



Interacción de membranas de lípidos con filamentos de actina y campos eléctricos

Tesis que para obtener el grado de Doctor en Ciencias Interdisciplinarias presenta

M. en C. María Gabriela Yolanda Ángeles Robles

Línea de investigación

Biofísica y Materia Blanda

Director de tesis

Dr. Said Eduardo Aranda Espinoza

San Luis Potosí, septiembre de 2022



**POSGRADO
EN CIENCIAS
INTERDISCIPLINARIAS**





<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

doi: [10.1016/j.bbamem.2022.183883](https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2022.183883)

Resumen

Los límites de la célula están constituidos por las membranas biológicas, las barreras que definen el interior y exterior de ésta. Todas las membranas tienen una estructura general común, que consta de una bicapa de fosfolípidos con proteínas y moléculas de colesterol incrustadas en ella. Otro componente de la célula es el citoesqueleto, el cual es la red tridimensional de proteínas que brinda soporte interno a la célula e interviene en diversos procesos celulares que presentan cambios en las propiedades mecánicas de la membrana. Una de las proteínas presentes en el citoesqueleto es la actina, y cuando ésta polimeriza sus filamentos son los responsables de brindar dicho soporte.

La célula es un sistema dinámico y mantiene una actividad mecánica, química y eléctrica, de ahí que los campos eléctricos puedan afectarlas. Éstas exhiben diferentes comportamientos dependientes de la frecuencia de los campos eléctricos aplicados, tales comportamientos han estimulado considerables esfuerzos de modelado dirigidos a la comprensión de los mecanismos físicos en la interacción de los campos eléctricos con células y tejidos. Pero la célula es una estructura bastante compleja y una evidente simplificación debe hacerse. Enfocaremos nuestra atención sólo en la membrana de lípidos antes de tratar de entender los efectos de los campos eléctricos en las células. Las vesículas tienen un comportamiento similar a las células cuando se les aplican campos eléctricos alternos.

El objetivo de este trabajo es hacer un estudio de las propiedades mecánicas de membranas lipídicas mediante la deformación de vesículas gigantes de una sola bicapa formadas de lípidos DMPC, EggPC y DOPC con la proteína actina encapsulada en su interior, polimerizada y sin polimerizar. Esto con el fin de determinar si la mera presencia (sin polimerizar) de dicha proteína afecta sus propiedades mecánicas o si es necesario que ésta polimerice para alterarlas. La deformación se logra aplicando un campo eléctricos AC, deformándolas en elipsoides de revolución. Se utiliza el tensor de esfuerzos de Maxwell para calcular las tensiones laterales que actúan sobre la bicapa lipídica durante la deformación. El modelo teórico que se utilizará está basado en el desarrollado por Kummrow y Helfrich, considerando las propiedades físicas del medio interno y externo a la membrana y tomando las contribuciones del tensor de esfuerzos de Maxwell.

Abstract

Biological membranes establish the cell boundaries, these are the barriers that define the inside and outside of the cell. All membranes have a common overall structure consisting of a phospholipid bilayer with proteins and cholesterol molecules embedded in it. Another cellular component is the cytoskeleton, which is the three-dimensional protein network that brings internal support to the cell, and it is involved in several cellular processes that present changes in the mechanical properties of membranes. One of the proteins present in the cytoskeleton is actin and, when it polymerizes, its filaments are in charge if provide such support.

Cell is a dynamic system that maintains a mechanical, chemical and electrical activity, hence electric fields can affect them. They exhibit different behaviors depending on the frequency of the applied electric field, such behaviors have stimulated modeling efforts aimed to understand the physical mechanisms in the interactions of electric fields with cells and tissues. But the cell is a very complex structure, and an evident simplification must be done. We will focus our attention only on the lipid membrane before trying to understand the effects of electric fields on cells. Vesicles have a similar behavior to cells when they are subjected to an electric field.

The objective of this work is to study the mechanical properties of lipid membranes through the deformation of giant unilamellar vesicles formed from lipids DMPC, EggPC and DOPC, with actin protein encapsulated within, polymerized and unpolymerized. To determine if only the presence of this protein (unpolymerized) affects its mechanical properties or if it is necessary to polymerize to affect them. The deformation is achieved by applying an AC electric field, deforming the into ellipsoids of revolution. The Maxwell stress tensor is used to calculate the lateral stresses acting on the lipid bilayer during deformation. The theoretical model that will be used is based on the one developed by Kummrow and Helfrich, considering the physical properties of the internal and external environment to the membrane and taking the contributions of the Maxwell stress tensor.

Agradecimientos

- A mi hijo, por ser mi motor. Gracias por iluminar cada uno de mis días con tu inocencia y con tu amor. Gracias por recordarme que todos los días son un regalo porque tengo la fortuna de verte crecer. Gracias por despertar en mi la fuerza que no sabía que tenía.
- A mi esposo Luis, por ser mi mejor amigo y mi apoyo. Nada en mi vida está completo hasta que lo comparto contigo. Gracias por estar ahí cuando sentía que todo se derrumbaba. Gracias por todo tu amor.
- A mi Gizmo. Estuviste conmigo al principio de este viaje, acompañádome en mis noches de estudio, en nuestros viajes de Zacatecas a San Luis y todos los momentos importantes de mi vida. Ojalá siguieras aquí conmigo. Gracias mi angelito peludo hasta donde estés.
- A mi familia. A mi madre, porque ella nunca se dio por vencida. A Lupis, Alfredo, Felipe, Didhier, Fátima, Daniel y Diego, gracias por siempre estar ahí para apoyarme en todo.
- Al Instituto de Física de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí y a los investigadores de dicho Instituto que de una u otra forma contribuyeron a mi formación.
- A CONACyT por el apoyo 460606 y al proyecto CB-2011-169504.

“The present is theirs; the future, for which I really worked, is mine”.

Nikola Tesla

Índice general

	Pág.
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 La célula.....	1
1.2 La membrana plasmática.....	2
1.3 Citoesqueleto.....	4
1.3.1 Microtúbulos.....	4
1.3.2 Filamentos intermedios.....	5
1.3.3 Filamentos de actina.....	6
Capítulo 2. Antecedentes.....	9
2.1 Efectos de los campos eléctricos en las células.....	9
Capítulo 3. Motivación.....	12
3.1 Vesículas: un modelo celular.....	12
Capítulo 4. Objetivo.....	14
Capítulo 5. Metodología teórica.....	15
5.1 Propiedades mecánicas de membranas.....	15
5.2 Modelos teóricos para la deformación de vesículas.....	16
5.2.1 Modelo de Kummrow y Helfrich.....	16
5.2.2 Modelo teórico para la deformación de vesículas generalizado.....	17
Capítulo 6. Metodología experimental.....	20
6.1 Reconstitución de los componentes del kit de actina.....	20
6.2 Preparación de vesículas.....	21
6.3 Deformación de GUVs con actina encapsulada.....	23
Capítulo 7. 1º Análisis y discusión de resultados.....	25
7.1 Encapsulación de actina dentro de GUVs formadas por los lípidos DMPC, DOPC y EggPC	25
7.2 Determinación de la dureza de doblado para GUVs puras de DMPC.....	27
7.3 Determinación de la dureza de doblado para GUVs de DMPC con actina encapsulada sin polimerizar (G-actina) a diferentes concentraciones: 0.05, 0.1 y 0.4 mg/ml	29
7.3.1 GUVs de DMPC con actina encapsulada a 0.05 mg/ml sin polimerizar (G-actina).....	29
7.3.2 GUVs de DMPC con actina encapsulada a 0.05 mg/ml polimerizada (F-actina).....	30

7.3.3 GUVs de DMPC con actina encapsulada a 0.1 mg/ml sin polimerizar (G-actina).....	33
7.3.4 GUVs de DMPC con actina encapsulada a 0.1mg/ml polimerizada (F-actina).....	34
7.3.5 GUVs de DMPC con actina encapsulada a 0.4 mg/ml sin polimerizar (G-actina).....	36
7.4 Medición de viscosidad de soluciones de sacarosa a diferentes concentraciones.....	43
7.5 Medición de viscosidad de vesículas puras de DMPC, y vesículas de DMPC con actina encapsulada sin polimerizar y polimerizada.....	44
Capítulo 8. Resultados adicionales.....	46
8.1 Efecto del ATP y la polimerización de actina en formaciones lipídicas.....	46
Capítulo 9. Conclusiones.....	51
Referencias.....	52

Índice de figuras

	Pág.
Figura 1.1 Célula procariota y eucariota.....	1
Figura 1.2 Representación esquemática de la membrana plasmática.....	3
Figura 1.3 Citoesqueleto de células animales.....	4
Figura 1.4 Microtúbulo.....	5
Figura 1.5 Filamentos intermedios.....	6
Figura 1.6 Filamento de actina.....	6
Figura 1.7 Procesos celulares en los que intervienen filamentos de actina.....	7
Figura 3.1 Esquema de la estructura y deformaciones de una vesícula.....	12
Figura 5.1 Modos de deformación de la membrana.....	15
Figura 5.2 Geometría de una vesícula esférica en un campo eléctrico AC.....	16
Figura 5.3 Componentes del tensor de Maxwell.....	18
Figura 6.1 Cámara de microfusión.....	22
Figura 6.2 Cámara de electroformación de vesículas.....	23
Figura 7.1 Imágenes de fluorescencia de GUVs de DMPC, EggPC y DOPC.....	25
Figura 7.2 Diferencia entre los lípidos DMPC, EggPC y DOPC.....	26
Figura 7.3 Secuencia de deformación de una vesícula de DMPC.....	27
Figura 7.4 Secuencia de deformación de una vesícula de DMPC con actina encapsulada sin polimerizar a 0.05 mg/ml.....	29
Figura 7.5 Secuencia de deformación de una vesícula de DMPC con actina encapsulada polimerizada a 0.05 mg/ml.....	31
Figura 7.6 Secuencia de deformación de una vesícula de DMPC con actina encapsulada sin polimerizar a 0.1 mg/ml.....	33
Figura 7.7 Secuencia de deformación de una vesícula de DMPC con actina encapsulada polimerizada a 0.1mg/l.....	34
Figura 7.8 Secuencia de deformación de una vesícula de DMPC con actina encapsulada sin polimerizar a 0.4 mg/ml.....	36
Figura 7.9 Casos propuestos para la interacción de los filamentos de actina con la Membrana.....	42
Figura 8.1 Estructura de un monómero de actina.....	46
Figura 8.2 Esquema de las fases de polimerización de actina.....	47
Figura 8.3 Vesículas de DMPC a diferentes volúmenes de G-buffer.....	48
Figura 8.4 Vesículas de DMPC con 235µl de G-buffer	48

Figura 8.5 Vesículas de DMPC formadas a diferentes volúmenes de G-buffer.....	49
Figura 8.6 Vesículas de DMPC sin MgCl ₂	50

Índice de gráficas

	Pág.
Gráfica 2.1 Análisis de GUVs de DMPC con actina encapsulada y polimerizada a 0.4 mg/ml.....	11
Gráficas 7.1 Análisis de GUVs puras de DMPC.....	28
Gráficas 7.2 Análisis de GUVs de DMPC con actina encapsulada a 0.05 mg/ml sin polimerizar.....	30
Gráficas 7.3 Análisis de GUVs de DMPC con actina encapsulada a 0.05 mg/ml polimerizada.....	31
Gráfica 7.4 DMPC GUVs con actina encapsulada a la concentración 0.05 mg/ml.....	32
Gráficas 7.5 Análisis de GUVs de DMPC con actina encapsulada a 0.1 mg/ml sin polimerizar.....	33
Gráficas 7.6 Análisis de GUVs de DMPC con actina encapsulada a 0.1 mg/ml polimerizada..	34
Gráfica 7.7 DMPC GUVs con actina encapsulada a la concentración 0.1 mg/ml.....	35
Gráficas 7.8 Análisis de GUVs de DMPC con actina encapsulada a 0.4 mg/ml sin polimerizar.....	36
Gráfica 7.9 DMPC GUVs con F-actina a diferentes concentraciones de actina.....	38
Gráfica 7.10 Gráfica de las interacciones de la concentración y estado de actina arrojadas por ANOVA de dos vías.....	40
Gráfica 7.11 Múltiples comparaciones de las interacciones entre la concentración y el estado de la proteína actina.....	41
Gráficas 7.12 Viscosidad de soluciones de sacarosa.....	43
Gráficas 7.13 Viscosidad de GUVs puras de DMPC y GUVs de DMPC con actina encapsulada.....	44
Gráfica 7.14 Viscosidades.....	45

Índice de tablas

	Pág.
Tabla 2.1 Durezas de doblado reportadas en la literatura para GUVs puras de DMPC.....	10
Tabla 2.2 Durezas de doblado para GUVs de DMPC con actina encapsulada y polimerizada a 0.4mg/ml.....	10
Tabla 6.1 Reconstitución de los componentes del kit de actina.....	20
Tabla 6.2 Protocolo para la electroformación de vesículas.....	22
Tabla 7.1 ANOVA de dos vías.....	39

Capítulo 1. Introducción

1.1 La célula

La primera característica de los organismos vivos es que están hechos de células. La célula es la unidad mínima de un organismo capaz de actuar de manera autónoma y así realizar sus funciones vitales. Existen dos tipos, las células procariotas y las células eucariotas (figura 1.1). La principal diferencia entre ambas es que las eucariotas poseen un núcleo en su interior en donde se almacena el material genético de la célula, mientras que en las células procariotas dicho núcleo no está presente. En el interior de todas las células, tienen lugar numerosas reacciones químicas que les permiten crecer, producir energía, mandar, recibir e interpretar señales, y hasta poder programar su muerte.

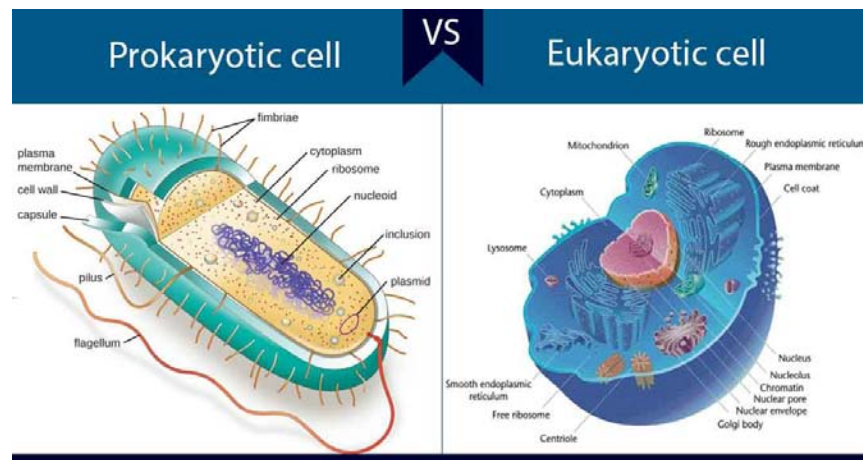


Figura 1.1. Célula procariota y eucariota. Las bacterias son un ejemplo de células procariotas. Los hongos, las plantas y células animales poseen células eucariotas. Ambos tipos de células están limitadas por una membrana plasmática que separa el interior y exterior de las células (Pharmapproach Limited, 2022).

Todas las células están envueltas por una membrana llamada membrana plasmática, que encierra una sustancia rica en agua llamada citoplasma (figura 1.1), y que sirve para delimitar el ambiente interior y exterior de la célula. Esta membrana está compuesta principalmente por una bicapa de fosfolípidos, con proteínas periféricas e integrales incrustadas en ella, así como el lípido colesterol. La estructura es altamente fluida y la mayoría de los lípidos y las proteínas se pueden mover en el plano de la membrana. Esta membrana evita que se liberen al exterior macromoléculas generadas en el interior y que entren macromoléculas no deseadas, posee, además, estructuras de transporte que permiten tomar del exterior moléculas específicas y desechar compuestos no deseados [1]. A su vez, las células de las bacterias, plantas y hongos poseen además una pared celular justo a un

lado de la membrana plasmática (que no está presente en las células animales) y la cual además de protección, les da flexibilidad a las células y contribuye a mantener su estructura [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7]. En el caso de las bacterias, esta pared celular está compuesta por peptidoglicano, el cual es un polímero formado por azúcares y aminoácidos [1, 6, 7]. En las plantas, dicha pared está formada principalmente por celulosa [1, 4, 5]. Mientras que, en el caso de los hongos, está formada por proteínas, glucanos y quitina [1, 2, 3].

La capacidad de las células para mantener su estabilidad estructural, así como el poder alterarla es de suma importancia ya que muchos procesos y funciones celulares dependen de ella. Procesos como el movimiento celular e intracelular, la endocitosis, fagocitosis, citocinesis, o incluso apoptosis involucran cambios en la estructura de la célula [1, 4, 8]. Tales cambios dependen principalmente de uno de los componentes más importantes de la célula: el citoesqueleto.

El citoesqueleto, que es el entramado tridimensional de proteínas que le brinda soporte interno a la célula, organiza sus estructuras internas, e interviene en los fenómenos de transporte, tráfico y división celular. Los filamentos del citoesqueleto interactúan con la membrana plasmática a través de proteínas de anclaje para formar estructuras que juegan un papel muy importante en la arquitectura de la célula y sus propiedades mecánicas. Una de las proteínas presentes en el citoesqueleto es la actina. Los procesos celulares dependientes de esta proteína están típicamente asociados con la dinámica de la membrana y la polimerización de la actina brinda la fuerza para los procesos de movilidad celular.

1.2 La membrana plasmática

La membrana plasmática es, de todas las membranas celulares, la más profundamente estudiada, y es en gran parte a través de investigaciones sobre ella que nuestros conceptos actuales de la estructura de la membrana han evolucionado. La membrana plasmática de células sanguíneas de mamíferos (eritrocitos) ha sido particularmente útil como modelo para estudios de la estructura de la membrana [9]. Dichas células sanguíneas no poseen núcleo o membranas internas, por lo que representan una fuente de la cual membranas plasmáticas puras pueden ser fácilmente aisladas para ser analizadas. De hecho, estudios en la membrana plasmática de estas células brindaron la primera evidencia de que las membranas biológicas consisten en bicapas lipídicas. En 1925, Gorter y Grendel extrajeron lípidos de la membrana de un número conocido de eritrocitos correspondiente a una superficie de área conocida de la membrana [1,9], y determinaron el área ocupada por estos lípidos, e inesperadamente, encontraron que dicho valor correspondía al doble del de la superficie calculada, concluyendo acertadamente que la membrana de los eritrocitos está constituida por una bicapa de lípidos.

Todas las membranas tienen una estructura general común (figura 1.2), la cual consiste en una bicapa de fosfolípidos con proteínas integrales y periféricas incrustadas en ella. La estructura es altamente fluida y la mayoría de los lípidos y las proteínas se pueden mover en el plano de la membrana. Esta membrana delimita el interior y exterior de la célula, la cual además de evitar que se liberen al exterior moléculas generadas en el interior y que entren moléculas no deseadas, posee sistemas de transporte que permiten tomar del exterior moléculas específicas y desechar compuestos no deseados.

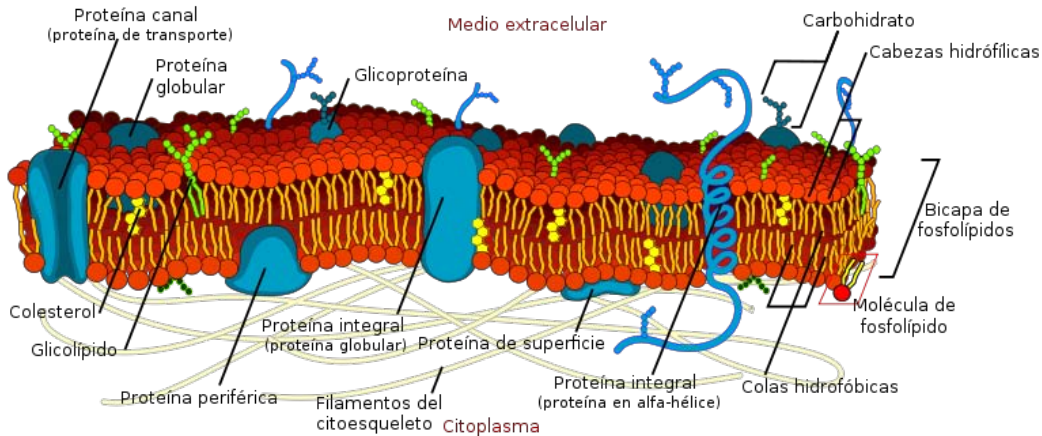


Figura 1.2. Representación esquemática de la membrana plasmática (Mariana Ruiz Villareal, 2007. Dominio Público).

