



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
SAN LUIS POTOSÍ
INSTITUTO DE FÍSICA



TESIS DE MAESTRÍA

Interacción de nanoestructuras de carbono con vesículas gigantes como modelo de membranas celulares

Autor:

Carlos Alejandro MORENO
AGUILAR

Co-Asesor:
Dra. Mildred QUINTANA RUIZ

Co-Asesor:
Dr. Said Eduardo ARANDA
ESPINOSA

*Proyecto de Tesis que se presenta para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Físicas*

Septiembre de 2015

“The important thing in science is not so much to obtain new facts as to discover new ways of thinking about them.”

–William Lawrence Bragg

Agradecimientos

Primero que nadie, doy gracias a Dios por permitirme dar un paso más en mi carrera. Hoy soy quien soy gracias a Ti.

También agradezco a mis padres: Blandina Aguilar Muñoz y Raymundo Moreno López. Gracias por su esfuerzo y dedicación para hacernos hombres de bien a mí y a mi hermano. Estoy muy orgulloso de poder llamarlos PAPÁS.

Gracias a mi hermano: Gerardo Enrique Moreno Aguilar, por todos los momentos divertidos y las anécdotas que hemos vivido juntos. Gracias por siempre tener una palabra de aliento para mí y por esas noches de desvelos contando historias graciosas.

A Verónica Pérez Luna. Gracias amor, por siempre estar para mí incondicionalmente. Gracias por tu apoyo y tus sabios consejos desde antes, durante y ahora también después de este proyecto.

A mis asesores: la Dra. Mildred Quintana y el Dr. Said Aranda, gracias por estar siempre al pendiente de este proyecto, por su apoyo y enseñanzas.

Gracias a mis compañeros de maestría: Daniel Martínez, Leonardo Núñez, Ivany Romero y Roberto Padrón. Gracias por esas noches de desvelo en el instituto, en las cuales no solo aprendí de las materias, sino también, que puedo contar con ustedes en cualquier situación.

Gracias a todos mis compañeros de laboratorio, porque trabajar nunca fue más divertido que cuando se está en compañía de ustedes.

Finalmente gracias a las instituciones que hicieron posible este trabajo, CONACYT y la Red Mexicana de Materia Condensada Blanda.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

Resumen

Instituto de Física

Maestría en Ciencias (Física)

Interacción de nanoestructuras de carbono con vesículas gigantes como modelo de membranas celulares

por Carlos Alejandro MORENO AGUILAR

El carbono es un elemento muy versátil, capaz de formar un sinnúmero de compuestos químicos. Existen distintos alótropos nanométricos de este elemento que poseen propiedades de gran interés para la industria y la nanomedicina. Sin embargo, aun se desconocen en gran medida los efectos que estas nanoestructuras causan a los organismos vivos; en particular, los nanotubos de carbono (CNTs) son unos de los alótropos del carbono de gran interés para la nanomedicina por su habilidad de internalizarse en células de mamíferos.

En este trabajo, utilizamos vesículas gigantes de una sola bicapa (GUVs, por sus siglas en inglés) como modelo experimental, para estudiar la interacción de nanotubos de carbono multicapa con membranas biológicas modelo. Para analizar los efectos que estas nanoestructuras causan en las membranas de las GUVs utilizamos la técnica de electrodeformación, que nos permite calcular las propiedades mecánicas de las membranas, como son la dureza de doblado κ_c y el módulo de estiramiento λ . Y mediante microscopía confocal observamos la interacción de los CNTs con los lípidos en las membranas de GUVs.

Se compararon las propiedades mecánicas de vesículas en presencia y ausencia de MWNTs y se encontró que los nanotubos causan un incremento en la dureza de doblado de las bicapas, así como en su módulo de estiramiento. Mediante microscopía confocal se encontró que los MWNTs interactúan con las membranas de las vesículas y que además pueden penetrarlas y localizarse en su interior.

Índice General

Agradecimientos	II
Resumen	III
Índice General	IV
Índice de Figuras	VI
Índice de Tablas	VIII
Abreviaciones	IX
1. Introducción	1
1.1. Nanoestructuras de Carbono	1
1.1.1. Nanotubos de carbono y sistemas biológicos	6
1.2. La membrana plasmática	8
1.2.1. Estructura de la membrana celular	10
1.3. GUVs: Un modelo experimental de la membrana plasmática	17
1.3.1. GUVs en campos eléctricos alternos	19
1.4. Antecedentes	26
1.5. Justificación	27
1.6. Objetivos	29
1.6.1. Objetivo general	29
1.6.2. Objetivos particulares	29
Referencias	31
2. Metodología Experimental	35
2.1. Vesículas Gigantes de una sola bicapa	35
2.1.1. Método de electroformación	35
2.1.2. Electrodeformación	39
2.2. Microscopía óptica	42
2.2.1. Microscopía de contraste de fases	42
2.2.2. Microscopio confocal y fluorescencia	43

Referencias	46
3. Propiedades mecánicas de los Sistemas GUVs –MWNTs	47
3.1. Introducción	47
3.2. Resultados	48
3.2.1. GUVs de EYPC	49
3.2.2. GUVs en presencia de MWNTs	52
3.3. Conclusiones	59
Referencias	60
4. Análisis de la interacción GUVs con MWNTs mediante microscopía confocal	61
4.1. Introducción	61
4.2. Resultados	62
4.2.1. fGUVs con MWNTs	62
4.3. Conclusiones	69
5. Conclusiones y Perspectivas	71
5.1. Conclusiones	71
5.2. Perspectivas	73
Referencias	76

Índice de Figuras

1.1.	Alótropos nanométricos del carbono	2
1.2.	Nanotubos de carbono	5
1.3.	Endocitosis de CNTs funcionalizados con proteínas	7
1.4.	Difusión de CNTs a través de la membrana celular	8
1.5.	Diagrama de un fosfolípido	10
1.6.	Fosfolípidos más abundantes en las membranas de mamíferos	11
1.7.	Influencia de la geometría molecular en el ensamblado de estructuras	12
1.8.	Estructura del colesterol	14
1.9.	Dibujo original del modelo del mosaico fluido	15
1.10.	Reconstrucción 3D de la membrana plasmática	16
1.11.	Esquema de una vesícula	18
1.12.	Tipos de vesículas	18
1.13.	Imagen típica de GUVs vistas con contraste de fases.	19
1.14.	Diagrama de fases de la deformación de vesículas	20
1.15.	Sistema de coordenadas y deformaciones en las vesículas	22
1.16.	Gráfica típica de la deformación de una vesícula	23
1.17.	GUVs incubadas con CNTs funcionalizados con FITC.	26
2.1.	Ensamblado de la cámara de electroformación	37
2.2.	Cámara de fusión	40
2.3.	Moléculas fluorescentes	44
2.4.	Diagrama del fenómeno de fluorescencia	44
2.5.	Diagrama de un microscopio confocal	45
3.1.	Vesículas deformadas por un campo eléctrico alterno	49
3.2.	“Cadena de perlas” de vesículas de EYPC	50
3.3.	Gráfica de la deformación de GUVs de EggPC	51
3.4.	Respuesta al campo eléctrico por vesículas incubadas con MWNTs 20-30	53
3.5.	Gráfica de la deformación de GUVs de EggPC con MWNTs 20-30	54
3.6.	“Cadena de perlas” de GUVs incubadas con MWNTs 20-30.	56
3.7.	Respuesta al campo eléctrico por vesículas incubadas con thin- MWNTs.	57
3.8.	Gráfica de la deformación de GUVs de EYPC con thin-MWNTs.	57
4.1.	GUVs fluorescentes	62

4.2. Rebanada óptica del sistema de fGUVs con MWNTs 20-30	63
4.3. Canales de color separados del sistema de fGUVs con MWNTs 20-30	65
4.4. Rebanada óptica del sistema de fGUVs con thin-MWNTs	67
4.5. Canales de color separados del sistema de fGUVs con thin-MWNTs	68

Índice de Tablas

2.1. Condiciones y tiempos para la electroformación de GUVs	38
2.2. Condiciones y tiempos para la electroformación de GUVs fluorescentes	39
2.3. Tabla de condiciones para la electrodeformación	41
5.1. Tabla comparativa de las durezas de doblado	71

Abreviaciones

CNTs	C arbon N ano T ubes
EggPC	E gg P hosphatidyl C holine
EYPC	E gg Y olk P hosphatidyl C holine
GUVs	G iant U nilamellar V esicles
ITO	I ndium T in O xide
LUVs	L arge U nilamellar V esicles
MWNTs	M ulti W alled N ano T ubes
PCh	P hosphatidyl C holina
PE	P hosphatidyl E thanolamine
PS	P hosphatidyl S erine
REL	R eticulo E ndoplásmico L iso
RER	R eticulo E ndoplásmico R ugoso
SM	S phingo M yelin
SUVs	S mall U nilamellar V esicles
SWNTs	S ingle W alled N ano T ubes
TEM	T ransmission E lectron M icroscopy

*Para mis papás:
Raymundo Moreno López y Blandina Aguilar Muñoz*

Capítulo 1

Introducción

1.1. Nanoestructuras de Carbono

El carbono es un elemento que se encuentra presente en una gran cantidad de compuestos químicos, componiendo un 0.027%^[3] de la corteza terrestre. Este elemento tiene una química muy versátil y puede formar compuestos tanto orgánicos como inorgánicos.

En su forma elemental, lo encontramos en la naturaleza en diferentes formas alotrópicas¹, las más comunes son el grafito y el diamante. En condiciones controladas de laboratorio se han encontrado más tipos de alótropos del carbono que, a diferencia de los alótropos naturales, sus dimensiones son en el orden de nanómetros (Figura 1.1).

Dentro de los alótropos nanométricos encontramos estructuras como las del grafeno, nanodiamantes, fulerenos y los nanotubos de una pared (SWNT) o de paredes múltiples (MWNT)^[26, 33]. Todas estas nanoestructuras de carbono tienen propiedades químicas y físicas únicas que dependen de la configuración electrónica de los átomos de carbono que los componen.

¹Los alótropos son las estructuras moleculares diferentes que puede formar un mismo elemento, estas estructuras varían en el número de átomos en la molécula, la estructura química y las propiedades fisicoquímicas; por ejemplo, el ozono (O₃) y el oxígeno molecular (O₂) son alótropos del elemento oxígeno^[10].

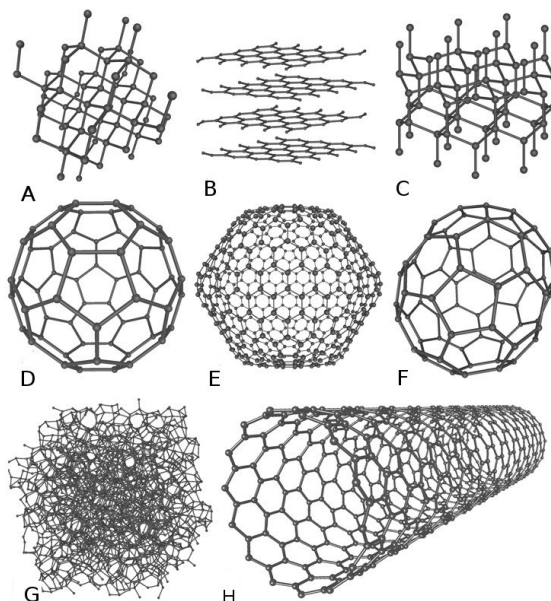


FIGURA 1.1: Alótropos nanométricos del carbono. (A) Nanodiamante. (B) Grafito (C) Lonsdaelita. (D), (E) y (F) Fullerenos de diferente número de carbonos. (G) Carbono amorfo. (H) Nanotubo de carbono.

La química del carbono es muy diversa debido a las configuraciones electrónicas que puede adoptar este elemento, las cuales le permiten formar una gran variedad de estructuras al enlazarse con diferentes átomos. Las distintas configuraciones electrónicas que puede adoptar son hibridaciones de sus orbitales $2s$ y $2p$, pudiendo tener hibridaciones sp , sp^2 y sp^3 . Cada una de estas hibridaciones da pie a una orientación distinta para los electrones de valencia del carbono.

A la hibridación sp la encontramos en los enlaces triples del carbono, formando moléculas lineales; como en el caso de los alquinos $\text{HC}\equiv\text{CH}$.

La hibridación sp^2 también genera un acomodo plano de los electrones de valencia con dos enlaces sencillos y uno doble, los cuales se arreglan en un triángulo equilátero, donde los electrones forman los vértices del mismo y están separados por un ángulo de 120° entre cada uno de ellos.

Finalmente, los carbonos con hibridación sp^3 se caracterizan por formar enlaces sencillos con un acomodo tridimensional, organizando sus electrones de valencia en los vértices de un tetraedro; el ángulo entre los enlaces es de 109.8° ^[33].

En los alótropos moleculares del carbono, nos encontramos con hibridaciones del tipo sp^2 y sp^3 mayoritariamente. En las cuales los átomos de carbono son capaces de formar enlaces dobles y sencillos, respectivamente. A continuación se mencionan algunas características y aplicaciones importantes de los alótropos moleculares del carbono.

Los nanodiamantes (Figura 1.1a) se componen de átomos de carbono con hibridación sp^3 enlazados a manera de tetraedro con otros cuatro átomos de carbono con la misma hibridación. Los nanodiamantes tienen aplicaciones en la industria como abrasivos, recubrimientos galvanizados, y aditivos de lubricantes. En la medicina se ha investigado su uso para la entrega controlada de fármacos y vacunas, agentes antimicrobianos, biosensores, ensayos inmunológicos, entre otros^[27].

Con hibridación sp^2 nos encontramos al grafeno (Figura 1.1b), los fulerenos (Figura 1.1d, e y f) y los nanotubos de carbono (Figura 1.1h). Todas estas estructuras también presentan átomos de carbono con hibridación sp^3 , las cuales se consideran como imperfecciones del material; pero, los que les dan la mayoría de sus propiedades físicas y químicas son los carbonos con hibridación sp^2 .

El grafeno se compone en su mayor parte de átomos de carbono enlazados de manera plana, cada átomo se enlaza con tres átomos más de carbono, formando una red hexagonal. El grafeno tiene aplicaciones en la nanomedicina y en la industria. Sus aplicaciones son tan diversas que los encontramos como candidatos como marcadores en imagenología médica, en dispositivos como nanosensores y nanodetectores, celdas fotovoltaicas, en entrega controlada de fármacos e incluso en terapias contra el cáncer^[4].

Los fulerenos, también conocidos como buckyballs, son estructuras semejantes a balones de fútbol, compuestos por átomos de carbono enlazados formando arreglos hexagonales y pentagonales, los que permiten que sean objetos curvados. Estas estructuras tienen una gran importancia en la industria de la electrónica ya que al doparse con metales alcalinos adquieren propiedades de superconductores. Sus aplicaciones también son muy diversas pues los podemos encontrar en dispositivos

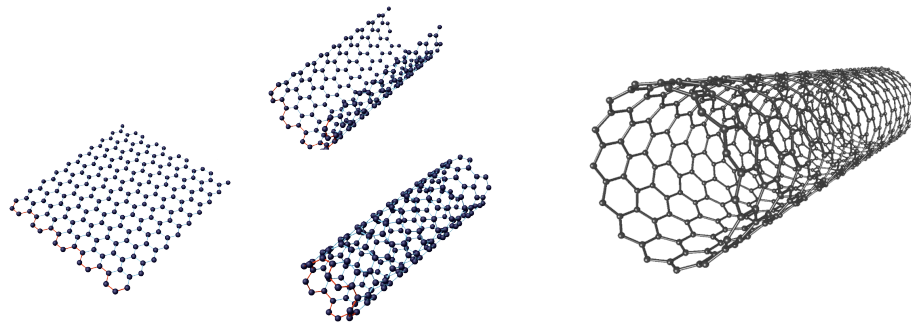
electrónicos como supercapacitores, o en la industria médica como transportadores de fármacos encapsulando en su interior a los compuestos de interés^[30].

Los nanotubos de carbono se pueden considerar como una hoja de grafeno enrollada sobre si misma (Fig.1.2a), de manera que se forme un cilindro. A los nanotubos los podemos clasificar en dos grandes grupos:

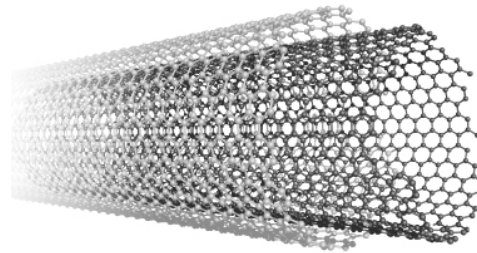
- Nanotubos de una sola pared (SWNT; Figura 1.2b). Los nanotubos de una sola pared poseen características físicas muy particulares, pues dependiendo del enrollamiento de la hoja de grafeno los podemos encontrar con propiedades metálicas o semiconductoras. Los diámetros típicos de estos nanotubos van de 1 a 10 nm; mientras que sus longitudes van desde 50 nm hasta 1 μm ^[26].
- Nanotubos de paredes múltiples (MWNT; Figura 1.2c). Los nanotubos multicapa son siempre metálicos, pues al tener en su estructura un nanotubo de características metálicas, toda la estructura se volverá conductora. Los diámetros típicos de estas estructuras van de 2.5 hasta los 30 nm y sus longitudes desde 10 nm hasta 1 μm ^[26]. En la actualidad se pueden sintetizar con longitudes que alcanzan los centímetros.

Los nanotubos de carbono son un sistema de gran interés en el área de la nanomedicina. Las propiedades más atractivas de estas estructuras para las aplicaciones médicas son, por ejemplo, sus diámetros en la escala nanométrica, que les permiten interactuar con los organismos vivos a nivel molecular; su gran área superficial, la cual se puede aprovechar para unirle grupos funcionales e implementarlos como acarreadores de fármacos; y el hecho de estar compuestos principalmente por carbono, que les permite ser modificados utilizando ciertas reacciones químicas.

Es sabido que estas estructuras, son tóxicas para los organismos vivos cuando no han sido correctamente tratadas. Los CNTs recién formados contienen impurezas metálicas como producto de las reacciones de síntesis. Es debido a esto que se ha frenado el uso de estas nanoestructuras en la medicina, además de los altos costos



(A) Lámina de grafeno enrollada para formar un nanotubo de carbono. (B) Nanotubo de carbono de una sola pared.



(c) Nanotubo de carbono de paredes múltiples.

FIGURA 1.2: Nanotubos de carbono. (A) Diagrama representativos del enrollamiento de una lámina de grafeno para formar un nanotubo. (B) y (C) Esquemas de un SWNT y un MWNT respectivamente.

de producción y la dificultad de producir nanotubos con las mismas propiedades físicas como: quiralidad, longitud, diámetro, número de paredes, etc. Sin embargo, se han realizado diversos estudios en los que se trata de entender cuales son las características de los nanotubos que los vuelven tóxicos, para controlarlas y modificar químicamente a los CNTs, volviéndolos biocompatibles.

En este trabajo nos enfocaremos en la interacción existente entre los nanotubos de carbono puros (“pristine”²), y las membranas biológicas.

²El termino “pristine” se refiere a la pureza de los nanotubos, indicando que no se les ha modificado químicamente

1.1.1. Nanotubos de carbono y sistemas biológicos

Los nanotubos de carbono tienen un gran potencial en el área médica debido a las propiedades tan particulares mencionadas anteriormente. Estos sistemas se tienen como candidatos importantes en diversas aplicaciones, como por ejemplo: los nanosensores, nanomotores, agentes de contraste, biomarcadores y excipientes para la entrega controlada de fármacos, entre otros^[13].

Además, se sabe que los CNTs son capaces de interactuar con células de mamíferos y sus componentes, llegando incluso a internalizarse por dos mecanismos diferentes: uno en el cual la célula participa activamente, llamado endocitosis y otro en el que los CNTs se internalizan sin la intervención de la maquinaria celular, mediante difusión. Gracias a esta habilidad, los CNTs son grandes candidatos para la entrega controlada de fármacos.

En el 2005, Dai et al., reportaron que los CNTs son capaces de internalizarse en células de humano en cultivo, incluso cuando llevaban unidos a su superficie proteínas como la estreptavidina y el citocromo c (Figura 1.3). Ellos reportaron que esta internalización se llevó a cabo mediante endocitosis, ya que en los ensayos de fluorescencia se observó que los CNTs colocalizan con los endosomas en las células incubadas con los CNTs^[11].

También en el 2005, Prato et al., reportaron que los nanotubos se internalizan a las células pasando a través de la membrana celular mediante un proceso de difusión simple, pues al incubar células de humano con los CNTs en presencia de inhibidores de la endocitosis y analizarlas con microscopía de transmisión de electrones (TEM), pudieron observar algunos nanotubos en el proceso de translocación, los cuales se encontraban atravesando la membrana celular (Figura 1.4). Esta configuración de los nanotubos, perpendicular a la membrana celular, sugiere que la internalización de estas estructuras se lleve a cabo mediante un mecanismo similar al de las nanoagujas^[2].

