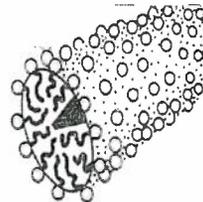
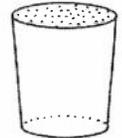
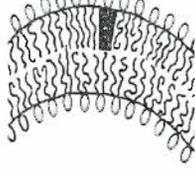
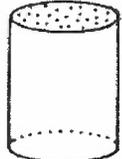
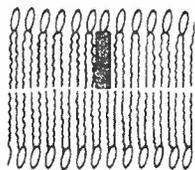
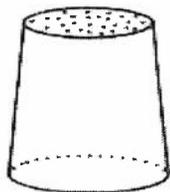
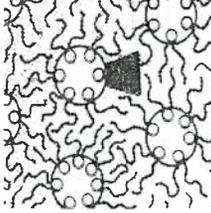
Lípido	Parámetro De empaquetamiento	Forma del empaquetamiento crítico	Estructuras formadas
Lípidos con una cadena (surfactantes) con área a_0 grandes	$< 1/3$	Cono 	Micelas esféricas 
Lípidos con una cadena con área a_0 pequeñas	$1/3 - 1/2$	Cono truncado 	Micelas cilíndricas 
Lípidos con dos cadenas con área a_0 grandes, con cadenas fluidas	$1/2 - 1$	Cono truncado 	
Lípidos con dos cadenas con área a_0 pequeña, lípidos aniónicos en sales, cadenas en fase sólida	~ 1	Cilindro 	Bicapas planas 
Lípidos con dos cadenas con área a_0 pequeña, lípidos no iónicos en sales, cadenas en fase sólida	> 1	Cono truncado invertido 	Micelas inversas 

Tabla 2.2. Relación del parámetro de empaquetamiento y la forma de agregados que pueden formar

2.3. Tamaño y forma de las vesículas

La formación de las vesículas se basa en el hecho de que las moléculas de lípidos, con un parámetro de empaquetamiento alrededor de la unidad, prefieren un arreglo en forma de bicapas (dos monocapas paralelas encontradas). Esta tendencia da lugar a la formación de micelas en forma de discos. Las vesículas cerradas, se forman cuando los agregados en forma de discos son muy grandes (Fig. 2.2). La vesícula se cierra como si fuera una bolsa y eventualmente da lugar a un agregado esférico.

Como para un área de bicapa dada, el radio del disco precursor del liposoma es dos veces el radio de la vesícula final, el balance de la tensión lineal (γ) y la energía de flexión definen un radio mínimo para las vesículas^(Markus Antonietti 2003):

$$R_v = \frac{2\kappa}{\gamma} \quad (2.4)$$

donde κ es el modulo elástico de curvatura que se estudia en el siguiente capítulo y determina que tan flexible es la membrana. En otras palabras, las vesículas se forman fácilmente cuando el módulo de curvatura en la bicapa es bajo y la tensión superficial es alta. Los lípidos tienen una solubilidad molecular tan baja que la conformación y el tamaño no son un producto de los procesos de intercambio y de equilibrio de moléculas, sino que quedan gobernados por las condiciones de preparación.. Esto nos arroja diámetros de vesículas que se adaptan a los diferentes tipos de preparación como rehidratación, electroformación y disolución directa en agua, entre otros, como veremos adelante.

Hay muchos factores que influyen en la forma de las vesículas. Podemos mencionar: las interacciones electrostáticas, la concentración electrolítica, entre otras.

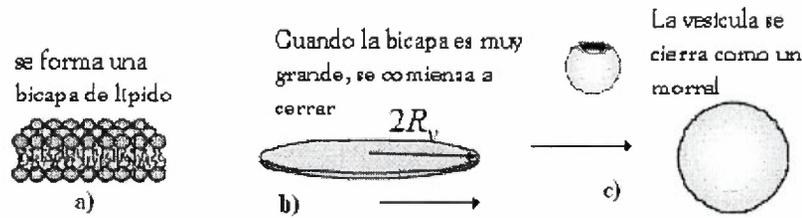


Fig. 2.2. Representación esquemática de la formación espontánea de vesículas. a) Primero se forma la capa de fosfolípido debido a la hidrofobicidad de sus colas, b) debido a la disminución de la tensión superficial, el disco se comienza a curvar y c) se cierra como una bolsa.

A partir de que Bangham, pionero de estas investigaciones, comenzó a fabricar vesículas mediante hidratación, donde disolvía fosfolípidos en una superficie sólida y le agregaba una solución acuosa a la muestra, muchos investigadores han utilizado este procedimiento para preparar liposomas. Pero ahora el problema radica en que mediante este tipo de formación de liposomas tienen una variedad de tipos de vesículas, predominantemente vesículas multilamelares (MLV), de una distribución de tamaños muy amplia (típicamente, de 0.2 a 20 μm) y en alguna variedad de lípidos el proceso es muy tardado, incluso algunas veces es prácticamente imposible. Para resolver estos problemas, han surgido modificaciones y procedimientos adicionales. Por ejemplo, perturbaciones mecánicas externas, como sonicación y extrusión a través de membranas policarbonadas nos ayudan para producir más rápidamente agregados más pequeños. Las vesículas que resultan de estos procedimientos son vesículas unilamelares pequeñas (SUV) con diámetros de alrededor de 30–50nm o vesículas unilamelares grandes (LUV) de 100–200nm en su diámetro.

A continuación describimos los métodos de fabricación de vesículas más usuales.

2.4. Fabricación de vesículas por rehidratación

Existe una clasificación para los lípidos dependiendo de su comportamiento en soluciones acuosas, los lípidos utilizados en el método de rehidratación pertenecen a la

clase II, esto es, son virtualmente insolubles en agua. De cualquier manera, debido al mesomorfismo liotrópico, estos lípidos bajo la interfase forman fases líquido cristalinas. El método original de Bangham et al. es todavía el procedimiento más simple para la formación de liposomas. Esta técnica produce liposomas hidratando películas de lípido depositadas con un solvente orgánico sobre un vidrio y disolviendo a temperaturas por encima de la temperatura de transición.

A concentraciones por encima de la concentración micelar crítica (cmc) se comienzan a formar los agregados en el volumen de agua. En esta sección veremos brevemente algunos de los factores que intervienen en las propiedades de fase de los fosfolípidos hidratados.

Los lípidos, como ya lo discutimos tienen una parte hidrófoba que generalmente está compuesta de cadenas acil, y una parte hidrófila que contiene derivados del ácido fosfórico. La baja solubilidad de las cadenas de ácidos grasos con el agua, combinado con los puentes de hidrógeno que forman las moléculas de agua, provee la “fuerza atractiva” que mantiene unidos a los lípidos polares en estructuras supramoleculares.

Existen una variedad tan amplia para la elaboración de liposomas mediante esta técnica que no existe realmente un protocolo establecido para el método de rehidratación, ya que cada experimentador sigue su propio protocolo, y este es muy variado, ya que depende de cada grupo de investigación y de los resultados que se desean. Algunos pasos son comunes en la literatura:

- Se prepara una solución con una concentración de fosfolípido en el intervalo de $0.2 - 1.6 \text{ mg/ml}$ en algún solvente orgánico
- Se coloca una pequeña gota de la muestra en un portaobjetos.
- Se deja secar en una campana de vacío el tiempo que se considere apropiado ($\sim 2 \text{ horas}$)
- Se coloca la muestra en el microscopio
- Se le agrega agua

La agitación que recibe la muestra es un parámetro que puede hacer variar las

características de los liposomas obtenidos. En algunos experimentos se coloca con mucho cuidado la muestra en el portaobjeto, mientras que en otros se agita la muestra. Estos y otros factores son los que dan la gran variedad de vesículas obtenidas por este método. También es muy importante la temperatura de transición; se debe trabajar por encima de ella para mejores resultados.

La desventaja principal de este método es que todavía no se pueden controlar, ni comprender teóricamente, todos los factores que nos llevan a la diversidad de vesículas obtenidas. Las muestras resultantes son generalmente polidispersas en tamaño y forma. Por este motivo, se han diseñado otras técnicas de fabricación de vesículas, con las cuales se puede controlar el tamaño y lamellaridad, como en el caso que describimos a continuación.

2.5. Fabricación de vesículas por Extrusión

Un método muy popular para la producción de vesículas es el de extrusión, donde las soluciones que contienen MLV son forzadas a pasar por unos poros muy pequeños aplicando presión (con un sistema de jeringas, por ejemplo). Este método produce una solución de vesículas monodispersas de un tamaño controlado.

Aunque el uso de la extrusión para formar vesículas unilamelares es muy común, el mecanismo mediante el cual las MLVs se convierten en vesículas pequeñas, de diámetros comparables con el tamaño del poro permanece sin ser comprendido completamente. El entender exactamente que pasa en el proceso nos daría un mejor control de las vesículas producidas y una amplia aplicación del método.

Varios estudios se han llevado a cabo para caracterizar las vesículas producidas mediante el método de extrusión. Algunos estudios han revelado que se requiere pasar la muestra varias veces para reducir el tamaño y la multilamellaridad de las vesículas extruidas, y que el tamaño final depende del tamaño del poro^(Hope 1985), como veremos

mas adelante.

La siguiente lista representa los pasos principales del protocolo^(www.avantilipids.com) que se sigue para la formación de vesículas unilamelares grandes mediante el proceso de extrusión (LUVET).

- Se prepara una mezcla de lípido secándola mediante evaporación al vacío
- Se coloca el soporte extrusor en un baño térmico y se espera a que alcance la temperatura adecuada (Aproximadamente 15 minutos)
- Se hidrata la mezcla de lípido utilizando un buffer⁶ apropiado para tiempos mayores a 30 minutos. La mezcla de lípidos debe conservarse arriba de la temperatura de transición del lípido durante la hidratación y la extrusión.
- Cuando la mezcla esta completamente hidratada, se vierte dentro de una de las microjeringas y cuidadosamente se coloca en un extremo del mini extrusor. Anteriormente a este paso es conveniente prelavarse el extrusor haciendo pasar buffer a través del mismo.
- Se Coloca la jeringa vacía en el otro extremo del mini extrusor, asegurándonos que la jeringa vacía este colocada en cero. La jeringa se llenará automáticamente cuando el lípido sea obligado a pasar a través de la membrana
- El extrusor se coloca en un baño térmico, dejando que la suspensión de líquido contenido en la jeringa se equilibre con la temperatura del baño (aproximadamente 5-10 min.)
- Se empuja cuidadosamente el émbolo de la jeringa llena hasta que la solución sea transferida totalmente a la otra jeringa. Después la solución se hace pasar en el sentido inverso y los pasos se repiten mínimo cuatro

⁶ En química, un buffer es una sustancia que hace que una reacción en la que interviene un ácido o una base se amortigüe o se produzca más rápidamente.

veces. En general, entre más veces pase la solución a través de la membrana, más homogénea se vuelve la muestra.

- En el proceso de extrusión, la suspensión de lípido comienza a hacerse clara hasta llegar a una solución lechosa un poco transparente. El color lechoso es debido a la dispersión de luz inducida por grandes partículas residuales que permanecen en la suspensión. Estas partículas pueden ser removidas mediante centrifugación para obtener una muestra clara de SUV.
- Después de la extrusión final, se remueve el mini extrusor del baño térmico, se remueve la jeringa llena del extrusor y se inyecta la solución en un vial limpio para su utilización en el experimento deseado. En todo el proceso, la preparación de vesículas debe mantenerse por encima de la temperatura de transición.

Entre las desventajas que tiene el método de extrusión es que no se puede llevar a cabo por abajo de la temperatura de transición de la fase gel-fluido, debido al decrecimiento en la fluidez de la membrana abajo de la temperatura de transición.