La bicapa de lípidos es un ensamblaje 3D con una rica variedad de características físicas que modulan la señalización celular y la función de las proteínas. Fuerzas laterales y transversales dentro de la membrana son de gran importancia y cambian rápidamente a medida que la membrana se deforma o se estira, y conforme nuevos constituyentes son añadidos, removidos o químicamente modificados [10]. La bicapa de una típica célula eucariota tiene un espesor de 5nm y un área superficial continua de cientos de micras cuadradas, que contienen cientos de lípidos diferentes y más de 10^8 moléculas individuales [11].

A escala macroscópica, las membranas biológicas son una mezcla concentrada de proteínas y lípidos. Nuestra comprensión de este complicado entorno es constantemente refinada por nuevos experimentos. Los datos que surgen a menudo revelan relaciones funcionales y cuantitativas entre interesantes parámetros biológicos, llevando con ellos un imperativo para los modelos de los fenómenos subyacentes y cada generación de nuevos experimentos refina los modelos utilizados para describir las membranas [12].

1.3 Citoesqueleto

Es uno de los componentes principales de las células eucariotas. Es una estructura tridimensional que se extiende a través del citoplasma, compuesta por filamentos de proteínas que ayuda a la célula a mantener su fuerza y organización interna; además de proveer a la célula con el soporte mecánico para realizar funciones vitales como la división celular y el movimiento, actuando tanto como músculo como esqueleto. Durante la división celular los componentes del citoesqueleto asisten al proceso jalando los cromosomas de cada célula hija hacia lados opuestos, hasta que la división se complete. Además, brindan un sistema de transporte físico que permite a motores moleculares con cargo de vesículas, y a orgánulos moverse dentro de la célula. Está formado por tres tipos de filamentos de proteínas de diferente composición, función y características: microtúbulos (25 nm de diámetro), filamentos intermedios (10 nm de diámetro) y filamentos de actina (8 nm de diámetro) (figura 1.3). Cada uno de estos tipos de filamentos se logra mediante la polimerización de miles de proteínas iguales y estos actúan de forma coordinada para poder realizar sus funciones.

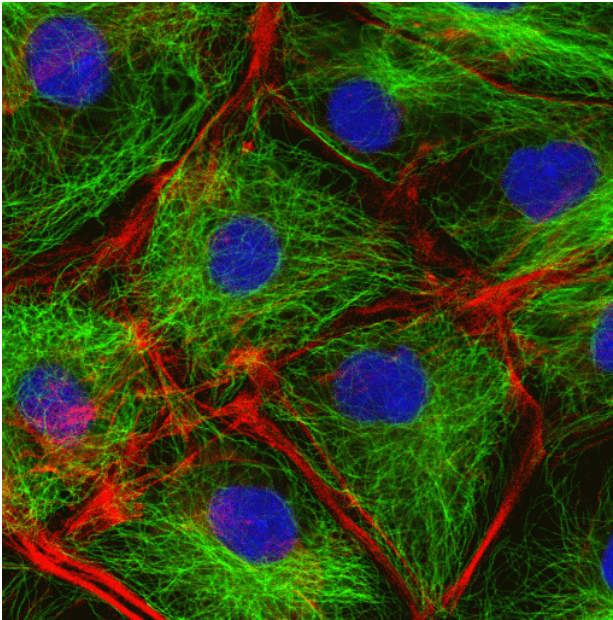


Figura 1.3. Citoesqueleto de células animales. Las células han sido marcadas con fluorescencia para una mejor visualización de los componentes del citoesqueleto. Verde para los microtúbulos, rojo para los filamentos de actina, y azul para el núcleo celular (Laboratory of Molecular Cell Biology, University College London, UK.).

1.3.1 Microtúbulos

Son tubos cilíndricos de 20-25 nm nanómetros de diámetro que están formados por moléculas de proteína tubulina, cada una de las cuales es un dímero (unión de dos monómeros) que consta de dos proteínas globulares llamadas α -tubulina y β -tubulina. Estos dímeros se unen para formar un protofilamento. Un microtúbulo consta de trece protofilamentos paralelos que forman un cilindro hueco [1, 4, 8, 13, 14, 15, 16, 17, 18].

Una característica importante de los microtúbulos es su polaridad. Debido a su estructura, la α -tubulina siempre formará un extremo del protofilamento y β -tubulina el otro. De este modo, cada protofilamento del microtúbulo queda orientado de la misma manera. Al extremo compuesto por un anillo de α -tubulinas se le denomina *extremo menos* (-), mientras que el extremo formado por el anillo de β -tubulinas se llama *extremo más* (+). El extremo menos de una molécula solo puede ligarse al extremo más de otra [1, 4, 8, 13, 14, 15, 16, 17, 18]. (Figura 1.4).

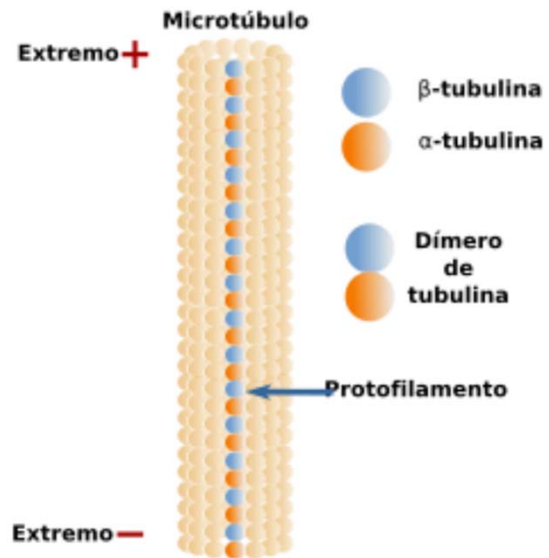


Figura 1.4. Organización de los dímeros de tubulina en un protofilamento de un microtúbulo [8].

Los microtúbulos llevan a cabo numerosas funciones tales como establecer la distancia entre algunos orgánulos, y formar un sistema de transporte y comunicación entre compartimientos celulares para vesículas o macromoléculas. Además, son los principales componentes estructurales y generadores del movimiento de los cilios y flagelos, estructuras que se proyectan desde la célula y son utilizados para desplazarse y como estructuras sensoriales. También constituyen el uso mitótico, el cual consiste en la organización del movimiento de los cromosomas, dividiéndolos y distribuyéndolos entre las dos células [1, 4, 8, 13, 14, 15, 16, 17, 18].

1.3.2 Filamentos intermedios

Los filamentos intermedios tienen un grosor de entre 8-10 nm, que es intermedio entre los microtúbulos y los filamentos de actina, de ahí su nombre. Son fibras proteicas resistentes semejantes a una cuerda formadas por un conjunto de proteínas específicas para cada tipo celular. Ejercen una gran resistencia a las tensiones mecánicas y su principal misión es permitir a las células soportar tensiones mecánicas cuando son estiradas, por lo que su presencia es muy abundante en células sometidas a este tipo de tensiones, como las células epiteliales, células musculares y los axones de las células nerviosas [1, 4, 8, 13, 14, 15, 19, 20, 21]. Además de su función de resistencia, intervienen en el anclaje de numerosas moléculas de señalización e interacción con diferentes orgánulos de la célula [1, 4, 8, 13, 14, 15, 19, 20, 21]. En la figura 1.5 se muestra la estructura de un filamento intermedio.

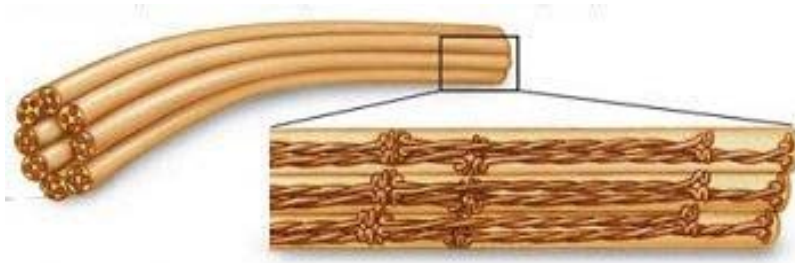


Figura 1.5. Esquema de un filamento intermedio. Están formados por la superposición de polímeros de proteínas con semejanza a una cuerda. Le da forma a la célula proporcionándole resistencia mecánica (WordPress.com).

1.3.3 Filamentos de actina

Por último, pero no menos importante, encontramos a los filamentos de actina, la cual es la proteína más abundante en las células eucariotas. Sus filamentos se forman cuando la proteína en forma de monómero llamado **G-actina** se polimeriza en presencia de ATP formando un filamento doble helicoidal llamado **F-actina**. También son filamentos polarizados debido a que la organización de sus monómeros siempre sigue la misma orientación. El extremo en donde predomina la adición de monómeros de actina (polimerización) se le denomina *extremo más*, mientras que el extremo con mayor disociación de monómeros de actina se llama *extremo menos* [1, 4, 8, 13, 14, 15]. De esta manera es posible la creación y destrucción de filamentos de actina continuamente dentro de la célula. En la figura 1.6 se muestra el esquema de un filamento de actina.

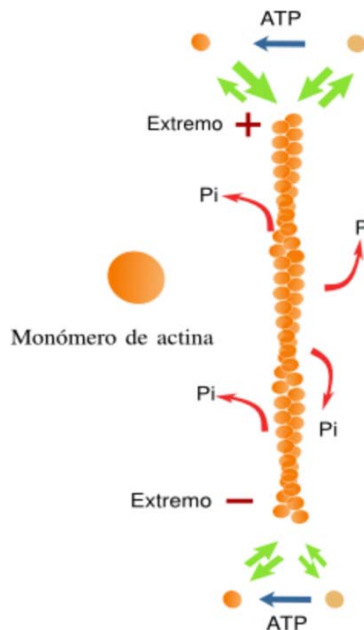


Figura 1.6. Filamento de actina. Las flechas verdes representan la adición y disociación de monómeros de actina (G-actina) en ambos extremos. La polimerización de la proteína siempre ocurre debido al ATP (Pollard y Earnshaw, 2007).

Son estos últimos los que captan nuestro particular interés, ya que en las células animales que carecen de una pared celular, estos tienden a formar una red cerca de la parte interna de la membrana plasmática, que se conoce como citoesqueleto cortical de actina, el cual le brinda fuerza mecánica a la superficie de la célula y le permite adoptar diversas formas,

además están involucrados en procesos como la citocinesis y el movimiento celular [1, 4, 8, 13, 14, 15, 22, 23, 24, 25, 26]. Es precisamente esta función de reforzamiento de la membrana plasmática la que nos es de mayor interés, ya que podría decirse que gracias a ella es posible realizar otras funciones celulares como el movimiento, la fagocitosis o endocitosis. En la figura 1.7 se muestran algunos de los procesos en los que intervienen los filamentos de actina.

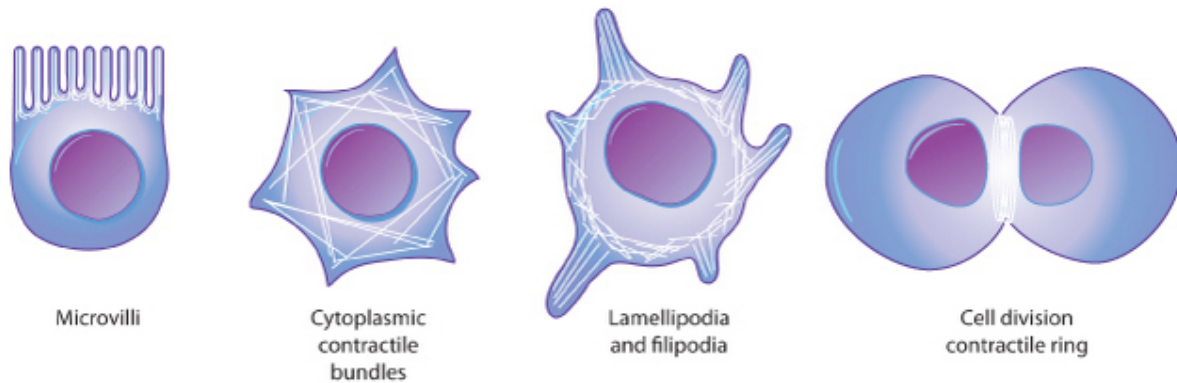


Figura 1.7. Procesos en los cuales intervienen los filamentos de actina. A). Las microvellosidades son protuberancias alargadas que están presentes en las células epiteliales. **B).** En la contracción del citoplasma los filamentos de actina se extienden a lo largo de la célula y terminan en los extremos de ésta. **C).** Los lamelipodios y filopodios permiten a la célula moverse. **D).** En la división celular los filamentos de actina están presentes en el anillo contráctil en el centro que conducirá a la división en dos células (Nature Education, 2014).

En el movimiento celular, la célula se desplaza por el medio circundante mediante un mecanismo de reptación que es posible gracias a extensiones formadas por filamentos de actina llamados lamelipodios y filopodios, los cuales se van adhiriendo al sustrato y permiten que la célula se arrastre (figura 1.7 C). [1, 4, 8, 13, 14, 15, 22, 23, 24, 25]. En el caso de la citocinesis, un anillo de filamentos de actina va estrechando su diámetro alrededor del citoplasma hasta lograr la división completa de éste en dos citoplasmas de las células hijas (figura 1.7 D) [1, 4, 8, 13, 14, 22, 23, 24, 25]. Ninguno de estos procesos celulares sería posible sin la densa red de filamentos de actina debajo de la membrana de las células animales que brinda la fuerza mecánica y les permite cambiar de forma y moverse.

Es precisamente este refuerzo mecánico de la membrana plasmática debido al citoesqueleto cortical de actina lo que motiva este estudio, ya que podría decirse que gracias a esto es posible que los demás procesos tengan lugar. En particular, nos interesa estudiar las deformaciones que sufre la membrana plasmática de la célula durante estos procesos y cómo se resiste a tales deformaciones, ya que todos ellos involucran cambios en la curvatura y estructura de la membrana. Existe un parámetro que nos dice cuánto se puede deformar una membrana, este parámetro se

conoce como dureza de doblado y está directamente relacionado con las propiedades mecánicas de la membrana.

Las células en el cuerpo humano están sujetas a estímulos mecánicos provenientes del medio ambiente y a condiciones fisiológicas internas [10]. Dependiendo de la naturaleza de estos estímulos (magnitud, dirección y distribución) la célula puede responder en función de ellos y de diversas maneras. Por ejemplo, en el flujo de tensión cortante que se ejerce sobre las paredes del endotelio se activa la liberación de hormonas que induce el endurecimiento de las células al reorganizar el citoesqueleto [27]. La tensión de estiramiento del sustrato celular puede alterar tanto la motilidad como la orientación celular [28]. Variaciones en la dirección de un campo eléctrico aplicado puede cambiar la dirección del movimiento de las células obligándolas a moverse en dirección contraria a su movimiento natural [29]. Durante el crecimiento, la migración, diferenciación y en la apoptosis la célula cambia dramáticamente de forma y estructura [30].

Capítulo 2. Antecedentes

2.1 Efectos de los campos eléctricos en las células

Como se mencionó, las células responden en función de estímulos externos de diversas maneras. En concreto, la exposición de células a campos eléctricos puede producir una gran variedad de efectos que dependen tanto de la naturaleza del campo eléctrico aplicado como de la naturaleza misma de la célula [31, 32, 33, 34, 35, 36]. Los campos eléctricos AC pueden inducir la deformación y la reorientación celular, así como el movimiento y reacomodo de las células, incluso pueden interrumpir la mitosis y producir apoptosis celular [36, 37, 38, 39, 40, 41]. Se ha reportado que, al variar la dirección del campo eléctrico aplicado a las células, se induce la migración celular y éstas se guían en dirección de dicho campo [31, 32, 33, 34, 35, 36, 42]. Cuando se aplica un campo eléctrico a la célula, su membrana plasmática actúa como un capacitor, en el que la bicapa de lípidos es la barrera aislante que separa los medios interno y externo a la célula, los cuales tienen sus propiedades eléctricas características. Debido al campo, hay una redistribución de la carga en la bicapa, y ésta se transforma en un dieléctrico que se polariza. Como resultado de esta polarización, pueden ocurrir procesos como el movimiento o la reorientación celular [37, 38, 41, 42]. En el caso de campos eléctricos DC, también pueden ocurrir procesos como la permeabilización y la fusión celular, así como la ruptura dieléctrica de la membrana celular [36, 37, 41, 43, 44, 45, 46]. Una vez que la célula deja de estar bajo la acción del campo eléctrico, ésta regresa a su forma, a su impermeabilidad, y a su resistencia natural [37, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53].

Estos fenómenos han estimulado considerables esfuerzos de modelado dirigidos a la comprensión de los mecanismos físicos en la interacción de los campos eléctricos con células y tejidos. Un tema común entre los diferentes modelos teóricos es la suposición de que la célula es un esferoide dieléctrico con pérdidas.

Este trabajo es continuación de mi proyecto de Maestría, en el cual estudié las propiedades mecánicas de un modelo del citoesqueleto cortical de actina cerca de la membrana de lípidos, basado en vesículas gigantes de una sola bicapa (GUVs) formadas por DMPC con la proteína actina encapsulada en su interior a una concentración de 0.4 mg/ml cuya polimerización dentro de las vesículas se logró mediante la internalización de iones de magnesio utilizando el ionóforo A23187. Las propiedades mecánicas se determinaron mediante la deformación de las vesículas aplicando campos eléctricos alternos y tomando las contribuciones del tensor de esfuerzos de Maxwell actuando sobre las membranas.

En ese estudio se observó que la presencia de esta proteína al polimerizarse dentro de las vesículas si afecta sus propiedades mecánicas, esto es, su dureza de doblado, volviendo a las vesículas más rígidas y por lo tanto más resistentes a las deformaciones. Este resultado se obtuvo al comparar las durezas de doblado reportadas en la literatura [54, 55, 56, 57, 58, 59] para vesículas puras de DMPC (tabla 2.1) a diferentes temperaturas, las cuales son reportadas del orden de 10^{-19} y 10^{-20} J, con el valor medio de las durezas que se obtuvieron para vesículas de DMPC con actina encapsulada y polimerizada (tabla 2.2) a 25°C , las cuales fueron del orden de 10^{-18} J y con un valor medio de 3.34×10^{-18} J esto es, un orden de magnitud mayor a las vesículas que no tienen actina polimerizada en su interior.