Como estos, existen más reportes en la literatura que tratan de identificar el mecanismo mediante el cual los CNTs entran a las células. Al respecto, podemos

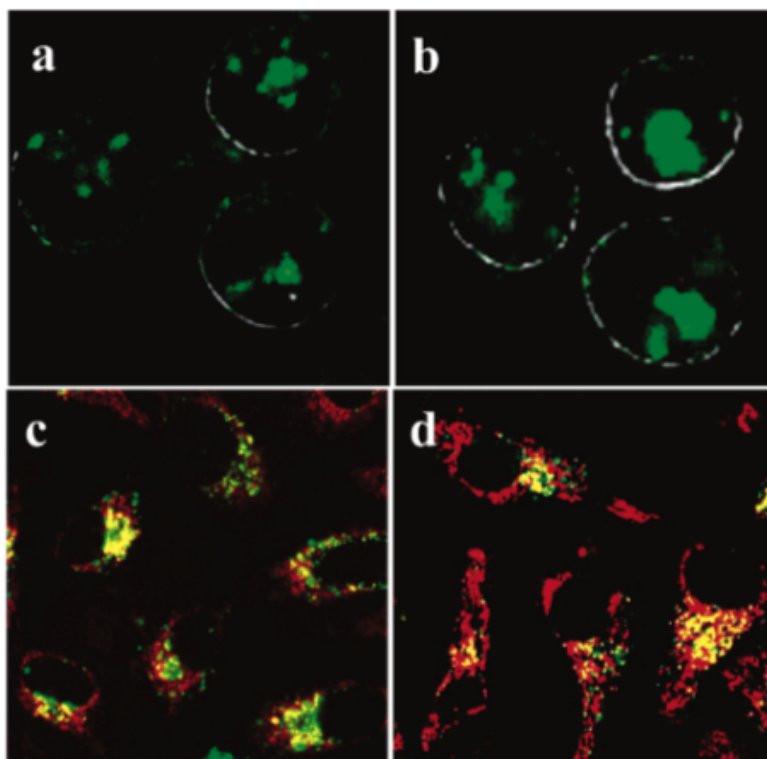


FIGURA 1.3: Microscopía confocal de células tras 2h de incubación con SWNTs funcionalizados con diferentes proteínas (las proteínas fueron marcadas en verde). (A) Células HL60 tras incubación con estreptavidina-CNTs. (B) Células HL60 incubadas con BSA-CNTs. (C) Células HeLa tras incubación con estreptavidina-CNTs en presencia de un marcador rojo para vesículas endocíticas. (D) Células HeLa incubadas con CitocromoC-CNTs en presencia del marcador para vesículas endocíticas.^[11]

concluir que la internalización de los nanotubos de carbono en las células, se puede llevar a cabo mediante endocitosis o mediante difusión. Sin embargo, las condiciones necesarias, que lleven a los nanotubos a internalizarse mediante una vía o la otra, son desconocidas; esto debido a que se sabe muy poco acerca de los mecanismos de interacción existentes entre los CNTs y los organismos vivos, así como los efectos que los nanotubos de carbono causen a nivel celular, dependiendo de sus propiedades físicas y químicas.

Con la finalidad de entender mejor el fenómeno de translocación, es necesario crear un panorama más amplio de la interacción que existe entre los CNTs y las células. Para lograr esto, primero debemos conocer los efectos que causan los CNTs directamente en la membrana, al penetrarla y translocarse.

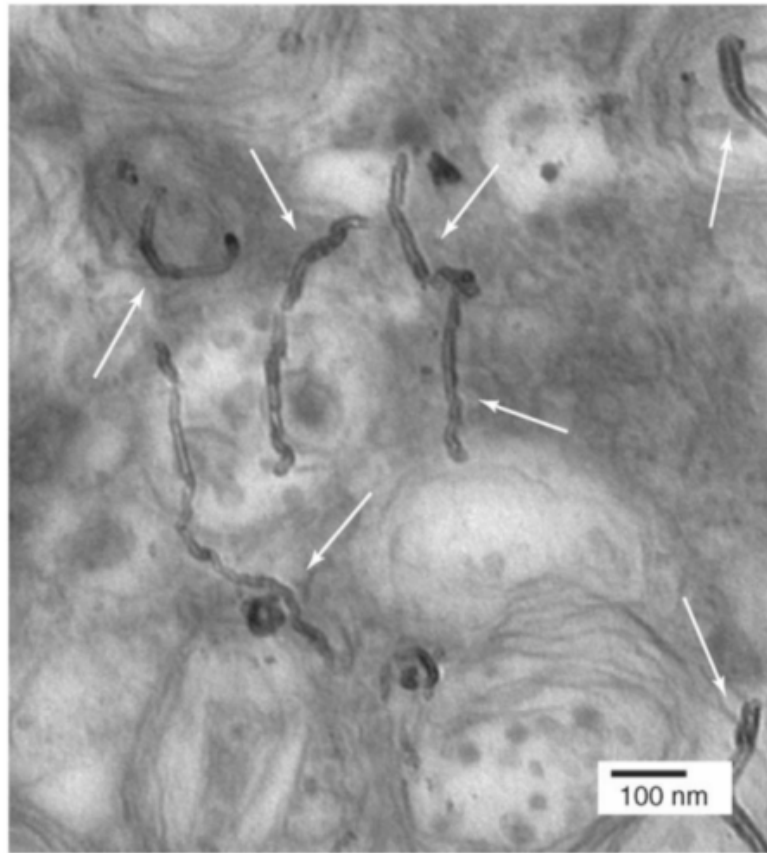


FIGURA 1.4: TEM de una rebanada transversal ultra delgada (90nm) de células HeLa incubadas con MWNTs, en presencia de inhibidores de la endocitosis.^[2]

Es por esto que en este trabajo proponemos analizar los efectos que causan los CNTs, en sistemas modelo que representen a una célula.

1.2. La membrana plasmática

A los organismos los podemos clasificar en dos grandes grupos: eucariontes y procariontes. Estos grupos tienen muchas diferencias, la más notoria es que los eucariontes son organismos compartimentalizados; es decir, tienen organelos delimitados por membranas en su interior, mientras que los organismos procariontes no están estructurados de esta manera. Sin embargo, ambos grupos coinciden en un aspecto muy importante: tienen una membrana lipídica que los delimita del exterior, a la cual conocemos como membrana citoplasmática.

La membrana celular o membrana citoplasmática es la primer barrera que delimita el interior de las células. Está compuesta por una mezcla de lípidos y proteínas que interactúan unos con otros y con los componentes del citoplasma, esta interacción previene la difusión libre de los constituyentes membranales, confinándolos a ciertas regiones^[6, 19]. La membrana celular no sólo se encarga de delimitar el interior de la célula, sino que también se encarga de una gran cantidad de actividades como la internalización de nutrientes y sustancias; la interacción con las superficies de otras células y estructuras mediante sitios de adhesión, transduciendo señales mecánicas; hasta la excreción de desechos y sustancias como péptidos y moléculas que sirven como señales para otras células.

La membrana plasmática es en extremo dinámica, y gracias a ella es que existe comunicación entre el medio extracelular y el interior de la célula. Una manera en que se transmite información a través de la membrana es mediante el uso de vesículas secretorias, las cuales son pequeñas regiones de la membrana celular que se pliegan formando compartimentos aislados, almacenando diferentes tipos de sustancias de importancia para la comunicación intercelular.

Incluso en el interior de las células eucariontes, la membrana desempeña una gran cantidad de funciones, como delimitar el interior de los organelos (núcleo, mitocondrias, cloroplastos, retículo endoplásmico, etc.), servir de reservorio de iones calcio Ca^{+2} (REL), ayudar a la síntesis de proteínas membranales (RER), almacenar y transportar nutrientes (aparato de Golgi), servir de andamio molecular para el metabolismo llevado a cabo por las proteínas (mitocondria), entre muchas otras funciones^[1].

En la siguiente sección se discutirá la estructura de la membrana plasmática, desde las primeras nociones acerca de ésta, hasta las que dieron pie al modelo actualmente aceptado, incluyendo la importancia de un modelo de estudio de la membrana plasmática.

1.2.1. Estructura de la membrana celular

La membrana celular es una estructura compuesta en su totalidad por moléculas anfifílicas, que como se mencionó anteriormente, son en su mayoría lípidos y proteínas. La mayor parte de los lípidos que componen a la membrana citoplásmica son fosfolípidos. En cambio, las proteínas de la membrana son de una gran variedad de tipos, desde receptores, transductores de señales y enzimas, proteínas estructurales, canales y transportadores.

Los fosfolípidos son moléculas anfifílicas, lo cual quiere decir que poseen dos regiones: la primera, a la que llamaremos cabeza, es una región polar o hidrófila; y la segunda, a la que se conoce como colas, es una región hidrófoba (Figura 1.5).

La región hidrófoba de los fosfolípidos está compuesta por cadenas alifáticas, que pueden variar en longitudes, siendo desde 12 hasta 24 carbonos. Usualmente, una cadena posee un doble enlace en configuración “*cis*”, mientras que la otra no. El número de enlaces dobles de las cadenas, influye en gran medida al acomodo que pueden adoptar los fosfolípidos en la membrana y por lo tanto, también modifica la fluidez de la misma.

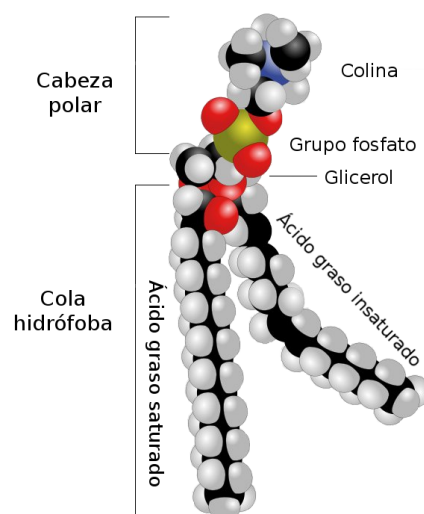


FIGURA 1.5: Diagrama de un fosfolípido. Los fosfolípidos tienen dos regiones de interés, una región polar y una no polar.

Podemos clasificar a los fosfolípidos que componen las membranas en dos principales grupos: fosfoglicéridos y esfingolípidos. Los primeros son los más abundantes y su estructura está formada por una molécula de glicerol, la cual tiene unidas dos cadenas de ácidos grasos mediante enlaces tipo éster en átomos de carbono adyacentes. Y en su tercer carbono, tiene unido un grupo fosfato, que a su vez puede unir muchos tipos de grupos funcionales. En la figura 1.6a-c vemos que la estructura común es el glicerol, por lo tanto, a estos fosfolípidos los llamamos fosfoglicéridos.

Los esfingolípidos están formados por una molécula de esfingosina (Figura 1.6e), la cual tiene unida una cadena de un ácido graso en el grupo amino (NH_2) y un grupo fosfato en el último de los grupos hidroxilos. En la figura 1.6d la estructura básica es la esfingosina (Figura 1.6e) por lo que a estos fosfolípidos los llamamos esfingolípidos. En la figura 1.6 podemos ver los cuatro diferentes tipos de fosfolípidos que forman mayoritariamente a las membranas de mamíferos.

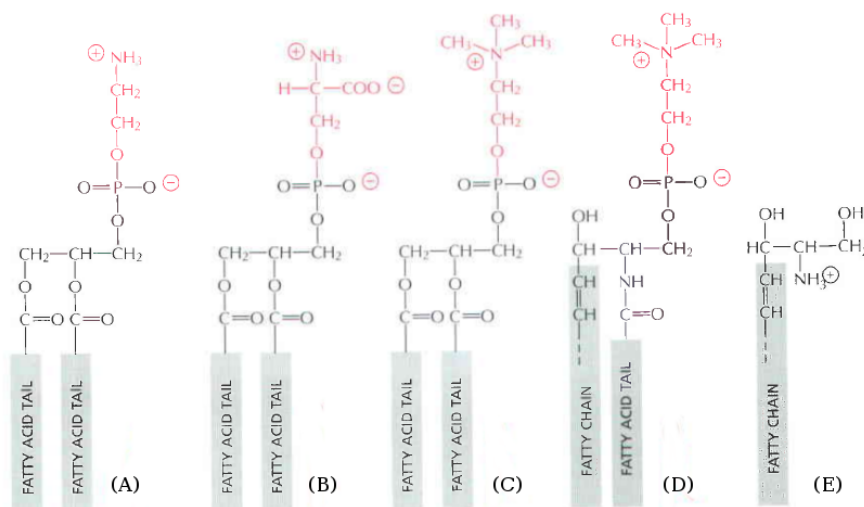


FIGURA 1.6: Fosfolípidos más abundantes en las membranas de mamíferos. (A) Fosfatidiletanolamina (PE); (B) Fosfatidilserina (PS); (C) Fosfatidilcolina (PCh); (D) Esfingomielina (SM); (E) Esfingosina. Nótese que únicamente la fosfatidilserina posee una carga neta negativa

Es debido a su naturaleza anfifílica, que los fosfolípidos se autoensamblan espontáneamente al estar inmersos en un medio hidrófilo: de tal forma que las colas hidrófobas de estas moléculas quedan escondidas del medio, agregándose entre si;

mientras que las cabezas polares permanecen expuestas al exterior, cubriendo el interior hidrófobo de la bicapa.

La geometría de las moléculas es de gran influencia en la estructura que obtienen las membranas al ensamblarse. Podemos encontrar un sinnúmero de moléculas anfifílicas en la naturaleza con diferentes geometrías. Las mas comunes poseen geometrías cilíndricas y cónicas (Figura 1.7). Dependiendo de la geometría de cada molécula y de su concentración, se forman diferentes estructuras lipídicas, dentro de las que encontramos a las micelas, bicapas, y vesículas.

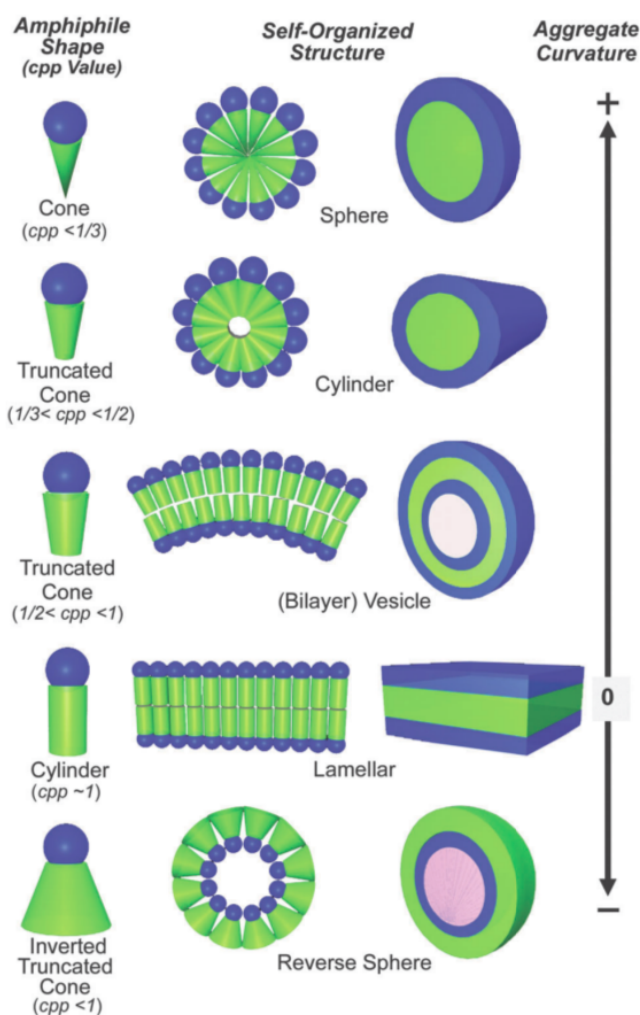


FIGURA 1.7: Influencia de la geometría en el ensamblado de estructuras. Esquema representativo de las estructuras autoensambladas por agregados de moléculas de diferentes geometrías. Imagen tomada de la referencia [24].

Los fosfolípidos tienen una simetría cilíndrica, por lo tanto, estos tienden a formar membranas planas. Sin embargo, al formar estas estructuras, se generan regiones

en la periferia de la membrana de gran hidrofobicidad; por lo que eventualmente, las bicapas planas tienden a cerrarse sobre ellas mismas para cubrir estas regiones hidrófobas, formando compartimentos esféricos cerrados, a los cuales se les conoce como vesículas (Figura 1.7).

Esta bicapa lipídica sirve de límite entre la parte interna y la externa de la célula, pues por su carácter hidrófobo, la membrana es casi totalmente impermeable a distintas moléculas hidrófilas.

Además de tener fosfolípidos, las membranas de células eucariontes contienen grandes cantidades de colesterol, comprendiendo hasta el 50% de su composición lipídica^[1]. El colesterol confiere mayor rigidez a la membrana al intercalarse entre las moléculas de fosfolípidos, impidiendo que éstos difundan fácilmente. Esto sucede porque a temperatura ambiente el colesterol se encuentra en un estado ordenado, a diferencia de los lípidos que son L_α , el cual es un estado desordenado que confiere el carácter de fluidez a la membrana³. Esta molécula es un esterol, está compuesta por una estructura rígida de anillos, a la cual están unidos un grupo hidroxilo (OH) y una cadena lipídica corta (Figura 1.8). El colesterol se orienta en la membrana, con su grupo hidroxilo cerca de las cabezas polares de los fosfolípidos adyacentes y con su cadena lipídica cerca de las cadenas no polares de los fosfolípidos.

Resumiendo, hasta el momento hemos hablado de los mayores componentes de las membranas plasmáticas (lípidos, colesterol, proteínas), sin embargo, aun no tenemos una imagen clara de como luce una membrana celular. El primer modelo que explicaba la membrana celular fue propuesto en 1972 por Singer y Nicholson, ellos lo llamaron *Modelo del Mosaico Fluido*. En este modelo, ellos recabaron la información obtenida hasta ese momento acerca de los componentes de la membrana plasmática, mismos que ya se han mencionado, además de incluir imágenes de microscopía electrónica de transmisión de membranas celulares. El modelo del

³Los lípidos en las membranas pueden adoptar diferentes fases dependiendo del ordenamiento que presenten las moléculas. Las principales fases son L_c o subgel, la cual es una fase muy ordenada; L_β o gel, que es ligeramente mas hidratada que la anterior; por último L_α o líquido cristalina, la cual es la de mayor importancia fisiológicamente y es la más desordenada de las tres fases^[12].

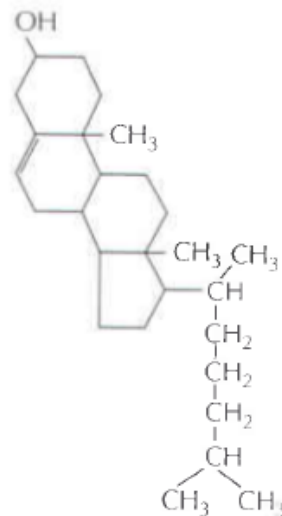


FIGURA 1.8: Estructura del colesterol.

mosaico fluido plantea a la membrana como una estructura formada por una matriz de fosfolípidos: los cuales se arreglan en una estructura de bicapa discontinua, con las cabezas polares hacia el medio acuoso y las colas hidrófobas en el interior (justo como se mencionó anteriormente); en dicha matriz están embebidas algunas proteínas globulares que se encuentran distribuidas de manera aleatoria por toda la membrana^[28]. Es importante notar que en este modelo los fosfolípidos de la membrana son el “solvente”, en el cual se encuentran inmersas las proteínas.

Aun cuando ya han pasado más de 40 años desde que se propuso esta idea, el modelo del mosaico fluido sigue siendo vigente y útil para explicar algunos fenómenos que ocurren en las membranas celulares. Sin embargo, se han ido agregando y corrigiendo algunos puntos de este modelo. Por ejemplo, es bien sabido que las células endoteliales tienen una organización en una dirección preferencial^[1], lo cual inmediatamente se opone a la propuesta de que las proteínas se encuentran dispuestas al azar en un mar de lípidos. También se sabe que no es un fluido completamente, pues se ha visto que las proteínas no difunden libremente en las membranas celulares, sino que lo hacen pasando por compartimentos^[15, 25]. Además, los mismos fosfolípidos en la membrana plasmática se difunden más lento (existe un confinamiento^[6, 19]) de lo que se esperaría en el modelo de Singer y Nicholson (difusión browniana^[29]), esto debido a que en realidad la membrana no es un continuo de moléculas, sino que existen compartimentos en la membrana que impiden

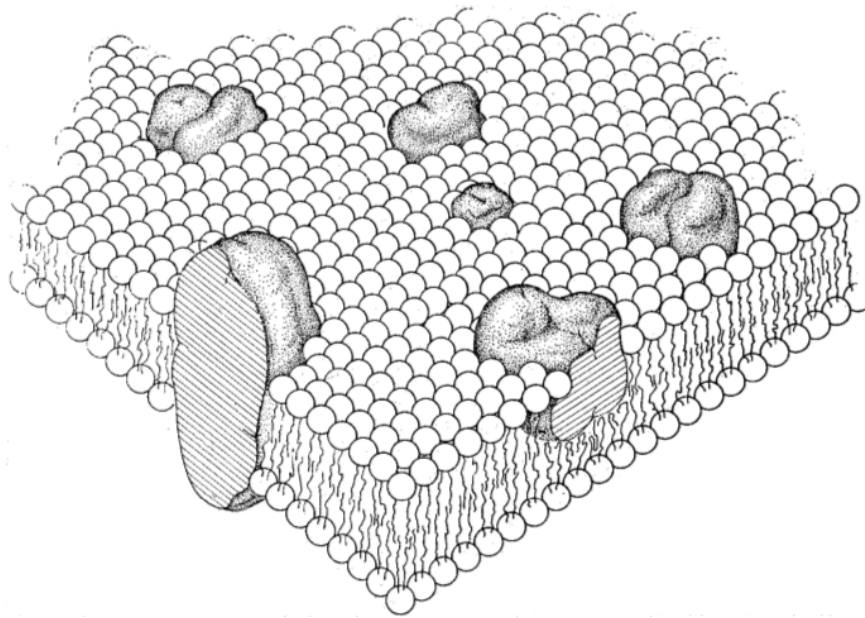


FIGURA 1.9: Esquema del modelo del mosaico fluido. Dibujo original del modelo del mosaico fluido de Singer y Nicholson [28]

la difusión de las moléculas en distancias largas^[8].