Por otra parte, el proceso de extrusión tiene una ventaja muy importante: el tamaño de las vesículas puede controlarse mediante la presión de extrusión y el diámetro de los poros de la membrana de extrusión.

2.5.1. Relación entre la presión y el radio de las vesículas.

La presión y la razón de flujo a través de los poros están relacionadas mediante la ley de Darcy^(Friskén 2003):

$$Q = \frac{\pi R_p^4 P}{8\eta L} \quad (2.5)$$

donde P es la diferencia de presión entre las extremos del poro y R_p y L son el radio y la longitud de los mismos. η es la viscosidad del fluido.

Veamos un modelo sencillo del comportamiento de la bicapa en un orificio, (Fig. 2.3 c)), este modelo se conoce como “crecimiento de burbujas” (“bubble blowing” en inglés).

La bicapa de lípido es empujada a través de un orificio circular y una burbuja se comienza a formar en el lado donde la presión es mas baja. Aquí se genera una fuerza F_ℓ debida a la tensión lineal^(Friskén 2003) y actúa sobre el cuello de la burbuja. Esta fuerza esta dada por:

$$F_\ell = 2\pi R_p \gamma \quad (2.6)$$

donde R_p es el radio del poro y γ es la tensión superficial. Los bordes que dan lugar a la tensión lineal aparecen debido a la presión aplicada. Esta presión a su vez da lugar a una fuerza

$$F_p = 4\pi R_v^2 P \quad (2.7)$$

donde R_v es el radio de la vesícula final. Cuando la tensión lineal inducida excede la tensión de lisis o de ruptura $\gamma = \gamma_\ell$, la vesícula se fragmenta y se separa de la vesícula original. Usando las ec. (2.6) y (2.7) podemos obtener una relación entre la presión aplicada y el radio de la vesícula final.

$$R_v \sim \sqrt{\frac{\gamma_\ell R_p}{2P}} \quad (2.8)$$

como podemos observar, este modelo no solo nos permite predecir la relación que existe entre ellos, sino que también nos dice que el radio vesicular depende de la tensión de lisis y del tamaño del poro.

2.5.2. Tensión de lisis

La tensión de lisis es la tensión que se requiere para la ruptura de una bicapa. Esta puede ser determinada midiendo la presión mínima que se requiere para la extrusión de soluciones de lípido a bajas concentraciones. Debajo de esta presión, la razón de flujo y el número de vesículas extrudidas tiende a cero. Esto es debido a que vesículas grandes tapan el poro de la membrana policarbonada, como se muestra en la

figura 1c). Para entrar en el poro, se debe reducir su volumen mediante lisis (ruptura). Cuando una vesícula de radio R_0 es jalada dentro de un poro de radio R_p , se induce una tensión lineal γ en la membrana. La vesícula revienta cuando la tensión lineal inducida es mayor que la lisis o tensión de ruptura de la bicapa.

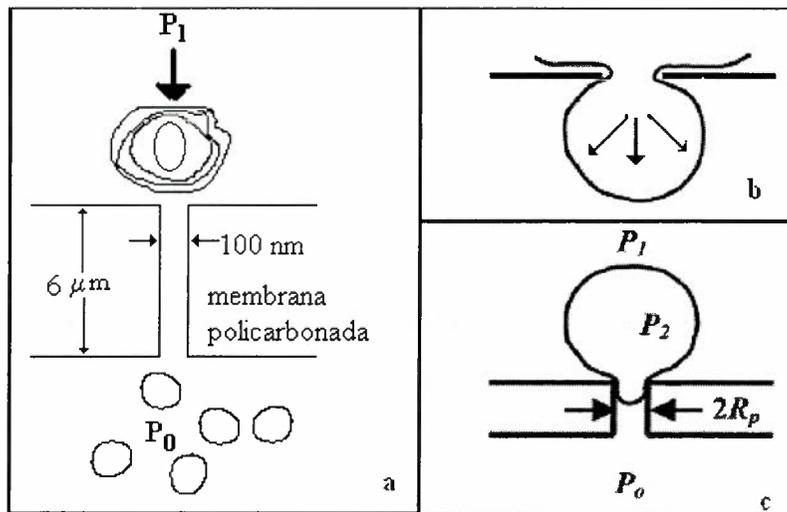


Fig. 2.3. (a) Diagrama esquemático del proceso de extrusión. MLV's son extruidas a través de membranas policarbonadas. (b) Diagrama esquemático bozquejando el modelo de inflar burbujas. (c) Diagrama esquemático de una vesícula a la entrada del poro. El fragmento de vesícula que es jalado dentro del poro tiene un radio igual al del radio del poro.

Una relación entre la diferencia de presión aplicada P , γ , R_p y R_0 puede ser derivada usando la ley de Laplace entre la diferencia de presión a través de una interfase curva y la tensión superficial de la interfase, asumiendo una tensión uniforme sobre toda la membrana^(Ipsen 2004)

$$P = 2\gamma \left(\frac{1}{R_p} - \frac{1}{R_0} \right) \quad (2.9)$$

Expresiones similares han sido derivadas para describir la aspiración de vesículas mediante micropipetas. Si la presión es muy baja, la tensión inducida es más pequeña que la tensión de lisis, y la vesícula no se rompe, por lo que el poro permanece bloqueado. La presión mínima P_{\min} para la extrusión de vesículas (cuando la razón de

flujo tiende a cero) puede ser asociada entonces con la tensión de lisis mediante la ec. (2.9). La tensión de lisis puede ser determinada si se conocen el radio del poro, la presión mínima y el radio de la vesícula preextrudida.

El método de extrusión permite obtener vesículas pequeñas de tamaño controlado. El siguiente método permite fabricar vesículas unilamelares de dimensiones muy pequeñas mucho más grandes que las conseguidas por extrusión o rehidratación.

2.6.- Método de sonicación para fabricar vesículas

Otro método para fabricar vesículas de tamaños pequeños a partir de una muestra rehidratada consiste en aplicar energía mecánica mediante ultrasonido a una suspensión de fosfolípido. De esta manera, las membranas vesiculares son agitadas para romperse y dar lugar a agregados de tamaños más pequeños. En el método de sonicación se consiguen vesículas de tamaños mucho menores que 50 nm, dependiendo de variables experimentales como el tipo de tensoactivo, el tiempo de sonicación y la concentración de electrolito.

Las ondas de ultrasonido son de naturaleza semejante a las del sonido convencional, pero con frecuencias más allá de nuestro límite de audición ($f > 20,000$ Hz). En los laboratorios se les usa para limpiar objetos puesto que las vibraciones son absorbidas por la suciedad, la cual es agitada, removida y puesta en suspensión en agua. En la industria se usa este método de limpieza para equipo frágil o para limpiar lugares inaccesibles de la pieza deseada.

La aplicación de ultrasonido a una muestra, somete a los agregados a agitación mecánica y efectos térmicos a la vez. Esto trae como consecuencia una reorganización de los agregados para obtener tamaños más pequeños.

En un experimento típico, la solución rehidratada de fosfolípidos se sumerge en un baño de ultrasonido de los utilizados en el laboratorio para limpiar material de vidrio. El tiempo de exposición es del orden de 10 a 30 segundos a temperatura ambiente.

Por citar un ejemplo, la aplicación de esta técnica a una suspensión de liposomas obtenidos por hidratación del tensoactivo SHBS (Sodium 4-(1'-heptylnonyl)benzenesulfonate) tuvo el efecto de convertir agregados irregulares y multilamelares de tamaños del orden de 50 nm, hasta agregados esféricos de diámetros del orden de 1 μm ^(Zasadzinski 1986). El tiempo de sonicación fue de 10 segundos. Experimentos de microscopía electrónica sugieren que los agregados obtenidos son unilamelares.

El mecanismo físico de los cambios producidos mediante sonicación está relacionado con el fenómeno de cavitación. Cuando una onda de ultrasonido se propaga en un líquido, este se comprime y se expande alternadamente. A partir de una cierta amplitud de las oscilaciones de presión, los cambios en la densidad del líquido pueden ser tan grandes que se formen espacios relativamente vacíos o “cavidades” en algunas partes del líquido. A este proceso se le conoce como cavitación. Cuando las cavidades se cierran, esto produce ondas de presión de amplitud mucho mayor que las oscilaciones ultrasónicas originales. Además de las enormes variaciones de presión, este fenómeno implica cambios grandes en la temperatura local del sistema.

Estos cambios en la presión y la temperatura locales hacen que los liposomas que tienen defectos estructurales en su superficie sean sometidos a esfuerzos u oscilaciones que tiene por efecto romper las membranas y formar agregados más pequeños.

Experimentalmente se ha observado que el radio mínimo de las vesículas obtenidas por sonicación es del orden de 3 a 5 veces el espesor de las membranas. Esto es, se pueden obtener agregados de diámetros tan pequeños como 15 nm.

En la literatura existen algunos trabajos que analizan el efecto de la sonicación sobre las vesículas fabricadas en diferentes sistemas. Por ejemplo, en el caso de la mezcla de dos tensoactivos (SDS-DDAB), se ha mostrado que, independientemente de la manera de fabricar una solución de vesículas, un tratamiento de sonicación de 1 minuto lleva al mismo estado final ^(Marquez 2000).

En un trabajo más reciente, Maulucci et al estudiaron por dispersión de luz el

efecto del tiempo de sonicación sobre la distribución de tamaños de vesículas de DMPC^(Giuseppe Maulucci 2005). Los resultados muestran que la distribución de tamaño de las vesículas se reduce con el tiempo de sonicación hasta llegar a un tamaño fijo para tiempos más grandes que un tiempo dado t_s . A tiempos más cortos, la energía total transferida por la sonicación no es suficiente para reducir las vesículas multilamelares a su tamaño óptimo. Si embargo, si el tiempo de sonicación es demasiado grande, las vesículas resultan dañadas. Por ello, los autores recomiendan encontrar el tiempo óptimo de sonicación de cada sistema.

2.7.- Fabricación de vesículas gigantes mediante electroformación

En las primeras aplicaciones de las vesículas, la propiedad más importante era su capacidad de encapsular productos químicos. Por esta razón se daba mucha importancia a la fabricación de agregados relativamente pequeños (SUVs y LUVs). Sin embargo, para investigaciones relacionadas con membranas celulares, estos agregados tienen una gran desventaja: su tamaño; tienen un diámetro muy pequeño comparado con las membranas celulares y poseen una curvatura más notoria que ellas, además que el empaquetamiento de los lípidos en la bicapa es también diferente, lo cual hace que las propiedades elásticas de la membrana sean diferentes. Otra desventaja consiste en el hecho de que, si bien es posible tener una suspensión uniforme de SUVs y LUVs en alguna solución de una sustancia activa de interés, no es posible exponer una parte de la vesícula a la sustancia activa, lo cual resulta de interés en muchos problemas donde se estudia la interacción de membranas con agentes químicos. Todo ello hace que las LUVs y SUVs sean modelos muy limitados para estudiar una membrana biológica.

Los agregados más utilizados para modelar membranas biológicas son las vesículas unilamelares gigantes (GUVs), las cuales tienen tamaños de alrededor de $10 - 200 \mu m$ de diámetro. Estos agregados se utilizan para estudiar las propiedades de membranas (mecánicas o eléctricas, por ejemplo) pues pueden ser visualizadas directamente con un microscopio óptico. Los estudios de cambios morfológicos en membranas se llevan a cabo con vesículas de un tamaño de $50 - 200 \mu m$.

Pero la formación de estos liposomas requiere la separación y doblamiento de las membranas, a partir de una bicapa de lípido hidratada. En el método de electroformación, se utiliza un campo eléctrico externo para controlar este proceso. La idea principal es que el campo externo afecta tanto la separación de la bicapa a partir de la capa hidratada de lípido, como su posterior plegamiento para formar la vesícula.