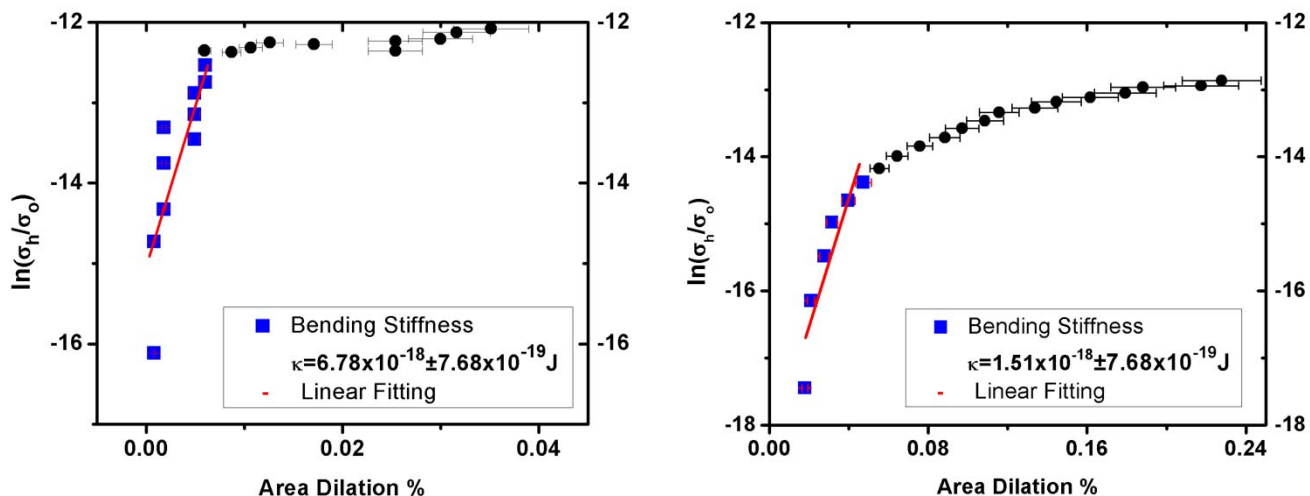
Tabla 2.1. Recopilación de las durezas de doblado reportadas en la literatura para vesículas puras de DMPC a diferentes temperaturas.

T ($^{\circ}\text{C}$)	Dureza de doblado vesículas puras de DMPC κ (J)	Ref.
10	$4.49 \pm 1.25 \times 10^{-19}$	58
22	7.22×10^{-20}	59
23	3×10^{-19}	54
25	1.2×10^{-19}	56
25	$8.23 \pm 0.82 \times 10^{-20}$	57
30	$1.15 \pm 0.15 \times 10^{-19}$	55
40	$7.35 \pm 0.43 \times 10^{-20}$	59

Tabla 2.2. Durezas de doblado obtenidas experimentalmente para vesículas de DMPC con actina encapsulada y polimerizada a la concentración de 0.4 mg/ml.

T ($^{\circ}\text{C}$)	Dureza de doblado vesículas de DMPC con actina encapsulada y polimerizada κ (J)
25	$3.34 \pm 0.77 \times 10^{-18}$

En las gráficas 2.1 se muestra el análisis de dos de las vesículas con actina encapsulada y polimerizada a 0.4 mg/ml. Para obtener la dureza de doblado se graficó el logaritmo de las tensiones (σ_h/σ_0) que actúan sobre la membrana de lípidos debido al campo eléctrico contra el cambio porcentual en área reducida de la membrana (Area Dilation %) y se realizó un análisis lineal a la gráfica. Se puede observar que el cambio en el área porcentual fue muy poco, para una cambió poco más de 0.03 %, mientras que la segunda alcanzó cerca de 0.24 %.



Gráfica 2.1. Logaritmo de la razón de las tensiones contra el cambio en el área para dos vesículas de DMPC con actina encapsulada y polimeriza en su interior a 0.4 mg/ml. Los cuadros azules corresponden al reacomodo de los lípidos, los cuales se caracterizan por un ligero aumento en el área porcentual a medida que aumenta la razón de las tensiones, mientras que los puntos negros que corresponden al ajuste del área por lípido presentan un estiramiento de la membrana a valores casi estables de la razón de las tensiones. El ajuste lineal (línea roja) se hace solo en los puntos correspondientes al reacomodo de los lípidos en la membrana.

La proteína polimerizada dentro de las vesículas hace que los lípidos tengan menor libertad de movimiento y, por lo tanto, se requiere de mayor energía para el reacomodo de los lípidos debido al campo eléctrico AC aplicado a la vesícula.

Para realizar un estudio completo sobre las propiedades mecánicas de vesículas gigantes de una sola bicapa con la proteína actina encapsulada en su interior, como modelo del citoesqueleto cortical de actina, este trabajo se enfoca en formación y manipulación de GUVs con la proteína actina encapsulada en su interior a diferentes concentraciones cuando dicha proteína se encuentra sin polimerizar o como monómero (G-actina) y polimerizada o como filamento (F-actina) y en el estudio de sus propiedades mecánicas mediante la deformación de éstas bajo la acción de un campo eléctrico AC.

Capítulo 3. Motivación

3.1 Vesículas: un modelo celular

Tanto de los procesos que ocurren en la célula cuando ésta se somete a estímulos externos como de los antecedentes de los efectos de campos eléctricos en la célula, se infiere que es importante conocer cómo las células responden mecánicamente a estos estímulos físicos para luego entender cómo estas señales mecánicas se traducen en respuestas biológicas o químicas. Es claro que las propiedades mecánicas tienen un papel muy importante en los procesos biológicos [11, 26, 30]. De esto surge el interés en desarrollar modelos mecánicos de la célula para entender cómo ésta responde a estímulos externos. Pero la célula es una estructura bastante compleja y una evidente simplificación debe hacerse. Dado que la membrana plasmática es la pared que delimita a la célula, enfocaremos nuestra atención en ella. Y ya que el componente mayoritario de esta membrana es la bicapa de fosfolípidos, podemos tomar ésta como modelo de la membrana celular.

Las vesículas son estructuras que mimetizan la membrana celular y por lo tanto pueden ser tomadas como modelo de la membrana de la célula (figura 3.1A). Cuando éstas son sometidas a campos eléctricos se pueden deformar en elipsoides prolata u oblata que dependen de los medios interior y exterior, además, los campos pueden desplazar a la vesícula e incluso campos muy fuertes pueden perforarlas [60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69]. Cuando las vesículas se exponen a un campo eléctrico AC se genera un potencial eléctrico a través de la membrana y como consecuencia se induce una tensión eléctrica, esto permite que la vesícula se deforme (figura 3.1B).

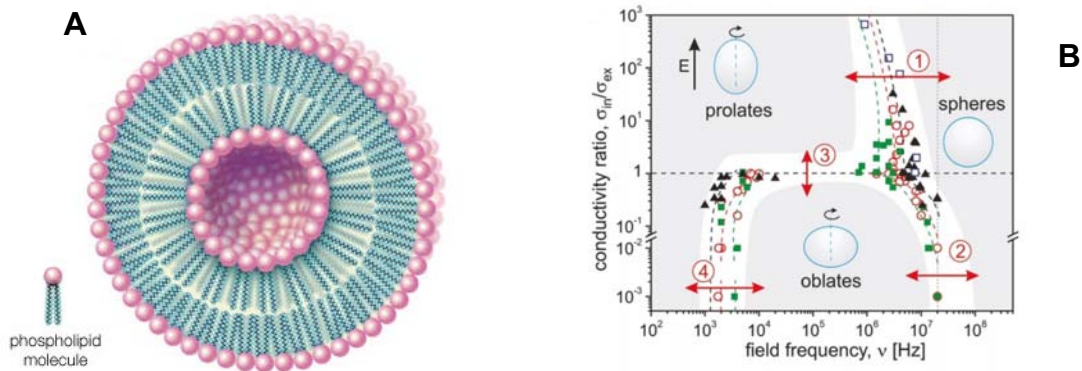


Figura 3.1. Esquema de la estructura y deformaciones de una vesícula. A) Vesícula (Encyclopedia Britannica, Inc. 2007). **B)** Diagrama morfológico de vesículas gigantes de una bicapa en campos eléctrico AC en función de las conductividades del medio interno y externo y de la frecuencia del campo [70].

La motivación es llegar a una mejor comprensión de los procesos celulares con un sistema modelo que nos permita mimetizar en mayor medida a la célula y a su estructura. Al hablar de la estructura de la célula nos referimos al citoesqueleto, y en particular a las interacciones entre los filamentos de la proteína actina y la membrana plasmática con un modelo del citoesqueleto cortical de actina. Esto es, entender desde una aproximación de abajo hacia arriba, los principios fundamentales de la movilidad celular. Para entender la movilidad en función de la membrana plasmática es necesario conocer las propiedades mecánicas de la célula. Con este objetivo se mimetiza la membrana de la célula usando solo unas componentes de la membrana plasmática: los lípidos. Se usa como modelo las vesículas gigantes de una sola bicapa (GUVs por sus siglas en inglés) y como modelo del citoesqueleto cortical de actina se usará la actina reticulada en su interior. Se estimulará las GUVs con actina encapsulada para estudiar el cambio en las propiedades mecánicas de nuestras células biomimetizadas. Dicho estímulo se hace por medio de campos eléctricos alternos. Al estudiar y comprender los cambios de una vesícula con actina encapsulada y reticulada podemos tener una base para comprender en estudios posteriores la movilidad celular.

Capítulo 4. Objetivo

El objetivo general de este trabajo es estudiar las propiedades mecánicas y reológicas de vesículas como modelo de membranas biológicas con la proteína actina encapsulada en su interior a diferentes concentraciones.

Objetivos específicos

1. Encapsulación y polimerización de la proteína actina a diferentes concentraciones dentro de vesículas gigantes de una sola bicapa (GUVs) formadas con DMPC (dimiristoilfosfatidilcolina) y EggPC (L- α fosfatilcolina).
2. Encapsulación y polimerización de la proteína actina a diferentes concentraciones dentro de vesículas gigantes de una sola bicapa (GUVs) formadas con el lípido DOPC.
3. Estudio de las propiedades mecánicas y reológicas de los sistemas descritos en los objetivos específicos 1 y 2 mediante la técnica de electrodeformación y con el uso de un reómetro.

Capítulo 5. Metodología teórica

5.1 Propiedades mecánicas de membranas

Las propiedades mecánicas de las vesículas se pueden caracterizar de acuerdo con los modos de deformación de la membrana, los cuales son: estiramiento o compresión del área, deformación por esfuerzo cortante y deformación por flexión o doblado, como se muestra en la figura 5.1.

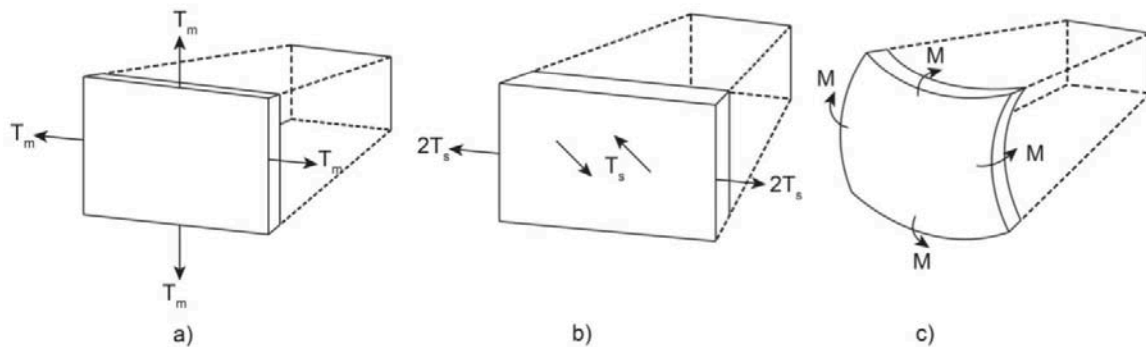


Figura 5.1. Modos de deformación de la membrana. Ilustración de un elemento cuadrado de una membrana lipídica. (a) Estiramiento o compresión del área. (b) Deformación por esfuerzo cortante. (c) Deformación por flexión o doblado. Las T_m son las fuerzas necesarias para estirar a la membrana; las T_s para que sufra esfuerzo cortante y las M son las fuerzas que provocan doblado [70].

El esfuerzo cortante no está presente en las vesículas debido a que los lípidos pueden moverse en el plano de la membrana y por lo tanto puede considerarse como un líquido. El estiramiento o compresión del área en la mayoría de los casos puede ser despreciado debido a que el estiramiento de la membrana requiere energías mayores a las aplicadas para el caso del doblado. Por lo tanto, la dureza de doblado, que se obtiene a partir de la deformación por flexión, es la mayor contribución a la energía sin que ésta destruya o modifique a la membrana, y está relacionada con el acomodamiento de los lípidos en la membrana.

5.2 Modelos teóricos para la deformación de vesículas

La metodología teórica está basada en los modelos desarrollados por Kummrow y Helfrich [62] y Yamamoto *et. al.* [66], considerando las propiedades físicas tanto del medio interno como del externo a la membrana, y tomando las contribuciones del tensor de esfuerzos de Maxwell. La vesícula adquiere forma esférica en ausencia de campos eléctricos, como se muestra en la figura 5.2. La deformación de la vesícula lleva a un aumento en la energía de doblado de ésta, adoptando formas prolatas u oblatas.

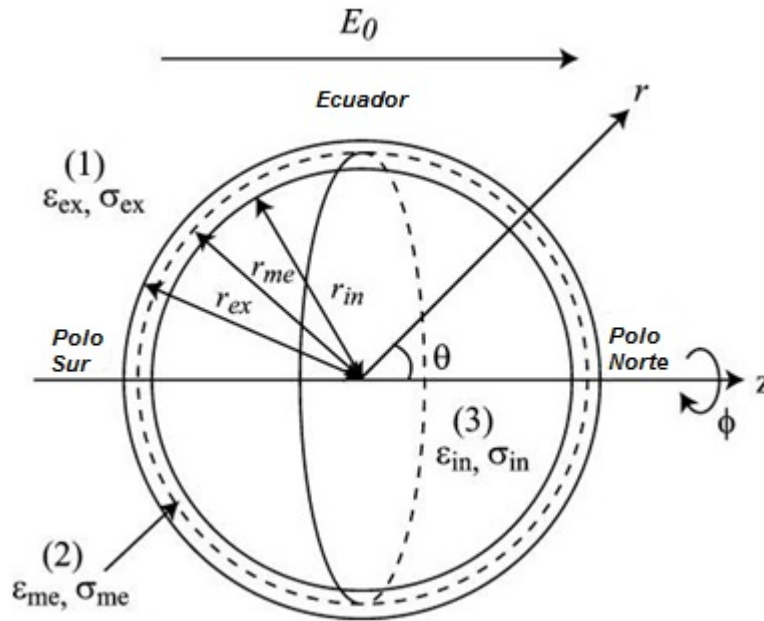


Figura 5.2. Geometría de una vesícula esférica en un campo eléctrico AC. La vesícula está modelada como un cascarón esférico dieléctrico con constante dieléctrica ϵ_{me} y conductividad σ_{me} . El campo eléctrico se aplica en la dirección z . El interior de la vesícula consiste en una solución caracterizada por constante dieléctrica ϵ_{in} y conductividad σ_{in} . Para la solución exterior es ϵ_{ex} y σ_{ex} . Los parámetros r_{in} , r_{me} y r_{ex} son los radios interior, el radio medio y exterior de la membrana, respectivamente [66].

5.2.1 Modelo de Kummrow y Helfrich

El modelo de Kummrow y Helfrich consiste en la deformación de vesículas blandas sujetas a un campo eléctrico alterno. Utilizando coordenadas polares con el eje polar paralelo a la dirección del campo eléctrico homogéneo aplicado \mathbf{E}_0 , la componente del tensor de esfuerzos de Maxwell debido al campo en el exterior de la esfera es [62]

$$T_{rr} = -\frac{9}{8}\epsilon_0\epsilon_w E_0^2 \sin^2 \theta, \quad (5.1)$$

Donde $\varepsilon_w=80$ es la constante dieléctrica del agua y θ es el ángulo azimutal con valor $\pi/2$, ε_o es la permitividad del vacío, y T_{rr} es la componente r en la dirección r del tensor de esfuerzos de Maxwell. La tensión ejercida en la superficie exterior de la vesícula da lugar a la deformación elipsoidal y el aplanamiento de las ondulaciones. En equilibrio habrá una tensión superficial homogénea σ_o y una presión p dentro de la vesícula tal que, de acuerdo con la ecuación de Laplace, para todo θ

$$(c_1 + c_2)\sigma_h - T_{rr} = p, \quad (5.2)$$

Donde c_1 y c_2 son las curvaturas principales de la membrana tomadas en el ecuador y en el polo. Esta tensión superficial se relaciona con un cambio en el área aparente de acuerdo con la ecuación de Evans [71]

$$\Delta A = \frac{k_B T}{8\pi\kappa} \ln \frac{\sigma_h}{\sigma_o} \times 4\pi R^2, \quad (5.3)$$

donde A es el área del elipsoide de revolución, $4\pi R^2$ es el área sin deformar, κ la dureza de doblado, k_B la constante de Boltzmann, T es la temperatura, y σ_o , σ_h las tensiones superficiales homogéneas inicial y final, respectivamente. Las curvaturas en el ecuador y en el polo están dadas por las ecuaciones

$$(c_1 + c_2)_{eq} = \frac{1}{b} + \frac{b}{a^2}, \quad (5.4)$$

$$(c_1 + c_2)_{pol} = 2\frac{a}{b^2}, \quad (5.5)$$

donde a y b son los semiejes mayor y menor de la elipse deformada con $a > b$.

5.2.2 Modelo teórico para la deformación de vesículas generalizado

El modelo teórico generalizado se basa también en la deformación de vesículas bajo la acción de un campo eléctrico AC. La deformación de las vesículas depende de varios factores entre los que destacan tanto la frecuencia de campo como las conductividades de las soluciones interior y exterior. La generalización de este modelo se basa en el hecho de que, a diferencia del modelo anterior en donde solo se considera el caso simétrico, esto es, cuando las conductividades interior y exterior son iguales, el modelo teórico generalizado se puede aplicar al caso simétrico y asimétrico en las conductividades interna y externa de la vesícula [66]. Dicha dependencia en las conductividades se refleja en la forma que adquieren las vesículas durante la deformación, si la conductividad exterior es mayor que la interior, la deformación es oblata; mientras que, si la conductividad interior es mayor, la deformación es prolata.