Esta compartimentalización se debe a las proteínas del citoesqueleto que se unen a las proteínas de la membrana, manteniendo una estrecha comunicación entre las proteínas del interior de la célula, las de la membrana y las del espacio extracelular. La interacción entre las proteínas del citoesqueleto, de la membrana y los lípidos de la misma, es la causante de formar dominios en la membrana, los cuales modifican las distancias permitidas de difusión de todas las moléculas que conforman la membrana plasmática. Esta misma interacción es la responsable de mantener concentradas en una región a las proteínas que tienen una función en común^[16, 22].

Actualmente, el modelo de la membrana plasmática toma como base al modelo del mosaico fluido de Singer y Nicholson, pero se ha complementado con los experimentos de seguimiento de molécula única por fluorescencia^[8, 15, 19, 25, 29] o por otras técnicas de fluorescencia como FRAP^[17] y micrografías electrónicas de alta resolución de la membrana^[21], entre otros.

En resumen, la membrana plasmática es una estructura altamente compleja, en la

cual se encuentran un sinnúmero de moléculas como lípidos, proteínas y carbohidratos, los cuales realizan sus funciones gracias a la estructuración preferencial de la membrana. Y el modelo que se usa para explicar a la membrana actualmente comprende muchos más conceptos que los que consideraron Singer y Nicholson. Algunos de éstos son: La motilidad de las proteínas de la superficie de la membrana se ve restringida por la segregación de dominios en la membrana; las proteínas en la membrana colocan unas con otras, haciendo del mosaicismo del modelo de Singer y Nicholson una cualidad prevalente; encontramos dominios en la membrana a diferentes jerarquías espaciales, en los cuales los agregados de proteínas son organizados por interacciones débiles o fuertes, en el interior y exterior de la membrana respectivamente^[31].

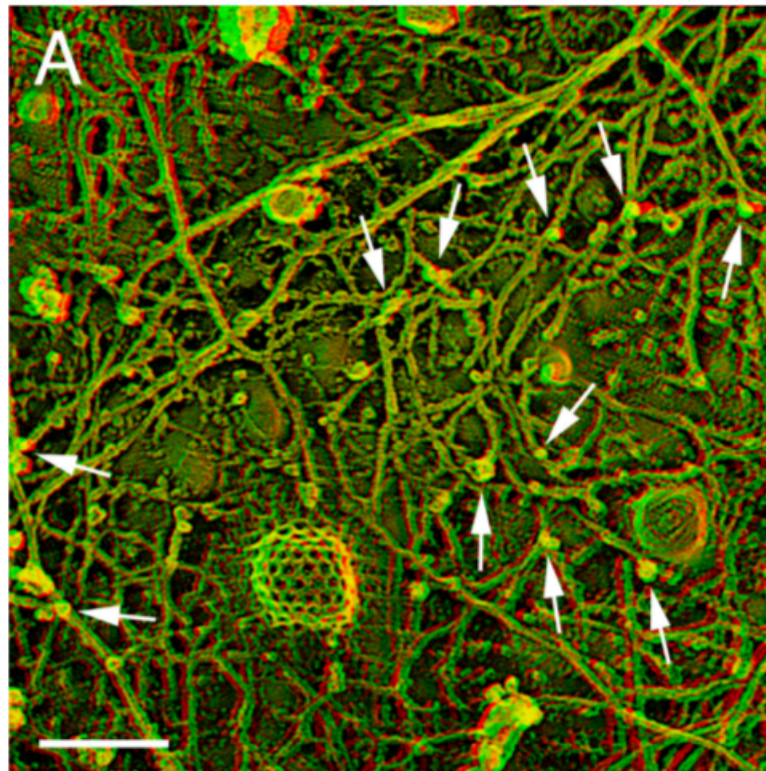


FIGURA 1.10: Reconstrucción 3D de la membrana plasmática. Micrografía electrónica de la cara interna de la membrana plasmática de una célula NRK^[21]. La imagen fue reconstruida utilizando múltiples imágenes tomadas con el microscopio de transmisión de electrones. Las flechas blancas indican los puntos donde los filamentos de actina interactúan con proteínas de la membrana.

Gracias a las técnicas de microscopía electrónica actuales, podemos apreciar con claridad el grado de complejidad de una membrana real, en la figura 1.10 vemos

una reconstrucción 3D de la membrana plasmática. Al ver la gran cantidad de moléculas que forman una membrana, nos damos cuenta que el modelo del mosaico fluido estaba muy lejos de la realidad. Sin embargo, para estudiar un sistema de este tipo, es necesario implementar modelos experimentales que reduzcan el nivel de complejidad del mismo. En este trabajo nosotros proponemos el uso de vesículas gigantes de una sola capa (GUVs), como un modelo experimental de la estructura básica de una membrana celular.

1.3. GUVs: Un modelo experimental de la membrana plasmática

El interés de este trabajo es estudiar los efectos que causan las estructuras de carbono en las membranas celulares. Sin embargo, la increíble complejidad de una membrana celular es tal que, con nuestro enfoque, resulta imposible considerar a la enorme cantidad de parámetros que se involucran al trabajar con un sistema 100 % natural. Al medir las propiedades mecánicas de los sistemas de interés, tenemos que ser capaces de distinguir en que medida contribuye a la dureza de la bicapa cada componente de la membrana. Por esta razón, para investigar este tipo de interacciones, lo más conveniente es utilizar un modelo experimental que nos permita reducir el grado de complejidad del sistema. El sistema experimental que proponemos en este trabajo, se basa en el uso de vesículas gigantes de una sola capa, a las que nos referiremos como GUVs (por sus siglas en inglés), como un modelo de la membrana celular para investigar los efectos que causan las nanoestructuras de carbono sobre la bicapa.

Las vesículas o liposomas son compartimentos esféricos cerrados, están formadas por bicapas de fosfolípidos, de la misma manera que una membrana celular (Figura 1.11). A las vesículas las podemos encontrar con múltiples capas (similar a una cebolla), con vesículas internas sin ser concéntricas (multivesiculares) o con una sola capa, las cuales son las que nos interesan en este trabajo por su mayor parecido a la estructura básica de una célula. Estas estructuras existen en un amplio rango

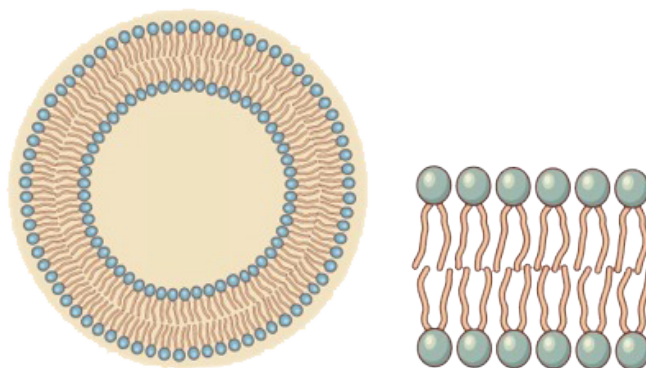


FIGURA 1.11: Esquema de una vesícula. En la izquierda se aprecia una caricatura de una vesícula, la cual está formada por fosfolípidos (derecha), de la misma manera que una membrana celular.

de tamaños, de menos de 50 nm les llamamos SUVs (Small Unilamellar Vesicles), desde 50 nm hasta 1 μm reciben el nombre de LUVs (Large Unilamellar Vesicles), y más grandes de 1 μm son las que llamamos GUVs (Giant Unilamellar Vesicles). Estas últimas pueden alcanzar diámetros de más de 100 μm (Figura 1.12).

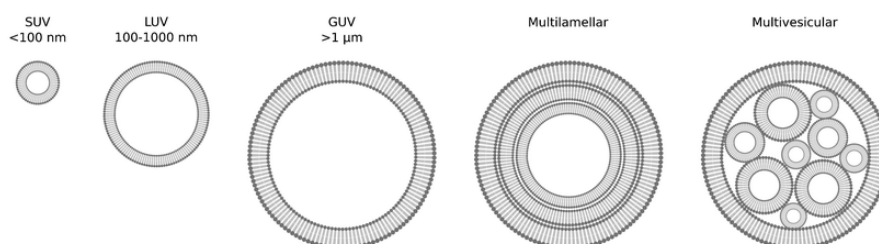


FIGURA 1.12: Tipos de vesículas. En la imagen se ilustran los tipos de vesículas que podemos encontrar. De izquierda a derecha: SUVs, LUVs, GUVs y multicapas (MLVs) y multivesiculares (MVVs)

Una gran ventaja que ofrecen estos sistemas al usarlos como modelo experimental, es la total ausencia de proteínas en la membrana y el interior de la estructura, lo que facilita el control de las variables involucradas en los experimentos; además, por su tamaño en el orden de μm es fácil observarlas con la ayuda de un microscopio óptico, las imágenes de mejor calidad se obtienen al utilizar un microscopio de contraste de fases (Figura 1.13).

Existen diferentes técnicas que nos permiten estudiar las propiedades mecánicas de las vesículas. La primer técnica que se implementó fue la de succión con micropipetas^[7], posteriores a esta técnica se han reportado diferentes metodologías, que permiten estudiar la dureza y flexibilidad de membranas de vesículas, como

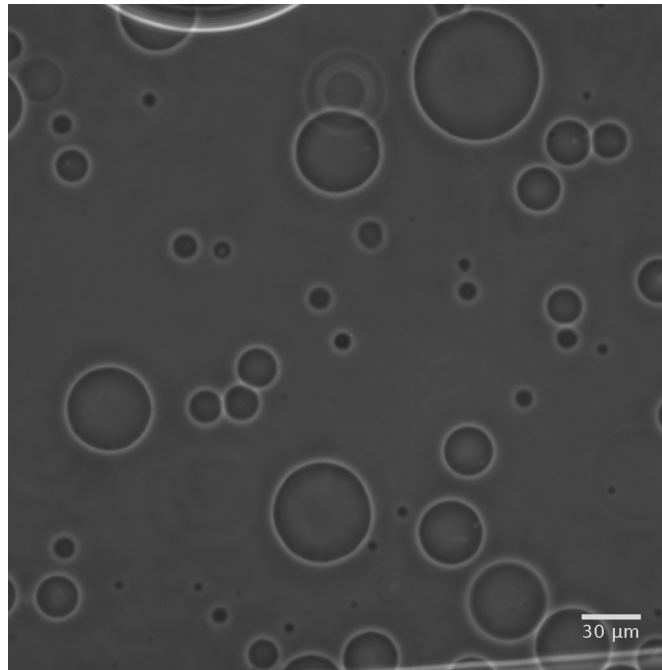


FIGURA 1.13: Imagen típica de GUVs de EggPC vistas con contraste de fases. Fotografía tomada con un aumento de 40x en un microscopio de contraste de fases, las vesículas tienen una solución de sacarosa 0.2 M en su interior y están dispersas en una solución de glucosa 0.2 M. Esta imagen fue tomada en el laboratorio, se aprecia la dispersión de tamaños de las vesículas.

la deformación de las vesículas por medio de campos eléctricos alternos^[14], o por análisis de fourier de las fluctuaciones de la membrana^[23], entre otros.

La técnica que usamos para el desarrollo de este trabajo es la de electrodeformación, la cual es una técnica no intrusiva que permite un control fino del sistema. Esta metodología fue reportada por primera vez en 1991^[14], donde aplicaban ecuaciones de un modelo descrito antes por Helfrich y Winterhalter^[32], que explica el comportamiento de vesículas esféricas cuando son sometidas a campos eléctricos alternos.

1.3.1. GUVs en campos eléctricos alternos

Desde finales de los años 70s se sabe que las vesículas pueden ser deformadas al colocarlas en campos eléctricos alternos, adoptando formas elipsoidales. En 1991 Kummrow y Helfrich desarrollaron un modelo teórico en el que explican el comportamiento de las vesículas al ser sometidas a campos eléctricos alternos^[14]. Ellos

determinaron el cambio de forma ocasionado por el campo eléctrico en las vesículas. Sin embargo, hicieron esto para vesículas en las que los medios internos y externos eran iguales.

Fue hasta el 2009 cuando Dimova et al.,^[5] mostraron que las vesículas pueden adoptar diferentes configuraciones dependiendo de la frecuencia del campo aplicado a las vesículas y de la razón existente entre la conductividad del medio interno y externo $\chi = \lambda_{in}/\lambda_{ex}$. En la figura 1.14 se muestra el cambio en la morfología de las vesículas y se puede apreciar que las vesículas pueden adoptar configuraciones paralelas al campo eléctrico aplicado (prolatas) y perpendiculares al campo eléctrico (oblatas).

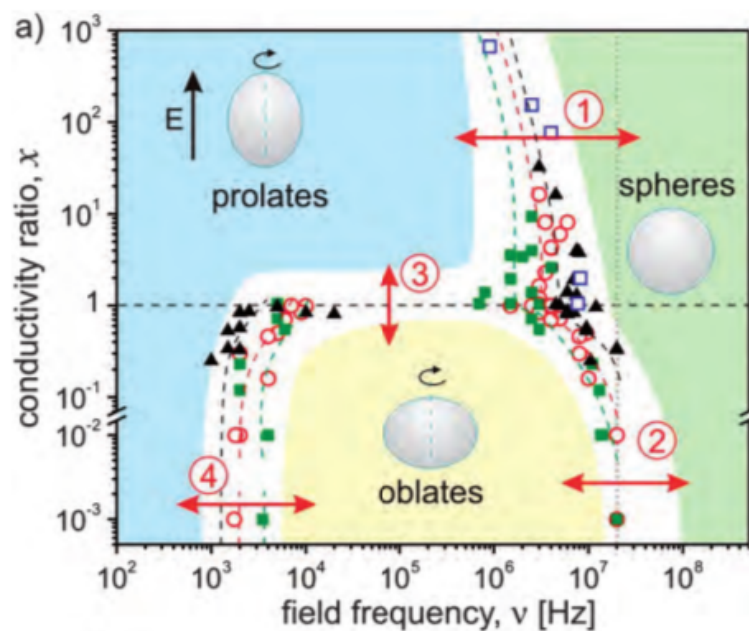


FIGURA 1.14: Diagrama de fases de vesículas a diferentes frecuencias y conductividades. En la imagen se pueden ver las diferentes configuraciones que adoptan las vesículas dependiendo de la razón en las conductividades interna y externa (eje x), con respecto a la frecuencia del campo eléctrico aplicado ν (eje y).

Imagen tomada de la referencia [5]

La deformación que sufren las vesículas se debe a la presencia del campo eléctrico, el cual genera un estrés en la membrana aplanando las ondulaciones de la misma. El modelo teórico que describe este fenómeno es el siguiente.

Modelo de Kummrow y Helfrich de la Electrodeformación de GUVs

Supongamos que la configuración inicial de las vesículas es en forma de esferas, por lo tanto las coordenadas que aprovechan mejor la simetría del problema son las esféricas. Escogemos que la dirección del campo eléctrico aplicado sea en la dirección z de nuestras coordenadas, como se muestra en la figura 1.15. Este campo eléctrico genera un estrés en la membrana que se puede describir con el tensor de estrés de Maxwell. Por consideraciones geométricas se toma únicamente la componente rr de dicho tensor^[14]:

$$T_{rr} = -\frac{9}{8}\epsilon_0\epsilon_W E_0^2 \sin^2 \theta \quad (1.1)$$

donde T_{rr} es la componente radial del tensor de estrés de Maxwell, ϵ_0 y ϵ_W son las permitividades eléctricas del vacío y del agua, respectivamente, E_0 es el campo eléctrico lejos de la vesícula y θ es el ángulo polar de nuestras coordenadas.

Kummrow y Helfrich hicieron una corrección extra. Ellos consideraron la atenuación del campo eléctrico en la superficie de la membrana, debido al cambio de forma de esta. Utilizando un factor de corrección que dedujo Landau^[18] para cascarones elipsoidales en campos eléctricos

$$\left(\frac{2}{5} + \frac{3b^2}{5a^2}\right)$$

donde a y b son los semiejes mayor y menor del elipsoide de revolución, respectivamente. Con esta corrección, la ecuación 1.1 queda

$$T_{rr} = -\frac{9}{8}\epsilon_0\epsilon_W E_0^2 \left(\frac{2}{5} + \frac{3b^2}{5a^2}\right) \sin^2 \theta$$

El campo eléctrico actúa en la membrana dependiendo de las conductividades internas y externas, ejerciendo una fuerza que deforma a las vesículas de manera prolata u oblata según sea la proporción en las conductividades de los medios

interno y externo^[5]. En la figura 1.15 se muestran estas deformaciones y las fuerzas que actúan en la vesícula.

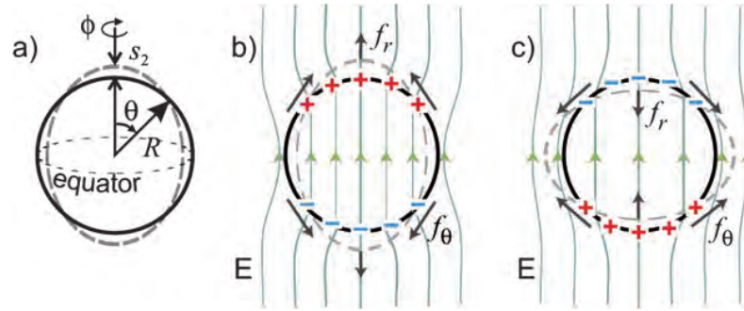


FIGURA 1.15: Sistema de coordenadas y deformaciones en las vesículas. En (a) se muestran las coordenadas elegidas para el sistema y la dirección del campo eléctrico aplicado. en (b) y (c) se muestran las deformaciones generadas en las vesículas por el campo eléctrico que actúa sobre ellas dependiendo de la proporción χ de las conductividades interna y externa de los medios. En (b) $\chi > 1$ son prolatas y en (c) son oblatas $\chi < 1$. Imagen tomada de la referencia [5]

Al cambiar de forma, la vesícula también sufre un cambio de área. En 1984 Helfrich y Servuss^[9] desarrollaron un modelo que relaciona el cambio de área de las vesículas, por medio del aplanamiento de las ondulaciones de la membrana, con su tensión superficial. Esta relación describe las características elásticas de la membrana de una vesícula.

$$\frac{\Delta A}{A} = \frac{k_B T}{8\pi\kappa_c} \ln \left(\frac{\sigma a^2}{\kappa\pi^2} \right) + \frac{1}{\lambda} \sigma \quad (1.2)$$

donde ΔA es la diferencia entre el área real y el área de una esfera con el mismo volumen, k_B es la constante de Boltzman, T es la temperatura, κ_c es la dureza de doblado de la membrana, σ es la tensión superficial en la membrana, a es el área que ocupa un lípido en la membrana y λ es el módulo de estiramiento de la vesícula.

Se puede apreciar que la ecuación 1.2 tiene dos regímenes, el primero es dependiente del logaritmo de la tensión superficial y es válido para tensiones superficiales bajas, a este término se le conoce como régimen de aplanamiento o régimen de deformación. La segunda parte de la ecuación depende de la tensión superficial

de manera lineal, a este término se le conoce como régimen de estiramiento y tiene validez para valores altos de la tensión superficial. En la figura 1.16 se muestra una gráfica típica de la deformación de una vesícula utilizando el método de electrodeformación y se muestran los regímenes antes descritos.

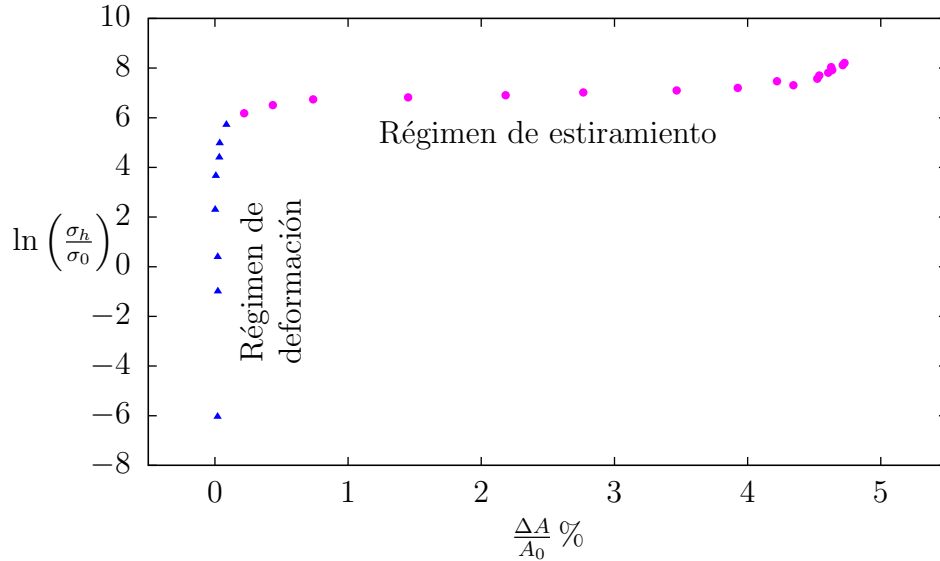


FIGURA 1.16: Gráfica típica de la deformación de una vesícula. Se muestran los regímenes de deformación de una vesícula, en el eje x se grafica el cambio de área porcentual de la vesícula en el eje y el logaritmo de la tensión superficial en la membrana. Cada régimen se muestra en una figura diferente, triángulo para el de aplanamiento y círculo para el de estiramiento.

El estrés ocasionado por el campo eléctrico causa un cambio en la presión interna de las vesículas. Este cambio en la presión se puede relacionar con la tensión superficial en la membrana mediante la ecuación de Young-Laplace:

$$\Delta P = \sigma(c_1 + c_2) \quad (1.3)$$

donde ΔP es la diferencia entre las presiones interna y externa, σ es la tensión superficial en la membrana y c_1 y c_2 son las curvaturas principales de la vesícula en el punto donde se calculan las presiones y la tensión superficial.