El método de electroformación de liposomas original ha evolucionado desde su descubrimiento, ya que primero se utilizaban unos electrodos de platino en forma de alambre, pero ahora se puede llevar a cabo mediante portaobjetos de microscopio recubiertos de una película conductora, con lo cual se obtienen electrodos en forma de placas paralelas. Tanto en el caso de los electrodos en forma de alambre, como en el caso de los electrodos en forma de placas, el crecimiento de las vesículas se controla mediante campos eléctricos externos de corriente alterna (AC) y corriente directa (DC).

Se ha establecido que la formación de vesículas de una gran variedad de lípidos zwitterionicos, así como de mezclas de lípidos cargados⁷, puede ser controlada por los campos eléctricos externos durante la dispersión de las películas de lípido en la superficie de los electrodos en los medios acuosos. El tamaño, la lamelalidad y la cantidad de vesículas unilamelares que se forman pueden ser controlados mediante el grosor de la película de lípido depositada inicialmente, así como por la magnitud del campo aplicado.

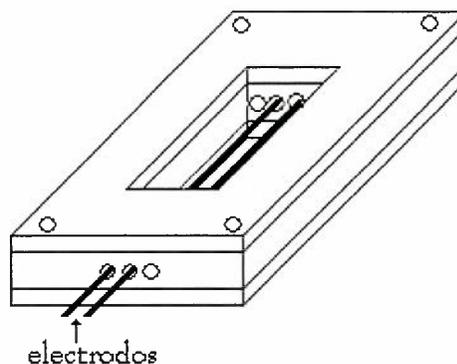
Para llevar a cabo el método de electroformación se requiere el siguiente equipo:

- Una celda de electroformación
- Un generador de funciones (para aplicar voltajes de frecuencia y amplitud controlable)
- Un microscopio óptico (con objetivo de 40X, contraste de fase, distancia de trabajo amplia)

La celda de electroformación se esquematiza en la figura 2.4.

⁷ Los fosfolípidos utilizados en el protocolo mas universal son los siguientes: PC, eggPC, DLPC, DMPC, DPPC, POPC, Sopc, DPhPC y algunas mezclas con fosfatidiletanolamina (PE)

Fig. 2.4. Celda de electroformación, los electrodos de platino están separados una distancia de 3 a 5mm. Se hace pasar una corriente alterna a través de los electrodos para facilitar el crecimiento de GUV's



Esta es una celda de teflón, con tapas metálicas que nos sirven para sujetar los cubreobjetos. En su interior van colocados 2 electrodos de platino de 0.8mm de diámetro, con sus centros separados de 3 a 5mm. También tiene un par de perforaciones extras, que nos sirven para introducir la solución acuosa en la que se formaran las vesículas.

El procedimiento para la preparación de las vesículas gigantes es el siguiente:

- Se prepara la muestra con una concentración de fosfolípido en un intervalo de 0.2 – 1.6mg / ml en algún solvente orgánico. Normalmente, cualquiera de las siguientes mezclas son utilizadas: (i) cloroformo:metanol 9:1 (v/v); (ii) dietil eter:metanol 9:1 (v/v); (iii) cloroformo:dietil eter:metanol 2:7:1 (v/v/v) o 4:5:1 (v/v/v)⁸.
- Se toma una gota de 1μl y se deposita en cada uno de los electrodos de platino en la celda de electroformación, evitando que la mezcla se escurra o resbale.
- Se coloca la celda en una cámara de vacío y se deja en ella por espacio de dos horas.

⁸ Las mezclas de dos solventes son eficientes para lípidos zwitterionicos y neutros. En cambio, se prefiere la mezcla de 3 solventes para lípidos cargados

-
- Hecho esto, se sella la cámara con grasa de vacío entre los cubreobjetos y el teflón, teniendo especial cuidado de no contaminar el interior de la cápsula.
 - Se inyecta la solución acuosa mediante una jeringa insertada en el tercer orificio de la celda.
 - Se aplica el campo eléctrico (10 V, 10 Hz) a los electrodos y la solución acuosa por espacio de 50 minutos.
 - Pasado este tiempo, se baja el voltaje y la frecuencia a 3 V y 3 Hz por espacio de 10 minutos.
 - Se baja paulatinamente el voltaje hasta un mínimo de 0.2 V antes de apagar la fuente.
 - Se retira la solución acuosa con otra jeringa por el otro extremo con mucho cuidado, debido a que pueden dañarse las vesículas que se hayan formado.

Se debe tener especial cuidado en la forma con la que se lleva a cabo el proceso, ya que cualquier cambio en el procedimiento afecta los resultados obtenidos. La ventaja que se tiene sobre los otros métodos es que se pueden controlar los resultados variando los tiempos de exposición al voltaje y las frecuencias.

2.7.1.- Mecanismo de formación

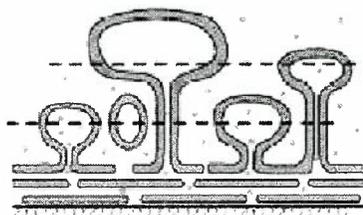
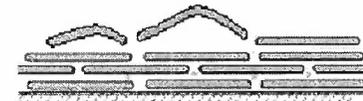
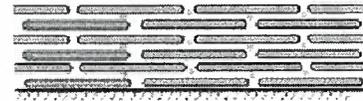
Aún no se comprende plenamente cómo y porqué se forman los liposomas por electroformación. En la literatura, se pueden encontrar sugerencias de efectos que pueden ser importantes en la formación de los agregados. A continuación hacemos una lista de tales efectos posibles:

- Interacciones electrostáticas directas entre los electrodos y la bicapa
- Tensión mecánica inducida electroosmóticamente;
- Redistribución del contorno de la doble capa entre bicapas;
- Decrecimiento de la tensión lineal, superficial y membranar;
- Reacciones electroquímicas;
- Inyección de cargas de los electrodos;
- Reorientación y difusión lateral de moléculas de lípido

Aunque el mecanismo de electroformación no es todavía entendido del todo, presentamos un diagrama en la figura 2.5, que representa el desarrollo en el proceso de electroformación de vesículas. Una de las posibles causas atribuidas al proceso de electroformación es debido a las vibraciones electrosmóticas del agua en la interfase agua-electrodo. Estas vibraciones son perpendiculares a los electrodos, entonces, esta misma fuerza arrastra regiones de bicapas de lípidos de los electrodos haciendo que se separen, creciendo como hongos. Las vesículas continúan creciendo hasta un tamaño de $10-20\mu m$. En este punto, los hongos comienzan a tocarse en sus paredes laterales contiguas. La zona de contacto se incrementa, hasta cierto punto, las vibraciones inducidas por la AC afectan la zona de contacto y la vuelven inestable, haciendo que los hongos se fusionen en un hongo mas grande. Después de algunos minutos el hongo se vuelve cuasiesférico, se cierre su cuello y se separa del electrodo.

Fig. 2.5. Uno de los posibles mecanismos de la formación de liposomas es debido a las vibraciones electrosmóticas.

1. Las vibraciones en los alrededores del electrodo causa protuberancias en las bicapas de lípido.
2. Estas protuberancias crecen hasta que forman hongos.
3. Cuando los hongos crecen lo suficiente, sus paredes se fusionan y eventualmente se separan formando GUV's



CAPÍTULO 3

Propiedades mecánicas de la membrana

El estudio de las propiedades mecánicas de membranas es importante pues en algunos procesos biológicos intervienen deformaciones de tales estructuras: endocitosis, exocitosis, fusión celular, división celular, transcripción genética, etc. Para tener una visión completa de los mecanismos físicos involucrados en los fenómenos mencionados es necesario conocer las propiedades mecánicas del sistema. Sin embargo, a pesar de su importancia, la biomecánica de membranas es un campo relativamente poco estudiado en la frontera entre la biología celular, la biofísica y la bioingeniería.

Estas propiedades son estudiadas comúnmente aplicando una fuerza controlada a un sistema modelo (vesículas gigantes por ejemplo) para analizar la deformación en función de la magnitud de la fuerza. Un método experimental para conseguir esto emplea la aspiración con micropipetas. Este procedimiento consiste en aplicar un gradiente de presión entre el exterior y el interior de una vesícula cuando es aspirada con micropipetas, lo que permite medir cambios en su área en función de la presión o tensión aplicada.

3.1.- Técnica de micropipetas.

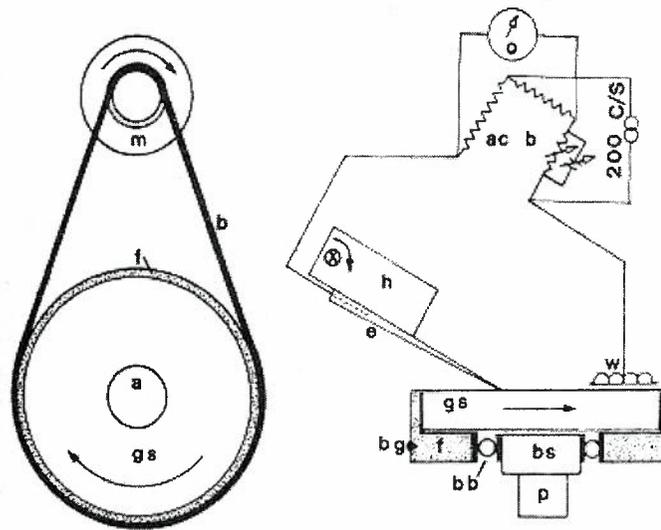
La técnica de micropipetas se ha utilizado desde finales de la década de los 40, donde se comenzaron a realizar experimentos en el campo de la fisiología celular. Los primeros pasos se dieron cuando se medía los impulsos eléctricos que pasan a través de los axones, insertando 8-9 mm. micropipetas llenas con agua de mar dentro de calamares gigantes^(Brown 1986). Esta técnica producía resultados muy importantes para futuras investigaciones en neurociencia, pero estaba limitado a células muy grandes, ya que el diámetro de las primeras pipetas era de alrededor de 0.1 mm.

Sin embargo, paulatinamente los experimentos con micropipetas han ido expandiendo sus posibilidades. En un momento se encontró que con ellos se puede tener una lectura continua del potencial eléctrico a través de la membrana de la célula penetrada. Después, las micropipetas comenzaron a ser utilizadas para introducir o absorber sustancias de la célula. También pueden ser convertidas en un electrodo que manda una señal de voltaje proporcional a la concentración de iones como Na^+ , Cl^- , K^+ o Ca^{2+} . Actualmente, se han convertido en una herramienta crítica en el campo de la ingeniería genética y de la inseminación artificial.

Se han desarrollado varios tipos de instrumentos para crear micropipetas, desde dispositivos manuales, hasta aparatos programables que permiten fabricarlas de manera reproducible, con puntas del orden de varias micras. Sin embargo, el procedimiento para crearlas tiene el mismo principio: Contienen una fuente de tensión para jalar las micropipetas, un filamento termoeléctrico para calentar una pequeña porción del vidrio, el calor puede ser controlado por la corriente que pasa a través del filamento y la distancia del vidrio con el filamento se mantiene relativamente constante. El capilar de vidrio estará sometido a la tensión cuando se este calentando, y esto es lo que separa al vidrio (lo cual es difícil hacerlo a mano). Jalando primero lentamente y después acelerando. Cuando se produce un jalón relativamente lento causa una rápida reducción del diámetro del capilar, haciendo que el capilar sea muy largo. Pero un rápido jalón se usa cuando se requiere una punta fina.

Ya que tenemos nuestra micropipeta el siguiente paso es biselar la punta de esta. Este biselado es dependiendo para que se requieran las micropipetas, en nuestro caso, el biselado debe estar contenido en un plano perpendicular a la longitud de la micropipeta. Para pulir las puntas de las pipetas se utilizan piedras abrasivas, usualmente utilizadas en afilar puntas de metal. Se utiliza también polvo de diamantes y partículas de alumina (Al_2O_3), estos dos últimos con mejores resultados.