Ahora, el campo eléctrico aplicado, el cual es uniforme lejos de la vesícula, se caracteriza por una frecuencia angular ω y está dirigido en la dirección z . Las componentes del campo para la superficie externa, la membrana y la superficie interna están dadas por

$$E_1 = E_o, \quad (5.6)$$

$$E_2 = \frac{3(1 + 2\beta_3)}{(2 + \beta_1)(1 + 2\beta_3) - 2(1 - \beta_1)(1 - \beta_3)\gamma^3} E_o, \quad (5.7)$$

$$E_3 = \frac{9\beta_3}{(2 + \beta_1)(1 + 2\beta_3) - 2(1 - \beta_1)(1 - \beta_3)\gamma^3} E_o, \quad (5.8)$$

donde $\gamma = 1 - l_m/R$ con l_m como el grosor de la membrana y R su radio sin deformar. Estas amplitudes están expresadas en términos de los parámetros β dados por

$$\beta_1 = \frac{\sigma_2 - i\omega\epsilon_2}{\sigma_1 - i\omega\epsilon_1}, \quad (5.9)$$

$$\beta_3 = \frac{\sigma_2 - i\omega\epsilon_2}{\sigma_3 - i\omega\epsilon_3}, \quad (5.10)$$

El campo eléctrico aplica un tensor de esfuerzos de Maxwell en la superficie interior y exterior de la vesícula, lo cual es la fuerza que la deforma. Las componentes de estas tensiones laterales sobre la membrana siempre actúan en dirección normal a la superficie, como se muestra en la figura 5.3 y cuyo tensor equivalente es

$$T_{eq} = T_{1rrex} - T_{2rrex} + T_{2rrin} - T_{3rrin}, \quad (5.11)$$

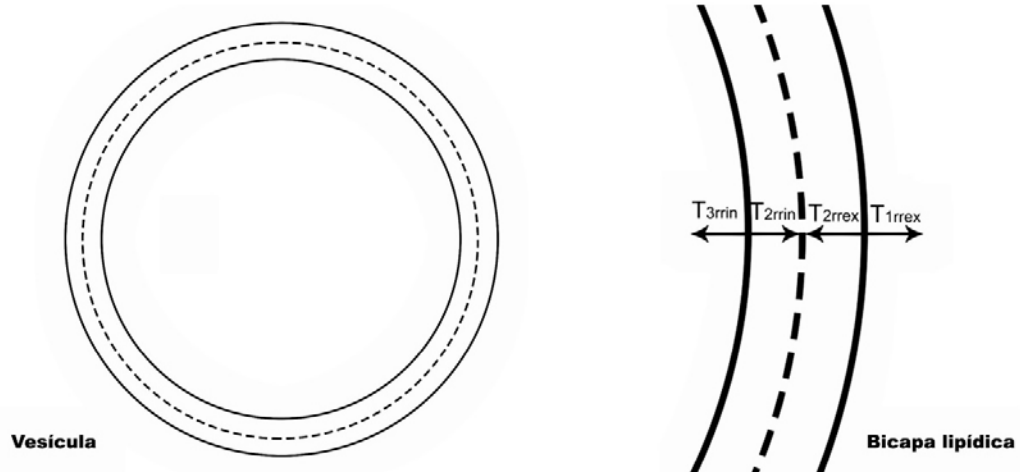


Figura 5.3. Componentes del tensor de esfuerzos de Maxwell actuando sobre la bicapa lipídica.

cuyas componentes están dadas por

$$T_{1rrex} = \frac{1}{4} \varepsilon_1 E_o^2 |\alpha_{1,ex}|^2, \quad (5.12)$$

$$T_{2rrex} = \frac{1}{4} \varepsilon_2 E_o^2 |\alpha_{2,ex}|^2, \quad (5.13)$$

$$T_{2rrin} = \frac{1}{4} \varepsilon_2 E_o^2 |\alpha_{2,in}|^2, \quad (5.14)$$

$$T_{3rrin} = \frac{1}{4} \varepsilon_3 E_o^2 |\alpha_{3,in}|^2, \quad (5.15)$$

donde \mathbf{E}_o es el campo eléctrico aplicado; ε_1 , ε_2 y ε_3 las permitividades de los medios y de la membrana, y las α 's son parámetros que dependen de las permitividades y conductividades, dadas por

$$\alpha_{1,ex} = \frac{3\beta_1[(1 + 2\beta_3) + 2(1 - \beta_3)\gamma^3]}{(2 + \beta_1)(1 + 2\beta_3) - 2(1 - \beta_1)(1 - \beta_3)\gamma^3}, \quad (5.16)$$

$$\alpha_{2,ex} = \frac{3[(1 + 2\beta_3) + 2(1 - \beta_3)\gamma^3]}{(2 + \beta_1)(1 + 2\beta_3) - 2(1 - \beta_1)(1 - \beta_3)\gamma^3}, \quad (5.17)$$

$$\alpha_{2,in} = \frac{9}{(2 + \beta_1)(1 + 2\beta_3) - 2(1 - \beta_1)(1 - \beta_3)\gamma^3}, \quad (5.18)$$

$$\alpha_{3,in} = \frac{9\beta_3}{(2 + \beta_1)(1 + 2\beta_3) - 2(1 - \beta_1)(1 - \beta_3)\gamma^3}, \quad (5.19)$$

donde nuevamente $\gamma = 1 - l_m/R$ y se toma la parte real de β para la evaluación de los tensores

$$\beta_1 = \frac{\sigma_1 \sigma_2 + \varepsilon_1 \varepsilon_2 \omega^2}{\sigma_1^2 + \varepsilon_1^2 \omega^2} + \frac{i \varepsilon_1 \sigma_2 - \varepsilon_2 \sigma_1}{\sigma_1^2 + \varepsilon_1^2 \omega^2}, \quad (5.20)$$

$$\beta_3 = \frac{\sigma_3 \sigma_2 + \varepsilon_3 \varepsilon_2 \omega^2}{\sigma_3^2 + \varepsilon_3^2 \omega^2} + \frac{i \varepsilon_3 \sigma_2 - \varepsilon_2 \sigma_3}{\sigma_3^2 + \varepsilon_3^2 \omega^2}, \quad (5.21)$$

con ω como la frecuencia del campo eléctrico [70]. Este modelo es usado para determinar los tensores eléctricos que se ejercen sobre la superficie de una membrana (ecuaciones 5.12-5.15). Con dichas tensiones y usando la ecuación 5.2 se puede determinar la tensión en base a los cambios de curvatura de la vesícula (cambios de área), y, finalmente, con la ecuación 5.3 se puede determinar la dureza de doblado al hacer el análisis de una gráfica del logaritmo de la tensión superficial contra el cambio porcentual en el área de un elipsoide prolata, producto de la deformación por campos eléctricos AC.

Capítulo 6. Metodología experimental

Para la formación de vesículas se utilizaron los lípidos DMPC (1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine), EggPC (L- α -phosphatidylcholine) y DOPC (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine), de avanti Polar Lipids, Inc., con una concentración inicial de 10 mg/ml. Las concentraciones de lípidos que se utilizaron fueron de 4 mg/ml. Como medio interior y exterior a las vesículas se utilizaron sacarosa y glucosa (Sigma-Aldrich, Inc.), respectivamente, con concentración de 0.2 M.

El kit de la proteína se obtuvo de Cytoskeleton, Inc., así como todos los componentes necesarios. La proteína está marcada con pireno (excitación: 340-380 nm, emisión: 395-440 nm) para poder observarla en el microscopio con un filtro de fluorescencia. Se utilizó el ionóforo A23187 (Sigma-Aldrich, Inc.) para permitir el paso de iones de magnesio (Mg^{+2}) para activar la polimerización de la proteína. Para los iones se utilizó $MgCl_2$ con concentración de 0.2 M.

6.1 Reconstitución de los componentes del kit de actina

El procedimiento para la reconstitución de la proteína se muestra en la tabla 6.1. Siguiendo las especificaciones del kit, se prepararon el G-buffer y la G-actina. Para el primero, se añaden 2 μ l de ATP por cada 1 ml de buffer general. Para el caso de la G-actina, se añaden 225 μ l de G-buffer en una alícuota congelada de 5 μ l de actina (volumen total 230 μ l), se deja en hielo durante una hora y después se centrifuga a 14k rpm durante 30 min. Finalmente se almacenan las alícuotas a -70°C.

Tabla 6.1. Reconstitución de los componentes del kit.

Componentes del kit	Reconstitución	Condiciones de almacenamiento
Actina purificada marcada con pireno	Reconstituir una alícuota de 1 mg en 50 μ l de agua desionizada estéril fría. Se preparan 5 alícuotas de 5 μ l y se enfrían en nitrógeno líquido.	-70°C
Buffer general	Reconstituir en 100 ml de agua desionizada estéril. 5 mM de Tris-HCl y 0.2 mM de $CaCl_2$ resuspendido.	4°C
Tris-HCl	Reconstituir en 5 ml de agua desionizada estéril. Concentración final de 100 mM a pH 7.5.	4°C
ATP	Reconstituir en 1 ml de Tris-HCl. Se preparan alícuotas de 100 μ l. Concentración de 100 mM.	-70°C

6.2 Preparación de vesículas

Las primeras vesículas fueron obtenidas por Alec Douglas Bangham y colaboradores en 1965 [72], quienes constataron que ciertos lípidos pueden formar estructuras membranosas cuando están en presencia de un exceso de agua [70]. Como se mencionó, las vesículas son estructuras que mimetizan la membrana celular, ya que poseen una estructura similar a la de las membranas biológicas de las células y de sus orgánulos internos. En general, una vesícula es una bicapa lipídica cerrada donde los grupos polares apuntan hacia la solución polar y las cadenas de hidrocarburos se encuentran en la parte interior de la bicapa. Pero ¿qué propiedades permiten a los lípidos formar membranas? La formación de membranas es una consecuencia de la naturaleza anfifílica de estas moléculas, es decir, que cuentan con una parte polar (hidrófila), y otra, la correspondiente a las cadenas hidrocarbonadas, que no es polar (hidrófoba). Sus cabezas polares facilitan el contacto con el agua, mientras que sus colas hidrocarbonadas interaccionan unas con otras en vez de hacerlo con el agua, de esta manera es posible la formación de una bicapa lipídica, mediante la interacción de las cadenas de hidrocarburos se forma un interior hidrófobo que actúa como barrera de permeabilidad. En esta bicapa plana, las cadenas hidrófobas se encuentran bien posicionadas a medida que están en un entorno hidrófobo, pero en el borde de la bicapa las cadenas se exponen al agua, por lo tanto, la estructura tenderá a proteger estos extremos del entorno acuoso mediante la conexión de estos bordes abiertos entre sí, esto da lugar a la formación de vesículas.

La versatilidad de las vesículas se refleja, en primer lugar, en el hecho de que son capaces de incorporar a su estructura moléculas hidrófilas, hidrófobas y también de carácter anfipático. Además, sus propiedades físicas como la carga, el tamaño, la permeabilidad/rigidez de la pared o su capacidad de carga, pueden ser fácilmente modulables. Además, utilizando lípidos funcionalizados, se pueden unir anticuerpos u otros ligandos a la superficie de estas vesículas con el fin de convertirlas en sistemas de transporte con capacidad para acceder, por ejemplo, específicamente a un determinado tejido o célula tumoral [73].

Existen varias metodologías que han sido desarrolladas con el fin de obtener vesículas con diferentes características en función del procedimiento aplicado. Algunos ofrecen la ventaja de permitir la encapsulación o translocación de moléculas dentro (o transmembranales) a las vesículas, en especial proteínas específicas.

El método que será empleado en este trabajo será el de electroformación, descrito inicialmente por Angelova y Dimitrov en 1986 [74], sólo que, para el caso de la preparación de vesículas con actina encapsulada, es necesario variar el protocolo. En el caso de los resultados mencionados en el capítulo 2, para la formación se utilizó una cámara de microfusión Eppendorf, la cual cuenta con dos electrodos de 500 μm de separación, entre los cuales con ayuda de una jeringa Hamilton de 5

μl , se esparcieron $5\mu\text{l}$ de la solución de lípidos. El lípido que se utilizó para la formación de vesículas fue DMPC (dimiristoilfosfatidilcolina) de Avanti® Polar Lipids Inc. Una vez hecho esto, se esparció $1\mu\text{l}$ (concentración $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$) del ionóforo A23187 (Sigma® Aldrich) dentro de los electrodos, y se dejó la cámara dentro del desecador en vacío durante 2 horas. Este ionóforo permitirá la entrada de iones de magnesio dentro de las vesículas para lograr la encapsulación de la proteína dentro de éstas.

Una vez finalizado el proceso de secado, se agregaron $840\mu\text{l}$ de sacarosa (la cual será la solución interior a las vesículas) y $20\mu\text{l}$ de G-actina (para los siguientes experimentos se utilizarán diferentes concentraciones de G-actina) y se tapó con un cubreobjetos, como se muestra en la figura 6.1. Esta proteína está marcada con pireno (excitación: $340\text{-}380\text{ nm}$, emisión: $395\text{-}440\text{ nm}$) para observarla mediante fluorescencia.



Figura 6.1. Cámara de microfusión. La cámara tiene dos electrodos entre los cuales actúa en campo eléctrico AC. Para la formación, se coloca la solución de sacarosa y la G-actina y se tapa con un cubreobjetos.

Una vez conectada la cámara al generados de funciones, se ajusta la frecuencia del campo eléctrico a 10 Hz , empezando el voltaje en 1 V/mm y se aumenta hasta alcanzar 6 V/mm , siguiendo el protocolo que se muestra en la tabla 6.2. Al alcanzar los 6 V/mm , se baja la frecuencia del campo a 3 Hz , esto con la finalidad de que las vesículas se desprendan de la cámara.

Tabla 6.2. Protocolo para la electroformación de vesículas. Al llegar a las 6 V/mm se baja la frecuencia del campo para despegar la frecuencia del campo.

Tiempo de exposición al campo eléctrico (min.)	Voltaje (V/mm)	Frecuencia (Hz)
20	1	10
40	2	10
40	3	10
40	4	10
40	6	10
5	6	3

Para monitorear el proceso de formación de las vesículas con actina encapsulada, se conecta la cámara al generador de funciones y se monta en el microscopio. Se utilizará un microscopio Leica con contraste de fases y filtros de fluorescencia, el cual se encuentra conectado a una PC para poder adquirir imágenes y videos.

En el caso de todos los experimentos de este estudio, las vesículas se prepararon utilizando una cámara de formación creada a partir de dos vidrios ITO sobre los cuales se esparcen los lípidos y se ponen a secar con el fin de eliminar el solvente. Al concluir el proceso de secado, entre los vidrios ITO se coloca un espaciador de teflón de 2 mm de espesor, el cual se adhiere a los vidrios utilizando grasa de vacío. Una vez que la cámara está lista, se inyecta la solución de sacarosa a 0.2 M (en el caso de vesículas con actina, se inyecta también la G-actina por dicho orificio) a través de dos orificios en el espaciador de teflón, por uno se inyecta la solución, mientras que el otro sirve para eliminar el exceso de aire dentro de la cámara (figura 6.2). Se siguió el mismo protocolo de electroformación (tabla 6.1).



Figura 6.2. Cámara de electroformación de vesículas. Se conectan los cables en cada uno de los vidrios ITO los cuales a su vez están conectados al generador de funciones.

6.3 Deformación de GUVs con actina encapsulada

Como se mencionó, en un trabajo previo ya se estudió el efecto de la polimerización de la proteína actina dentro de las vesículas a la concentración de 0.4 mg/ml; ahora, lo que se desea es analizar el efecto producido por la polimerización a diferentes concentraciones de dicha proteína.

El procedimiento para la deformación de vesículas con actina encapsulada es el siguiente. Se utiliza nuevamente la cámara de microfusión, en donde se colocan 840 μ l de glucosa, 20 μ l de

vesículas con actina, y para lograr la polimerización de la proteína, se añaden 5 μl de MgCl_2 , finalmente, se tapa la cámara de microfusión con un cubreobjetos. El ionóforo A23187 que se añade durante la formación de las vesículas crea canales en la membrana que permiten pasar a los iones de magnesio [75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85] y así iniciar la polimerización de la proteína. Una vez que la muestra está dentro de la cámara, se conecta al generador de funciones y se monta nuevamente en el microscopio. Se fija la frecuencia del campo a 100 kHz y se aumenta el campo desde 0.00 V/mm hasta 20.00 V/mm. De todos los procesos de deformación se obtendrán imágenes y videos de las vesículas deformadas mediante la cámara conectada al microscopio y el software *LAS V4.8*. Estas imágenes serán analizadas con *ImageJ* para determinar el cambio en el área que sufren las vesículas debido a la acción del campo eléctrico, para esto, se miden los semiejes menor y mayor de las vesículas para cada cambio de voltaje y finalmente se hace uso de los modelos teóricos para determinar la dureza de doblado de las vesículas.

Capítulo 7. Análisis y discusión de resultados

7.1 Encapsulación de actina dentro de GUVs formadas por los lípidos DMPC, DOPC y EggPC

En la primera etapa de este estudio, se procedió a encapsular proteína actina dentro de GUVs formadas por los lípidos DMPC, DOPC y EggPC mediante el método de electroformación, siguiendo el mismo protocolo descrito en el capítulo anterior, con el fin de realizar el mismo análisis para los sistemas con los tres tipos de lípidos. En la figura 7.1 se muestran imágenes de fluorescencia de vesículas de DMPC (figura 7.1 (a)), EggPC (7.1 (b)) y DOPC (7.1 (c)) con actina encapsulada y polimerizada.

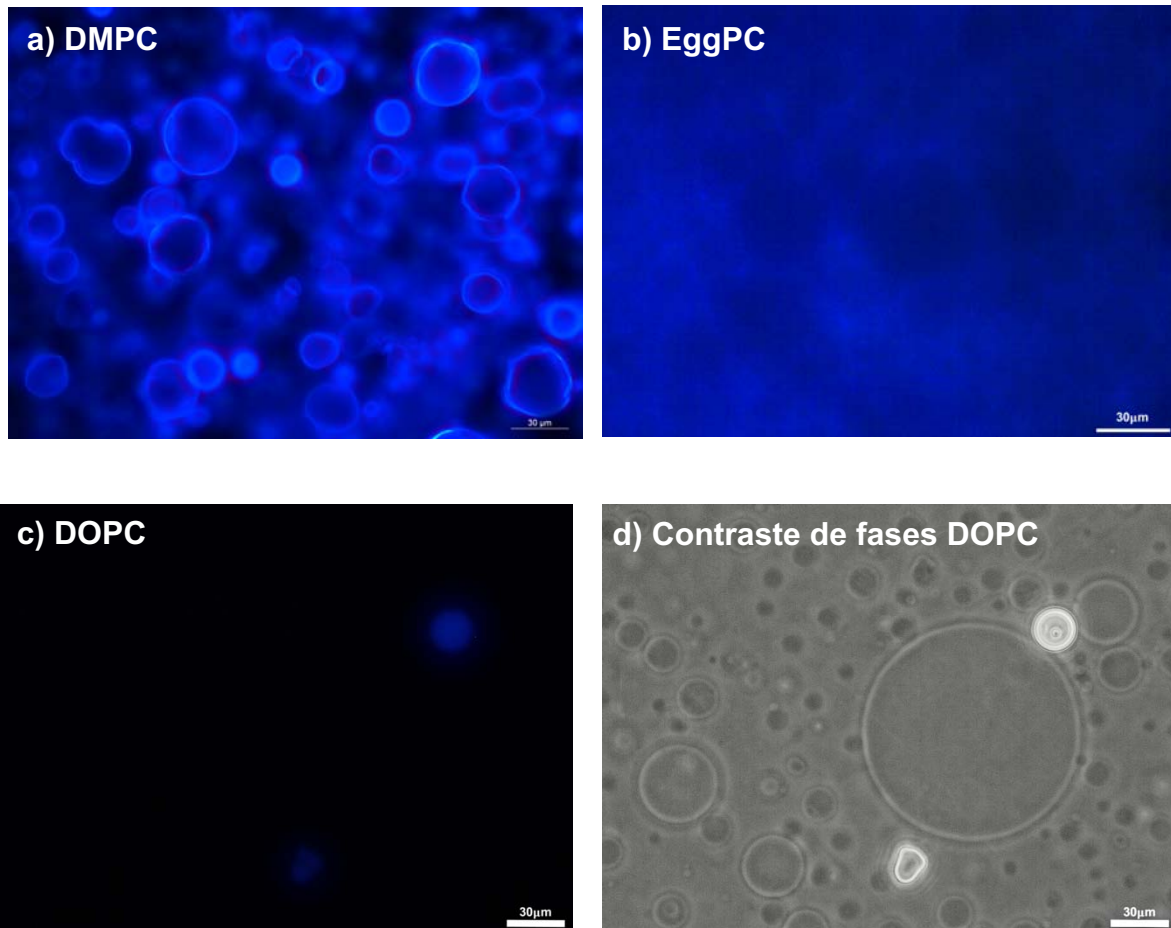


Figura 7.1. Imágenes de fluorescencia para GUVs con actina encapsulada y polimerizada. **a)** DMPC. **b)** EggPC. **c)** DOPC. **d)** Contraste de fases de las vesículas de DOPC de la imagen **c)**.

En el caso del lípido EggPC, como puede observarse en las figuras 7.1 (a) y 7.1 (b), la proteína no logró encapsularse de la misma manera que para DMPC, donde para esta última se pueden observar las vesículas bien definidas con el aumento en la fluorescencia correspondiente a la polimerización de la proteína, mientras que para EggPC solo se observa la fluorescencia debido a la proteína, pero fuera de las vesículas. Para DOPC (figura 7.1 (c)), además de que no se logró encapsular la proteína dentro de las vesículas, no se observó fluorescencia de la proteína salvo en pequeños puntos que podrían representar un exceso de proteína en esa zona. En la figura 7.1 (d) se muestra el contraste de fases de las vesículas de DOPC de la figura 7.1 (d), donde se pueden observar los puntos que presentan este exceso de proteína fuera de la vesícula. Esta facilidad del lípido DMPC para encapsular actina de una mejor manera que los lípidos EggPC y DOPC podría deberse a una diferencia estructural. La figura 7.2 (a) muestra la estructura de los tres lípidos, donde, tanto el DOPC como EggPC presentan dobles enlaces en sus cadenas de hidrocarburos (incluso en el caso de DOPC este presenta dos dobles enlaces), dichos enlaces causan un cambio en los ángulos de la molécula (un “doblamiento” de la cadena a nivel del doble enlace, figura 7.2 (b)) lo cual cambia toda su estructura en comparación con la molécula con los carbonos saturados. Debido a este cambio en su estructura, estos lípidos no se pueden empaquetar tan juntos [86], lo cual puede ser la razón de que tanto las vesículas de EggPC como las de DOPC no logren encapsular los monómeros de actina en su interior, tal vez al momento de formarse los lípidos quedan más separados entre sí (figura 7.2 (c)).