Si calculamos la tensión superficial en el ecuador de la vesícula, considerando el estrés ejercido por el campo eléctrico, usando la ecuación 1.3 se obtiene la siguiente relación

$$\Delta P = \sigma_h(c_1 + c_2)_{ec} - (T_{rr})_{ec} \quad (1.4)$$

donde ΔP es la diferencia de presiones entre el interior y el exterior de la vesícula, σ_h es la tensión superficial homogénea en la vesícula (igual en cualquier punto de la membrana), c_1 y c_2 son las curvaturas principales en el ecuador de la vesícula y $(T_{rr})_{ec}$ es el componente rr del tensor de estrés de Maxwell evaluado en el ecuador ($\theta = \pi/2$).

Como la diferencia de presiones es la misma en cualquier punto de la vesícula, podemos escribir una relación muy semejante a la ecuación 1.4 pero ahora considerando los polos de la vesícula. En estos puntos, el campo eléctrico no ejerce ningún estrés extra a la membrana en esta aproximación, por lo que la ecuación de Young-Laplace para los polos de la vesícula queda

$$\Delta P = \sigma_h(c_1 + c_2)_{pol} \quad (1.5)$$

donde ΔP y σ_h representan los mismos parámetros que en la ecuación 1.4, ahora c_1 y c_2 son las curvaturas principales de los polos en la vesícula. En este caso no interviene el tensor de esfuerzos de Maxwell debido a que, a diferencia del ecuador, el gradiente del campo eléctrico en los polos es cero, como se puede apreciar en la figura 1.15. Además, en la ecuación 1.1 podemos apreciar la dependencia angular del tensor de estrés de Maxwell, que causa que se desvanezca en los polos.

Igualando las ecuaciones 1.4 y 1.5 obtenemos la siguiente relación

$$\sigma_h(c_1 + c_2)_{ec} - (T_{rr})_{ec} = \sigma_h(c_1 + c_2)_{pol} \quad (1.6)$$

con lo que ahora podemos relacionar el campo eléctrico aplicado con la tensión superficial en la membrana. Utilizando únicamente el término del régimen de aplanamiento de la ecuación 1.2, Kummrow y Helfrich realizaron la siguiente suposición^[14]. Consideremos a una vesícula que tiene una tensión superficial $\sigma_0 > 0$, al

ejercer un cambio en el voltaje aplicado a la vesícula, ésta tendrá un cambio en su tensión superficial hasta llegar a un valor $\sigma_h > \sigma_0$. Esto ocasionará un cambio en el área de la vesícula descrita por la siguiente relación

$$\frac{\Delta A}{A} = \frac{k_B T}{8\pi\kappa_c} \ln\left(\frac{\sigma_h}{\sigma_0}\right) \quad (1.7)$$

Midiendo los semiejes de las vesículas podemos calcular el cambio en el área de las mismas, y despejando σ_h de la ecuación 1.6 podemos hacer una gráfica como la que se muestra en la figura 1.16. Realizando un ajuste lineal a los puntos del régimen de aplanamiento, obtenemos la pendiente de la recta que se ajusta a esa región. Utilizando la ecuación 1.7 podemos despejar el valor de la dureza de doblado de las membranas y calcular su valor.

Este es el modelo en que nos basamos para hacer los cálculos de la dureza de doblado de los diferentes sistemas analizados en este trabajo.

1.4. Antecedentes

Estudios previos a este trabajo, han mostrado que los nanotubos de carbono multicapa son capaces de interactuar con las vesículas gigantes. Esto fue observado en nuestro laboratorio, al incubar GUVs con MWNTs funcionalizados de manera no covalente con moléculas fluorescentes y observarlos con un microscopio confocal. En la figura 1.17 se muestra un ejemplo de lo que se observó con anterioridad.

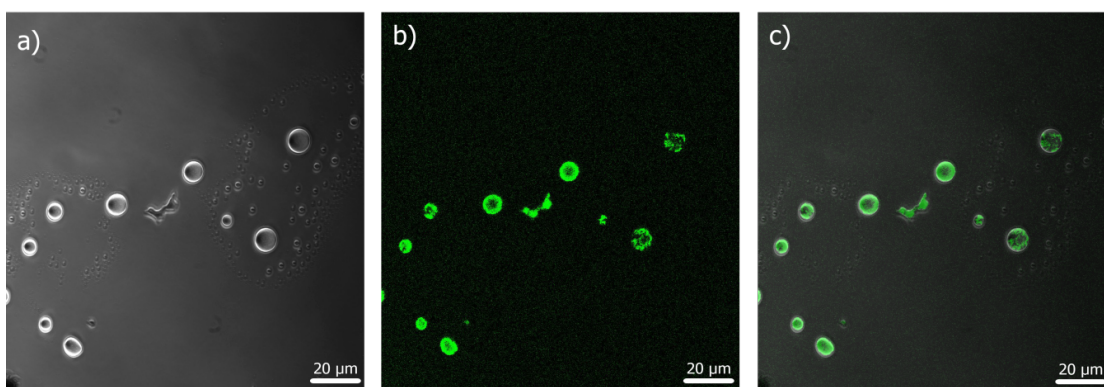


FIGURA 1.17: GUVs incubadas con CNTs funcionalizados con FITC. En (a) se muestra la imagen obtenida por microscopía de transmisión, el panel (b) muestra el corte óptico hecho con un microscopio confocal y en (c) se aprecia la superposición de (a) y (b)

En ese estudio se observó que los nanotubos interactúan con la membrana de las vesículas, permaneciendo en la periferia de las mismas^[20]. Sin embargo, en ese estudio no se analizó el efecto producido por los nanotubos en las membranas, lo cual es de gran interés por las posibles aplicaciones tecnológicas de los nanotubos en la medicina.

Es por esto, que en este trabajo se utilizó la técnica de electrodeformación para medir los cambios causados por los CNTs en las propiedades mecánicas de las membranas y determinar el efecto que causan los nanotubos en las vesículas.

1.5. Justificación

Como ya se mencionó anteriormente, los CNTs son estructuras en escalas del orden de nanómetros que tienen un gran potencial en el área de la nanomedicina⁴. Gracias a las propiedades tan diversas y únicas que poseen estas estructuras, sus aplicaciones abarcan una gran área en el ámbito tecnológico. Algunas de estas posibles aplicaciones son^[13]:

- Nanosensores.
- Nanomotores.
- Agentes de contraste.
- Biomarcadores
- Excipientes para la entrega controlada de fármacos, entre otros.

A pesar de este enorme potencial, la comunidad científica e industrial no ha desarrollado estas tecnologías. Esto se debe al desconocimiento de los efectos que pueden causar estas estructuras en los organismos donde se implementen y a la falta de modelos físicos predictivos que permitan el diseño molecular de los materiales.

Es por lo anterior, que se deben estudiar los efectos que causarían estas estructuras, así como los de los diferentes alótropos del carbono, en los sistemas biológicos. Y de la misma forma, caracterizar las condiciones necesarias (tanto físicas como químicas) para que los CNTs tengan algún efecto deseado, que eventualmente se pueda controlar para su aplicación en la medicina.

Como primer enfoque, es necesario conocer los efectos que causan estas entidades químicas sin modificaciones en su estructura, en algún modelo que nos permita estudiarlos con facilidad; de esta manera entender los cambios causados por los nanotubos, aislando sus efectos de las otras variables en los experimentos. Una

⁴La nanomedicina es la aplicación de la nanotecnología en el campo de la medicina. Los problemas actuales en esta rama de la tecnología involucran el conocimiento de los efectos tóxicos de los materiales nanoestructurados, tanto en el cuerpo humano como en el medio ambiente.

vez que se tenga noción de los cambios que provocan los CNTs en los sistemas estudiados, se podrán proponer nuevos experimentos con la finalidad de controlar el comportamiento de los nanotubos en los sistemas biológicos.

El entender la fenomenología causada por estas estructuras será de gran impacto en la nanomedicina. Esta información permitirá a la comunidad científica idear nuevas formas para implementar estos sistemas en las aplicaciones antes mencionadas, pero esta vez con un poco más de conocimiento respecto a los efectos intrínsecos de las nanoestructuras al interactuar con sistemas biológicos.

1.6. Objetivos

1.6.1. Objetivo general

El objetivo principal de este trabajo es estudiar la internalización de nanotubos de carbono multicapa (MWNTs) en vesículas gigantes y analizar el efecto causado por estos en la dureza de doblado de bicapas lipídicas de vesículas gigantes de una sola capa (GUVs). Realizando esto mediante una técnica no invasiva, que permita medir las propiedades mecánicas de las bicapas de manera simple y eficaz, como lo es la técnica de *electrodeformación*.

1.6.2. Objetivos particulares

Para alcanzar el objetivo general de este trabajo, se requirió completar una serie de objetivos particulares, los cuales fueron:

- Dominar la síntesis de vesículas gigantes de una sola capa, mediante la técnica de electroformación.
- Manipular el microscopio de contraste de fases y sus aditamentos.
- Dominar la técnica de deformación de vesículas en campos eléctricos alternos (*Electrodeformación*).
- Utilizar el software especializado ImageJ para el análisis de las imágenes de las vesículas, obtenidas mediante microscopía de contraste de fases.
- Desarrollar un software propio, que realice los cálculos numéricos para obtener el cambio de área de las vesículas y la tensión superficial de las mismas, utilizando las ecuaciones descritas en la sección 1.3.1.
- Utilizar el software Gnuplot, para la creación de las figuras donde se grafique el comportamiento de las vesículas, al ser sometidas a un campo eléctrico alterno; y para terminar el análisis de los sistemas, realizando el ajuste lineal necesario para calcular la dureza de doblado de las membranas.

-
- Establecer los protocolos de incubación de GUVs con diferentes tipos de MWNTs (pristine 20-30 y pristine thin).
 - Analizar el efecto causado por los CNTs en las propiedades mecánicas de las vesículas, mediante la técnica de electrodeformación.
 - Desarrollar un protocolo de formación de vesículas gigantes fluorescentes, que nos permita estudiar a las vesículas con un microscopio confocal.
 - Establecer el protocolo de incubación de las GUVs fluorescentes con los MWNTs para su análisis.
 - Observar, con la ayuda de un microscopio confocal, la interacción existente entre las vesículas gigantes de una capa y los nanotubos de carbono multi-capas, marcados con moléculas fluorescentes.

Referencias

- [1] Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. *Molecular Biology of The Cell*. Garland Science, Taylor & Francis Group, 2008.
- [2] Alberto Bianco, Kostas Kostarelos, and Maurizio Prato. Applications of carbon nanotubes in drug delivery. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 9:674–679, 2005.
- [3] T. L. Brown, H. E. LeMay, B.E. Bursten, and J.R. Burdge. *Química. La ciencia central*. Pearson Educación, 2004.
- [4] Cui Chung, Young-Kwan Kim, Doll Shin, Soo-Ryoon Ryoo, Byung Hee Hong, and Dal-Mee Min. Biomedical applications of graphene and graphene oxide. *Acc. Chem. Res.*, 46:2211–2224, 2013.
- [5] Rumiana Dimova, Natalya Bezlyepkina, Marie Domange Jordö, Roland L Knorr, Karin A Riske, Margarita Staykova, Petia M Vlahovska, Tetsuya Yamamoto, Peng Yang, and Reinhard Lipowsky. Vesicles in electric fields: Some novel aspects of membrane behavior. *Soft Matter*, 5(17):3201–3212, 2009.
- [6] Christian Eggeling, Christian Ringemann, Rebecca Medda, Günter Schwarzmann, Konrad Sandhoff, Svetlana Polyakova, Vladimir N. Belov, Birka Hein, Claas von Middendorff, Andreas Schönle, and Stefan W. Hell. Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell. *Nature*, 457:1159–1162, 2009.
- [7] E Evans and W Rawicz. Entropy-driven tension and bending elasticity in condensed-fluid membranes. *Phy. Rev. Lett.*, 64(17):2094–2097, 1990.
- [8] Takahiro Fujiwara, Ken Ritchie, Hideji Murakoshi, Ken Jacobson, and Akihiro Kusumi. Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane. *J. Cell Biol.*, 157:1071–1082, 2002.
- [9] WSRM Helfrich and R-M Servuss. Undulations, steric interaction and cohesion of fluid membranes. *Il Nuovo Cimento D*, 3(1):137–151, 1984.

-
- [10] *Compendium of Chemical Terminology: Gold Book*. International Union of Pure and Applied Chemistry, 2.3.3 edition, Febrero 2014.
- [11] Nadine Wong Shi Kam and Hongjie Dai. Carbon nanotubes as intracellular protein transporters: generality and biological functionality. *J. Am. Chem. Soc.*, 127:6021–6026, 2005.
- [12] Marieke Kranenburg and Berend Smit. Phase behavior of model lipid bilayers. *The Journal of Physical Chemistry B*, 109(14):6553–6563, 2005.
- [13] Ákos Kukovecz, Gábor Kozma, and Zoltán Kónya. Multi-walled carbon nanotubes. In *Springer Handbook of Nanomaterials*, pages 147–188. Springer Berlin Heidelberg, 2013.
- [14] M Kummrow and W Helfrich. Deformation of giant lipid vesicles by electric fields. *Physical Review A*, 44(12):8356, 1991.
- [15] Akihiro Kusumi, Yasusi Sako, and Mutsuya Yamamoto. Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells. *Biophys. J.*, 65:2021–2040, 1993.
- [16] Akihiro Kusumi, Kenichi GN Suzuki, Rinshi S Kasai, Ken Ritchie, and Takahiro K Fujiwara. Hierarchical mesoscale domain organization of the plasma membrane. *Trends iochem Sci.*, 36:604–615, 2011.
- [17] S Ladha, AR Mackie, LJ Harvey, DC Clark, EJ Lea, M Brullemans, and H Duclohier. Lateral diffusion in planar lipid bilayers: a fluorescence recovery after photobleaching investigation of its modulation by lipid composition, cholesterol, or alamethicin content and divalent cations. *Biophys. J.*, 71:1364–1373, 1996.
- [18] L. Landau and E. M. Lifshitz. *Electrodynamics Of Continuous Media, Course of Theoretical Physics*, volume 8. Pergamon, New York, 1960.

- [19] Pierre-François Lenne, Laure Wawrezinieck, Fabien Conchonaud, Olivier Wurtz, Annie Boned, Xiao-Jun Guo, Hervé Rigneault, Hai-Tao He, and Didier Marguet. Dynamic molecular confinement in the plasma membrane by microdomains and the cytoskeleton meshwork. *EMBO J.*, 25:3245–3256, 2006.
- [20] Verónica Pérez Luna. Translocación de nanotubos de carbono en vesículas gigantes. Master's thesis, Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, 2013.
- [21] Nobuhiro Morone, Takahiro Fujiwara, Kotono Murase, Rinshi S Kasai, Hiroshi Ike, Shigeki Yuasa, Jiro Usukura, and Akihiro Kusumi. Three-dimensional reconstruction of the membrane skeleton at the plasma membrane interface by electron tomography. *J. Cell Biol.*, 174:851–862, 2006.
- [22] Kotono Murase, Takahiro Fujiwara, Yasuhiro Umemura, Kenichi Suzuki, Ryota Iino, Hidetoshi Yamashita, Mihoko Saito, Hideji Murakoshi, Ken Ritchie, and Akihiro Kusumi. Ultrafine membrane compartments for molecular diffusion as revealed by single molecule techniques. *Biophys. J.*, 86:4075–4093, 2004.
- [23] Jacques Pécréaux, H-G Döbereiner, Jacques Prost, J-F Joanny, and Patricia Bassereau. Refined contour analysis of giant unilamellar vesicles. *The European Physical Journal E*, 13(3):277–290, 2004.
- [24] Muruganathan Ramanathan, Lok Kumar Shrestha, Taizo Mori, Qingmin Ji, Jonathan P. Hill, and Katsuhiko Ariga. Amphiphile nanoarchitectonics: from basic physical chemistry to advanced applications. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 15:10580–10611, 2013.
- [25] Yasusi Sako and Akihiro Kusumi. Compartmentalized structure of the plasma membrane for receptor movements as revealed by a nanometer-level motion analysis. *J. Cell Biol.*, 125:1251–1264, 1994.
- [26] O.A. Shenderova, V.V. Zhirnov, and D.W. Brenner. Carbon nanostructures. *Crit Rev Solid State Mater Sci*, 27(3/4):227–356, 2002.

-
- [27] Olga A. Shenderova and Suzanne A. Ciftan Hens. Nanodiamonds. In Robert Vajtai, editor, *Springer Handbook of Nanomaterials*, chapter 8, pages 263–300. Springer Berlin Heidelberg, 2013.
- [28] S. J. Singer and Garth L. Nicholson. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175:720–731, 1972.
- [29] A Sonnleitner, GJ Schütz, and Th Schmidt. Free brownian motion of individual lipid molecules in biomembranes. *Biophys. J.*, 77:2638–2642, 1999.
- [30] Humberto Terrones. Fullerenes and beyond: Complexity, morphology, and functionality in closed carbon nanostructures. In Robert Vajtai, editor, *Springer Handbook of Nanomaterials*, chapter 3, pages 83–104. Springer Berlin Heidelberg, 2013.
- [31] G Vereb, J Szöllősi, J Matko, P Nagy, T Farkas, LMLWTA Vigh, L Matyus, TA Waldmann, and S Damjanovich. Dynamic, yet structured: the cell membrane three decades after the singer–nicolson model. *PNAS*, 100:8053–8058, 2003.
- [32] M Winterhalter and W Helfrich. Deformation of spherical vesicles by electric fields. *Journal of colloid and interface science*, 122(2):583–586, 1988.
- [33] E Yasuda, M. Inagaki, K. Kaneko, M. Endo, A. Oya, and Y. Tanabe. *Carbon Alloys: Novel concepts to develop carbon science and technology*. Elsevier, 2003.

Capítulo 2

Metodología Experimental

2.1. Vesículas Gigantes de una sola bicapa

Las vesículas gigantes, a las que nos seguiremos refiriendo como GUVs, son estructuras autoensambladas hechas en su totalidad por fosfolípidos. Estas estructuras (tal como ya se mencionó en la introducción) nos permiten modelar experimentalmente la estructura básica de una célula, pues al ser de una sola bicapa representan muy bien a una membrana celular, la cual es la primer barrera con la que se encuentran las entidades extracelulares al momento de interactuar con los organismos vivos.

2.1.1. Método de electroformación

La síntesis de las vesículas gigantes se puede llevar a cabo de diversas maneras. Sin embargo, el método de *electroformación* ofrece algunas ventajas para nuestro trabajo que son de particular interés. La primera de ellas es que genera vesículas de una sola bicapa, con lo cual obtenemos sistemas que se asemejan a las células y que podemos manipular de manera simple para conocer sus propiedades mecánicas. La segunda cualidad importante, es que podemos controlar el medio del interior de las vesículas, lo que facilita su observación al microscopio de contraste de fases

(colocando medios con diferente índice de refracción dentro y fuera de las vesículas; Figura 1.13).

Este método, fue descrito por primera vez en 1986^[2], pero en 1992 fue reportada una variante de este método^[1], que es en la que nos basamos para formar las vesículas que utilizamos para nuestros experimentos.

Las vesículas que utilizamos para nuestros experimentos de deformación se formaron utilizando lípidos EggPC (L- α -phosphatidylcholine (Egg, Chicken) EggPC, cat., no., 840051C. Avanti[®] Polar Lipids Inc.). Para utilizar estos lípidos hacemos una dilución de la muestra original que se encuentra a 10 mg/ml. Colocamos 400 μ l de la solución original de lípidos EggPC en 600 μ l de cloroformo al 99.9% (Cloroformo ACS, Fermont), para dejar una solución de trabajo a 4 mg/ml.

El método de electroformación consiste de lo siguiente: Sobre la superficie conductora de dos vidrios recubiertos con óxido de Indio-Estaño (ITO; Sigma Aldrich[®], cat., no., 636916; Figura 2.1a), se esparcen 15 μ l de la solución de trabajo de los fosfolípidos EggPC usando una jeringa Hamilton (100 μ l, Model 1710 N SYR, Cemented NDL; Figura 2.1b); posteriormente, los vidrios se colocan en un desecador de vacío durante una hora, permitiendo que se evapore el cloroformo. Al cabo de la hora, los vidrios se ensamblan colocando un espaciador de teflón de 2 mm de espesor entre ellos, con la superficie conductora de los vidrios viendo al interior de la cámara, el sistema se sella usando grasa de vacío (Dow Corning[®] high vacuum grease; Figura 2.1c); este espaciador tiene un par de orificios por los cuales se puede inyectar la solución que se desea que las vesículas lleven en su interior, para este trabajo siempre se utilizaron 3 ml de una solución de sacarosa a 0.2 M (Sucrose, MP Biomedicals; Figura 2.1d). En la figura 2.1 se muestra el material utilizado y el ensamblaje del sistema.