Fig. 3.1. Diagrama del aparato para biselar micropipetas. A la izquierda es el diagrama visto desde arriba, y a la derecha visto de lado. Los elementos son los siguientes: (m) motor; (b) banda; (gs) superficie abrasiva; (f) anillo contenedor; (a) eje central; (bg) canal para la banda; (bb) glóbulos directores; (bs) superficie sobre la cual gs rota; (p) pedestal estacionario; (e) micropipeta; (h) sujetador de micropipetas;



En las secciones siguientes discutiremos algunos conceptos básicos necesarios para entender los experimentos donde se determinan propiedades mecánicas de membranas, mediante la aspiración con micropipetas.

Podemos caracterizar la mecánica de membranas biológicas con cuatro tipos de modos de deformación:

1. estiramiento,
2. plegamiento o curvatura,
3. esfuerzo de corte y
4. deslizamiento entre las monocapas que generan la bicapa de lípido.

En este trabajo discutiremos solamente los dos primeros modos puesto que son los que se pueden estudiar con la técnica de manipulación con micropipetas.

3.2.- Módulos principales de deformación

El estudio de las fuerzas aplicadas a membranas biológicas es de gran importancia ya que estas fuerzas se encuentran virtualmente en todos los procesos y funciones celulares. En membranas transportan información a la célula, programando la transcripción de genes. A pesar de esta tarea central, la biomecánica de membranas permanece relativamente todavía bajo estudio atrapada entre la biología celular y la biofísica y bioingeniería.

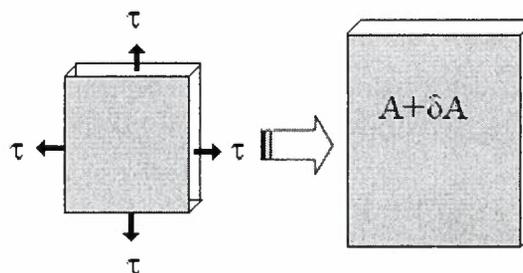
A continuación, vamos a estudiar los dos módulos de deformación implicados en la técnica de micropipetas.

3.2.1.- Modulo de expansión

Debido a sus dimensiones, la membrana celular solo puede ser tratada como un medio continuo en el espacio bidimensional el cual nos ofrece herramienta suficiente para caracteriza la superficie. Usualmente, los radios de curvatura son mucho mayores que el grosor de la membrana, es por eso que se considera como una superficie delgada, y esto hace que podamos aplicar la técnica de micropipetas.

El primer modulo de deformación que estudiaremos es el modulo de expansión o estiramiento, denotado generalmente por la letra K . Cuando a un material se le aplica una tensión, este, como respuesta, dilata o contrae el área superficial, creando una extensión lateral isotrópica si el material es considerado homogéneo e isotrópico.

Fig. 3.2. Representación esquemática del aumento en el área de una lamina debido a la tensión aplicada donde el aumento en el área varía linealmente proporcional a la tensión aplicada.



$$\tau = K \frac{\Delta A}{A_0}$$

El modulo de expansión K , lo podemos medir utilizando el método de micropipetas, que es el método mas eficiente debido a que podemos encontrar una resolución mejor que 0.1% para el cambio en el área. También podemos observar la reversibilidad del sistema, respuesta a tensiones espontáneas y estudiar con más detalle la dilatación en el área máxima en el punto de ruptura, es decir, tensión de lisis que fue estudiada también con el proceso de extrusión.

Para medir K , se aspira una vesícula con una micropipeta (figura 3.4). Conociendo la tensión aplicada, la cual es función de la diferencia de presión, en un régimen específico, que se aplica con la micropipeta, se determina el cambio relativo en el área, el es función de L , la longitud de penetración de la vesícula en la pipeta. La tensión se relaciona con el cambio en el área de la siguiente manera:

$$\tau = K\alpha$$

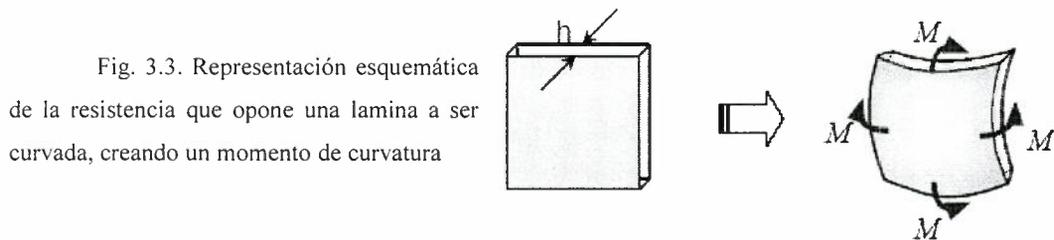
donde α es el cambio en el área (vease ec. (3.13)) Los valores típicos obtenidos con este método para membranas de fosfolípido puro son de alrededor de 100-200 din/cm .

Cuando las membranas tienen colesterol, estos valores aumentan. Por ejemplo, en membranas con una concentración equimolar de SOPC y colesterol, $K \approx 850 \text{din/cm}$ ^(Helfrich 1984); en el caso de eritrocitos (50% colesterol), se han obtenido valores de $K \approx 750 \text{din/cm}$.

En las secciones siguientes realizaremos el análisis teórico necesario para medir K mediante el método de aspiración con micropipetas, utilizando como base la ecuación; se trata de obtener una expresión para la tensión τ en términos de la diferencia de presión aplicada a una vesícula con la micropipeta, así como otra expresión para la deformación $(\Delta A/A_0)$ en términos de la geometría del sistema (vesícula aspirada).

3.2.2.- Módulo de curvatura

Otro modulo estudiado con este método es el modulo de curvatura, generalmente denotado por κ . Lo que este modulo son indica es la resistencia que presenta la membrana a curvarse.



Cuando la membrana se curva, se crea un momento de curvatura M proporcional a los cambios en la curvatura de la membrana

$$M = \kappa \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} - C_0 \right)$$

donde C_0 es la curvatura espontánea

3.3.- Relaciones mecánicas del sistema

La variación en las propiedades como temperatura, osmosis, presión, tensión y otros factores, hacen que se produzcan cambios en las membranas en el área de su superficie, así como también en su volumen. Hay procesos en los que las variables involucradas se pueden mantener constantes y estudiar como reacciona una membrana a los cambios que se les pueden dar por separado. Tal es el caso del estudio mediante micropipetas, donde a una vesícula se le mantiene a un volumen constante y también a una temperatura constante para medir el cambio relativo del área en función de la presión ejercida por las micropipetas

En esta sección analizaremos la geometría que envuelve la técnica de aspiración con micropipetas, ya que nos será de gran ayuda para llegar a unas relaciones constitutivas en donde se relaciona el cambio en el área con la diferencia de presión aplicada. En la figura 3.4 podemos observar los parámetros implicados, El sistema pipeta-vesícula se divide en dos subsistemas.

En el subsistema 1 estamos considerando que la vesícula, al ser succionada, forme un cilindro dentro de la micropipeta y una semiesfera en la parte final de este. Con un radio R_1 y una diferencia de presión $\Delta P = P_1^{ext} - P_1^{int}$. El subsistema 2 esta delimitado por la vesícula aspirada hasta donde entra en contacto con la micropipeta.

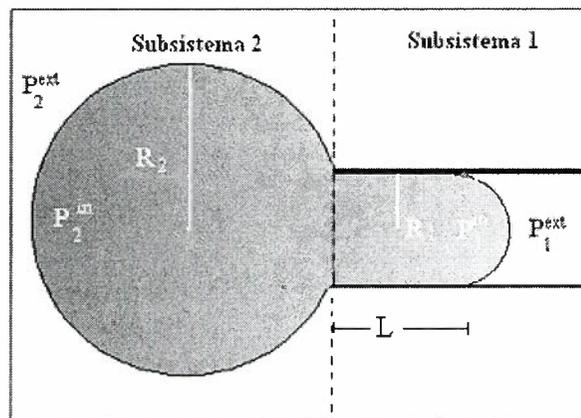
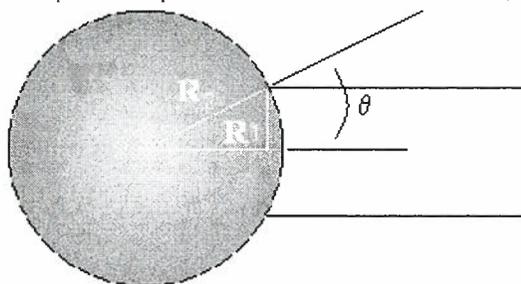


Fig. 3.4. Representación grafica de aspiración con micropipetas.

El área macroscópica en el subsistema 1 esta dada por el área del cilindro y la semiesfera, esto es:

$$A_{p,1} = 2\pi R_1 L + 2\pi R_1^2 \quad (1.1)$$

Fig. 3.5. Representación geométrica de las distancias involucradas en los cálculos del cambio en el área superficial de la vesícula.



Para el área macroscópica del subsistema 2 tenemos que integrar desde el ángulo al cual llega la micropipeta:

$$A_{p,2} = \int r^2 \sin\theta d\theta d\varphi$$

de la figura 3.5, vemos que la norma del cateto adyacente es $\sqrt{R_2^2 - R_1^2}$, así:

$$\cos\theta = \frac{\sqrt{R_2^2 - R_1^2}}{R_2} \Rightarrow \theta = \cos^{-1}\left(\sqrt{1 - \frac{R_1^2}{R_2^2}}\right)$$

así, la integral nos queda:

$$A_{p,2} = R_2^2 \int_0^{2\pi} d\varphi \int_{\cos^{-1}\left(\sqrt{1 - \frac{R_1^2}{R_2^2}}\right)}^{\pi} \sin\theta d\theta$$

entonces;

$$A_{p,2} = 2\pi R_2^2 \left[1 - \sqrt{1 - \frac{R_1^2}{R_2^2}}\right] \quad (3.1)$$

y para los volúmenes:

$$V_{p,1} = \pi R_1^2 L + \frac{2\pi}{3} R_1^3 \quad (3.2)$$

$$V_{p,2} = \frac{2\pi}{3} R_2^3 \left[1 - \sqrt{1 - \frac{R_1^2}{R_2^2}}\right] \quad (3.3)$$

Dado que la mayoría de los experimentos son realizados con vesículas que cumplen con el criterio $\frac{R_1}{R_2} < \frac{1}{3}$, el área y volumen del subsistema 2 es dado como una buena aproximación como:

$$A_{p,2} = 4\pi R_2^2 \left(1 - \frac{1}{4} \left(\frac{R_1}{R_2}\right)^2 + o\left(\frac{1}{16} \left(\frac{R_1}{R_2}\right)^4\right)\right) \quad (3.4)$$

$$V_{p,2} = \frac{4\pi}{3} R_2^3 \left(1 - \frac{1}{4} \left(\frac{R_1}{R_2}\right)^2 + o\left(\frac{1}{16} \left(\frac{R_1}{R_2}\right)^4\right)\right) \quad (3.5)$$

El máximo error relativo por el truncamiento de la serie de Taylor es del orden de 10^{-3} . Ahora, el cambio en el área y el volumen de los subsistemas 1 y 2 es dado por

$$dA_{p,1} = 2\pi R_1 dL \quad (3.6)$$

$$dV_{p,1} = \pi R_1^2 dL \quad (3.7)$$

y

$$dA_{p,2} = 8\pi dR_2 \left(1 - \frac{1}{4} \left(\frac{R_1}{R_2} \right)^2 + o \left(\frac{1}{16} \left(\frac{R_1}{R_2} \right)^4 \right) \right) \quad (3.8)$$

$$dV_{p,2} = 4\pi R_2^2 dR_2 \left(1 - \frac{1}{4} \left(\frac{R_1}{R_2} \right)^2 + o \left(\frac{1}{16} \left(\frac{R_1}{R_2} \right)^4 \right) \right) \quad (3.9)$$

Tomando en cuenta que el radio de la pipeta R_1 permanece constante durante el experimento y comparando las ecuaciones (3.6)-(3.9), obtenemos una ecuación que nos relaciona el cambio diferencial en el área con respecto al volumen en cada subsistema, esto es

$$\left(\frac{\partial A_{p,i}}{\partial V_{p,i}} \right) = \frac{2}{R_i} \quad (3.10)$$

Asumiendo que el volumen de la vesícula permanece constante llegamos a la relación

$$\begin{aligned} d(V_1 + V_2) &= d(V_{p,1} + V_{p,2}) \\ d(V_1 + V_2) &\approx \pi R_1^2 dL + 4\pi R_2^2 dR_2 = 0 \end{aligned} \quad (3.11)$$

de aquí

$$\left(\frac{\partial R_2}{\partial L} \right)_V = -\frac{1}{4} \left(\frac{R_1}{R_2} \right)^2 \quad (3.12)$$

La ecuación (3.12) es usada en el análisis de aspiración ya que nos permite estimar la variación del radio de la vesícula ΔR_2 en función del cambio en la longitud del cilindro, $\Delta L = L - L_{in}$.