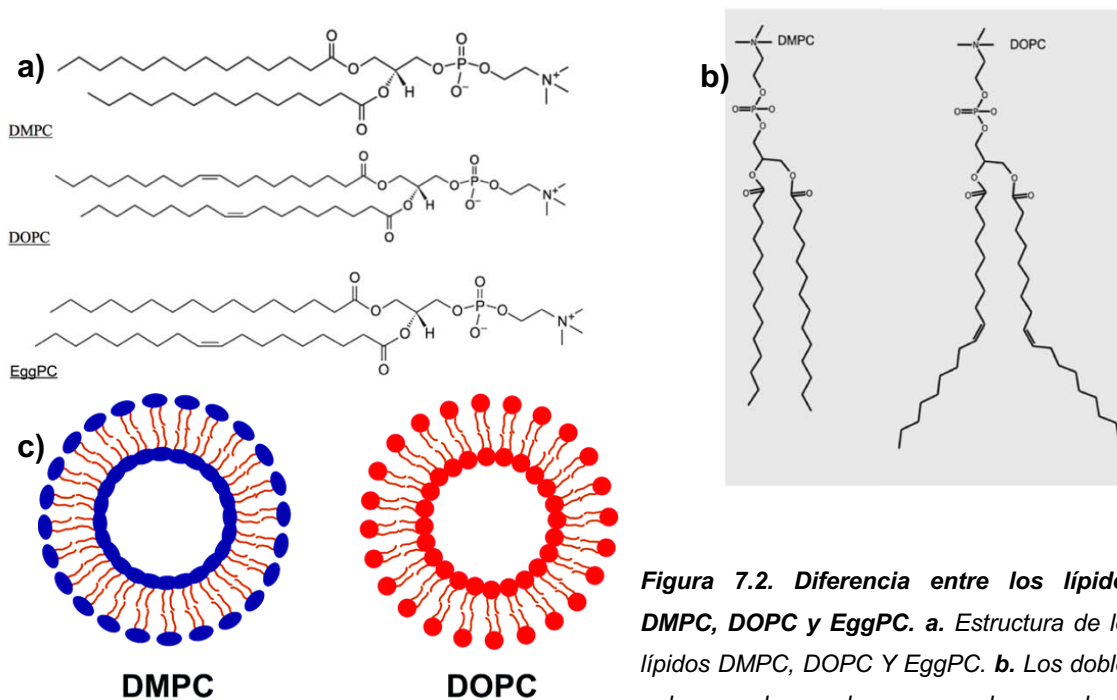


Figura 7.2. Diferencia entre los lípidos DMPC, DOPC y EggPC. a. Estructura de los lípidos DMPC, DOPC Y EggPC. **b.** Los dobles enlaces de carbono en las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos DOPC y EggPC causan un doblamiento de dichas cadenas a nivel de los enlaces dobles [87]. **c.** Vesículas de DMPC y DOPC. Los lípidos de DOPC quedan más separados entre sí al formarse la vesícula debido al cambio en su estructura como consecuencia de los dobles enlaces [88].

hidrocarbonadas de los lípidos DOPC y EggPC causan un doblamiento de dichas cadenas a nivel de los enlaces dobles [87]. **c.** Vesículas de DMPC y DOPC. Los lípidos de DOPC quedan más separados entre sí al formarse la vesícula debido al cambio en su estructura como consecuencia de los dobles enlaces [88].

En la literatura se ha reportado que tanto la presencia de estos dobles enlaces como su posición en las cadenas de hidrocarburos afecta varias propiedades de la membrana, presentando un aumento en el área por lípido en la membrana (menor empaquetamiento) en comparación con los fosfolípidos con cadenas saturadas, cambios en su grosor, así como el ordenamiento de su cadenas y cambios en su temperatura de transición de fase. Los cambios más significativos se presentan cuando el doble enlace se encuentra en la mitad de la cadena (como es el caso de DOPC y EggPC), con un aumento en el área por lípido en la membrana lo cual lleva a una disminución en el grosor de la membrana y a un desorden en la cadenas de hidrocarburos. En pocas palabras, la presencia de los dobles enlaces introduce desorden en la membranas lipídicas [89, 90, 91, 92].

7.2 Determinación de la dureza de doblado para GUVs puras de DMPC

Dado que solo en las GUVs del lípido DMPC se tuvo éxito en la encapsulación de la proteína actina, se utilizaron para el análisis solo las vesículas de este lípido con y sin actina encapsulada. Primero, para determinar la dureza de doblado en ausencia de la proteína actina (G-actina), y poder comparar los valores obtenidos con los reportados en la literatura (tabla 2.1) [54, 55, 56, 57, 58, 59], se siguió el protocolo que se describe en la sección 6.2 utilizando la cámara de formación creada a partir de dos vidrios ITO que se muestra en la figura 6.2. Para la deformación de las vesículas se usa la cámara de microfusión que se muestra en la figura 6.1 y se sigue el mismo protocolo descrito en la sección 2.3, pero sin agregar el $MgCl_2$. En la figura 7.3 se muestra una secuencia de deformación para una vesícula.

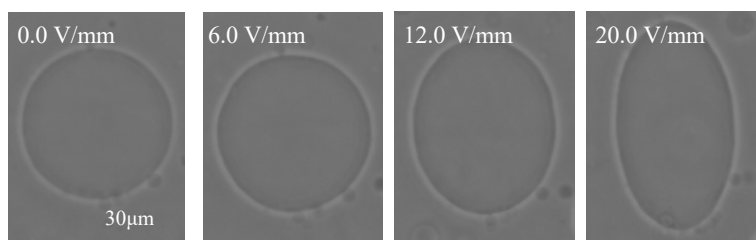


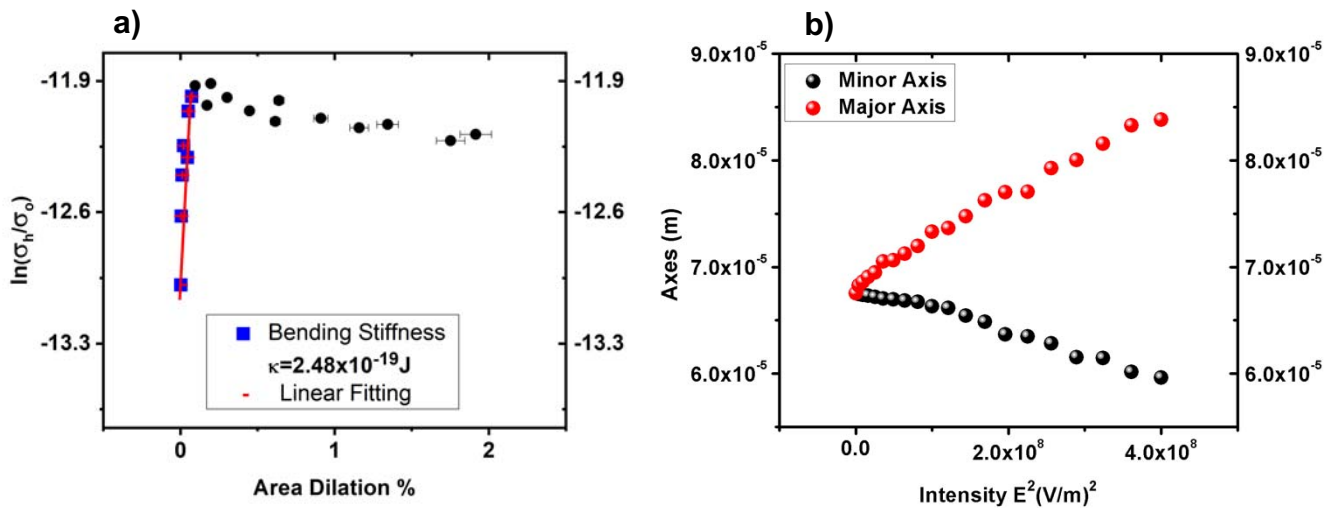
Figura 7.3. Secuencia de deformación de una vesícula de DMPC. A 100 kHz de frecuencia, 0.0 V/mm, 6.0 V/mm, 6.0 V/mm y 10.0 V/mm. La solución interior a la vesícula es sacarosa (0.2 M) e interior es glucosa (0.2 M).

Las imágenes de las vesículas deformadas se analizan utilizando *ImageJ* para medir los semiejes menor y mayor de elipsoide deformado y con esto determinar el cambio en el área para cada

voltaje. Se tabularon los parámetros que influyen en la deformación, esto es, la intensidad del campo eléctrico, los ejes mayor y menor de las vesículas, la excentricidad, los cambios en el área, las curvaturas de la membrana, las componentes de los tensores y las tensiones superficiales. Para obtener la dureza de doblado se grafica el logaritmo de las tensiones (σ_h/σ_0) contra el cambio porcentual en área reducida de la membrana (Area Dilation %) y se realiza un análisis lineal a la gráfica, tomando la ecuación (5.3) como la ecuación de una recta donde la pendiente estará dada por

$$m = \frac{8\pi\kappa}{k_B T}$$

De esta ecuación se obtiene la dureza de doblado κ . En las gráficas 7.1 se muestra el análisis de una de las vesículas, así como el cambio en los ejes a medida que aumenta el campo eléctrico utilizando los modelos teóricos para la caracterización de la deformación de vesículas descritos en el capítulo 5 con los valores de la dureza de doblado obtenidos. Las vesículas analizadas alcanzaron un cambio en el área de entre 1.4 y 1.8 %.



Gráfica 7.1a). Logaritmo de la razón de las tensiones contra el cambio porcentual en el área para una vesícula de $49 \mu\text{m}$ de diámetro. Los cuadros azules corresponden al reacomodo de los lípidos, los cuales se caracterizan por un ligero aumento en el área porcentual a medida que aumenta la razón de las tensiones, mientras que los puntos negros que corresponden al ajuste del área por lípido presentan un estiramiento de la membrana a valores casi estables de la razón de las tensiones. El ajuste lineal (línea roja) se hace sólo en los puntos correspondientes al reacomodo de los lípidos en la membrana. **b).** Cambio en los ejes de la vesícula deformada en relación con la intensidad del campo eléctrico.

El análisis lineal para obtener la dureza de doblado se realiza sólo a los puntos que corresponden a la deformación por flexión o doblado, el otro conjunto de puntos corresponde al estiramiento de la

membrana. El valor medio de las durezas de doblado obtenidas fue de $2.96 \pm 0.81 \times 10^{-19}$ J, del mismo orden a las reportadas en la literatura (tabla 2.1) [54, 55, 56, 57, 58, 59]. Con lo cual podemos decir que el modelo funciona para predecir las propiedades mecánicas de las vesículas.

7.3 Determinación de la dureza de doblado para GUVs de DMPC con actina encapsulada sin polimerizar (G-actina) a diferentes concentraciones: 0.05, 0.1 y 0.4 mg/ml

Para analizar si existe una relación entre la concentración de actina, la dureza de doblado de las vesículas y el estado de la proteína, esto es, si esta polimerizada (F-actina) o no (G-actina), en esta sección se siguió el mismo protocolo que en los casos anteriores para la encapsulación de actina, tomando las concentraciones de ésta a 0.05 mg/ml, 0.1 mg/ml y 0.4 mg/ml, esto se logra preparando diluciones de la actina (concentración inicial de 0.4 mg/ml) en buffer general (5 mM de Tris-HCl y 0.2 mM de CaCl_2).

7.3.1 GUVs de DMPC con actina encapsulada a 0.05 mg/ml sin polimerizar (G-actina)

Para determinar la dureza de doblado de estas vesículas no se añadió MgCl_2 para la polimerización de la proteína. En la figura 7.4 se muestra una secuencia de deformación de una vesícula de DMPC con actina encapsulada sin polimerizar.

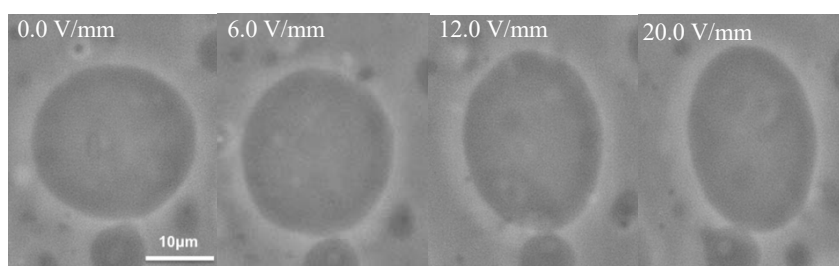
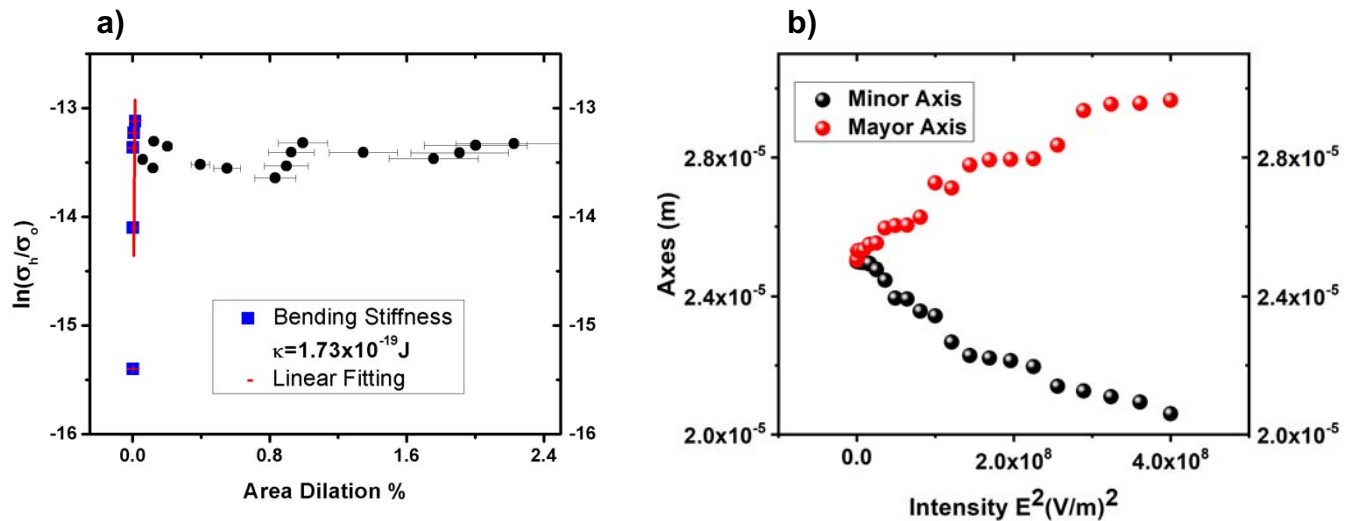


Figura 7.4. Secuencia de deformación de una vesícula de DMPC con actina encapsulada sin polimerizar a 0.05mg/ml. A 100 kHz de frecuencia y 0 V/mm, 6 V/mm, 12 V/mm y 20 V/mm. El medio interno a la vesícula es sacarosa (0.2 M) y G-actina (0.05 mg/ml). Medio externo glucosa (0.2 M).

Al analizar las imágenes de la deformación de estas vesículas siguiendo el mismo procedimiento que en los casos anteriores se obtuvo su dureza de doblado al graficar la razón del logaritmo de las tensiones que sufre la membrana contra el cambio en el área de la vesícula debido a dichas tensiones. En las gráficas 7.2 se muestra lo anteriormente dicho para una de las vesículas

analizadas, en base a la metodología teórica del capítulo 5. Las vesículas analizadas alcanzaron un cambio porcentual en el área de entre 1 y 2.2 %, empezando a deformarse entre -16 y -15.



Gráfica 7.2 a). Logaritmo de la razón de las tensiones contra el cambio en el área para una vesícula de DMPC con actina encapsulada sin polimerizar a 0.05mg/ml. De 25 μm de diámetro. Los cuadros azules corresponden al reacomodo de los lípidos, mientras que los puntos negros al ajuste del área por lípido durante la deformación. El ajuste lineal se hace solo en los puntos correspondientes al reacomodo de los lípidos en la membrana. **b).** Cambio en los ejes de la vesícula deformada en relación con la intensidad del campo eléctrico.

El valor medio de las durezas de doblado obtenidas para estas vesículas fue $2.56 \pm 0.83 \times 10^{-19} \text{ J}$, el cual se encuentran dentro del orden reportado en literatura para GUVs de DMPC sin actina encapsulada (tabla 2.1) [54, 55, 56, 57, 58, 59] y anteriormente determinado en este estudio en la sección 7.2 para GUVs puras de DMPC. Lo cual una vez más confirma que la presencia de la proteína como monómero no afecta sus propiedades mecánicas, ya que la energía necesaria para su deformación sigue siendo del mismo orden.

7.3.2 GUVs de DMPC con actina encapsulada a 0.05 mg/ml polimerizada (F-actina)

En el siguiente caso si se agregó MgCl_2 para polimerizar a la proteína dentro de las vesículas. Una vez que se añade éste, las vesículas se deformaron aplicando campo eléctrico alterno como en la sección 7.2 para determinar la dureza de doblado. La figura 7.5 muestra una secuencia de deformación para una vesícula de DMPC con actina encapsulada polimerizada a 0.05 mg/ml.

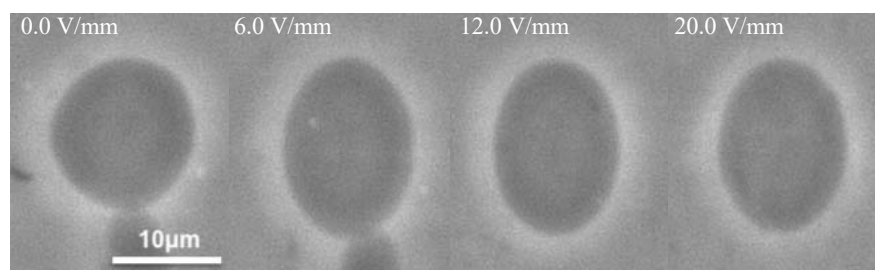
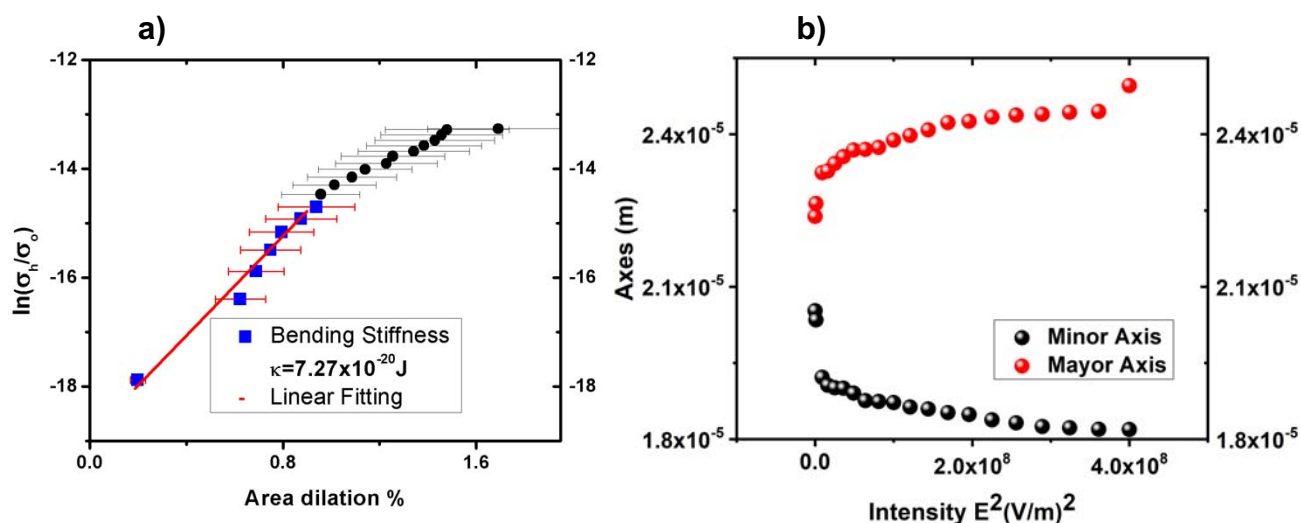


Figura 7.5. Secuencia de deformación de una vesícula de DMPC con actina encapsulada polimerizada a 0.05mg/ml. A 100 kHz de frecuencia y, 0 V/mm, 6 V/mm, 12 V/mm y 20 V/mm. El medio interno a la vesícula es sacarosa (0.2 M) y F-actina (0.05 mg/ml). Medio externo glucosa (0.2 M).