Una vez llenada la cámara de electroformación con la solución deseada, se procede a incubar la muestra para formar las vesículas. La incubación se realiza a temperatura ambiente, aplicando un voltaje alterno durante todo el tiempo que se realiza la formación de vesículas; para esto, se colocan las pinzas caimán de un cable que

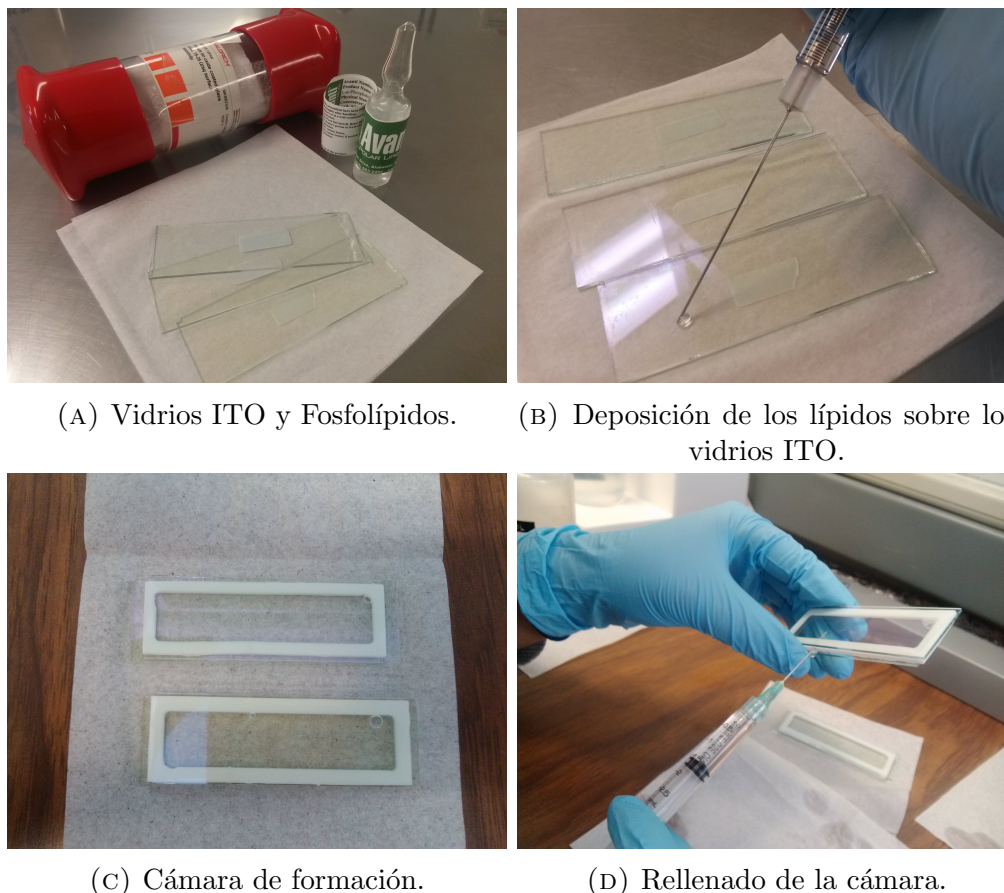


FIGURA 2.1: Ensamblado de la cámara de electroformación. En la figura (A) se muestran los vidrios recubiertos con indio-estaño y los fosfolípidos utilizados. (B) Se muestra cómo se aplican los lípidos a la superficie conductora de los vidrios ITO. (C) Cámara de formación ensamblada. (D) Rellenado de la cámara para incubar.

está conectado a un generador de funciones (Keysight 33500B series Trueform waveform generator), en cada uno de los vidrios ITO para aplicar el voltaje deseado. En la tabla 2.1 se muestran los tiempos, voltajes y frecuencias utilizadas durante la formación de las vesículas:

Al finalizar el proceso de formación, se recupera la solución de vesículas utilizando una pipeta, se aspira de manera suave con una punta truncada hasta unos 3 mm de diámetro, cortando la última parte de la punta, esto para evitar que el paso por el orificio reducido de la punta rompa las vesículas. La solución se almacena en tubos eppendorf a 4 °C, y se utilizaban dentro de los cuatro días posteriores a su formación^[3, 6]. Para observar las vesículas al microscopio de contraste de fases,

Paso	Voltaje (V _{pp})	Frecuencia (Hz)	Tiempo (min)
1	2	10	30
2	3	10	30
3	4	10	30
4	5	10	30
5	5	3	5

TABLA 2.1: Condiciones y tiempos para la electroformación de GUVs.

es necesario colocar a la solución de vesículas en un medio con índice de refracción distinto al del interior de las vesículas. Para esto, usamos una solución de glucosa a 0.2 M (D-Glucose, Anhydre. Caledon LC).

Síntesis de GUVs fluorescentes

Para los ensayos de fluorescencia y microscopía confocal, se sintetizaron vesículas fluorescentes. En estos experimentos se utilizaron los lípidos fluorescentes Egg-Rod-PE (L- α -Phosphatidylethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl) (Ammonium Salt) (Egg-Transphosphatidylated, Chicken), cat., no., 810146C, Avanti®). Estos lípidos tienen una molécula de sulfo-rodamina-B unida covalentemente a su cabeza polar, lo cual nos permite observar a las vesículas utilizando un microscopio de fluorescencia.

Los lípidos fluorescentes Egg-Rod-PE vienen en solución a una concentración de 10 mg/ml. De esta solución stock se hace una dilución a 4 mg/ml para trabajar.

Para sintetizar las vesículas se hizo una solución que contenía 10 μ l de la solución de trabajo de Egg-Rod-PE y 90 μ l de la solución de trabajo de EggPC, lo que mantiene la concentración de la mezcla a 4 μ l que es con la que se trabaja. El método para formar estas vesículas es muy semejante al de la sección anterior, pero difiere en algunos pasos del protocolo.

La primer diferencia es que se colocaron 25 μ l de la mezcla de trabajo sobre la parte conductora de los vidrios ITO; posteriormente, los vidrios se colocaron

en un horno de convección (Labline Instruments mod. 3471M) a 65 °C durante media hora, con la finalidad de evaporar la mayor cantidad de solvente posible que quedara en los lípidos. Después se colocaron los vidrios en el desecador de vacío durante una hora y se prosiguió con el ensamblado de la cámara de formación de la misma manera que ya se mencionó anteriormente (Figura 2.1), todos los pasos de la preparación, fueron hechos cubriendo al sistema de la exposición a la luz para evitar el blanqueamiento del fluoróforo antes de los experimentos. El protocolo de incubación también tuvo ligeras variaciones, las cuales se pueden ver en la tabla 2.2.

Paso	Voltaje (V _{pp})	Frecuencia (Hz)	Tiempo (min)
1	2	10	30
2	3	10	30
3	4	10	30
4	5	10	120
5	4	3	30

TABLA 2.2: Condiciones y tiempos para la electroformación de GUVs fluorescentes

Una vez terminado el protocolo de formación, las vesículas fueron recuperadas con una pipeta con la punta truncada, y la muestra se almacenó en tubos eppendorf a 4 °C cubriendo los tubos de la exposición a la luz. Las vesículas fluorescentes se utilizaban siempre en un periodo de tiempo que no sobrepasaba los 4 días posteriores a su síntesis.

2.1.2. Electrodeformación

Para estudiar las propiedades mecánicas de las vesículas, es necesario manipular a las mismas y poder someterlas a algún cambio que refleje esta propiedad de la membrana: su dureza. El método de electrodeformación fue reportado por primera vez en 1991^[5].

Esta técnica consiste en colocar GUVs en presencia de un campo eléctrico alterno, el cual genera un estrés en la membrana que causa su deformación^[4].

Nosotros utilizamos una cámara de electroporación (Micro fusion chamber No. 4308031) como la que se muestra en la figura 2.2, la cual consiste de un par de cables cilíndricos de platino de $100\ \mu\text{m}$ de diámetro, los cuales están dispuestos paralelos entre sí, separados $500\ \mu\text{m}$ uno de otro.

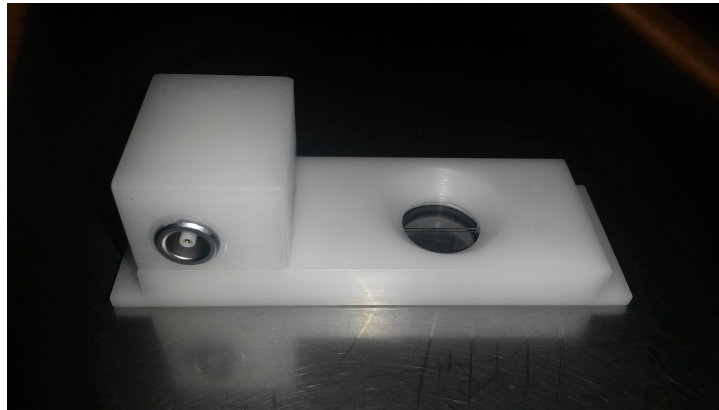


FIGURA 2.2: Cámara de fusión utilizada para someter a campos eléctricos a las GUVs.

La cámara es conectada a un generador de funciones, mediante un cable LEMO-VNC y se aplica una señal de tipo senoidal con una frecuencia de 100 kHz. Esta frecuencia se utiliza porque nos permite deformar a las vesículas sin causar efectos de electroforesis, ya que a frecuencias bajas las vesículas se desplazan por efecto del campo eléctrico aplicado y a frecuencias muy altas las vesículas permanecen con forma esférica^[4]. El voltaje aplicado se aumenta gradualmente comenzando con un voltaje de $4\ \text{mV}_{pp}$ hasta alcanzar los $10\ \text{V}_{pp}$. Los cambios en el voltaje se realiza esperando al menos 10s entre cada paso, pues se sabe que las vesículas tardan al menos 2 segundos en alcanzar su forma de equilibrio^[4]. En la tabla 2.3 se muestran los voltajes aplicados en cada paso de la deformación de las vesículas.

Cada muestra utilizada para los experimentos de deformación se preparó de la siguiente manera: en un tubo eppendorf de $2\ \mu\text{l}$ se colocaron $980\ \mu\text{l}$ de una solución de glucosa a 0.2 M. A esa solución se agregaron $20\ \mu\text{l}$ de la solución con las vesículas (siempre utilizando puntas de pipeta truncas para evitar dañar a las GUVs durante su manipulación). Esta mezcla se colocó en la cámara de fusión y se selló por

Paso	Voltaje V_{pp}	Paso	Voltaje V_{pp}
1	0.004	14	4.5
2	0.05	15	5
3	0.1	16	5.5
4	0.25	17	6
5	0.5	18	6.5
6	0.75	19	7
7	1.0	20	7.5
8	1.5	21	8
9	2.0	22	8.5
10	2.5	23	9
11	3.0	24	9.5
12	3.5	25	10
13	4.0		

TABLA 2.3: Tabla de condiciones para la electrodeformación. Se indican los valores del voltaje aplicado en cada paso de la deformación. La frecuencia utilizada durante todo el experimento fue de 100 kHz. Cada cambio en el voltaje se realizaba esperando al menos 10 s entre cada paso.

capilaridad colocando un cubreobjeto sobre la muestra. Se le aplicaron los voltajes ya mencionados al sistema y se tomó una fotografía por cada voltaje aplicado.

Las vesículas fueron observadas con un microscopio de contraste de fases (Olympus CKX41) y las imágenes fueron adquiridas con una cámara ultra rápida Hamamatsu (EM-CCD Digital Camera, Image EM-1K). El análisis de las imágenes fue realizado con el software ImageJ 1.48^[7], los cálculos para medir la dureza de doblado de las vesículas fueron realizados con un software desarrollado por nosotros y las gráficas y el ajuste lineal con el software Gnuplot 4.6.

Deformación de GUVs en presencia de CNTs

Para analizar el efecto producido por los nanotubos de carbono en las membranas, se procedió a incubar una mezcla de vesículas con los nanotubos de interés. Las

muestras se prepararon de la siguiente manera: en 980 μl de una solución de glucosa al 0.2 M se añadieron 20 μl de la solución de vesículas, posteriormente, se agregó 1 μl de una solución a 0.1 mg/ml de nanotubos de carbono multicapa (tMWNT o MWNT 20-30 en muestras independientes). Estas nuevas mezclas con nanotubos se dejan incubar por periodos de al menos una hora antes de someterlas a los campos eléctricos para medir sus propiedades mecánicas.

El procedimiento de la deformación de estos nuevos sistemas se realizó de la misma manera que en el caso de las vesículas sin nanotubos.

En este trabajo se utilizaron dos tipos de nanotubos diferentes, con la finalidad de comparar el efecto causado por estas estructuras con propiedades físicas diferentes. Unos nanotubos fueron los NANOCYLTM NC7000 series, thin multi-wall carbon nanotubes, adquiridos de la empresa Nanocyl. Estas nanoestructuras poseen un diámetro y longitud promedio de 9.5 nm y 1.5 μm , respectivamente. El otro tipo de nanotubos fue MWNTs 20-30, fueron adquiridos de la empresa SkySpring Nanomaterials, Inc. Estos nanotubos tienen diámetros de 20-30 nm y longitudes de 10-30 μm .

2.2. Microscopía óptica

Una enorme ventaja que presentan las GUVs como modelo de estudio, es su gran tamaño, lo cual nos permite observarlas utilizando un microscopio óptico. A pesar de esto, su composición las vuelve casi transparentes en un microscopio convencional, por lo que es necesario utilizar arreglos ópticos más sofisticados para aprovechar las propiedades de éstas estructuras.

2.2.1. Microscopía de contraste de fases

El microscopio de contraste de fases posee un arreglo óptico que le permite acentuar algunas características de las muestras observadas sin la necesidad de realizar algún tipo de tinción.

El principio detrás de este tipo de microscopios es el siguiente: Cuando la luz incidente pasa a través de la muestra, ésta es dispersada por haber interactuado con las moléculas que conforman al sistema de interés; esta luz dispersada es la que nosotros vemos cuando observamos algún objeto al microscopio convencional. El microscopio de contraste de fases aprovecha esta luz dispersada y controla la fase con la que sale y se recombina con la luz no dispersada. Al hacer esto, regiones donde la luz dispersada haya tenido la misma fase que la luz incidente se verán con mayor intensidad, mientras que donde las fases fueron diferentes la intensidad de la luz observada será menor.

El cambio de fase se logra haciendo que la luz dispersada se retrase al pasar por un disco de fase en el plano focal, el cual es un disco transparente, con un anillo de índice de refracción diferente del resto del disco. La luz directa estará menos retrasada que la luz dispersada, lo que introduce una diferencia de fase. Esto permite formar una imagen nítida en un campo claro.

El microscopio que utilizamos fue un Olympus CKX41.

2.2.2. Microscopio confocal y fluorescencia

La fluorescencia es un fenómeno cuántico que presentan algunas moléculas, sobre todo las que tienen estructuras de carbono en forma de anillos, también conocidas como moléculas aromáticas (fluoresceína, rodamina, triptófano, entre otras; Figura 2.3).

El fenómeno de fluorescencia ocurre cuando se hace incidir luz o radiación electromagnética sobre una molécula aromática capaz de fluorescer. Primero, los electrones de estas moléculas absorben la energía de la luz incidente, pasando de un estado base (S_0) a un estado excitado (S_1), tal como se aprecia en la figura 2.4. Posteriormente, los electrones pierden energía debido a las fluctuaciones térmicas en el medio, llegando al nivel vibracional más bajo del estado S_1 . Finalmente, los

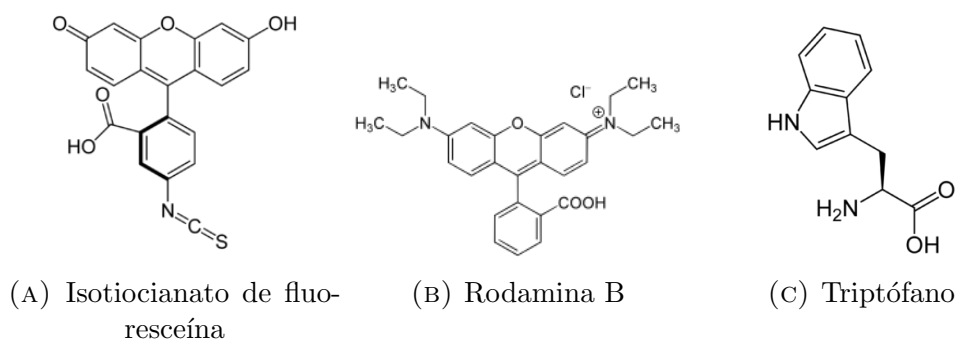


FIGURA 2.3: Moléculas fluorescentes. Se muestran las estructuras de diferentes moléculas fluorescentes. (A) La fluoresceína fluoresce en el visible a 512 nm; (B) la rodamina B fluoresce en el visible a 627 nm; (C) el triptófano fluoresce en el UV a 348 nm.

electrones pasan del estado excitado S_1 al estado base S_0 , emitiendo fotones de menor energía que los absorbidos, lo que resulta en la fluorescencia de las moléculas. En la figura 2.4 se muestra un esquema del proceso de fluorescencia.

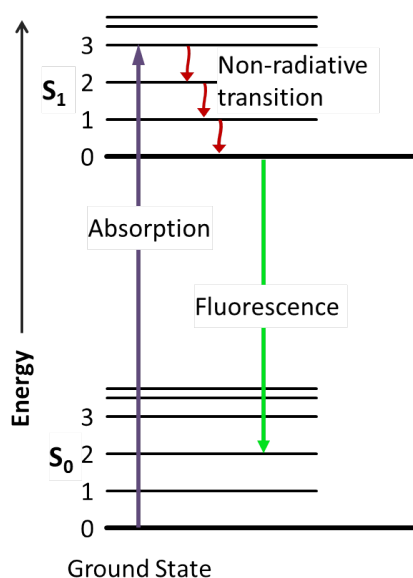


FIGURA 2.4: Diagrama del fenómeno de fluorescencia. Se puede apreciar la transición del estado base S_0 al estado excitado S_1 de un electrón, por absorción de energía. El electrón pierde energía al bajar de nivel vibracional. Posteriormente, el electrón da un “brinco” al estado base, emitiendo un fotón de menor energía que el absorbido.

En este trabajo aprovechamos de la capacidad de fluorescer de diferentes moléculas, para marcar los componentes de nuestros sistemas y poder observarlos con

microscopios de fluorescencia, como es el caso del microscopio confocal.

Microscopio confocal

Al observar los sistemas fluorescentes con un microscopio de fluorescencia convencional, las imágenes resultantes se ven saturadas. Esto ocurre porque a pesar de enfocar el objetivo del microscopio en un punto de la muestra, se recibe la luz de todas las moléculas que son excitadas, generando que se vea un fondo luminoso fuera de foco. El microscopio confocal resuelve este problema utilizando un arreglo óptico que le permite filtrar la luz emitida por las moléculas fuera de foco.

El arreglo óptico consta de filtros llamados “pinholes”, que bloquean el paso de la luz fuera de foco, permitiendo que la imagen que se forma sea únicamente de la región de la muestra en el plano focal del objetivo. En la figura 2.5 se muestra un esquema de un microscopio confocal.

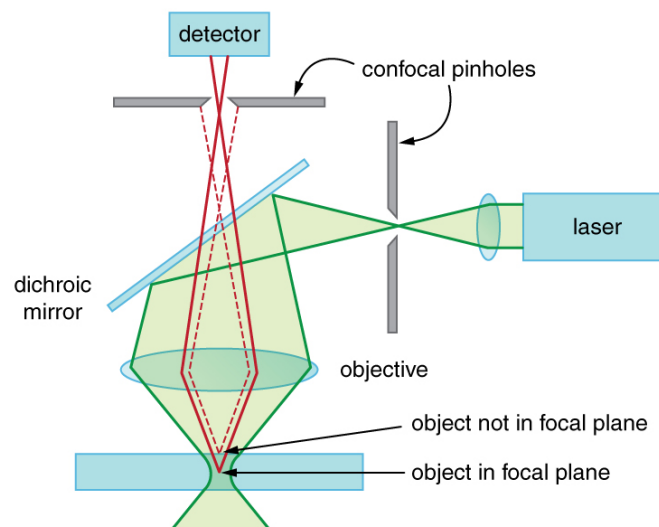


FIGURA 2.5: Diagrama de un microscopio confocal. Se muestra el arreglo de filtros (pinholes) que “limpian” a la imagen obtenida de la muestra, permitiendo que solo se aprecie la luz del plano focal.

Las muestras que observamos con ayuda de este microscopio fueron preparadas de la siguiente manera. En un tubo eppendorf de 1.5 ml se colocó 1 ml de una solución de glucosa al 0.2 M, en esta solución se agregaron 20 μ l de las vesículas

fluorescentes. A esta mezcla se le añadieron 20 μl de la solución de nanotubos fluorescentes a 0.1 mg/ml, haciendo una mezcla diferente por cada tipo de nanotubos y se dejaron incubar por una hora.

El microscopio confocal que utilizamos fue un Microscopio Confocal-Multifotónico LSM 710 NLO (Carl Zeiss), en el Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías del IPN.

Referencias

- [1] MI Angelova, S Soleau, Ph Méléard, F Faucon, and P Bothorel. Preparation of giant vesicles by external ac electric fields. kinetics and applications. In *Trends in Colloid and Interface Science VI*, pages 127–131. Springer, 1992.
- [2] Miglena I Angelova and Dimiter S Dimitrov. Liposome electroformation. *Faraday Discuss Chem Soc*, 81:303–311, 1986.
- [3] Stephan Becqué. Production and characterization of giant unilamellar vesicles. Master’s thesis, Leiden University, 2005.
- [4] Rumiana Dimova, Natalya Bezlyepkina, Marie Domange Jordö, Roland L Knorr, Karin A Riske, Margarita Staykova, Petia M Vlahovska, Tetsuya Yamamoto, Peng Yang, and Reinhard Lipowsky. Vesicles in electric fields: Some novel aspects of membrane behavior. *Soft Matter*, 5(17):3201–3212, 2009.
- [5] M Kummrow and W Helfrich. Deformation of giant lipid vesicles by electric fields. *Physical Review A*, 44(12):8356, 1991.
- [6] Nelson F Morales-Pennington, Jing Wu, Elaine R Farkas, Shih Lin Goh, Tatiana M Konyakhina, Judy Y Zheng, Watt W Webb, and Gerald W Feigenson. Guv preparation and imaging: minimizing artifacts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1798(7):1324–1332, 2010.
- [7] Caroline A Schneider, Wayne S Rasband, and Kevin W Eliceiri. Nih image to imagej: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9(7):671–675, 2012.