3.3.1.- Expansión relativa

La deformación de las membranas mediante el uso de aspiración de micropipetas

es usualmente caracterizada midiendo la expansión relativa del área óptimamente observable con respecto a un estado inicial. El cambio relativo en el área es definido por

$$\alpha = \frac{A_p - A_0^{in}}{A_0^{in}} \quad (3.13)$$

donde $A_p = A_p^{(1)} + A_p^{(2)}$ es el área macroscópica del sistema. Esta puede escribirse como

$$dA_p = dA_p^{(1)} + dA_p^{(2)} = 2\pi R_1 dL + 8\pi R_2 dR_2 \quad (3.14)$$

usando la restricción del volumen y la ec. (3.12), podemos escribir (3.14) como

$$\left(\frac{\partial A_p}{\partial L} \right)_V = 2\pi R_1 \left(1 - \frac{R_1}{R_2} \right) \quad (3.15)$$

así, la expansión relativa puede calcularse integrando (3.15)

$$\alpha = \frac{\Delta A_p}{A_p^{in}}, \quad \Delta A_p = \int_{L^{in}}^{L^{in} + \Delta L} \left(\frac{\partial A_p}{\partial L} \right)_V dL \quad (3.16)$$

Para evaluar la integral, la dependencia del integrando sobre R_1 / R_2 es expresada utilizando la condición de que el volumen se conserva constante

$$\frac{R_1}{R_2} = \frac{R_1}{R_2^{in}} \left[1 - \frac{3}{4} \left(\frac{R_1}{R_2^{in}} \right)^3 \frac{\Delta L}{R_1} \right]^{-\frac{1}{3}} \quad (3.17)$$

introduciendo (3.17) en (3.16) e integrando sobre L tenemos

$$\Delta A_p = 2\pi R_1 \Delta L + 4\pi (R_2^{in})^2 \left[\left[1 - \frac{3}{4} \left(\frac{R_1}{R_2^{in}} \right)^3 \frac{\Delta L}{R_1} \right]^{\frac{2}{3}} - 1 \right]$$

y expandiendo el segundo corchete en serie de Taylor, obtenemos

$$\Delta A_p \approx 2\pi R_1 \Delta L \left(1 - \left(\frac{R_1}{R_2^{in}} \right) + o \left(\frac{1}{8} \left(\frac{R_1}{R_2^{in}} \right)^4 \frac{\Delta L}{R_1} \right) \right) \quad (3.18)$$

Para terminar de calcular la expansión relativa, α , el inverso del área macroscópica inicial expandido en serie de Taylor es

$$\frac{1}{A_p^{in}} \approx \frac{1}{4\pi (R_2^{in})^2} \left[1 - \frac{2R_1 L^{in} + R_1^2}{4(R_2^{in})^2} + \dots \right] \quad (3.19)$$

entonces, la expansión relativa la podemos escribir como

$$\alpha = \frac{\Delta A_p}{A_p^{in}} = \left[\frac{1}{2} \left(\frac{R_1}{R_2^{in}} \right)^2 \frac{\Delta L}{R_1} + \left[1 - \frac{3}{4} \left(\frac{R_1}{R_2^{in}} \right)^3 \frac{\Delta L}{R_1} \right]^{\frac{2}{3}} - 1 \right] \gamma$$

$$\alpha = \frac{1}{2} \left[\left(\frac{R_1}{R_2^{in}} \right)^2 - \left(\frac{R_1}{R_2^{in}} \right)^3 \right] \frac{\Delta L}{R_1} \gamma \quad (3.20)$$

donde

$$\gamma = \left[1 - \frac{2R_1 L^{in} + R_1^2}{4(R_2^{in})^2} + \dots \right]$$

es un factor de corrección a la expansión relativa que en artículos anteriores ^(Evan Evans 1987) no se tomaba en cuenta. En el caso en que el estado inicial fuera puramente esférico $\gamma = 1$, estas relaciones serian iguales. La aspiración de vesículas en el estado flácido puede producir una longitud inicial en el rango de $[R_1; 4R_1]$, con lo que obtenemos un valor aproximado de $\gamma \in [0.80, 1]$ ^(Ipsen 2004), el cual depende de la razón entre el radio de la vesícula y la pipeta. Es importante enfatizar que estas ecuaciones son validas solo si el volumen se conserva constante. La succión de la pipeta ($\sim 10^3 Pa$) necesaria para expandir una superficie de una vesícula ($\sim 20 \mu m$) ^(W. Rawicz 2000) es pequeña comparada con la fuerza osmótica necesaria para desplazar agua en la escala de tiempo del experimento. Es por esto que el volumen se considera constante.

3.3.2.- Tensión en la membrana.

Cuando tenemos una vesícula que podemos observar en el microscopio, no observamos el área real de la vesícula, ya que por debajo del rango de observación del microscopio la membrana fluctúa debido a su energía térmica, asociándosele dos áreas, el área del marco de referencia macroscópico $A_{p,i}$, y un área superficial microscópica real A_p

De la figura 3.4 tenemos que

$$\Delta P_1 = P_1^{ext} - P_1^{in} \quad \Delta P_2 = P_2^{ext} - P_2^{in}$$

en el equilibrio, la diferencia de presión a través de la pared de la pipeta se escribe como

$$\Delta P = \Delta P_2 - \Delta P_1 = P_2^{ext} - P_1^{ext}$$

usando la definición de presión efectiva^(Ipsen 2004)

$$\bar{P}_i = \Delta P - \tau_i \left(\frac{\partial A_{p,i}}{\partial V_{p,i}} \right)$$

podemos escribir

$$\Delta P = \tau_1 \left(\frac{\partial A_{p,1}}{\partial V_{p,1}} \right) - \tau_2 \left(\frac{\partial A_{p,2}}{\partial V_{p,2}} \right) \quad (3.21)$$

y usando la ec. (3.10) tenemos

$$\Delta P = \tau_1 \frac{2}{R_1} - \tau_2 \frac{2}{R_2} \quad (3.22)$$

de aquí, si hacemos $\tau_1 = \tau$ y $\Delta\tau = \tau_2 - \tau_1$ y reacomodamos (3.22), obtenemos una relación entre la tensión y la diferencia de presión dada por

$$\tau = \frac{\Delta P R_1}{2 \left(1 - \frac{R_1}{R_2} \right)} \left(1 + \frac{2\Delta\tau}{\Delta P R_2} \right) \quad (3.23)$$

Aunque en el limite, cuando $\tau_1 \rightarrow \tau_2$, la ecuación anterior se puede escribir como

$$\tau = \frac{\Delta P R_1}{2 \left(1 - \frac{R_1}{R_2} \right)} \quad (3.24)$$

esto se puede hacer debido a que las tensiones, aunque diferentes, difieren de una cantidad muy pequeña.

Con esta ecuación, deducimos una relación entre la diferencia de presión efectuada en la micropipeta y la tensión media que siente la superficie de la vesícula.

El limite cuando $\tau_1 \rightarrow \tau_2$ es alcanzado cuando ΔP es muy grande y la ec. (3.24) se vuelve acertada en el régimen de altas tensiones

La ecuación (3.24) relaciona la tensión de la membrana τ con la diferencia de presión ΔP . Esta ecuación, junto con las ecuaciones (3.20), permite calcular el módulo de expansión o estiramiento K . Algunos resultados publicados en la literatura se presentarán en el capítulo siguiente.

CAPÍTULO 4

Aplicaciones de liposomas y micropipetas

El estudio de las vesículas puede considerarse relativamente nuevo. No obstante, debido a sus propiedades estos sistemas tienen una gran cantidad de aplicaciones.

Una característica muy utilizada de estos agregados es su capacidad de encapsular o encerrar un volumen dado de solvente. Esto se aprovecha en diferentes áreas como la farmacología, la cosmetología o la ciencia de alimentos para encapsular sustancias activas. Para ello se requieren liposomas de tamaño controlable, relativamente pequeños y estables.

Por otra parte, las vesículas de fosfolípido son muy empleadas como modelos de membranas biológicas. Esto ha permitido estudiar algunas de sus propiedades: coeficientes de difusión, módulos elásticos, etc. Para este tipo de aplicaciones se utilizan generalmente vesículas gigantes obtenidas con el método de electroformación.

En este capítulo primeramente abordaremos algunas aplicaciones de liposomas en distintas ramas de la ciencia para después analizar algunos resultados publicados en los cuales podamos apreciar los valores de los módulos observados en el capítulo anterior.

4.1.- Aplicación de liposomas en ciencia

Las membranas de lípido son superficies bidimensionales contenidas en un espacio tridimensional, se pueden caracterizar por su flexibilidad, la cual está relacionada con su elasticidad de curvatura. Por ello, las vesículas pueden ser utilizadas como modelo para comprender la topología, fluctuaciones de forma, comportamiento de fase, permeabilidad, fusión y fisión de las membranas biológicas. A pesar de su amplia

aplicación, el mecanismo de formación de liposomas todavía se mantiene en la incertidumbre. Los cálculos de equilibrio de las formas de las vesículas gigantes, y el poder observarlas en el microscopio nos ofrecen una guía para modelar las transformaciones estructurales que sufren los agregados en los diferentes métodos de formación. Se han llevado a cabo experimentos en los cuales mediante el gradiente de hidratación en las bicapas continuas de las vesículas multilamelares grandes se induce una curvatura, que paulatinamente brota otra vesícula pequeña de esta. Más aun, la vesiculación en la naturaleza es un proceso esencial en las funciones celulares, ya que se ha observado que vesículas pequeñas unilamelares (SUV) son producidas a partir de membranas o vesículas cilíndricas mediante brotes en su superficie. Estos procesos pueden ser análogos a los establecidos en las preparaciones de liposomas en laboratorio, en los cuales se les aplica una alta energía de rompimiento causando la formación de SUV^(Helfrich 1974). Es posible asumir que mecanismos similares pasan en el proceso de exocitosis y en la formación de vesículas sinápticas (Vesículas que se forman en la unión de dos neuronas)^(D.D. 1991). Esto son procesos no espontáneos que nos proveen de la fuerza de conducción para estas transformaciones, pero más que nada es importante conocer el papel que juegan las bicapas de lípido en estos procesos.

4.2.- Aplicación de liposomas en medicina

La aplicación de liposomas en medicina se puede dividir en aplicaciones terapéuticas, en las cuales se usan los liposomas como contenedores y medios de transporte de medicamentos y en su uso como modelo, herramienta o reactivos en los estudios de las interacciones celulares, como son reconocimiento, procesos y el modo de acción de ciertas sustancias.