Las gráficas 7.3 muestran la razón del logaritmo de las tensiones que sufre la membrana contra el cambio en el área para una de las vesículas analizadas. La línea roja representa el análisis lineal realizado a los puntos correspondientes a la deformación para determinar la dureza de doblado. Las vesículas analizadas alcanzaron un cambio porcentual en el área de entre 1.6 y 2 %, empezando dicha deformación en -18 aproximadamente.

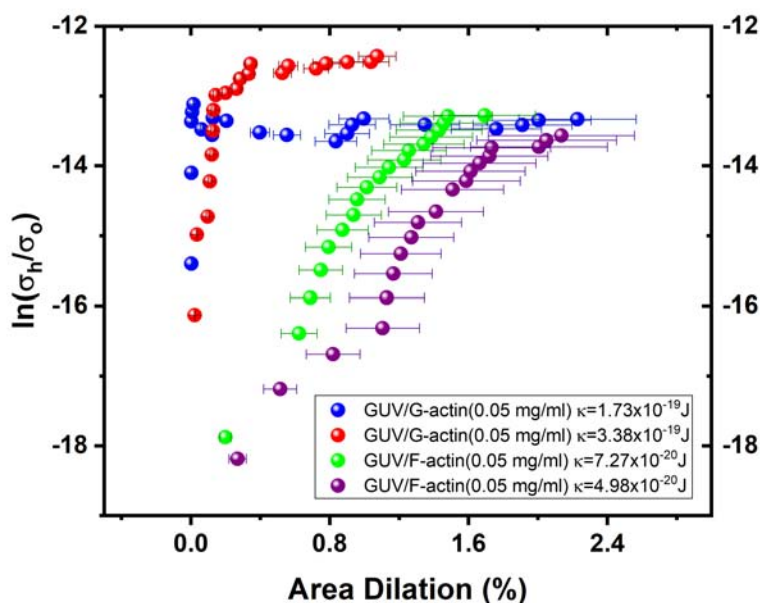


Gráfica 7.3 a). Logaritmo de la razón de las tensiones contra el cambio en el área para una vesícula de DMPC con actina encapsulada polimerizada a 0.05mg/ml de 22 μm de diámetro. Los cuadros azules corresponden al reacomodo de los lípidos, mientras que los puntos negros al ajuste del área por lípido durante la deformación. El ajuste lineal se hace solo en los puntos correspondientes al reacomodo de los lípidos en la membrana. **b).** Cambio en los ejes de la vesícula deformada en relación con la intensidad del campo eléctrico.

El valor medio de las durezas de doblado obtenidas para estas vesículas con actina encapsulada a 0.05mg/ml y polimerizada fue $9.76 \pm 4.58 \times 10^{-20}$ J, éstas no son del orden de las durezas encontradas para vesículas con actina encapsulada y polimerizada a 0.4 mg/ml presentadas en el capítulo 2 (tabla 2.2), las cuales son del orden de 10^{-18} J. Al contrario, son del orden de las durezas

de doblado reportadas en la literatura para GUVs puras de DMPC (tabla 2.1) [54, 55, 56, 57, 58, 59], así como las determinadas experimentalmente en la sección 7.2 para GUVs puras de DMPC.

En la gráfica 7.4 se muestra el análisis de cuatro vesículas correspondientes a la concentración de 0.05 mg/ml de actina para los dos casos, esto es, sin polimerizar (G-actina) y polimerizada (F-actina). Las tensiones ejercidas sobre las vesículas estuvieron dentro del mismo rango, entre -18 y -12; incluso las vesículas con F-actina encapsulada (polimerizada) empezaron a deformarse a tensiones menores que las vesículas con G-actina, como puede verse en la gráfica. Sucede lo mismo con el cambio porcentual en el área, el cual fue de entre el 1 % y 2.2 %. Esto es, no fue necesaria mayor energía para deformar a las vesículas con actina encapsulada y polimerizada.



Gráfica 7.4. DMPC GUVs con actina encapsulada a la concentración 0.05 mg/ml. GUV/G-actina (círculos azules). GUV/G-actina (círculos rojos). GUV/F-actina (círculos verdes). GUV/F-actina (círculos morados). El comportamiento de las vesículas con F-actina encapsulada a esta concentración es muy similar a las vesículas con G-actina, presentando valores similares para el cambio porcentual en el área. Además, las vesículas con F-actina empezaron a deformarse a tensiones menores que aquellas con G-actina, como si no hubiera filamentos en su interior.

La concentración 0.05mg/ml está muy cerca de la concentración crítica de la actina del kit utilizado (0.03mg/ml), por lo cual al polimerizar la proteína los filamentos de actina no son suficientes para brindar soporte interno a la vesícula y por lo tanto sus propiedades mecánicas no se ven afectadas, incluso puede ser que no se alcance la polimerización, en otras palabras, es como el caso en el que no hay actina dentro de las vesículas.

7.3.3 GUVs de DMPC con actina encapsulada a 0.1 mg/ml sin polimerizar (G-actina)

En esta sección se continua con el caso de vesículas de DMPC con actina encapsulada a 0.1 mg/ml sin polimerizar, siguiendo los mismos protocolos que en los casos anteriores para la deformación y sin agregar MgCl₂ para la polimerización de la proteína. La figura 7.6 muestra una secuencia de deformación para una vesícula de este caso.

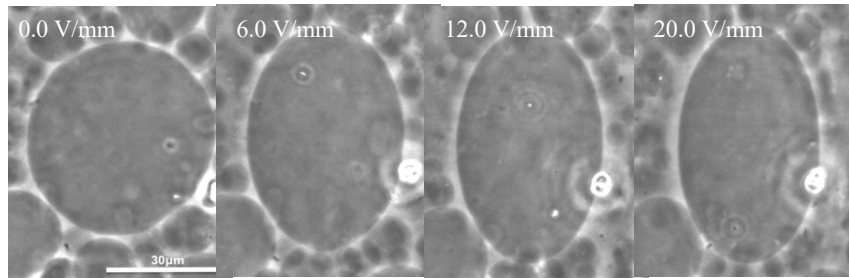
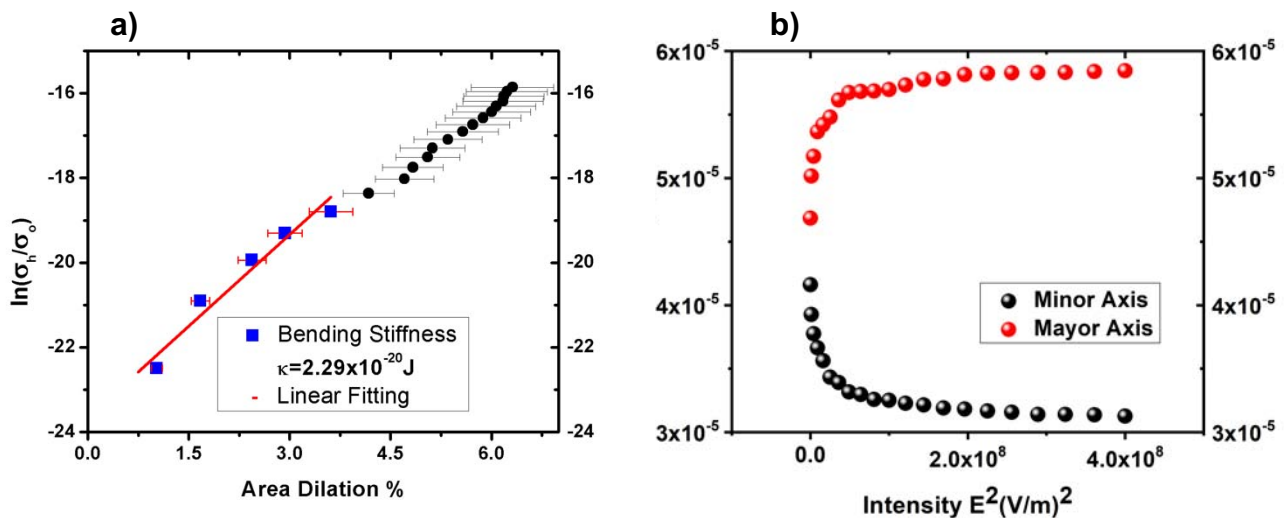


Figura 7.6. Secuencia de deformación para una vesícula de DMPC con actina encapsulada a 0.1mg/ml sin polimerizar. A 100 kHz de frecuencia y, 0 V/mm, 6 V/mm, 12 V/mm y 20 V/mm. El medio interno a la vesícula es sacarosa (0.2 M) y G-actina (0.1 mg/ml). Medio externo glucosa (0.2 M).

Las gráficas 7.5 muestran la razón del logaritmo de las tensiones que sufre la vesícula contra su cambio en el área y el análisis lineal para obtener la dureza de doblado para una de las vesículas analizadas, así como el cambio que sufre la vesícula debido al campo eléctrico aplicado. Dicho análisis se realiza solo sobre los puntos correspondientes al reacomodo de los lípidos en la membrana (cuadros azules). Todas las vesículas alcanzaron un cambio porcentual en el área de aproximadamente 6.4 %.



Gráficas 7.5 a). Logaritmo de la razón de las tensiones contra el cambio en el área para una vesícula de DMPC con actina encapsulada sin polimerizar a 0.1 mg/ml de 47 μm diámetro. Los cuadros azules corresponden al reacomodo de los lípidos, mientras que los puntos negros al ajuste del área por lípido durante la deformación. El ajuste lineal se hace solo en los puntos correspondientes al reacomodo de los lípidos en la membrana. **b).** Cambio en los ejes de la vesícula deformada en relación con la intensidad del campo eléctrico.

El valor medio de las durezas de doblado obtenidas para este caso fue $2.76 \pm 0.47 \times 10^{-20}$ J, este orden está dentro de los reportados en la literatura para GUVs puras de DMPC (tabla 2.1) [54, 55, 56, 57, 58, 59] y los presentados en las sección 7.2, así como en los casos anteriores de esta misma sección. Lo cual una vez más confirma que la presencia de la proteína como monómero no afecta las propiedades mecánicas de las vesículas.

7.3.4 GUVs de DMPC con actina encapsulada a 0.1 mg/ml polimerizada (F-actina)

Finalmente, se determinó la dureza de doblado para GUVs de DMPC con actina encapsulada y polimerizada a 0.1 mg/ml. La figura 7.7 muestra una secuencia de deformación para una vesícula de este caso.

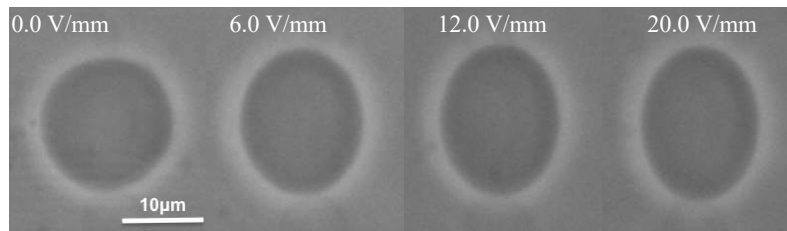
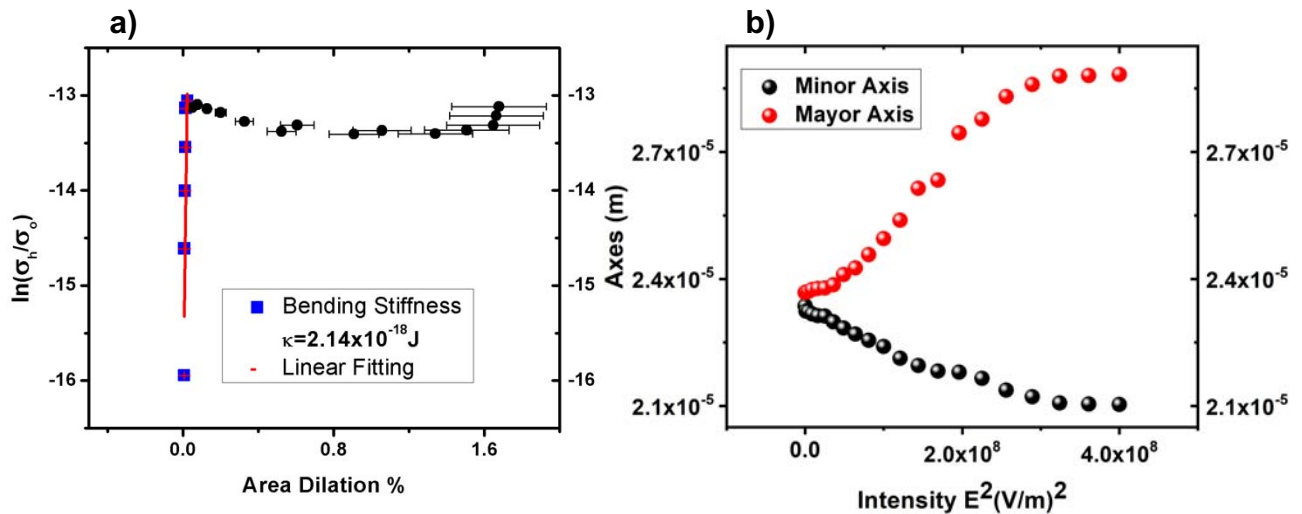


Figura 7.7. Secuencia de deformación para una vesícula de DMPC con actina encapsulada polimerizada a 0.1mg/ml. A 100 kHz de frecuencia y, 0 V/mm, 6 V/mm, 12 V/mm y 20 V/mm. El medio interno a la vesícula es sacarosa (0.2 M) y F-actina (0.1 mg/ml). Medio externo glucosa (0.2 M).

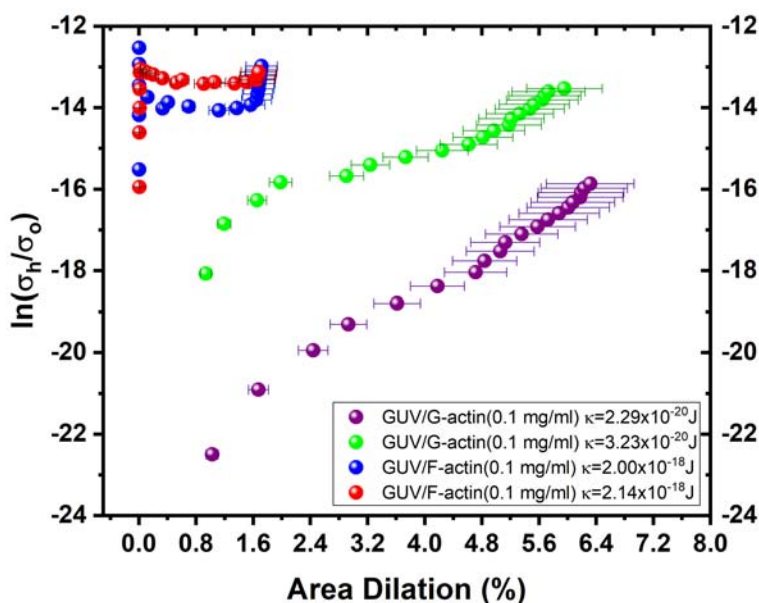
Las gráficas 7.6 muestran la razón del logaritmo de las tensiones en la vesícula contra su cambio en el área para determinar la dureza de doblado para una de las vesículas analizadas, así como en cambio en sus ejes debido al campo eléctrico. Todas las vesículas alcanzaron un cambio porcentual en el área de aproximadamente 1.6 %.



Gráfica 7.6 a). Logaritmo de la razón de las tensiones contra el cambio en el área para una vesícula de DMPC con actina encapsulada polimerizada a 0.1 mg/ml de 28 μm de diámetro. **b).** Cambio en los ejes de la vesícula deformada en relación con la intensidad del campo eléctrico.

El valor medio de las durezas de doblado obtenidas para las vesículas de este caso fue $1.11 \pm 0.56 \times 10^{-18}$ J, el cual es del orden de las presentadas en el capítulo 2 (tabla 2.2) para vesículas con actina encapsulada y polimerizada a la concentración de 0.4 mg/ml, un orden de magnitud mayor a las durezas de doblado de las vesículas puras de DMPC (sección 7.2), así como en los casos anteriores de esta sección.

Para observar mejor este resultado, en la gráfica 7.7 se muestran los análisis de las vesículas para la concentración 0.1 mg/ml. Es evidente como en el caso de GUVs con G-actina se necesitaron tensiones menores para deformarlas, empezando dicha deformación entre -24 y -18, alcanzando a su vez un cambio porcentual en el área de hasta 6.4 %. Mientras que en el caso de GUVs con F-actina, la deformación empezó hasta -16 llegando hasta -12 aproximadamente. Pero lo más sorprendente es que, para este caso cuando hay filamentos de proteína dentro de las GUVs, el cambio porcentual en el área es mucho menor, el cual es de 1.6 %, 4.8 % menor que en el caso de las GUVs con actina sin polimerizar. Esto es, cuando la proteína se encuentra polimerizada, sus filamentos le brindan soporte a la vesícula y la hacen más resistente contra deformaciones.



Gráfica 7.7. DMPC GUVs con actina encapsulada a la concentración 0.1 mg/ml. GUV/G-actina (círculos morados). GUV/G-actina (círculos verdes). GUV/F-actina (círculos azules). GUV/F-actina (círculos rojos). Las GUVs con F-actina encapsulada presentaron un menor cambio porcentual en el área que las GUVs con G-actina, hasta 4.8 % menor. Además, para las GUVs con F-actina fueron necesarias mayores tensiones en la membrana para deformarlas, empezando dicha deformación en -16, a diferencia de las GUVs con G-actina las cuales empezaron a deformarse entre -22 y -18. Esto es, para las GUVs con F-actina son necesarias mayores tensiones para lograr una deformación menor a las GUVs con G-actina.

7.3.5 GUVs de DMPC con actina encapsulada a 0.4 mg/ml sin polimerizar (G-actina)

En la siguiente etapa del estudio de las propiedades mecánicas de vesículas con actina, se deformaron vesículas de DMPC con G-actina (sin polimerizar) encapsulada ahora a la concentración 0.4 mg/ml, siguiendo el mismo protocolo que en los casos anteriores. En la figura 7.8 se muestra una secuencia de deformación para una vesícula de DMPC con actina encapsulada sin polimerizar (G-actina).