Capítulo 3

Propiedades mecánicas de los Sistemas GUVs –MWNTs

3.1. Introducción

La interacción de los MWNTs con los sistemas biológicos es de gran interés para la comunidad científica por sus posibles aplicaciones. Pues a pesar de que se ha reportado que los nanotubos son capaces de internalizarse por difusión o endocitosis, aún se desconocen las condiciones necesarias para que suceda mediante uno u otro mecanismo. El primero, mediante difusión, ocurre cuando los CNTs se internalizan en las células atravesando la membrana plasmática como lo hacen las nanoagujas^[1], siendo un proceso que no involucra un gasto energético por parte de la célula. El segundo mecanismo, mediante endocitosis, es un mecanismo en el cual participa la célula activamente, utilizando proyecciones de la membrana plasmática para atrapar e internalizar a los CNTs, los cuales pueden internalizarse incluso acarreando moléculas y péptidos pequeños^[4]. Ambos mecanismos resultan de gran interés para la nanomedicina, por su gran potencial en la liberación controlada de fármacos.

Estudiar este tipo de fenómenos es muy difícil utilizando células por la gran cantidad de variables que se deben considerar en cada experimento. En este trabajo,

nos interesa conocer los efectos que causan los CNTs exclusivamente en las membranas; sin embargo, utilizar membranas de células es todavía muy complicado por la cantidad de elementos que las constituyen, es por esto que primero es necesario conocer los efectos que causan los CNTs en membranas compuestas únicamente por lípidos. En este trabajo utilizamos GUVs como modelo para entender estos fenómenos. El enfoque que utilizamos es medir las propiedades mecánicas de las vesículas en presencia y ausencia de los CNTs, y así determinar el efecto causado por estas nanoestructuras en las membranas.

Utilizar GUVs como modelo de estudio presenta grandes ventajas, como su facilidad de síntesis en el laboratorio; su gran tamaño, el cual es de dimensiones comparables a las de células y esto también nos permite observarlas fácilmente utilizando un microscopio óptico de contraste de fases; su manipulación, por ejemplo mediante campos eléctricos alternos, se facilita por la misma razón. Por todo esto, existe una gran reproducibilidad de resultados en cada experimento.

En este capítulo se presentan y discuten los resultados obtenidos mediante la técnica de electrodeformación, en presencia y en ausencia de MWNTs.

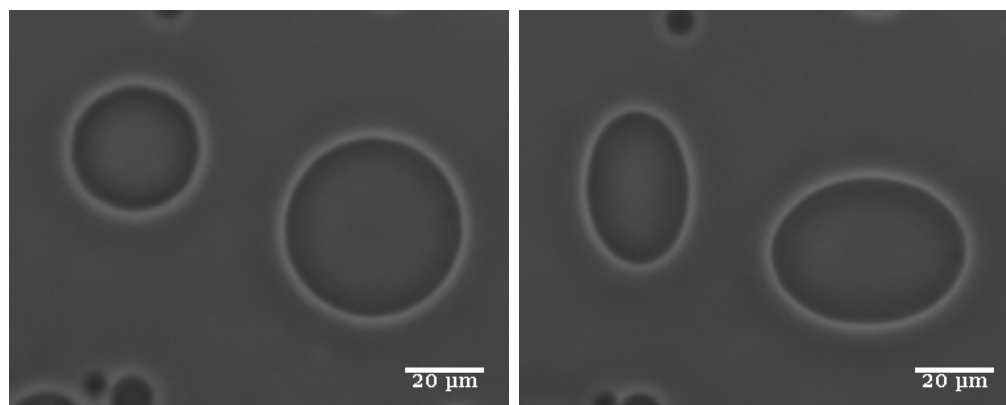
3.2. Resultados

Siguiendo los protocolos mencionados en el capítulo 2, se sintetizaron GUVs (Figura 1.13), las cuales fueron deformadas sometiénolas a campos eléctricos alternos. Además, con ayuda de software especializado se analizaron las imágenes obtenidas en los experimentos y se midió el cambio en las dimensiones de vesículas al ser deformadas. Para el cálculo de la tensión superficial se utilizó un software desarrollado por nosotros, el cual fue escrito en Fortran 90.

En las siguientes secciones se discuten los resultados obtenidos al deformar sistemas de vesículas en ausencia y en presencia de CNTs.

3.2.1. GUVs de EYPC

El primer paso para determinar la validez de nuestros protocolos y análisis, fue caracterizar a los sistemas compuestos únicamente por GUVs. En la figura 3.1 se muestra el cambio que presentan un par de vesículas al ser sometidas a un campo eléctrico con una frecuencia $\nu = 100$ kHz. Se puede apreciar que las vesículas adoptan una configuración muy elongada debido a la presencia del campo.



(A) 4 mV_{pp} , 100 kHz.

(B) 10 V_{pp} , 100 kHz.

FIGURA 3.1: Vesículas deformadas por un campo eléctrico alterno. Se muestran los casos extremos de la deformación de un par de vesículas al ser sometidas a un campo eléctrico con una frecuencia de 100 kHz. En (A) con una intensidad de 4 mV_{pp} y en (B) con una intensidad de 10 V_{pp} . Todas las fotografías mostradas en este capítulo son de GUVs de EYPC vistas al microscopio de contraste de fases, con un aumento de 40x; las vesículas fueron formadas en una solución de sacarosa 0.2 M y están dispersas en una solución de glucosa 0.2 M.

Deformando las vesículas pudimos encontrar diferentes fenómenos en el sistema, uno de ellos fue la aparición de vesículas de la misma muestra deformadas en sus dos configuraciones posibles, oblata (Figura 3.1b derecha) y prolata (Figura 3.1b izquierda). Esto se debe a que en este sistema de vesículas, las conductividades de las soluciones que utilizamos como medios interno y externo son muy parecidas, por lo que la proporción entre estas conductividades es aproximadamente la unidad. La configuración de las líneas de campo alrededor de las vesículas se concentra en mayor medida en los polos y el ecuador, esta concentración está determinada por las propiedades eléctricas externas e internas al sistema. En el caso de igualdad de conductividades la probabilidad de que se concentren el polo y en el ecuador

es la misma, por eso los dos tipos de deformaciones en el caso simétrico de las conductividades externa e interna.^[2], el cual es el caso de la figura 3.1.

También observamos que al aplicar campos eléctricos de distintas intensidades, (que iban desde los 4 mV_{pp} hasta los 10 V_{pp}) a la misma muestra, por un periodo de tiempo de aproximadamente una hora, las vesículas tienden a ordenarse formando lo que se conoce en la literatura como “pearl chains” (cadenas de perlas). Estos arreglos, que se pueden apreciar en la figura 3.2, se forman en tiempos largos de aproximadamente 1 hora. Como no aparecen muy rápido, nos permiten analizar diferentes campos de la muestra y deformar a las vesículas sin problemas, pero cuando se forman es necesario cambiar la muestra, porque el empalme que hay en las vesículas impide que el análisis se lleve a cabo de manera adecuada.

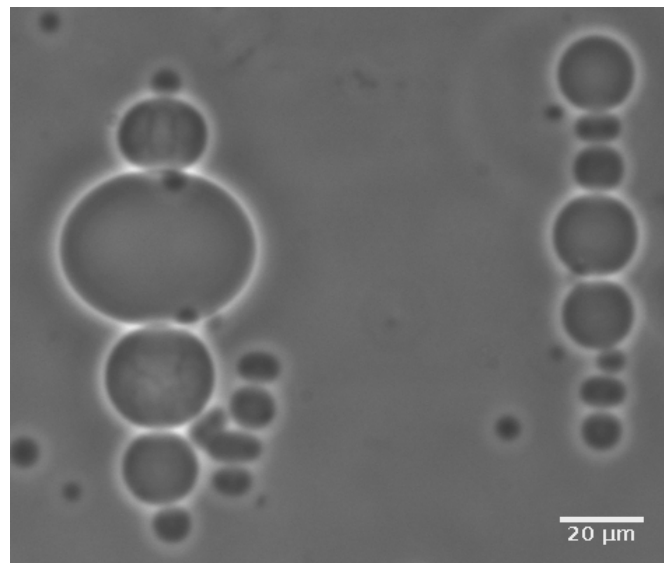


FIGURA 3.2: “Cadena de perlas” de vesículas de EYPC. Esta imagen fue tomada después de aproximadamente una hora de someter al sistema a voltajes de diferentes intensidades, los cuales iban desde los 4 mV_{pp}, hasta los 10 V_{pp}.

Para calcular la dureza de las membranas deformamos 14 vesículas de una misma síntesis. Se registró por medio de fotografías la deformación alcanzada por la vesícula, en cada cambio de voltaje. De las fotografías pudimos medir (con ayuda del software ImageJ) las longitudes del eje mayor y menor de las vesículas, en cada voltaje aplicado. Con estos datos calculamos el cambio de área de la vesícula y la tensión superficial en la membrana. Con esta información se construyó la gráfica que se muestra en la figura 3.3.

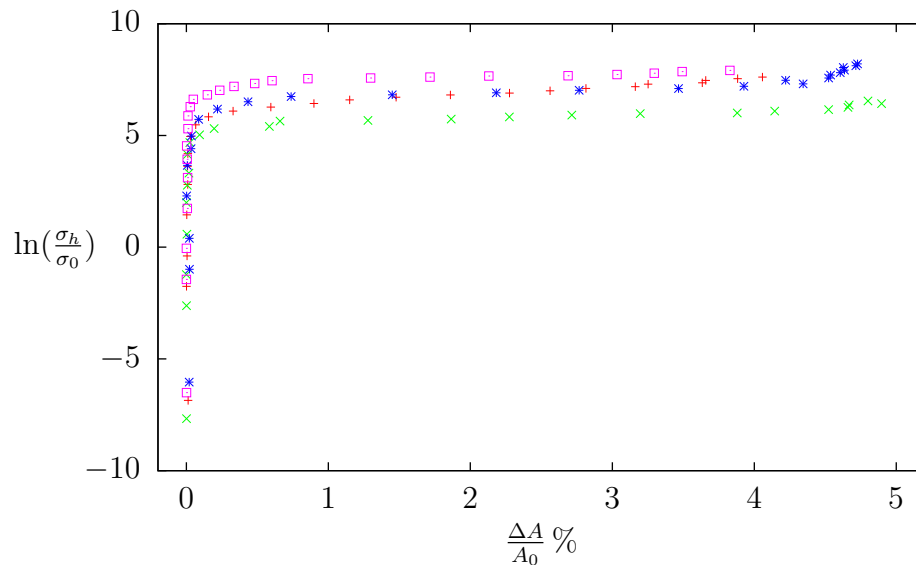


FIGURA 3.3: Gráfica de la deformación de GUVs de EggPC. Se muestran algunas curvas representativas de la deformación de vesículas en campos eléctricos alternos. En el eje x se grafica el cambio de área porcentual de la vesícula, mientras que en el eje y se grafica el logaritmo de la tensión superficial en la membrana. Las barras de error son menores a los puntos de la gráfica. Cada código de color representa a una vesícula diferente.

Tomando los puntos del régimen de aplanamiento (o deformación, figura 1.16) se hizo un ajuste lineal para obtener el valor de la pendiente en esa sección de la gráfica. Tomando la ecuación 1.7, despejamos κ_c , pues conocemos la pendiente de la recta que pasa por esos puntos y calculamos la dureza de doblado de la membrana, el valor encontrado fue

$$\kappa_{EYPC} = 3 \pm 0.5 \times 10^{-18} \text{J}$$

En la literatura se han reportado valores para vesículas de EYPC, que van desde $2.3 \times 10^{-19} \text{ J}$ [3] a $5 \times 10^{-19} \text{ J}$ [5]. El valor que nosotros encontramos es 10 veces mayor al reportado anteriormente. Esto puede ser debido a las diferencias en las condiciones experimentales de cada caso, ya que en nuestro sistema utilizamos soluciones de azúcares como medios interno y externo a las vesículas. Este cambio en las soluciones aumenta la presión osmótica a la que se ve sometida la vesícula, lo que causa un aplanamiento en las ondulaciones de la membrana, aumentando la dureza de la misma. En el caso del trabajo de Kummrow y Helfrich se usó agua

destilada dentro y fuera de la vesícula, además las vesículas eran formadas por el método de rehidratación simple. Creemos que la fuerza que la membrana debe ejercer al cambiar de forma, debe de ser mayor dado que para desplazar un sistema mas denso, como el caso de nuestros experimentos, es necesaria una mayor energía. Para determinar el grado de endurecimiento de la membrana es necesario realizar experimentos variando el contenido de azúcares dentro y fuera de esta, este resultado abre un nuevo tema de investigación que debería de ser estudiado ya que en la literatura solo se manejan cambios en la estructura de la vesícula y no en el medio que los rodea.

Con este dato, podemos corroborar que nuestro sistema experimental es el adecuado para realizar este tipo de mediciones.

3.2.2. GUVs en presencia de MWNTs

Una vez corroborada la validez del sistema experimental, proseguimos a medir el efecto causado por los CNTs en las membranas. Para esto utilizamos dos tipos de nanotubos diferentes. Los primeros son los MWNTs 20-30 (de ahora en adelante los llamaremos “20-30”), que son nanotubos de carbono de paredes múltiples, con diámetros entre 20 y 30 nm. El otro tipo de nanotubos son los thin-MWNTs (a los cuales llamaremos simplemente “thin”), que también son nanotubos de múltiples capas, pero de diferente longitud siendo más cortos y angostos que los 20-30. En los dos casos los tubos utilizados fueron “pristine”, esto se refiere al grado de funcionalización que tienen estas estructuras y quiere decir que no tienen modificaciones químicas en su superficie.

Los nanotubos “pristine” son hidrófobos debido a su composición química, por lo que esperamos se encuentren en la membrana dentro de las cadenas hidrófobas de los lípidos que forman las vesículas, al ser también una región de alta hidrofobicidad. Por lo tanto, la dureza de doblado de las vesículas debería de cambiar, ya que al introducirse los nanotubos provocan un reacomodo de los lípidos en la membrana, causando que el exceso de área disminuya. Haciendo que la vesícula se reajuste

cubriendo a los tubos, evitando su contacto con el medio acuoso. Mediante simulaciones de dinámica molecular se han observado este tipo de fenómenos, donde los nanotubos perturban a la membrana, causando que los fosfolípidos salgan de su posición en la bicapa y recubran a los nanotubos^[6].

GUVs en presencia de MWNTs 20-30

Los primeros nanotubos que analizamos fueron los 20-30, en la figura 3.4 se muestra el cambio en la forma de una vesícula incubada con los nanotubos al ser sometida a un campo eléctrico, de manera similar al caso de la figura 3.1. Comparando la deformación de éstos sistemas con los de vesículas solas (sin nanotubos), podemos ver que la elongación de las vesículas en este caso es menor que en el caso de las vesículas solas (Figura 3.1), bajo las mismas condiciones de voltaje. Podemos tomar esto como un indicio de que las propiedades mecánicas de las vesículas se ven afectadas por causa de los nanotubos.

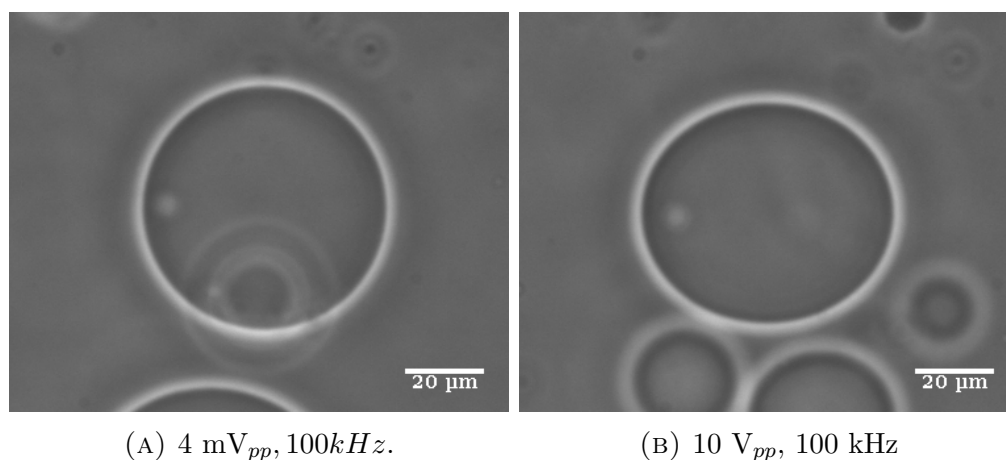


FIGURA 3.4: Respuesta al campo eléctrico por vesículas incubadas con MWNTs 20-30. Se muestran los casos extremos de la deformación de una vesícula incubada con los nanotubos 20-30, al ser sometida a un campo eléctrico con una frecuencia de 100 kHz. En (A) con una intensidad de 4 mV_{pp} y en (B) con una intensidad de 10 V_{pp}

Se deformaron 18 vesículas incubadas con los tubos 20-30, y se analizaron del mismo modo que las vesículas sin nanotubos. En la figura 3.5 se muestra la gráfica del comportamiento de las vesículas con nanotubos al ser deformadas.

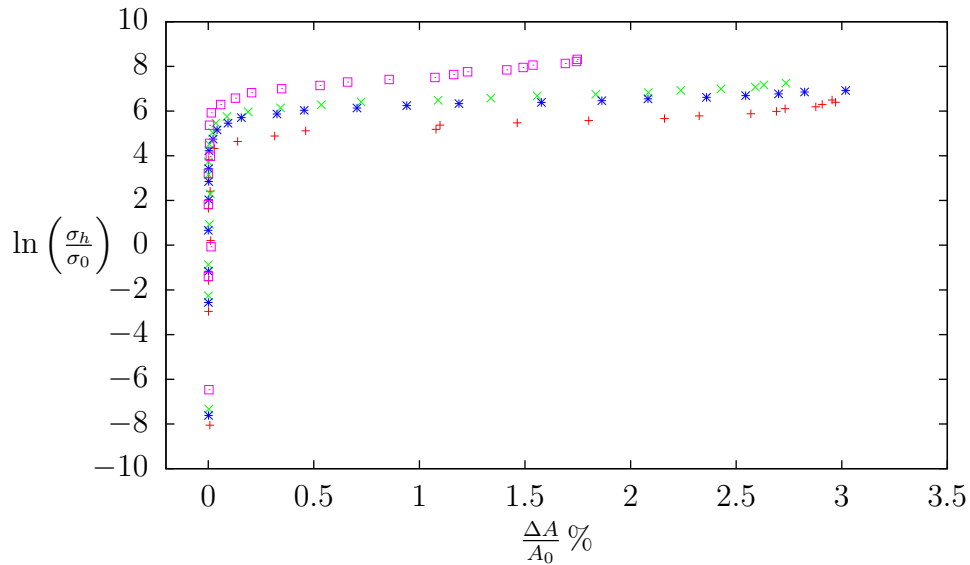


FIGURA 3.5: Gráfica de la deformación de GUVs de EggPC con MWNTs 20-30. Se muestran algunas curvas representativas de la deformación de los sistemas en campos eléctricos alternos. En el eje x se grafica el cambio de área porcentual de la vesícula, en el eje y se grafica el logaritmo de la tensión superficial en la membrana. Las barras de error son menores a los puntos de la gráfica. Cada código de color representa a una vesícula diferente.

Haciendo un ajuste lineal al régimen de aplanamiento, calculamos dureza de doblado κ_c , obteniendo un valor de

$$\kappa_{20-30} = 4 \pm 8 \times 10^{-17} \text{J}$$

El cual es 10 veces mayor que en el caso de las vesículas sin tubos; además, comparando las gráficas podemos apreciar que el régimen de estiramiento de las vesículas en ausencia de nanotubos (Figura 3.3), es mayor que el de las vesículas con los tubos 20-30 (Figura 3.5) dicho en otras palabras, las GUVs solas son más elásticas que las GUVs con nanotubos.

Este sistema es completamente nuevo en la literatura, y el valor que encontramos para la dureza de doblado, es mayor que en el caso de las vesículas solas en un orden de magnitud. Una posible explicación para este aumento en la dureza es la siguiente: Los nanotubos son estructuras hidrófobas, que al entrar en contacto con las vesículas provocan un reacomodo de los fosfolípidos de la membrana. Podemos pensar que los fosfolípidos “mojan” a los tubos y los recubren, enguyendolos y

atrapándolos en la membrana. Los lípidos que se utilizan para cubrir a los tubos, son parte del exceso de área de las vesículas, por lo que las ondulaciones de la membrana disminuyen, aumentando la dureza de doblado del sistema por el efecto de la disminución de lípidos libres.

Se repitió este mismo experimento con concentraciones más altas de nanotubos. Primero probamos con una concentración 3 veces mayor que la utilizada inicialmente. Las vesículas si se deformaban en esa condición, pero ocurría la aparición de “cadenas de perlas” a voltajes bajos ($\sim 6 V_{pp}$) aún al inicio de los experimentos (Figura 3.6), lo que impedía la correcta caracterización de los sistemas, por esta razón no se muestran resultados de las propiedades mecánicas en las condiciones mencionadas. Todos los nanotubos de multicapa “pristine” son conductores, esto podría ayudarnos a explicar la formación tan rápida de las cadenas. Pues al haber mayor concentración de estos nanotubos en las membranas, las vesículas se vuelven mas susceptibles al campo eléctrico, adoptando configuraciones eléctricas como dipolos, lo que explica su apilamiento en respuesta al campo eléctrico.

De igual manera, se exploró el sistema a mayores concentraciones en busca de algún fenómeno diferente, pero al agregar una cantidad diez veces mayor de nanotubos con respecto a la del experimento de deformación, las vesículas eran incapaces de deformarse con las condiciones a las que las podíamos someter (el voltaje máximo que nos permite aplicar el generador de funciones es de $10 V_{pp}$). Esto sugiere que la dureza de doblado de las membranas, aumenta proporcionalmente a la concentración de nanotubos que se encuentran embebidos en la misma. Este aumento se puede explicar pensando que los nanotubos “secuestran” al exceso de lípidos en la membrana, reduciendo las ondulaciones de la vesícula. Para poder explorar la dureza de doblado a estas concentraciones es necesario emplear otro tipo de técnicas, por ejemplo la electroporación, en esta se aplican campos eléctricos mas intensos. Se perfora la membrana y al medir las intensidades de campos empleados y los radios de poración es posible estimar la tensión superficial de las membranas.