Los beneficios y limitaciones de las vesículas en función del acarreo de medicamentos dependen de la interacción de los liposomas con las células y su comportamiento *In vivo* después de la administración. Experimentos *In vivo* e *In Vitro* de las interacciones con células nos muestran que la interacción más predominante de las células con los liposomas es la endocitosis. La fusión con las membranas celulares sucede, pero es muy raro. La otra posible interacción que sufren es el intercambio de

constituyentes, como lípido, colesterol y de moléculas contenidas en la membrana.

Cuando entra un objeto extraño al cuerpo humano, este se protege con un sistema de defensa muy complejo. Al momento de entrar el objeto extraño causa la formación de un coágulo y eventualmente su superficie se vuelve menos activa químicamente debido al recubrimiento con biomacromoléculas hasta que las partículas más pequeñas, incluso los microbios, bacterias y coloides sean engullidos por las células del sistema inmunológico. Esta respuesta del sistema inmunológico ha provocado un esfuerzo muy grande para el desarrollo de superficies biocompatibles y no reconocibles.

Los liposomas, como sistemas de entrega de fármacos ofrecen algunas ventajas sobre las formas convencionales de dosificación, especialmente para dosis tipo, tópica y vías de administración aerea. Los beneficios de los liposomas, los cuales son aplicados en aerosol, en cremas o soluciones coloidales son enlistados en la siguiente

- Mejoran la solubilidad de fármacos lipofílicos y anfifílicos, como la anfoterisina B. Además, en algunos casos, los fármacos hidrofílicos pueden ser encapsulados en el interior del liposoma a concentraciones arriba de su solubilidad en agua. ^(Lasic 1992)
- Permiten la liberación regulada de farmacos de administración local
- Mejora las transferencias de moléculas anfifílicas cargadas como los antibióticos y genes dentro de la célula.
- Mejora la penetración hacia el tejido, especialmente en aplicaciones tópicas

En general, la encapsulación de fármacos se considera cuando es muy potente, toxico y tiene un corto periodo de vida en el torrente sanguíneo o en sitios de administración local (subcutánea, intramuscular y pulmonar).

Se ha mostrado que pequeños liposomas compuestos de lípidos con cadenas de hidrocarburos largas y saturadas en mezcla con colesterol se acumulan en los sitios de

inflamación. Estos liposomas también pueden ser usados como repartidores de fármacos antiinflamatorios.

Por ejemplo, los liposomas que contienen PEG adherido a la cabeza polar de los fosfolípidos se están desarrollando para entrega de fármacos *In vivo* dirigido hacia tumores y otros sitios en el cuerpo. La llave para poder utilizar este tipo de liposomas radica en que cuando estas vesículas son inyectadas dentro del torrente sanguíneo el tiempo de circulación es mucho más alto comparado con liposomas convencionales^(Senior 1991). Mientras que los liposomas convencionales son removidos muy rápidamente por los macrófagos, los liposomas con PEG tienden a permanecer mucho más tiempo en el torrente sanguíneo.

4.3.- Aplicación de liposomas en cosméticos

Las mismas propiedades que discutimos anteriormente también pueden ser utilizadas en el reparto de ingredientes en cosméticos. Más aun, los liposomas como acarreadores ofrecen ventajas por si mismos, debido a que los lípidos están bien hidratados y reducen la resequead de la piel, la cual es la principal causa en el envejecimiento de la piel. Además, liposomas pueden actuar como fuente de recarga de lípidos.

En general, el reglamento para aplicaciones de fármacos vía tópica y entrega de otros compuestos es menos estricto que otros y varios cientos de productos cosméticos están disponibles desde 1987. En estos productos se puede encontrar desde pastas de liposomas las cuales son usadas como reemplazo para cremas y ungüentos para llevar a cabo recetas que contengan extractos, humectantes, antibióticos e incluso productos más complejos como aquellos que contienen agentes recombinantes para curar quemaduras de sol y heridas en la piel. La mayoría de los productos que se encuentran en esta categoría son cremas para el antienvjecimiento de la piel. Aunque también se encuentran en protectores solares, perfumes de larga duración, acondicionadores de cabello, cremas de afeitar y productos similares que ya están en el mercado.

Las personas que estudian estos liposomas no se encuentran muy de acuerdo con su mecanismo de acción. Mientras algunos dicen que los liposomas aumentan la permeabilidad de la piel, otros dicen que la mayoría de los liposomas son no irritantes y no interactuantes (sin alcohol, y otros solubilizantes) con los ingredientes activos de la piel.

4.4.- Liposomas en bioingeniería

La ingeniería genética esta basada en la entrega de material genético, es decir, fragmentos de ADN, dentro de algunas células y microorganismos con el propósito de alterar su código genético y forzarlos a producir proteínas particulares o polipéptidos. Los ácidos nucleicos utilizados en la transferencia de genes son grandes, con peso molecular de algunos millones de daltons, altamente cargados e hidrofílicos, lo que hace muy difícil su paso a través de la membrana. Adicionalmente al método clásico, uno de los cuales es mediante inyección directa, los liposomas son probados como acarreadores de ácidos nucleicos encapsulados dentro de ellos para facilitar la endocitosis.

Los liposomas que se utilizan son generalmente GUV's hechas con fosfolípidos cargados negativamente (generalmente PS) para prevenir interacciones con las moléculas de ADN las cuales pueden contener poca carga negativa^(Fraley 1980).

4.5.- Aplicación de liposomas en la industria de la comida

La habilidad de los liposomas para solubilizar compuestos con propiedades de solubilidad baja, envolver compuestos potencialmente dañinos al medio y la liberación de compuestos en medios controlados puede ser también utilizada en la industria de procesamiento de alimentos

Las moléculas de lípido, desde los ácidos grasos hasta los lípidos polares, son uno de los ingredientes principales en la mayoría de las comidas. Por ejemplo, la lecitina y algunos otros lípidos polares son extraídos de los nutrientes, como las semillas de soya o la yema de huevo. Tradicionalmente, los lípidos polares se utilizan para estabilizar

emulsiones de agua-aceite. Los liposomas se han convertido en sistemas atractivos ya que se componen de compuestos comestibles, lo que hace favorable también la microencapsulación.

El concepto de sistema de liberación ininterrumpida puede ser utilizado en varios procesos de fermentación en los cuales, las enzimas encapsuladas pueden acortar los tiempos de fermentación y mejorar la calidad del producto. Esto es debido al mejoramiento espacial y temporal de liberación de constituyentes así como a su protección en fases particulares del proceso contra la degradación química. Un ejemplo clásico es la elaboración de queso. Después de estudios preeliminares en los cuales se optimizaron sistemas de liposomas el tiempo en la elaboración del queso entre 30-50%^(Law 1991). Esto se refleja en un sustancial beneficio económico sabiendo que el tiempo de maduración de estos quesos, como el cheddar, es de alrededor de un año durante el cual se necesitan condiciones muy controladas.

4.6.- Resultados analizados con micropipetas

En esta sección presentaremos algunos resultados de estudios de propiedades mecánicas de vesículas, medidas con la técnica de micromanipulación con micropipetas

Como se muestra en la figura 4.1(a), el segmento de la vesícula exterior a la pipeta inicialmente no es esférica; esta ondula con el tiempo. Las fluctuaciones son claramente visibles para tensiones arriba del orden de $(2-3) \times 10^{-3} \text{ din/cm}$. Cuando la succión se incrementa hasta producir una tensión de 10^{-2} din/cm (o mayor), la vesícula tomara suavemente la forma esférica, como se muestra en la figura 4.1 (b). No obstante, todavía podemos sustraer un área significativa de las ondulaciones microscópicas hasta que la tensión es incrementada 2 órdenes de magnitud.

En la figura 4.2 se trabajo con mezclas de SOPC:Chol 1:1 (w:w) y DGDG. En la

figura 4.2 (a) se presenta la grafica del $\ln(\text{tensión})$ en función de α obtenida de vesículas individuales de lípidos. La figura 4.2 (b) muestra los mismos datos para el cambio en la tensión en función de la dilatación del área pero graficada en escala lineal.

Cuando realizamos el experimento de succión nos encontramos en dos tipos de régimen, el de bajas tensiones y el de altas tensiones. El cruce entre el régimen exponencial al régimen lineal se da a niveles de tensión comparables ($\sim 1 \text{ din/cm}$) ya que la razón entre las dos pendientes (lineal y logarítmica) no son muy diferentes para las dos tipos de vesículas en ese régimen.

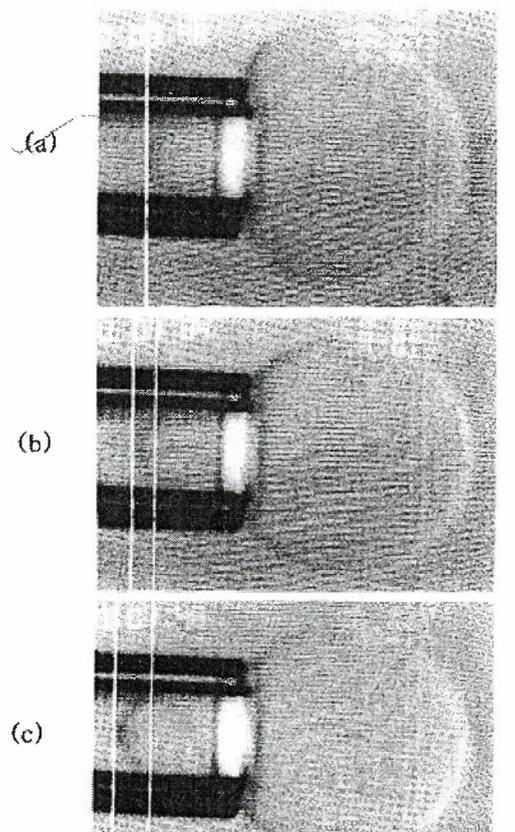


Fig. 4.1. Fotografías de presurización de vesículas (diámetro de las vesículas $\sim 20 \mu m$, diámetro de la pipeta $\sim 8 \mu m$. (a), régimen de bajas tensiones $\leq 4 \times 10^{-4} \text{ din/cm}$. El contorno de la vesícula fluctúa y no es esférica. (b) La succión se incrementa hasta producir una tensión de $\sim 0.01 \text{ din/cm}$. (c) Se incrementa de nuevo la tensión a $\sim 0.2 \text{ din/cm}$

Cuando nos encontramos en el régimen de bajas tensiones, la vesícula estará fluctuando, cambiando su forma, y mientras producimos succión, la vesícula tenderá a tomar una forma esférica, pero sin expandir su área, utilizando el área microscópica de las fluctuaciones. Creando una resistencia a ser doblada. En este régimen, como vemos

en la figura 4.2 (a) el logaritmo de la tensión se comporta de manera lineal en función de la expansión en el área, esto es:

$$\alpha = \frac{k_B T}{8\pi\kappa} \ln \left(\frac{\tau}{\tau_0} \right) \quad (4.1)$$

donde τ_0 es la tensión en el estado inicial.

El modulo de expansión en el área K_{app} se mide en el régimen de altas tensiones (RAT). Este módulo aparente difiere del módulo real K debido a que en este régimen, el incremento en α , aunque es casi completamente debido al incremento en el área por molécula de los lípidos, y la contribución a α de las fluctuaciones térmicas es muy pequeña ^(W. Rawicz 2000), no se considera despreciable. Se ha observado que existe una relación lineal entre la tensión τ y el cambio relativo en el área α , donde la pendiente de esta recta es el modulo de expansión aparente del área K_{app} , el cual incluye el cambio asociado al área microscópica. Para obtener el modulo real K necesitamos restarle la contribución de las fluctuaciones térmicas y obtenemos el cambio real debido a la expansión del área por molécula α_{real} . Esta contribución también ha sido calculada ^(W. Rawicz 2000)

$$\Delta\alpha(i) = \left[\frac{k_B T}{8\pi\kappa_c} \right] \ln \left[\frac{\tau(i)}{\tau(1)} \right] \quad (4.2)$$

donde $\tau(1)$ es escogido como la tensión en el punto de cruce de los dos regimenes, entonces:

$$\alpha_{real}(i) = \alpha(i) - \Delta\alpha(i) \quad (4.3)$$

y el modulo de expansión del área real es dado por la pendiente de la grafica de τ vs α_{real} .