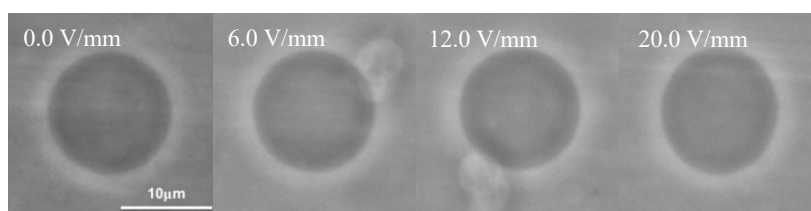
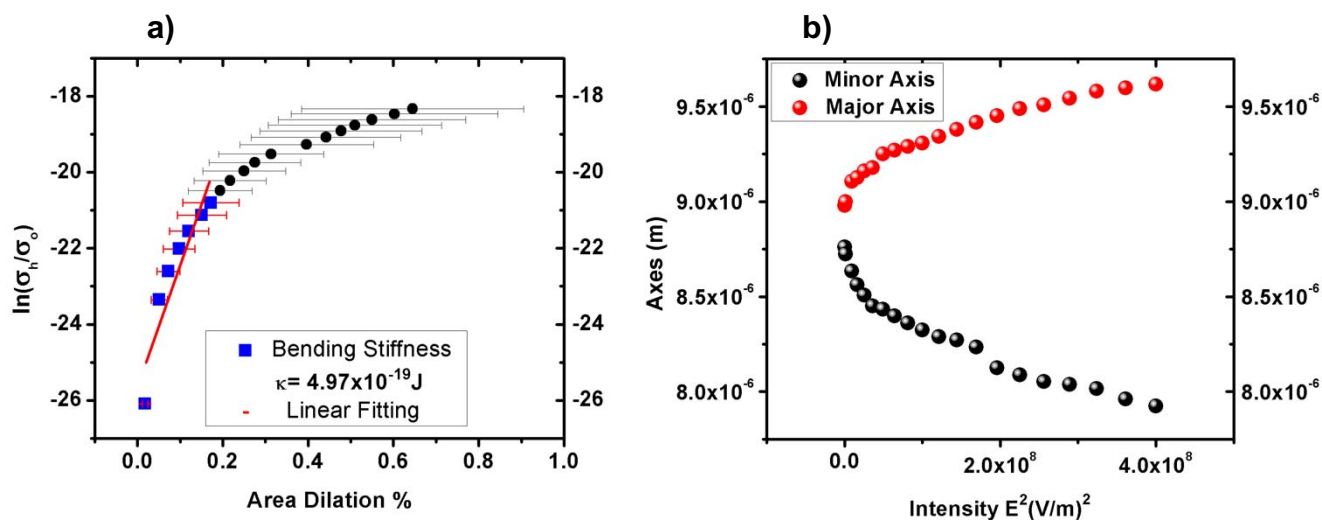


Figura 7.8. Secuencia de deformación de una vesícula de DMPC con actina encapsulada sin polimerizar (G-actina). A 100 kHz de frecuencia, 0.0 V/mm, 6 V/mm, 12 V/mm y 20 V/mm. El medio interno a la vesícula es sacarosa (0.2 M) y G-actina (0.04 mg/ml). El medio externo glucosa (0.2 M).

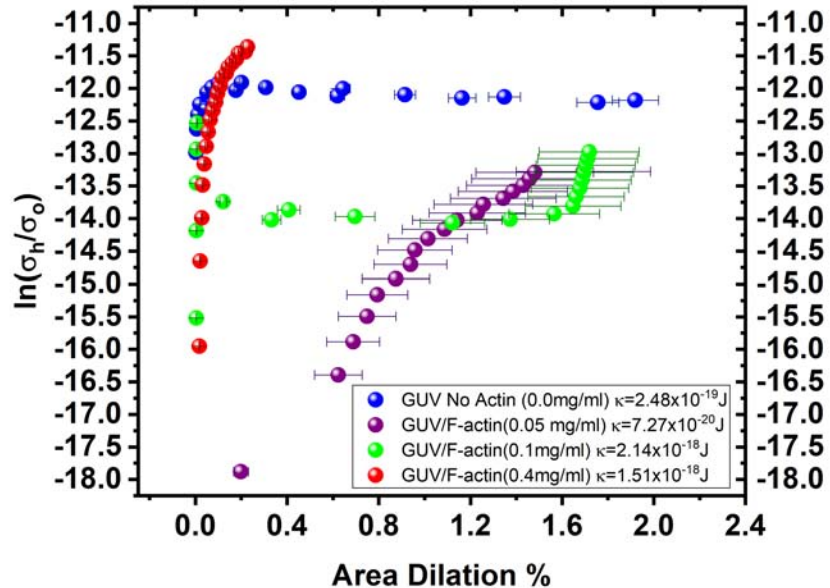
Al analizar las imágenes siguiendo el mismo procedimiento que en los casos anteriores, se obtuvieron las durezas de doblado para estas vesículas. Las gráficas 7.8 muestran el logaritmo de la razón de las tensiones que sufre la vesícula contra el cambio en el área debido al campo eléctrico, así como el cambio en los ejes a medida que el campo eléctrico aumenta. En este caso las vesículas alcanzaron un cambio en el área de entre 0.6 y 9 % aproximadamente.



Gráfica 7.8 a). Logaritmo de la razón de las tensiones contra el cambio en el área para una vesícula de DMPC con actina encapsulada de 8.76 μm de diámetro. Los cuadros azules corresponden al acomodamiento de los lípidos, los cuales se caracterizan por un ligero aumento en el área porcentual a medida que aumenta la razón de las tensiones, mientras que los puntos negros que corresponden al ajuste del área por lípido presentan un estiramiento de la membrana a valores casi estables de la razón de las tensiones. El ajuste lineal (línea roja) se hace solo en los puntos correspondientes al acomodamiento de los lípidos en la membrana. **b)** Cambio en los ejes de la vesícula deformada en relación con la intensidad del campo eléctrico.

Todas las durezas de doblado obtenidas para GUVs de DMPC con actina encapsulada sin polimerizar (G-actina) a 0.4 mg/ml fueron del orden de 10^{-19} - 10^{-20} J, con valor medio de $4.27 \pm 1.20 \times 10^{-19}$ J, es decir, del mismo orden que para las vesículas puras de DMPC reportadas en la literatura [54, 55, 56, 57, 58, 59] (tabla 2.1), al igual que las obtenidas experimentalmente en sección anterior para GUVs puras de DMPC, cuyo valor medio fue de $2.96 \pm 0.81 \times 10^{-19}$ J, esto es, se necesitan energías del mismo orden de magnitud para deformar tanto a GUVs puras de DMPC como a GUVs de DMPC con actina encapsulada sin polimerizar (G-actina), a diferencia de las durezas de doblado para GUVs de DMPC con actina encapsulada y polimerizada (F-actina) obtenidas experimentalmente y reportadas en la sección 2.1 con valor medio $3.44 \pm 0.95 \times 10^{-18}$ J, las cuales requieren mayor energía. Lo cual puede indicar que la presencia de la proteína dentro de las vesículas no afecta sus propiedades mecánicas a menos que ésta esté polimerizada.

Podemos concluir entonces que, al igual que en el capítulo 2 para la concentración de F-actina a 0.4 mg/ml, a la concentración de 0.1 mg/ml la proteína polimerizada (F-actina) aún afecta las propiedades mecánicas de la membrana y la vuelve más resistente, a diferencia de la concentración de actina a 0.05 mg/ml polimerizada (F-actina) donde las GUVs se comportaron como si no hubiera filamentos de actina en su interior. Dicha comparativa puede verse mejor en la gráfica 7.9 en donde se muestran los análisis de cuatro DMPC GUVs con F-actina en su interior, cada una correspondiente a las concentraciones de actina de 0.0, 0.05, 0.1 y 0.04 mg/ml. Para la vesícula sin actina (0.0 mg/ml, círculos azules) se alcanza un cambio porcentual en el área de casi 2 %, el cual disminuye en las otras vesículas a medida que aumenta la concentración, como puede verse para el caso de la vesícula con F-actina a 0.05 mg/ml (círculos morados) y la vesícula con F-actina a 0.1 mg/ml (círculos verdes), el cual es de aproximadamente 1.7 %. Y es aún más evidente para el caso de la vesícula con F-actina a 0.4 mg/ml, donde alcanzó un cambio en el área aparente de apenas el 0.5 %.



Gráfica 7.9. DMPC GUVs con F-actina a diferentes concentraciones. 0.0 mg/ml, sin actina (círculos azules). 0.05 mg/ml (círculos morados). 0.1 mg/ml (círculos verdes). 0.4 mg/ml (círculos rojos). A medida que aumenta la concentración de actina dentro de las vesículas disminuye el cambio porcentual en el área. A 0.0 mg/ml se llega a un cambio porcentual en el área de casi 2 %, mientras que a 0.4 mg/ml éste es de apenas 0.5 %.

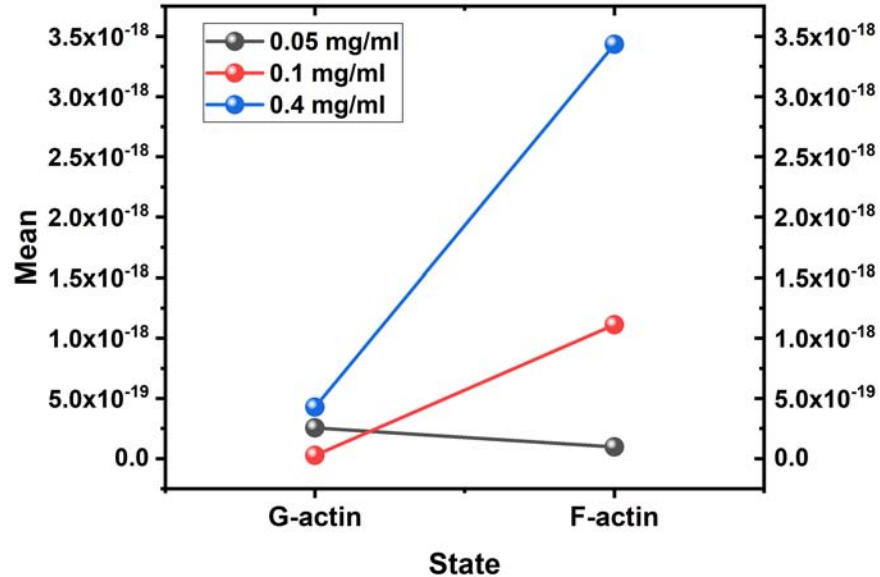
De este resultado de la relación entre la concentración de actina polimerizada dentro de las GUVs y su cambio porcentual en el área se realizó un análisis ANOVA de dos vías para determinar si existe una relación también entre la dureza de doblado de las vesículas, la concentración de actina y el estado de ésta última, es decir, si se encuentra polimerizada o no. A los valores medios de la dureza de doblado de GUVs con G-actina y F-actina encapsulada se les realizaron previamente pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk por lo que tiene validez utilizarlos como medida de tendencia central y poder compararlos. En el caso de GUVs puras de DMPC fue interesante encontrar que sus durezas de doblado no poseen un comportamiento normal, es decir, cuando no hay proteína encapsulada en su interior (ya sea polimerizada o no), su distribución no es normal. En la tabla 7.1 se muestran los datos arrojados por el ANOVA de dos vías, donde *DF* son los grados de libertad, *SS* suma de los cuadrados, *MS* el cuadrado medio, *F* es un valor estadístico que nos ayuda a conocer si nuestros resultados son significativos, y *p* nos da la probabilidad de que los resultados confirmen o rechacen la hipótesis nula del análisis. Dicho análisis reveló que al nivel 0.05 las medias de la concentración no son significativamente diferentes, las medias del

estado no son significativamente diferentes, y que la interacción entre la concentración y el estado no es significativa. Como se puede ver en la tabla con valores p mayores que el nivel significativo.

Tabla 7.1. ANOVA de dos vías. Las variables independientes son la concentración y el estado de la proteína. La variable dependiente es la dureza de doblado de las GUVs. El análisis arrojó que al nivel 0.05 la interacción entre la concentración y el estado de la proteína no es significativa.

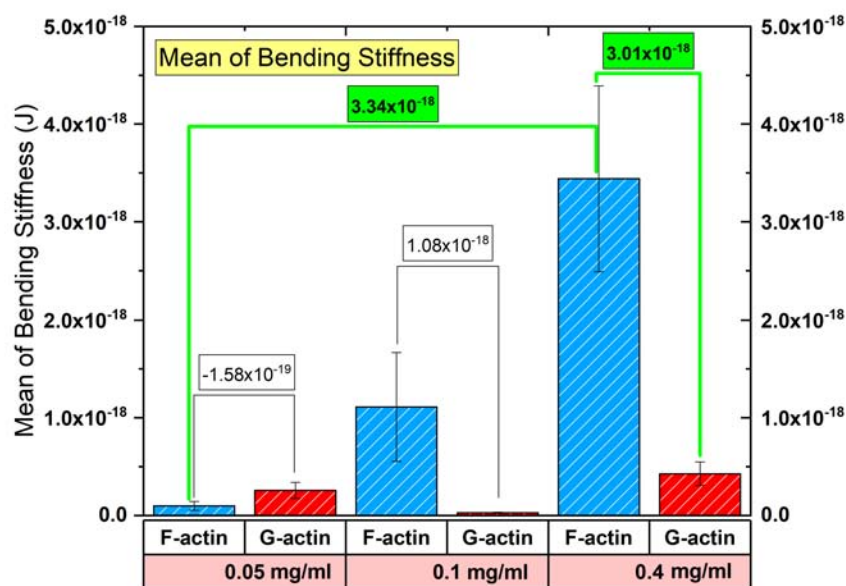
	DF	SS	MS	F Value	p value
Concentration	2	1.50x10 ⁻³⁵	7.49x10 ⁻³⁶	2.7244	0.0899
State	1	8.63x10 ⁻³⁶	8.63x10 ⁻³⁶	3.1386	0.0917
Interaction	2	1.07x10 ⁻³⁵	5.37x10 ⁻³⁶	1.9535	0.1679
Error	20	5.50x10 ⁻³⁵	2.75x10 ⁻³⁶	3.8023	0.0139
Total	25	1.07x10 ⁻³⁴			

Para una mayor precisión en el resultado, se procedió a analizar las múltiples interacciones entre la concentración de la proteína y su estado arrojadas por el ANOVA. En la gráfica 7.10 se muestran dichas interacciones donde se puede observar claramente que si hay una relación entre la concentración y el estado de la proteína, ya que para las tres concentraciones cuando la proteína está sin polimerizar (G-actina) las medias de las interacciones están muy cercanos entre sí, pero al polimerizar (F-actina) las medias de las concentraciones 0.1 mg/ml y 0.4 mg/ml se disparan, caso contrario para la media a la concentración 0.05 mg/ml, la cual incluso disminuye un poco. Esto refuerza nuestro resultado de que a las concentraciones de 0.1 y 0.4 mg/ml cuando la proteína está polimerizada (F-actina), ésta vuelve más resistente a las membranas afectando sus propiedades mecánicas, a diferencia de la concentración 0.05 mg/ml, donde al deformar a las vesículas éstas se comportan como si no hubiera proteína en su interior y media de las interacciones permanece casi igual.



Gráfica 7.10. Gráfica de las interacciones de la concentración y estado de actina arrojadas por ANOVA de dos vías. Concentraciones 0.05 mg/ml (negro), 0.1 mg/ml (rojo) y 0.4 mg/ml (azul). Las medias de las interacciones cuando la proteína no está polimerizada (G-actina) se encuentran muy cercanas entre sí. Cuando la proteína polimeriza (F-actina) las medias de las concentraciones 0.1 y 0.4 mg/ml se disparan. A 0.05 mg/ml, la media disminuye.

De dichas interacciones, se encontró que sólo las interacciones entre F-actina (0.4 mg/ml) – G-actina (0.05 mg/ml) y F-actina (0.4 mg/ml) – G-actina (0.4 mg/ml) fueron significativas, con valores p de 0.03719 y 0.03198, respetivamente. En la gráfica de barras 7.11 se muestran las medias de dichas interacciones significativas en color verde, así como la medias de las interacciones entre cada concentración y su estado. Las barras azules corresponden a la proteína polimerizada (F-actina), mientras que las barras rojas corresponden a la proteína sin polimerizar (G-actina). Este resultado confirma que si hay una relación entre la concentración de la proteína y si ésta se encuentra polimerizada (F-actina) o no (G-actina), ya que las interacciones significativas fueron entre las concentraciones y estados extremos o más importantes, esto es, entre la concentración mayor polimerizada y la concentración menor sin polimerizar, y la concentración mayor polimerizada y la concentración mayor sin polimerizar.



Gráfica 7.11. Múltiples comparaciones de las interacciones entre la concentración y el estado de la proteína actina. Las diferencias entre las medias sólo fueron significativas para F-actina (0.4 mg/ml) – G-actina (0.05 mg/ml) y F-actina (0.4 mg/ml) – G-actina (0.4 mg/ml), con $p=0.03719$ y $p=0.03198$, respectivamente, las cuales se muestran en color verde.

Con base en los resultados obtenidos para la dureza de doblado de GUVs puras de DMPC, GUVs de DMPC con G-actina encapsulada y GUVs de DMPC con F-actina encapsulada, se proponen dos casos para las interacciones de los filamentos de actina con la membrana (figura 7.9). En el primer caso se propone que los filamentos de la proteína se acumulan cerca de la membrana, como lo hace el citoesqueleto cortical de actina en las células animales, haciéndola más resistente a las deformaciones, como se muestra en la figura 7.9 (a). En el segundo caso, se propone que los filamentos no solo se acumulan cerca de la membrana, sino que están dispersos dentro de toda la vesícula, y cuando la vesícula se deforma, los filamentos se orientan brindando resistencia a la vesícula ante dicha deformación (figura 7.9 (b)). Para caracterizar estos casos, se marcó con rodamina el lípido DMPC mientras que la actina está marcada con pireno. La figura 7.9 (c) muestra un vesícula marcada con rodamina y la figura 7.9 (d) muestra la F-actina encapsulada dentro de dicha vesícula. En ésta última se puede observar un aro azul cerca de la membrana, correspondiente al citoesqueleto cortical de las membranas modelo, así como un incremento en la fluorescencia en el centro de la vesícula debido a la polimerización de la proteína. Este aumento podría indicar una acumulación de filamentos de la proteína en esa región. Este mismo comportamiento se observó en otras vesículas con F-actina encapsulada, como se muestra en la figura 7.9 (e).