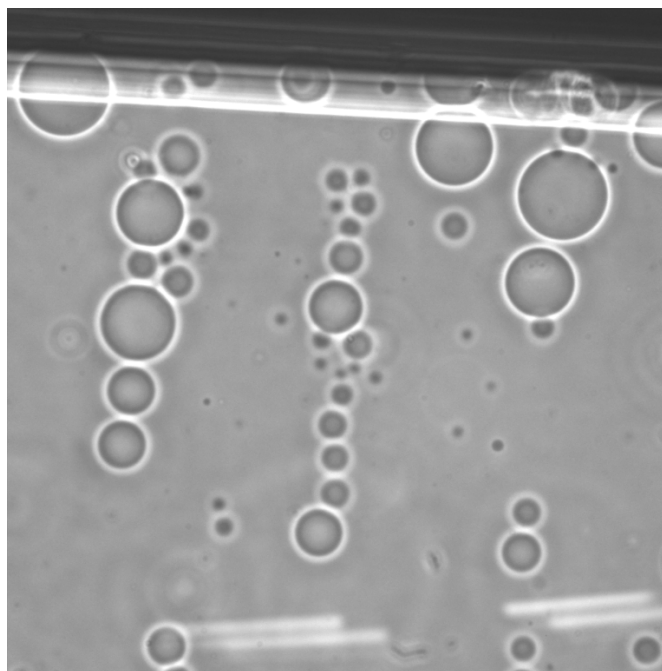


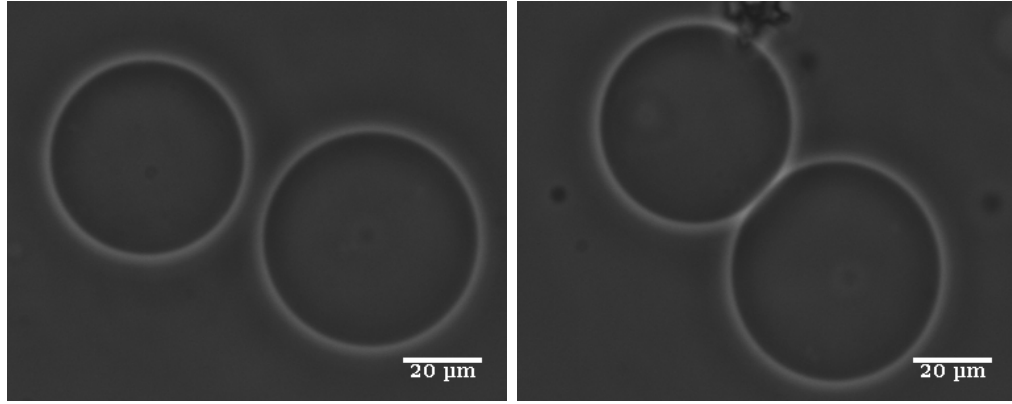
FIGURA 3.6: “Cadena de perlas” de GUVs incubadas con MWNTs 20-30. La formación de estas estructuras ocurriría muy rápidamente, en la imagen se muestra un cuadro de un video en donde se aplicó un campo eléctrico alterno de $10 V_{pp}$ al sistema en cuestión, en la parte superior podemos observar uno de los cables cilíndricos que forman la cámara. Las cadenas se formaron en los primeros 20 s de aplicado el voltaje.

GUVs en presencia de thin-MWNTs

El último sistema experimental que medimos consistió de vesículas de EYPC en presencia de thin-MWNTs. En la figura 3.7 se muestra la deformación alcanzada por una vesícula incubada con nanotubos thin, en ausencia y presencia de un campo eléctrico alterno. En este caso también es fácil notar que el estiramiento de las vesículas, es mucho menor que en el caso de las vesículas sin nanotubos (Figura 3.1).

Se deformaron 15 vesículas en estas condiciones y los datos se analizaron de la misma forma que anteriormente. En la gráfica que se muestra en la figura 3.8 podemos observar el comportamiento de las vesículas al ser deformadas.

Tomando los puntos del régimen de aplanamiento, se hizo un ajuste lineal para obtener la pendiente de esa región de la gráfica. Utilizando la ecuación 1.7 calculamos la dureza de doblado de este sistema:


 (A) 4 mV_{pp} , 100 kHz.

 (B) 10 V_{pp} , 100 kHz.

FIGURA 3.7: Respuesta al campo eléctrico por vesículas incubadas con thin-MWNTs. Se muestran los casos extremos de la deformación de una vesícula incubada con los nanotubos thin, al ser sometida a un campo eléctrico con una frecuencia de 100 kHz. En (A) con una intensidad de 4 mV_{pp} y en (B) con una intensidad de 10 V_{pp}

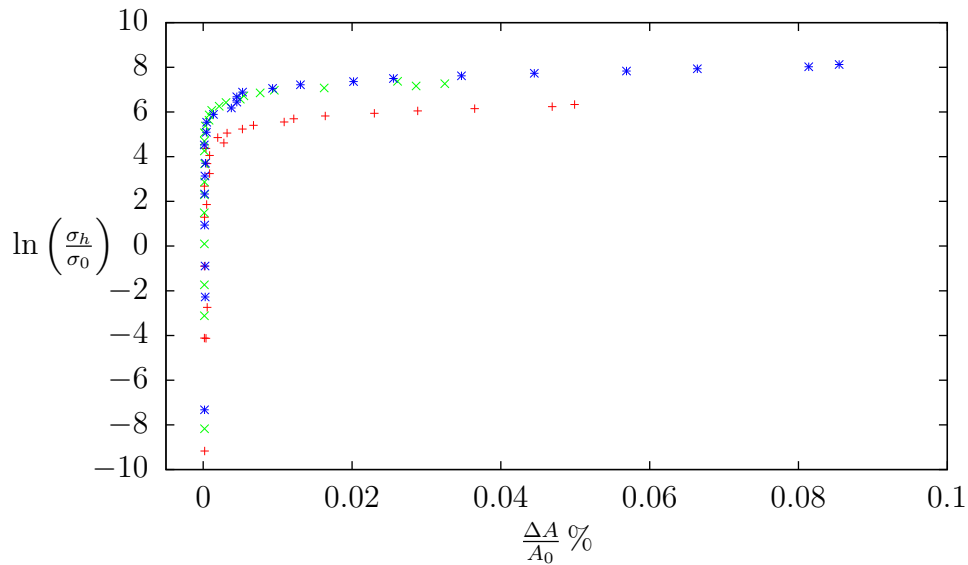


FIGURA 3.8: Gráfica de la deformación de GUVs de EYPC con thin-MWNTs. Se muestran algunas curvas representativas de la deformación de los sistemas en campos eléctricos alternos. En el eje x se grafica el cambio de área porcentual de la vesícula, mientras que en el eje y se grafica el logaritmo de la tensión superficial en la membrana. Las barras de error son menores a los puntos de la gráfica. Cada código de color representa a una vesícula diferente.

$$\kappa_{thin} = 1.3 \pm 0.7 \times 10^{-16} \text{ J}$$

Esta dureza de doblado tampoco ha sido reportada anteriormente en la literatura, y concuerda también con la explicación propuesta anteriormente.

En este caso, la dureza de doblado es incluso mayor que la del sistema con los tubos 20-30, siendo aproximadamente tres veces más grande en este caso. De la misma forma, podemos explicar este comportamiento pensando que los lípidos se adsorben a la superficie de los nanotubos. En este sistema, la diferencia más notoria es que los nanotubos thin presentan longitudes y diámetros menores que las de los tubos 20-30. De tal manera que al internalizarse en la región hidrófoba de la membrana, causan un reacomodo mayor en los lípidos, aplanando de manera más efectiva a las ondulaciones de la membrana.

En un experimento posterior, intentamos deformar las vesículas agregando una mayor cantidad de nanotubos (10 veces más que en el experimento de deformación), sin embargo, no pudimos deformar las vesículas debido al aumento en la tensión de las mismas y por causa del límite experimental de nuestro generador de funciones, con lo que también se aprecia un aumento en la dureza de doblado de las vesículas que es proporcional a la concentración de nanotubos en la muestra. En este sistema no se observó la formación de “cadenas de perlas”

Ambos tipos de nanotubos tienen un efecto similar aumentando la dureza de las membranas. Nosotros atribuimos este aumento en la dureza al reacomodo de los lípidos, que al adsorberse sobre los nanotubos causan una disminución en el área de las vesículas. Estos experimentos de electrodeformación arrojan evidencia a favor de que los nanotubos de carbono multicapas “pristine” permanecen en la membrana de las vesículas y afectan sus propiedades mecánicas, aumentando la dureza de éstas.

3.3. Conclusiones

Encontramos que los nanotubos de carbono si afectan las propiedades mecánicas de las membranas de las GUVs. La primera de ellas, y la más notoria es que la dureza de doblado de las membranas aumenta en presencia de los nanotubos; así mismo, el módulo de estiramiento de las vesículas también incrementa cuando colocamos a las GUVs en presencia de MWNTs. Podemos dar un estimado del cambio en el modulo de estiramiento basándonos en el régimen de estiramiento de las diferentes gráficas (Figuras 3.3, 3.5 y 3.8) notando un aumento de al menos el doble para el caso de nanotubos 20-30 y hasta 50 veces para los nanotubos thin. En cada caso, el modulo de estiramiento da cuenta de que la membrana esta completamente estirada y se comienza a aumentar el área por lípido, con la posibilidad de crear un poro en la membrana.

Los nanotubos que utilizamos tienen características físicas distintas, esto da pie a diferencias en los efectos causados por ellos en las membranas. Los nanotubos 20-30 mostraron, además de los cambios en las propiedades mecánicas, un cambio en las propiedades eléctricas del sistema GUVs –MWNTs, volviendo a las vesículas más conductoras eléctricamente. Este fenómeno fue observado cualitativamente al momento de aplicar los campos eléctricos, en donde los sistemas de GUVs –MWNTs mostraron mayor sensibilidad a los campos eléctricos que los sistemas de GUVs solas.

Los nanotubos thin no causaron un cambio apreciable en las propiedades eléctricas del sistema al observarlas al microscopio, sin embargo, estos nanotubos fueron los que afectaron las propiedades mecánicas del sistema de mayor manera, teniendo un incremento mayor en la dureza de doblado y en el modulo de estiramiento.

Referencias

- [1] Alberto Bianco, Kostas Kostarelos, and Maurizio Prato. Applications of carbon nanotubes in drug delivery. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 9:674–679, 2005.
- [2] Rumiana Dimova, Natalya Bezlyepkina, Marie Domange Jordö, Roland L Knorr, Karin A Riske, Margarita Staykova, Petia M Vlahovska, Tetsuya Yamamoto, Peng Yang, and Reinhard Lipowsky. Vesicles in electric fields: Some novel aspects of membrane behavior. *Soft Matter*, 5(17):3201–3212, 2009.
- [3] J. F. Faucon, M. D. Mitov, P. Meleard, I. Bivas, and P. Bothorel. Thermal fluctuations of giant vesicles and elastic properties of bilayer lipid membranes. *J. Phys. (Paris)*, 50:2389, 1989.
- [4] Nadine Wong Shi Kam and Hongjie Dai. Carbon nanotubes as intracellular protein transporters: generality and biological functionality. *J. Am. Chem. Soc.*, 127:6021–6026, 2005.
- [5] M Kummrow and W Helfrich. Deformation of giant lipid vesicles by electric fields. *Physical Review A*, 44(12):8356, 1991.
- [6] Edita Sarukhanyan, Antonio De Nicola, Danilo Roccatano, Toshihiro Kawakatsu, and Giuseppe Milano. Spontaneous insertion of carbon nanotube bundles inside biomembranes: A hybrid particle-field coarse-grained molecular dynamics study. *Chemical Physics Letters*, 595:156–166, 2014.

Capítulo 4

Análisis de la interacción GUVs con MWNTs mediante microscopía confocal

4.1. Introducción

Para averiguar si los efectos causados por los CNTs en las propiedades mecánicas de las vesículas, son en realidad causados por la interacción entre los nanotubos y los lípidos de la membrana, procedimos a analizar los sistemas GUVs –MWNTs utilizando marcadores fluorescentes para observar a cada uno de los componentes del sistema. Los fosfolípidos llevaban unida covalentemente una molécula de rodamina, la cual nos permitió ver a las membranas de las vesículas de un color rojo intenso. Los nanotubos llevaban unidas, de manera no covalente, moléculas de FITC, con lo que los podíamos observar fluoresciendo de un color verde muy intenso.

Utilizamos estos dos marcadores fluorescentes para determinar la localización de los CNTs al estar en presencia de las GUVs. Para llevar a cabo este análisis, utilizamos un microscopio confocal.

4.2. Resultados

En el laboratorio se cuenta con nanotubos de carbono marcados con fluoresceína, de tal forma que al verlos en un microscopio de fluorescencia brillan de color verde intenso. Los fosfolípidos fluorescentes se compraron para estos experimentos. Éstos tienen una molécula de rodamina B unida a su cabeza polar, lo que hace que fluorescan en un color rojo intenso.

El primer paso para analizar estos sistemas fue la síntesis de las vesículas fluorescentes. Utilizando el protocolo descrito en la metodología sintetizamos GUVs fluorescentes “fGUVs”. En la siguiente figura se muestran estas vesículas vistas con un microscopio de fluorescencia.

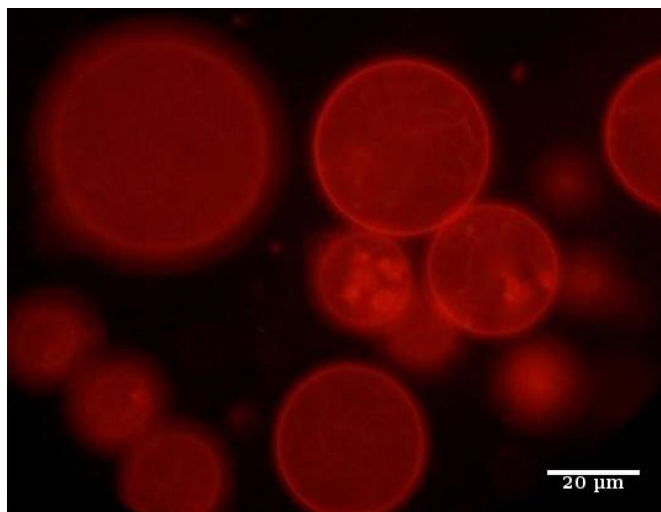


FIGURA 4.1: GUVs fluorescentes (fGUVs). En la imagen se muestran a las vesículas fluorescentes obtenidas por el método de electroformación. Imagen tomada con un aumento de 60x.

Una vez que se dominó el protocolo de formación de fGUVs, se procedió a analizar a las estructuras utilizando un microscopio confocal.

4.2.1. fGUVs con MWNTs

Los resultados obtenidos en el capítulo 3 sugieren que los CNTs permanecen en la membrana de las vesículas, ya que la dureza de doblado de las vesículas aumenta al

estar en contacto con los nanotubos. Para confirmar esto se observaron los sistemas fluorescentes de GUVs con MWNTs, al microscopio confocal.

fGUVs con MWNTs 20-30

El primer sistema que se analizó en el confocal, fue el de fGUVs con nanotubos 20-30, en la figura 4.2 se muestra una fotografía de una rebanada óptica de la muestra, en donde se aprecia que los tubos (verde) se introducen a las vesículas (rojo), en un gran número de casos. En menor cantidad observamos que existen vesículas con CNTs en su membrana, colocalizando con los lípidos de la vesícula.

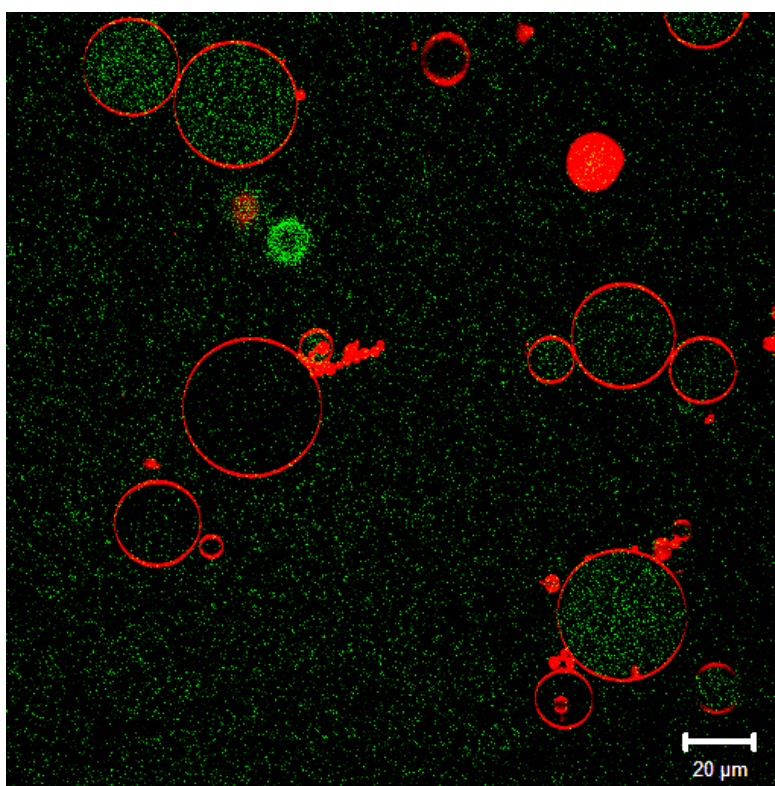


FIGURA 4.2: Rebanada óptica del sistema de fGUVs con MWNTs 20-30. Se muestra una imagen de microscopía confocal de la muestra en cuestión, donde se aprecian diferentes situaciones de interacción. En algunos casos se aprecia que los CNTs se internalizan en las vesículas, y en otros se ve como los CNTs cubren completamente a las GUVs, apagando la fluorescencia de la rodamina por la interacción con los CNTs.

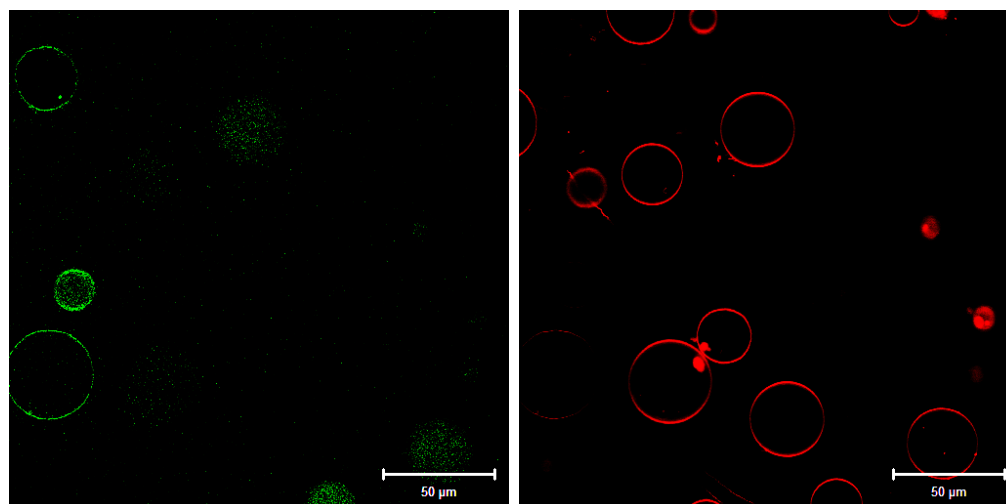
Resulta muy interesante que en un mismo campo de la muestra, encontramos diferentes situaciones de la interacción de las moléculas. En la figura 4.2 podemos ver una vesícula que sólo está marcada de color verde; esto es de particular interés

porque todas las vesículas están compuestas por lípidos marcados con rodamina, por lo que la aparición de una vesícula sin fluorescencia de esta molécula en condiciones sin tubos es prácticamente imposible. Más aún, que la vesícula esté marcada sólo con fluoresceína, indica que la interacción entre las moléculas (nanotubos y lípidos) es muy estrecha, tanto que esta interacción posiblemente esté causando el apagamiento de la rodamina. Esto nos alienta a pensar que los nanotubos interactúan fuertemente con los fosfolípidos en la membrana.

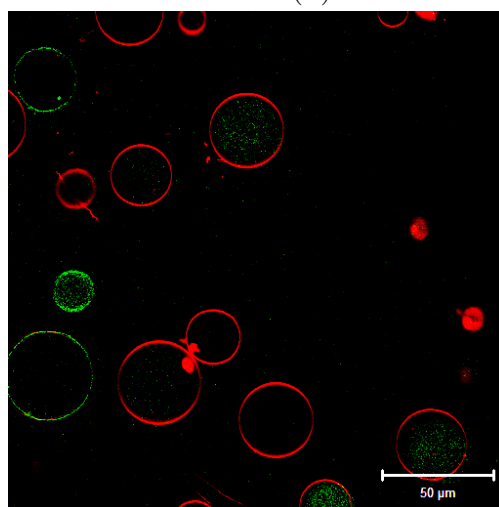
En esa misma imagen encontramos un par de situaciones de gran interés para este trabajo. La primera es que en la esquina inferior derecha de la figura 4.2 se aprecia una vesícula en la cual se han internalizado los nanotubos marcados. Esto genera ideas encontradas, porque desde un punto de vista de aplicaciones, como en la entrega controlada de fármacos, resulta muy alentador que los nanotubos sean capaces de atravesar la membrana de la vesícula por medio de difusión y permanecer en su interior, este fenómeno necesita ser mas estudiado para determinar las condiciones necesarias para que ocurra esta internalización.