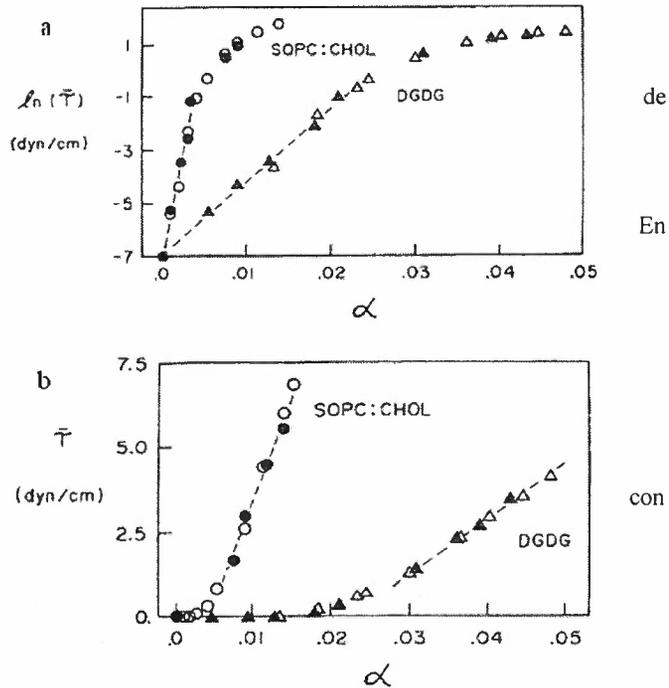
La tensión de cruce entre los regimenes es muy parecida en las vesículas de lípidos, esta tensión esta relacionada con K y κ mediante la siguiente relación:

$$\tau_x = \frac{k_B T}{8\pi} \frac{K}{\kappa} \quad (4.4)$$

Con estas expresiones, podemos medir los módulos de elasticidad y curvatura y poder caracterizar las vesículas de fosfolípido y ver como reaccionan ante los cambios en sus alrededores.

Las graficas que veremos a continuación son resultados experimentales que se han obtenido de la literatura

Fig. 4.2. Grafica de valores de la tensión vs. el cambio relativo en el área para dos vesículas con diferente composición de lípido.^(Rawicz 1990) (a) el régimen de bajas tensiones, tenemos una pendiente dada por $\frac{8\pi\kappa}{k_bT}$. (b) Cruzando de régimen, la pendiente es K . (Los círculos blancos, presión ascendente y los negros son presión descendente).



En el régimen de bajas tensiones ((Fig. 2 (a)), la pendiente de la grafica del $\ln(\tau)$ vs. α es proporcional al modulo de curvatura, es decir, $\frac{8\pi}{k_bT}\kappa$. Después de cruzar al otro régimen, la pendiente de la gráfica de la tensión vs. α es el modulo de expansión K_{app} . En la tabla 4.1 observamos algunos valores de los módulos de deformación. Podemos observar que las bicapas con más baja compresibilidad son también menos flexibles.

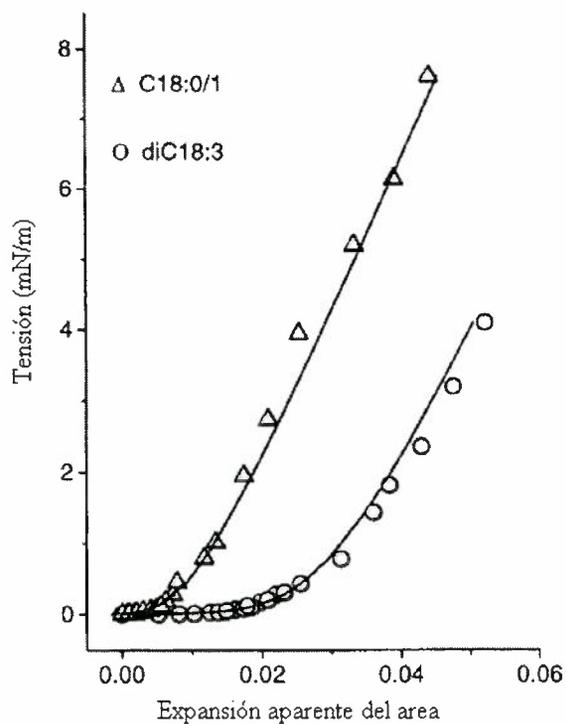
También podemos observar como aumenta enormemente la resistencia a deformarse cuando se le agrega colesterol en SOPC.

Lípido ⁹	κ (10^{-12} din/cm)	K (din/cm)
DAPC (18°C)	0.44 ± 0.05	135 ± 20
DGDG (23°C)	0.44 ± 0.03	160 ± 7
DMPC (29°C)	0.56 ± 0.06	145 ± 10
SOPC (18°C)	0.90 ± 0.06	190 ± 10
SOPC:CHOL (15°C)	2.46 ± 0.39	640 ± 32

Tabla 4.1. Mediciones de los módulos elásticos^(Rawicz 1990)

Fig. 4.3.^(Hung 2002) Grafica lineal de la tensión vs. K_{app} . La forma exponencial del inicio nos revela que las fluctuaciones térmicas se van suavizando, la cual es seguida de un incremento lineal en la tensión cuando la membrana comienza a expandirse. Los lípidos utilizados son:

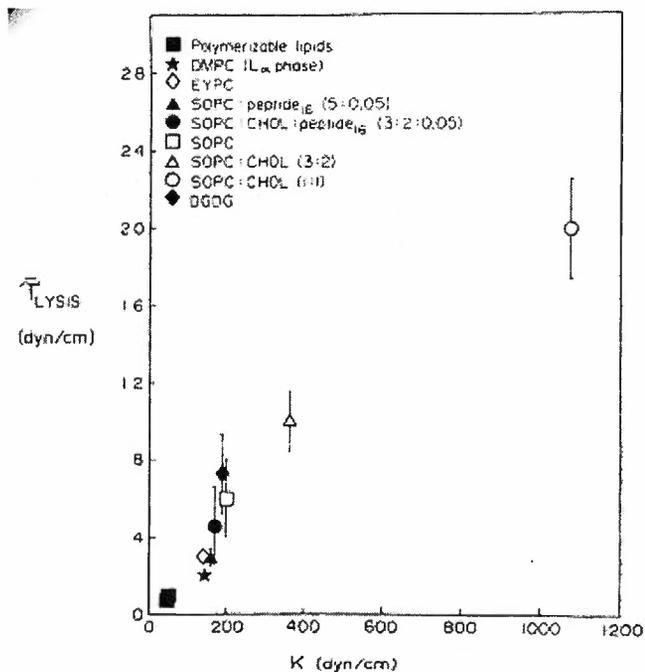
- Δ : 1-stearoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-fosfolina
- O : 1,2-dilinolenoyl-sn-glycero-3-fosfatidilcolina



⁹ DAPC: diarachidonoil fosfatidilcolina, DGDG: diagalactoil diacilglicerol, SOPC:CHOL es una mezcla 1:1 de SOPC y colesterol

El método de micropipetas también nos sirve para medir la tensión de lisis, al igual que vimos en el capítulo 2 con el proceso de extrusión, creando también un gradiente de presión hasta que la vesícula revienta. En la figura 4.4 encontraremos algunos valores para la tensión de lisis proporcionados por la literatura.

Fig. 4.4. Tensión de lisis medida con la técnica de micropipetas, podemos observar que los liposomas mas difíciles de romper son compuestos de fosfolípido y colesterol.



Conclusiones

En este trabajo hemos estudiado algunos conceptos relacionados con membranas biológicas. Estas son estructuras complejas formadas por una bicapa de fosfolípido.

Para estudiar sus propiedades se preparan membranas modelo, las cuales adquieren la forma de agregados esféricos uni o multilamelares, llamados vesículas o liposomas.

Hemos visto que existen diferentes métodos de preparación de liposomas, dependiendo del tipo de aplicación deseada. El método de rehidratación resulta en vesículas grandes, polidispersas en tamaño y forma, las cuales se pueden romper aplicando energía mecánica, como en los métodos de extrusión o sonicación, los cuales brindan vesículas pequeñas de tamaño controlado. Por último, el método de electroformación proporciona vesículas gigantes, las cuales pueden utilizarse para estudiar las propiedades mecánicas de membranas.

En este trabajo estudiamos los distintos métodos de formación de vesículas, los cuales también nos proporcionan un marco de referencia bastante amplio en cuestión de características de las vesículas que produce. Por ejemplo, para el estudio de las propiedades mecánicas con micropipetas, las vesículas que podemos estudiar son *GUV's*, ya que debido a su tamaño, son fácilmente observables por medio del microscopio. Pero si lo que se desea es una población de vesículas homogénea tenemos que utilizar el método de extrusión y hacer pasar la muestra a través del extrusor hasta que se obtenga la homogenización adecuada.

El método que produce vesículas más pequeñas, del orden de 15 nm es el método de Sonicación. Aquí, el proceso de cavitación es el que genera diferencias de presión y temperatura a nivel local que rompen los agregados, pudiendo formar agregados más pequeños.

Con el método de micropipetas podemos caracterizar las vesículas dependiendo de los constituyentes que contenga, por ejemplo, Al variar los parámetros como la

longitud de las colas hidrofóbicas varia el modulo elástico y el modulo de expansión. Al igual podemos encontrar variaciones marcadas cuando se agrega a la membrana colesterol.

Son importantes estos módulos ya que se relacionan con que tan fácil se puede deformar la membrana e inclusive romper, lo que podemos aprovechar para aplicar los liposomas en campos como medicina, cosméticos y otros.

Este trabajo de tesis fue diseñado con la finalidad de poder implementar las técnicas de formación de liposomas en nuestro laboratorio, así como para comprender el funcionamiento básico de las micropipetas

Apendice

Propiedades físicas de los lípidos

En este apéndice se discute el comportamiento que toman ciertos lípidos al mezclarse con agua, así también, la variación de sus propiedades físicas con la temperatura y concentración. Es de suma importancia el comprender este tipo de fenómenos ya que la respuesta de las membranas celulares a la acción de agentes externos está íntimamente ligada con las propiedades intrínsecas de los lípidos.

Estados físicos de los lípidos

Los estados físicos de los arreglos que forman los fosfolípidos al auto ensamblarse, comúnmente son llamadas fases liotrópicas, ya que dependen tanto de la concentración de fosfolípido como de su temperatura.

Nomenclatura

La nomenclatura mayormente utilizada y comprendida es la propuesta por Luzzati, (Luzzati 1968) la cual también utilizaremos en el desarrollo del tema. El tipo de arreglo que obtienen los fosfolípidos se denota por una mayúscula, L para la fase lamelar, H para la fase hexagonal y Q para la fase cúbica. También, estas fases se pueden presentar en fases normales (aceite en agua) e inversas (agua en aceite), denotando los subíndices I y II respectivamente para los dos tipos de fase. Se utilizan letras del alfabeto griego para diferenciar el estado de las cadenas de hidrocarburos: β para la fase gel, α para la fase líquida, $\alpha\beta$ para la fase de coexistencia gel-líquida y δ para una conformación helicoidal en espiral de las cadenas. El subíndice c se utiliza frecuentemente para representar un arreglo cristalino en las colas

Tipos de fase liotrópicas

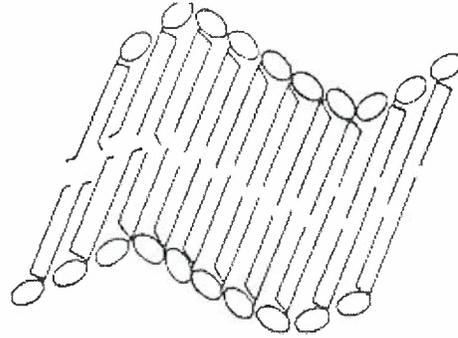
La presentación de fases en los agregados de los fosfolípidos depende, tanto de la concentración como de la temperatura a la cual se encuentra, a esto se le conoce como fase liotrópica. Los lípidos tienden a formar estos agregados debido a su naturaleza dual,

es decir, por mantener sus partes liposolubles fuera del alcance del agua.