Por otra parte, la explicación que se planteó en la sección 3.2.2 de la deformación de las vesículas con nanotubos, en la que se propuso que el cambio de la dureza de doblado se debe al secuestro del exceso de lípidos por parte de los nanotubos, podría estar comprometida. Esto debido a que si los CNTs se internalizan pueden afectar las propiedades eléctricas del medio interno, volviéndolo muy conductivo, de tal manera que al aplicar un campo eléctrico a la membrana, que en condiciones normales es un dieléctrico, se vuelva conductora a bajas frecuencias y con ello no permita que el campo interactúe con la vesícula como se planteó en el modelo de Kummrow y Helfrich. Esto mismo puede explicar la aparición de cadenas de perlas.^a bajos voltajes, como se vio en la sección 3.2.2

En la figura 4.3 se muestran los canales de color de un área distinta de la misma muestra, en donde se aprecian diferentes fenómenos. Por ejemplo, la aparición de vesículas marcadas en color verde por los nanotubos. También se puede ver que siguen apareciendo las vesículas que tienen CNTs en su interior.



(A) MWNTs 20-30 marcados con FITC (B) GUVs marcadas con rodamina



(C) Superposición de A y B

FIGURA 4.3: Canales de color separados del sistema de fGUVs con MWNTs 20-30. En el panel (A) se muestran los nanotubos funcionalizados con FITC, en el panel (B) se muestra la fluorescencia de la rodamina, que marca las membranas de las vesículas. Finalmente, el panel (C) es la superposición de los canales A y B, se aprecian regiones de color amarillo, es donde colocalizan los nanotubos con los lípidos en la membrana de las vesículas. Además, se observan GUVs que tienen CNTs en su interior y en otros casos GUVs con nanotubos en su membrana.

En la esquina inferior izquierda de la imagen 4.3b se aprecia una vesícula marcada muy tenue en color rojo y en el panel (c) se puede ver que esta vesícula está rodeada por nanotubos fluorescentes, lo cual nos deja ver que la fluorescencia de la rodamina se ve afectada por la presencia de los CNTs.

La posible explicación a estos resultados, tiene que ver con las condiciones en las

que se encuentra el sistema. En estos análisis de microscopía confocal se utilizaron concentraciones altas de nanotubos, las cuales fueron 20 veces mayores que las utilizadas en los experimentos de deformación. Este drástico aumento en la concentración podría ser el causante de que los tubos entren a las vesículas, pues se genera un gradiente de concentración entre el medio interno de la vesícula y el externo. Además encontramos situaciones en las que no se internalizan los nanotubos, esto podría ser un efecto de la incubación, que al realizarse en tubos con fondo cónico y en reposo, provoca que las vesículas precipiten al fondo, quedando unas sobre otras formando capas de vesículas. Por lo que al agregar los nanotubos, éstos alcanzan de una mejor manera a las vesículas que quedaron en la parte superior del decantado, alcanzando menos a las vesículas del fondo por quedarse atrapados en las membranas de las primeras vesículas.

fGUVs con thin-MWNTs

El último sistema que analizamos, fue el de las vesículas fluorescentes en contacto con los nanotubos thin. En la figura 4.4 se muestra un corte óptico del sistema en cuestión. En este experimento las vesículas también están marcadas con rodamina y los nanotubos con fluoresceína.

En este sistema apareció una nueva característica en las vesículas. Tanto en la figura 4.4, como en la 4.5 se pueden ver vesículas que se han adherido, como si fuesen burbujas de jabón. Este nuevo fenómeno sugiere que los nanotubos se encuentran en la membrana de las vesículas y que además cambian la tensión superficial de las vesículas propiciando que se unan sin fusionarse (sin formar una vesícula de mayor tamaño), a pesar que la fluorescencia de los CNTs en la región interna de las vesículas es mayor que en sus membranas. Por otra parte, se sigue presentando el fenómeno de internalización, lo que también podría ayudar a explicar el aumento en la dureza de doblado y el módulo de estiramiento de las GUVs incubadas con nanotubos thin. Ya que, si a bajas concentraciones también ocurre esta internalización, se puede explicar el incremento en la dureza de doblado de las vesículas de la siguiente manera. Al aumentar la concentración de CNTs

en el interior de la vesícula vuelven más denso al medio interno, por lo que para deformar a estas GUVs se necesita una mayor cantidad de energía. Por la misma razón incrementa el módulo de estiramiento, el cual se ve afectado de manera similar a cuando se llena un globo con alguna sustancia más densa que el aire que habitualmente ponemos dentro. De esta manera, los CNTs endurecen a las GUVs modificando la densidad del medio interno, incrementando el módulo de estiramiento de la vesícula.

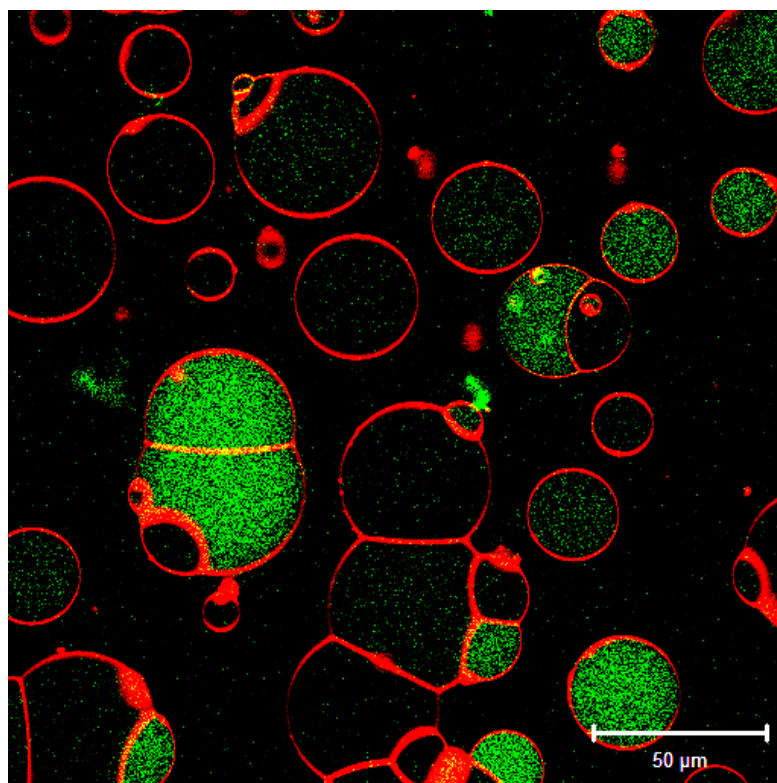
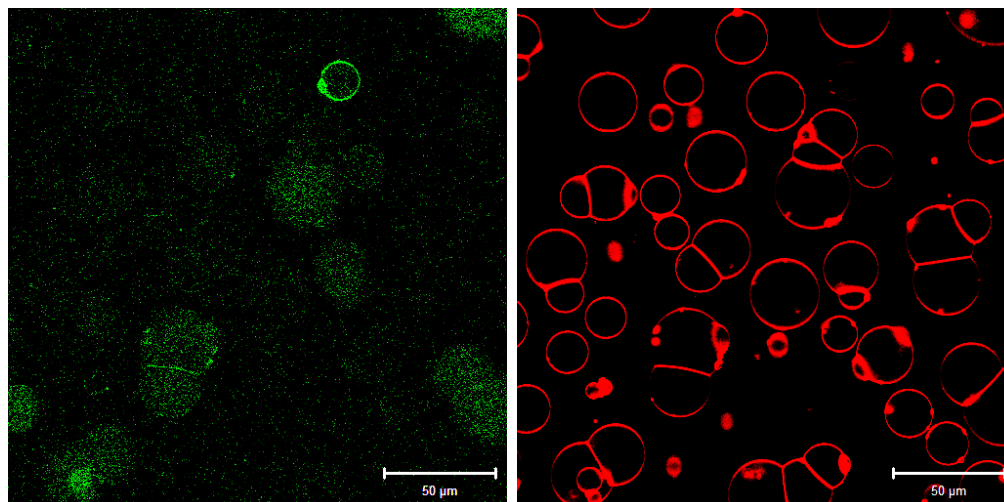
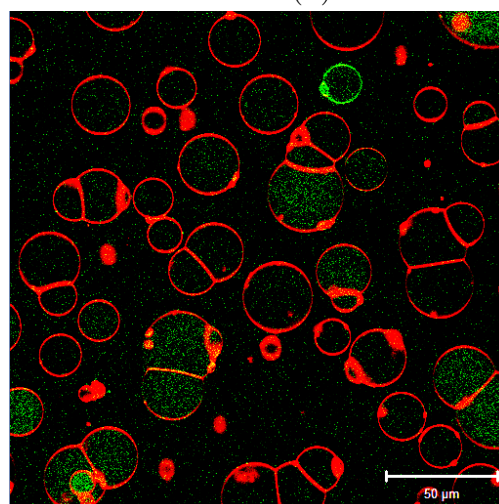


FIGURA 4.4: Rebanada óptica del sistema de fGUVs con thin-MWNTs. Se muestra una imagen confocal de la muestra, donde se aprecian diferentes fenómenos de interacción, causados por los nanotubos.

En este sistema encontramos situaciones parecidas a las que vimos con los nanotubos 20-30. Por ejemplo, también se encontraron vesículas que presentaban fluorescencia por parte de los tubos (verde) en la membrana. En la imagen 4.5 se encuentran separados los canales de fluorescencia de un campo distinto y podemos apreciar con claridad este fenómeno. También en la segunda imagen encontramos vesículas que contienen a los nanotubos en su interior, como en el caso de los tubos 20-30 (Figura 4.2).



(A) thin-MWNTs marcados con FITC (B) GUVs marcadas con rodamina



(c) Superposición de A y B

FIGURA 4.5: Canales de color separados del sistema de fGUVs con thin-MWNTs. En el panel (A) se muestran los nanotubos funcionalizados con FITC, en el panel (B) se muestra la fluorescencia de la rodamina, que marca las membranas de las vesículas. Finalmente, el panel (C) es la suma de los canales A y B, se aprecian regiones de color amarillo, es donde colocalizan los nanotubos con los lípidos en la membrana de las vesículas. De manera similar al caso de los tubos 20-30, se observan vesículas que han perdido su fluorescencia de rodamina. En estas condiciones aparecieron estructuras de vesículas adheridas en toda la muestra.

En la figura 4.5 se aprecia una vesícula en la esquina superior derecha, marcada con fluoresceína, en el panel (b) se puede apreciar la misma vesícula pero de manera muy tenue, marcada con rodamina. A pesar de que este fenómeno es como el observado con los nanotubos 20-30, no es tan frecuente como en ese caso. Esto puede deberse a las diferencias estructurales de los nanotubos 20-30 y thin, pues

los nanotubos thin son mas cortos que los 20-30, lo que podría propiciar su entrada a las vesículas como nanoagujas, pudiendo llegar hasta el interior de las vesículas y no solo a las membranas como en el caso de los 20-30, los cuales probablemente estén intercalandose en la membrana de las vesículas.

Hay que recordar que las condiciones utilizadas en estos experimentos son muy diferentes a las que se usaron en los experimentos de deformación. Una posible explicación a estos fenómenos es que la concentración de los nanotubos es la causa de la aparición de estas nuevas estructuras, siendo que algunos de estos fenómenos no aparecieron en bajas concentraciones de nanotubos.

4.3. Conclusiones

Mediante microscopía confocal nos fue posible determinar la localización de los nanotubos al entrar en contacto con las GUVs. Encontramos diferentes configuraciones para cada tipo de nanotubo utilizado.

Se observó que en la mayoría de los casos, los nanotubos 20-30 se encuentran en las membranas de las vesículas, lo que ayuda a confirmar las suposiciones hechas en el capítulo anterior, donde se especuló acerca del incremento de la dureza de doblado de estos sistemas.

Sin embargo, los nanotubos thin no se encontraron tan frecuentemente interactuando con las membranas de las vesículas al analizarlas con este método, sino que se observó que los nanotubos generan la aparición de estructuras diferentes a las anteriormente vistas, como son las vesículas adheridas como burbujas de jabón. Estas observaciones, apoyan la idea de que los thin-MWNTs interactúan con la región hidrófoba de las membranas, a bajas concentraciones.

Encontramos diferentes configuraciones en la localización de las estructuras. Siendo inesperado que los nanotubos hayan sido capaces de internalizarse en las vesículas, observamos esto de manera independiente del tipo de nanotubo utilizado. Este fenómeno se puede atribuir a la alta concentración de nanotubos en el medio.

En los dos tipos de nanotubos se presentaron situaciones muy particulares, en ambos casos se pudieron ver vesículas que habían perdido su fluorescencia de rodamina, lo que nos indica una estrecha interacción entre los nanotubos y los fosfolípidos. También, encontramos vesículas en donde los tubos se encontraban en la membrana, esto ocurrió en mayor medida con los nanotubos 20-30.

Podemos concluir que los nanotubos de carbono 20-30 si interactúan con la membrana de las vesículas gigantes. Esta interacción es tal que los nanotubos permanecen en la membrana y apagan la fluorescencia de la rodamina en las vesículas. Esta observación concuerda con el aumento en la dureza de doblado de las membranas.

Los nanotubos thin se internalizan la mayoría de las veces, lo que también puede explicar el aumento de la dureza de doblado de las membranas. Sin embargo, se necesita llevar a cabo más experimentos que determinen las condiciones necesarias para que los nanotubos thin permanezcan sólo en las membranas, como en el caso de los 20-30.

Capítulo 5

Conclusiones y Perspectivas

5.1. Conclusiones

En este trabajo se estudiaron las propiedades mecánicas de los sistemas GUVs – MWNTs, mediante el método de electrodeformación. Pudimos observar diferentes fenómenos que surgieron al agregar nanotubos a las vesículas.

El primero de estos fenómenos fue el aumento en la dureza de doblado de las vesículas. En la tabla 5.1 se muestran los datos de la dureza de doblado para los distintos sistemas analizados en este trabajo.

Sistema	Valor en la literatura 10^{-19}J	Valor en este trabajo 10^{-18}J
GUVs de EYPC	0.247[2] 2.3[1]	3 ± 0.5
GUVs + MWNTs 20-30	N.R.*	40 ± 80
GUVs + thin-MWNTs	N.R.*	130 ± 70

TABLA 5.1: Tabla comparativa de las durezas de doblado. *N.R.: No Reportado.

La dureza de doblado de nuestro sistema en ausencia de los nanotubos es un orden de magnitud mayor al reportado en la literatura debido a la diferencia en los sistemas experimentales. En nuestro caso utilizamos soluciones con azúcares

en los medios internos y externos, mientras que en los reportados en la literatura solo utilizan agua desionizada para ambos medios.

En la tabla 5.1 se puede apreciar de mejor manera el cambio que presentan los sistemas de GUVs con MWNTs. La dureza de los sistemas con nanotubos es mayor que el de las vesículas solas, aumentando en un orden de magnitud. También existen diferencias entre los sistemas con diferentes tipos de nanotubos. Los nanotubos thin endurecen aproximadamente tres veces más a las vesículas, que los nanotubos 20-30.

En el caso de los nanotubos 20-30, se propone que este cambio en la dureza se debe al reacomodo de los lípidos de la membrana, los cuales recubren a los nanotubos que están en contacto con las vesículas. Este reacomodo se ve reflejado en la disminución de las ondulaciones en la membrana, lo cual es un claro indicio del aumento en la tensión de la membrana y de su dureza de doblado. Esta misma explicación tiene que ser revisada para el caso de los nanotubos thin, ya que se vio que estos tienden a internalizarse más fácilmente que los nanotubos 20-30, lo que podría causar un cambio en la conductividad del medio, afectando el efecto del campo eléctrico en las vesículas.

La diferencia de durezas entre los tipos de nanotubos se puede atribuir a los distintos fenómenos que causan cada uno de los nanotubos, pues mientras los 20-30 interactúan fuertemente con las membranas, los tubos thin se internalizan fácilmente.

El segundo fenómeno que surgió en los sistemas GUVs–MWNTs fue el de la internalización de los CNTs en las GUVs, situación inesperada debido a la naturaleza hidrófoba de ambos tipos de nanotubos. Esta situación debe ser explorada con mayor detalle para determinar las condiciones necesarias que causen la internalización de estas nanoestructuras. Esto es un hallazgo importante en el que se puede apreciar el gran potencial de los CNTs como acarreadores de fármacos. Se debe notar que las dimensiones de los CNTs juegan un papel importante en la internalización. Los thin-MWNTs presentaron más eventos de internalización y en mayor cantidad que los MWNTs-20-30.

Utilizando el microscopio confocal, pudimos visualizar que la interacción de los CNTs con las GUVs no ocurre de manera homogénea en la muestra, sino que los diferentes fenómenos varían en intensidad de vesícula en vesícula. Con esta observación podemos explicar la gran dispersión de los datos obtenidos al medir la dureza de doblado de los sistemas con nanotubos thin y 20-30.

También con ayuda del microscopio confocal, pudimos observar la aparición de nuevas estructuras en el caso de los sistemas de GUVs con nanotubos thin. En este caso se encontró que las vesículas tendían a adherirse unas con otras. Es por este motivo que no se descarta la interacción de los thin-MWNTs con la región hidrófoba de la membrana, ya que en experimentos similares en el laboratorio, se han encontrado este mismo tipo de estructuras al poner en contacto CNTs con GUVs.

Con este trabajo nosotros podemos afirmar que los nanotubos 20-30, al ser hidrófobos, interactúan fuertemente con la membrana de las vesículas, sin embargo, pueden internalizarse en las vesículas. La interacción entre los nanotubos y los fosfolípidos de las membranas hace que las últimas presenten un incremento en su dureza de doblado, lo cual deberá de tomarse en cuenta si se quiere utilizar a los nanotubos en aplicaciones médicas, como en la entrega controlada de fármacos o en cualquier situación donde tengan que interactuar con células y tejidos (en nanosensores, agentes de contraste, etc.). Los nanotubos thin podrían ser un mejor candidato para la entrega controlada de fármacos ya que se vio que pueden internalizarse en mayor cantidad a las vesículas.

5.2. Perspectivas

En las imágenes de microscopía confocal muestran una distribución de nanotubos en las vesículas muy heterogénea. Encontramos algunas vesículas con una gran concentración de nanotubos, tanta que los encontramos en el interior de la vesícula y no solo en la membrana. Es por esto que los ensayos de deformación deberían llevarse a cabo nuevamente, pero utilizando sistemas que nos permitan

conocer la cantidad de nanotubos en las vesículas; por ejemplo utilizando nanotubos marcados con moléculas fluorescentes. O realizar los experimentos de confocal nuevamente disminuyendo la concentración, utilizando la misma que en los ensayos de deformación.

Se realizaron experimentos en donde se quiso aumentar la cantidad de nanotubos utilizados, al momento de deformar a las vesículas, pero no se obtuvieron resultados debido a las limitaciones experimentales de nuestro sistema (el límite de voltaje de nuestro generador de funciones). Aún así, se observó que la dureza de doblado de las membranas aumenta con la concentración de los nanotubos. Un experimento futuro, sería el de aumentar gradualmente la concentración de los nanotubos agregados a las vesículas, con la finalidad de hacer una curva de respuesta de la dureza del sistema, con respecto a la concentración de nanotubos utilizada.

Analizar los sistemas con CNTs a concentraciones altas utilizando campos eléctricos alternos con frecuencias distintas a las utilizadas en este trabajo, con la finalidad de observar algún cambio en el comportamiento de las vesículas debido a la presencia de los CNTs. Así mismo, analizar los sistemas de GUVs–MWNTs con altas concentraciones de CNTs utilizando campos eléctricos más intensos, para determinar si existe un punto de rompimiento de estos sistemas.

Las vesículas que se utilizaron para los ensayos de deformación estaban hechas con lípidos EggPC, los cuales son una mezcla de lípidos extraídos de la yema de huevo. Resultaría interesante utilizar diferentes mezclas de fosfolípidos, o agregar colesterol u otro tipo de lípidos, para formar las vesículas y realizar estos ensayos de deformación en presencia y ausencia de nanotubos para determinar si la composición de las membranas juega algún papel en la interacción con los nanotubos.

Un paso más adelante, sería el de utilizar modelos celulares más complejos, como es el caso de las células “fantasma”. Estas células se conocen como fantasmas porque se les extrae su citoplasma, dejando sólo una membrana celular. Aumentando la complejidad del sistema, nos ayudaría a entender de mejor manera el comportamiento de los nanotubos al interactuar con sistemas biológicos, para que

eventualmente se puedan implementar en la industria médica y explotar su gran potencial.

Los estudios realizados en este trabajo mostraron ser los adecuados para conocer los efectos de los nanotubos en las bicapas de GUVs. Por esta razón, es necesario continuar con estos análisis, pero ahora estudiando diferentes nanoestructuras de carbono, como los fullerenos, los nanodiamantes o el grafeno. En el laboratorio de Nanoestructurados Multifuncionales (donde se llevó a cabo este trabajo) se cuenta con diferentes alótropos nanométricos del carbono, lo que hace viable esta perspectiva de trabajo.

También se pueden implementar diferentes técnicas como las de microfluídica, que nos permitan apreciar la interacción de los sistemas GUVs–MWNTs con diferentes sustratos al aplicar un flujo a la muestra. Observar la dinámica de estos sistemas nos ayudará a entender mejor las propiedades mecánicas de éstos, y plantear posibles usos para los mismos en la nanomedicina.

Referencias

- [1] J. F. Faucon, M. D. Mitov, P. Meleard, I. Bivas, and P. Bothorel. Thermal fluctuations of giant vesicles and elastic properties of bilayer lipid membranes. *J. Phys. (Paris)*, 50:2389, 1989.

- [2] M Kummrow and W Helfrich. Deformation of giant lipid vesicles by electric fields. *Physical Review A*, 44(12):8356, 1991.