Fase lamelar

- Fase lamelar cristalizada 3-D. Esta fase lamelar (L_c) se puede obtener a bajas temperaturas y/o mediante hidratación para la mayoría de los fosfolípidos. Esta fase tiene un orden en 3 dimensiones, lo que lo hace un cristal. Son anhídridos, pero pueden contener un número de moléculas de agua.
- Fase lamelar cristalizada 2-D. Hay una fase llamada sub-gel, es una fase más ordenada que existe debajo de la fase gel. Consiste en capas cristalinas que no presentan un arreglo regular y se le ha llamado cristal bidimensional. Para los lípidos cargados, las bicapas cristalinas se pueden expandir mediante repulsiones electrostáticas. (McIntosh 1986)
- Fase lamelar 2-D. Existe un número de fases que están parcialmente desordenadas, y exhiben un orden traslacional en dos dimensiones. Esta fase es la base de estructuras lamelares. La fase ondulada $P_{\beta'}$ (Fig. A.1) ocurre abajo de la fase L_{α} en función de la temperatura y ha sido observada en fosfatidilcolinas (A. Tardied 1973) a PH neutro, y en fosfatidiletanolamina (J. Stumpel 1980).
- Fase lamelar ordenada 1-D. En esta fase, las moléculas son acomodadas en bicapas, las cuales están apiladas una sobre otra (multilamelar) con capas de agua entre las bicapas. Las bicapas están a la misma distancia y son paralelas a las otras. El grosor de la capa de agua depende de factores como el contenido de agua, temperatura, tamaño de la parte hidrofílica, polaridad y carga. En la región de los hidrocarburos, el arreglo puede ser en fase gel o fase gel-liquida ($\alpha\beta$).

Fig. A.1.- La fase ondulada $P_{\beta'}$ ocurre bajo la fase L_{α} como función de la temperatura



Fases fluidas

- Fase fluida lamelar 1-D. Arriba de cierta temperatura característica o bajo la influencia de la combinación de agua y temperatura, las cadenas llevan a cabo una transición de fase gel o β' a una conformación líquida L_{α} . En esta transición, el área interfacial por molécula sufre una expansión del 15-30%^(Cevc 1993)
- Fase fluida 2-D. La forma más conocida de las fases fluidas bidimensionales son las que tienen topología hexagonal. Las cadenas son fluidas, y se pueden formar fases normales e inversas. La fase H_{II} es muy común en fosfolípidos como PE, debido a que tiene el grupo polar hidratado débilmente y tiene interacciones atractivas entre los grupos polares

Lípidos en solución: monómeros y micelas

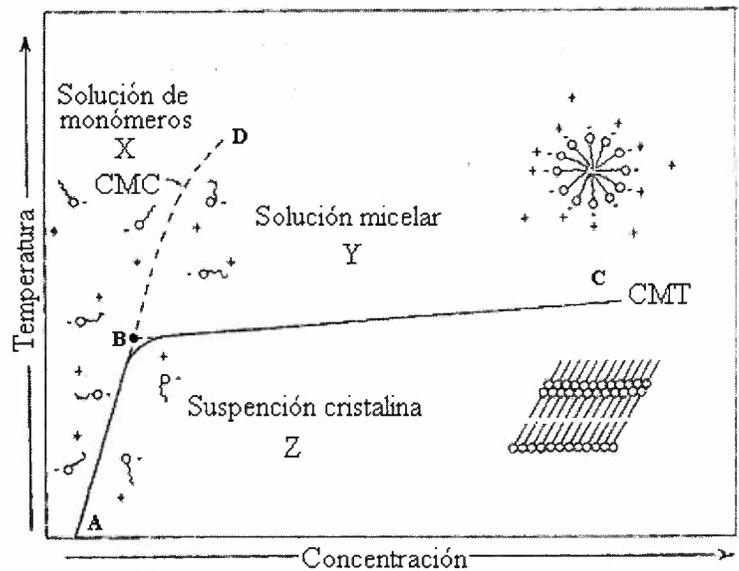
La solubilidad real de los lípidos en agua es muy baja. Un gran número de lípidos, como los ácidos grasos, tienen solubilidad que puede medirse en soluciones reales. La solubilidad es menor debajo del punto de fusión que arriba de este, y para cualquier temperatura dada, esta decrece al aumentar el largo de las cadenas, o cuando el tamaño de la parte hidrofóbica aumenta. Estos lípidos tienen baja solubilidad como monómeros, pero, espontáneamente, cuando se sobrepasa la solubilidad real, se forman agregados de moléculas llamadas micelas. Estas soluciones se llaman soluciones micelares

Soluciones micelares

Una solución micelar es un sistema termodinámicamente estable formado espontáneamente en agua cuando se encuentra por encima de una concentración y temperatura crítica.

En soluciones acuosas muy diluidas, estos lípidos están presentes como una solución de moléculas sin asociarse. Cuando la concentración de lípido aumenta (siempre que la temperatura sea alta para causar un cambio de fase en las cadenas (acuosas)), las micelas se forman espontáneamente en un rango de concentración crítica mediante la asociación de las partes hidrofóbicas de las moléculas. El grupo hidrofílico se mantiene en el ambiente acuoso, formando un escudo hidrosoluble alrededor de las partes hidrofóbicas. La formación de micelas se lleva a cabo solo arriba de una cierta concentración de soluto, llamada concentración micelar crítica (CMC) y a una temperatura en la solución por encima de la temperatura micelar crítica (CMT).

Figura 4. Comportamiento de lípidos solubles a altas concentraciones de agua en función de la temperatura y concentración. La temperatura es graficada sobre la ordenada y la concentración sobre la abscisa. Las micelas se producen en la región Y. En esta región, las moléculas anfifílicas se encuentran arriba de la curva **BD** y arriba de la temperatura indicada por **BC**. **BD** es la CMC. Entonces, la CMC varía a lo largo de la curva **BD** con la temperatura. La solución también se debe encontrar arriba de una cierta temperatura definida por la curva **BC**, la cual indica la temperatura de transición del estado cristalino a la solución micelar. El punto **B**, en el cual la CMC y la CMT se unen recibe el nombre de punto Krafft.^(M. 1971) Puede ser considerado como un punto triple e indica la CMT a la CMC



Bibliografía

- A. Tardied, V. L. a. F. C. R. (1973). "Structure and polymorphism of the hydrocarbon chains of lipids." *J. Mol. Biol.* **75**: 711-733.
- Brown, K. T. (1986). Advanced micropipette technique for cell physiology.
- Cevc, G. (1993). "Handbook of phospholipids."
- D.D., L. (1991). "Formation of membranes." *Nature* **351**(163).
- Evan Evans, D. N. (1987). "Physical Properties of Surfactant bilayer Membranes: Thermal transitions, Elasticity, Rigidity, cohesion and colloidal interactions." *J. Phys. Chem* **91**: 4219-4228.
- Fraley, R. T., S. Subramani, P. Berg and D. Papahadjopoulos (1980). "Introduction of liposome encapsulated SV40DNA into cells." *J. Biol. Chem.* **255**: 10431-10435.
- Friskén, P. J. P. a. B. J. (2003). "The Pressure-Dependence of the Size of Extruded Vesicles." *Biophysical Journal* **85**: 996-1004.
- Giuseppe Maulucci, M. D. S., Giuseppe Arcovito, Federico Boffi, y Agostina Congiu Castellano, (2005). "Particle size distribution in DMPC vesicles undergoing different sonication times." *Biophys. J* **88**: 3545-3550.
- Gorter, E. G., F. (1925). "On biomolecular layers of lipids on the chromocytes of blood." *J. Exp. Med.* **41**: 439-443.
- Hauser, H., Pascher, I., Pearson, R. H., and Sundell, S. (1981). "Preferred conformation and molecular packing of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine." *biochimestri biophysics* **650**: 21.
- Helfrich, S. (1984). *Nuovo Cimento* **D3**: 137.
- Helfrich, W. (1974). "The size of sonicated vesicles." *Phys. Lett.* **6 50a**: 115-116.
- Hicks, J. J. (1999). *Bioquímica*. Madrid.
- Hope, M. J., M. B. Bally, G. Webb, and P. R. Cullis (1985). "Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure: characterization of size, trapped volume and ability to maintain a membrane potential." *Biochim. Biophys. Acta.* **812**:55-65.
- Hung, L. (2002). "INTERFACIAL TENSION EFFECT OF ETHANOL ON LIPID BILAYER RIGIDITY, STABILITY, AND AREA/MOLECULE: A MICROPIPETTE ASPIRATION APPROACH." *Langmuir* **18**: 2988-8995.
- Ipsen, J. R. H. a. J. H. (2004). "Measurement of membrane elasticity by micro-pipette aspiration." *The European Physical Journal E* **14**: 149-167.
- J. Stumpel, K. H., and H. eibl (1980). "Charged induced pretransition in phosphatidylethanolamine multilayers: The occurrence of ripples structures." *Biochim. Biophysics Acta* **599**: 464-472.
- Lasic, D. D., P.M. Frederik, M.C.A. Stuart, Y. Barenholz and T.J. McIntosh (1992). "Gelation of liposome interior. A novel method for drug encapsulation." *FEBS Lett.* **312**: 255-258.
- Law, B. A., J.S. King (1991). "Use of liposomes for proteinase addition to cheddar cheese." *J. Dairy Res.* **52**: 183-188.
- Luzzati, V. (1968). X-ray diffraction studies of lipid-water systems.
- M., S. D. (1971). The physico-chemical properties of cholanic acids. Bile acids: Chemistry, physiology and metabolism. D. K. P. P. Nair. **1**: 247-354.

-
- Markus Antonietti, S. F. (2003). "Vesicles and liposomes: A self-Assembly Principle Beyond Lipids." Advanced Materials **15**: 1323-1327.
- Marquez, E. F. (2000). "Size and Stability of Catanionic Vesicles: Effects of Formation Path, Sonication, and Aging." Langmuir **16**: 4798-4807.
- McIntosh, A. E. B. a. T. J. (1986). "Structure of the cristalline bilayer in the subgel phase of phosphatidylglycerol." Biochemistry **25**: 299-305.
- Pascher, I., Sundell, S., and Hauser, H. (1981). "Polar group interaction and molecular packing of membrane lipids." J. mol. Biol. **153**: 807.
- Rawicz, E. E. a. W. (1990). "Entropy-Driven Tension and Bending elasticity in condensed fluid membranes." Physical review letters **64**: 2094.
- Senior, J., Delgado (1991). "Influence of surface hydrophilicity of liposomes and their interactions with plasma proteins and clearance from the circulation: studies with PEG-coated vesicles." Biochim. Biophys Acta **77**: 1062.
- Singer S.J., a. N., G.L. (1972). "Fluid Mosaic." Science **175**: 120.
- W. Rawicz, K. C. O., T. McIntosh, D. Needham, and E. Evans (2000). "Effect of Chain Length and Unsaturation on Elasticity of Lipid Bilayers." Biophysical Journal **79**: 328-339.
- www.avantilipids.com.
- Zasadzinski, J. A. N. (1986). Biophys. J **49**: 1119.