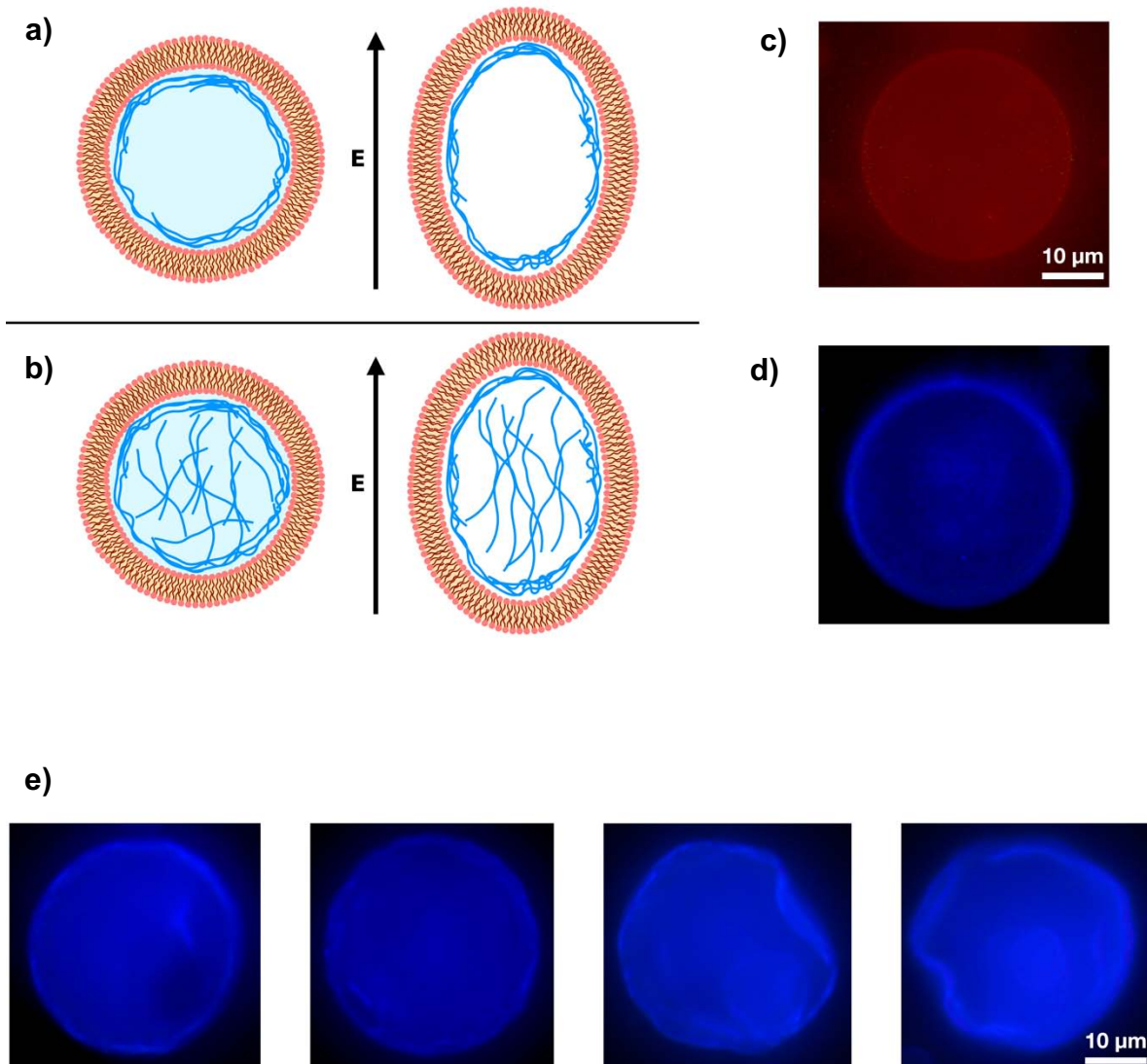
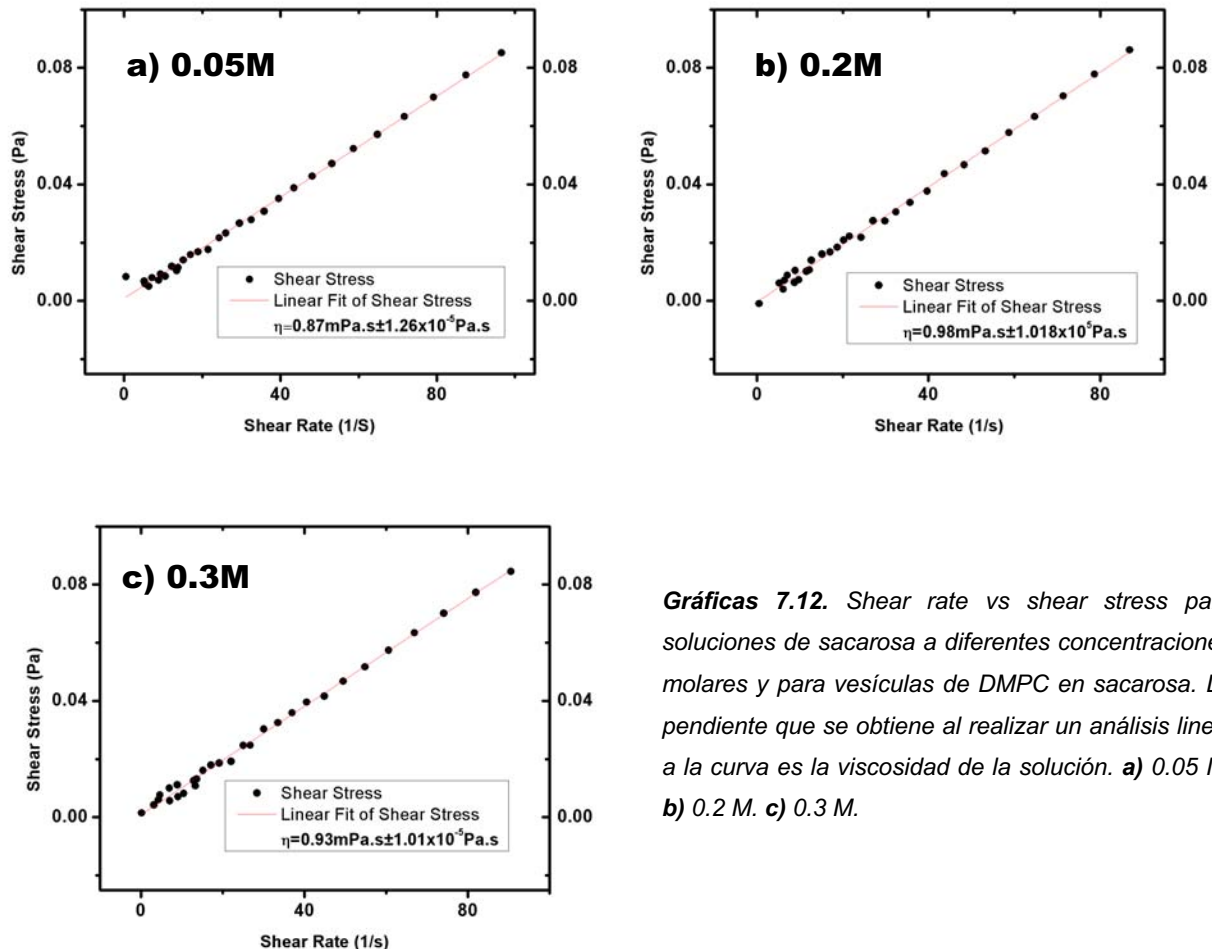


Figura 7.9. Casos propuestos para la interacción de los filamentos de actina con la membrana. **a)** Los filamentos se acumulan cerca de la membrana. **b)** Los filamentos no solo se acumulan en la membrana, también están dispersos en el interior de la vesícula. **c)** Vesícula marcada con rodamina. **d)** Actina polimerizada marcada con pireno encapsulada dentro de la vesícula de la imagen d). **e)** GUVs de DMPC con F-actina encapsulada donde se puede observar un aro azul cerca de la membrana, así como un aumento en la fluorescencia en el centro.

7.4 Medición de viscosidad de soluciones de sacarosa a diferentes concentraciones

La viscosidad de un fluido es una propiedad muy importante que nos permite conocer cómo se resiste un fluido a la deformación o al movimiento. Se ha reportado en la literatura que esta propiedad juega un papel muy importante en la mecánica de la célula y sus componentes [93, 94, 95, 96]. Ya que en este estudio se abordan las propiedades mecánicas de un modelo del citoesqueleto cortical de actina, antes de determinar la viscosidad de las DMPC GUVs con G-actina y F-actina, se procedió a medir la viscosidad de soluciones de sacarosa a diferentes concentraciones, para tener el valor control de la viscosidad, ya que el medio exterior a las vesículas es sacarosa. Para medir la viscosidad se prepararon soluciones de sacarosa a las concentraciones molares de 0.05 M, 0.2 M y 0.3 M. Se depositaron 2ml de cada solución en el reómetro y se fijó la temperatura a 25°C, se tomó como referencia la viscosidad del agua a esta temperatura la cual es de 0.89 mPa·s. En las gráficas 7.12 se muestran las curvas de esfuerzo cortante (shear stress) contra tasa de corte (shear rate) en donde la pendiente de la curva es la viscosidad.

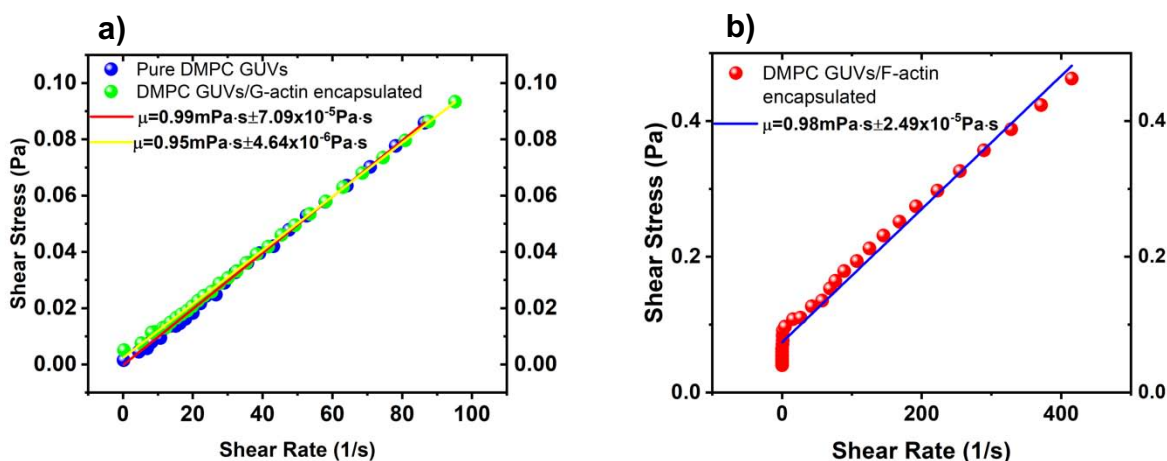


Gráficas 7.12. Shear rate vs shear stress para soluciones de sacarosa a diferentes concentraciones molares y para vesículas de DMPC en sacarosa. La pendiente que se obtiene al realizar un análisis lineal a la curva es la viscosidad de la solución. **a)** 0.05 M. **b)** 0.2 M. **c)** 0.3 M.

La viscosidad para la solución de sacarosa a 0.2 M resultó mayor que la viscosidad a 0.3 M, tal vez debido a que a tiempos más cortos hay más probabilidades de error.

7.5 Medición de viscosidad de vesículas puras de DMPC, y vesículas de DMPC con actina encapsulada sin polimerizar y polimerizada

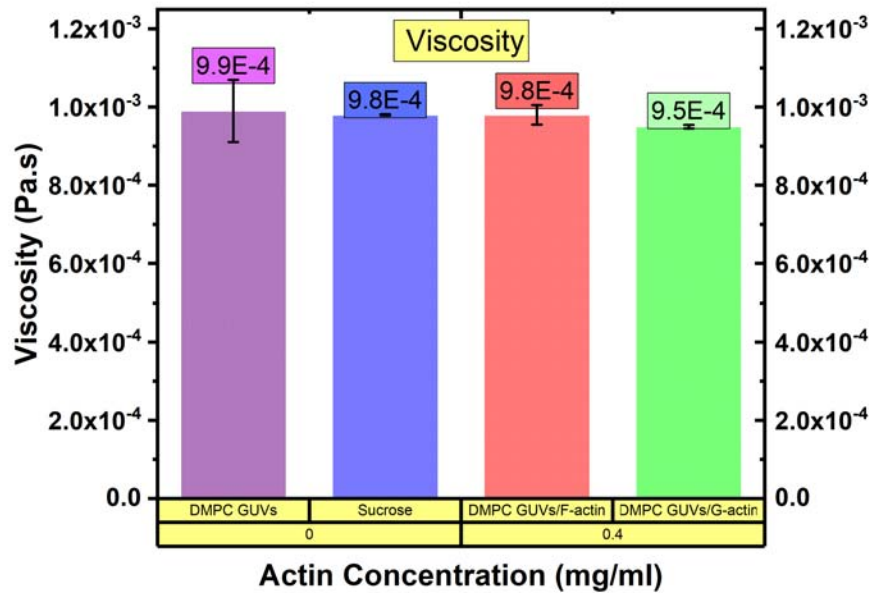
Se prepararon las vesículas por el método de electroformación descrito en la sección 6.2, con sacarosa a 0.2 M y actina a 0.4 mg/ml, así como vesículas puras de DMPC. En 1ml de solución de vesículas con actina encapsulada se añadieron 5 μ l de $MgCl_2$ para inducir la polimerización de la proteína. Se tomó 1ml de cada muestra. Posteriormente, se depositó cada muestra en el reómetro y se fijó la temperatura a 25°C. De igual manera que en los casos anteriores se tomó como referencia la viscosidad del agua a esta temperatura. En las gráficas 7.13 se muestra el análisis de esfuerzo cortante (shear stress) contra tasa de corte (shear rate) para cada una de estas muestras, donde el ajuste lineal arroja la pendiente que corresponde a la viscosidad.



Gráficas 7.13. Shear rate vs shear stress para vesículas de DMPC en sacarosa a 0.2 M para los tres diferentes casos. La pendiente que se obtiene al realizar un análisis lineal a la curva es la viscosidad de la solución. **a)** (Círculos azules) Vesículas puras de DMPC. (círculos verdes) Vesículas de DMPC con actina encapsulada sin polimerizar o G-actina. **b)** Vesículas de DMPC con actina encapsulada y polimerizada o F-actina.

En la gráfica 7.13(a) podemos observar que tanto las vesículas puras de DMPC (círculos azules) como las vesículas con G-actina encapsulada (círculos verdes) tienen comportamiento Newtoniano, con valores de viscosidad de $0.99 \text{ mPa}\cdot\text{s} \pm 7.09 \times 10^{-5} \text{ Pa}\cdot\text{s}$ y $0.95 \text{ mPa}\cdot\text{s} \pm 4.64 \times 10^{-6} \text{ Pa}\cdot\text{s}$, respectivamente. En el caso de vesículas con F-actina encapsulada (gráfica 7.13(b)), la muestra

requirió valores más altos de esfuerzo cortante para empezar con las mediciones, mientras que en los dos casos anteriores las mediciones empezaron en cero. Este comportamiento comúnmente se observa en el fluido o plástico de Bingham, el cual necesita de un esfuerzo cortante inicial para fluir. La viscosidad para estas vesículas fue de $0.98 \text{ mPa}\cdot\text{s} \pm 2.49 \times 10^{-5} \text{ Pa}\cdot\text{s}$. Estos valores de viscosidad se asemejan al valor de la viscosidad de sacarosa a 0.2 M (gráfica 7.14).



Gráfica 7.14. Viscosidad de las soluciones de sacarosa (azul), DMPC GUVs (morado), DMPC GUVs con G-actina (verde) y DMPC GUVs con F-actina (rojo). Después del esfuerzo cortante inicial aplicado a la solución de DMPC GUVs con F-actina, el valor de su viscosidad fue igual al de la solución de sacarosa.

Capítulo 8. Resultados adicionales

8.1 Efecto del ATP y la polimerización de actina en formaciones lipídicas

La actina se caracteriza por ser una proteína monomérica (G-actina) cuyos monómeros tienen sitios de unión que regulan la interacción con otros monómeros de actina, de tal modo que en presencia de ATP se polimeriza y forma filamentos (F-actina). Se considera que los monómeros de esta proteína tienen una estructura globular, sin embargo, se ha encontrado que cada uno de estos monómeros está compuesto por lóbulos separados por una hendidura donde se une la molécula de ATP y el catión divalente Mg^{+2} , para después hidrolizar el ATP en ADP (figura 8.1).

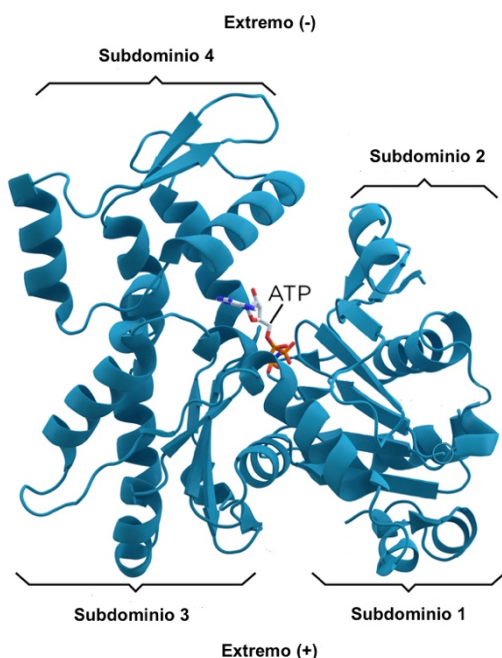


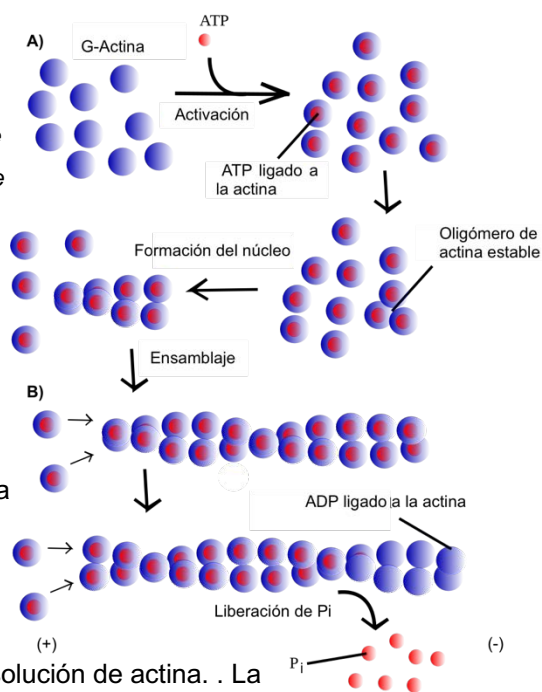
Figura 8.1. Estructura de un monómero de actina. Además de estar compuesta por dos lóbulos, su estructura también se divide en cuatro subdominios. El sitio de enlace de ATP y Mg^{+2} pertenece a los subdominios 1 y 3. Los extremos (-) y (+) corresponden a la orientación de la molécula durante la formación de los filamentos (Graceffa y Domínguez, 2003).

La polimerización de esta proteína es un proceso de tres etapas: nucleación, elongación y fase de equilibrio. Durante la fase de nucleación, tiene lugar el intercambio de cationes divalentes, en este caso Mg^{+2} en los sitios de unión con ATP del monómero, lo cual produce hidrólisis de ATP para formar ADP liberando un fosfato p_i . Esto da como resultado la formación de dímeros y trímeros que actúan como núcleos para la polimerización (figura 8.2(a)). Si bien aún no se conoce con exactitud dónde ocurre la hidrólisis de ATP, si ocurre cuando el ATP se une al catión divalente Mg^{+2} aún en el monómero [97, 98, 99, 100] o si ésta ocurre cuando ya se encuentra en el filamento [101], es claro que los cationes divalentes Mg^{+2} juegan un papel muy importante durante la primera fase de la polimerización [102]. En la segunda fase (elongación), comienza la adición reversible de monómeros de actina en ambos extremos del núcleo, esto dará lugar a la formación del filamento. Los filamentos poseen un extremo positivo y un extremo negativo, el positivo es donde se van añadiendo monómeros de actina con ATP, es decir, donde

prevalece el ATP; mientras que el negativo es donde ADP es liberado (figura 8.2(b)). En la fase final de equilibrio, los monómeros de actina se van uniendo y desprendiendo de los extremos del filamento sin variación de la longitud del filamento, es aquí donde se llega a la concentración crítica, la cual representa la concentración de monómeros de actina que se añaden y desprenden en los extremos del filamento sin afectar la longitud de éste.

Figura 8.2. Esquema de las fases de polimerización de actina.

A) Fase de nucleación en la que los monómeros de actina se unen a ATP para formar los núcleos. **B)** Proceso de ensamblaje del filamento en la fase de elongación. Los monómeros de actina se unen y desprenden en los extremos del filamento (Mikael Häggström, 2014).



La actina se une con mayor afinidad al ATP que al ADP, por lo que, a una concentración mayor de ATP, la G-actina se encontraría saturada de ATP [103]. Con base en esto y en que el catión divalente Mg^{+2} induce la polimerización de la proteína, se procedió a formar vesículas de DMPC con actina encapsulada esta vez añadiendo más ATP a la solución de actina. La reconstitución de los componentes del kit de actina (Cytoskeleton® Inc.) se muestra en la tabla 6.1.

En el caso de los experimentos de esta sección, se optó por aumentar 5 y 10 μ l el volumen de G-buffer en la proteína para preparar la G-actina, esto es, se prepararon dos soluciones de G-actina con 230 y 235 μ l de G-buffer que contiene ATP (volúmenes totales de 235 y 240 μ l). Posteriormente se procedió a preparar GUVs de DMPC con dichas soluciones siguiendo exactamente el mismo protocolo que en los experimentos de las secciones anteriores. A diferencia de los experimentos anteriores, las vesículas no se formaron con característica estructura esférica, si no que se obtuvieron formaciones lipídicas con pequeñas protuberancias o crenaciones que asemejaban más a una “estrella” que a una esfera. La figura 8.3(a) muestra vesículas de DMPC preparadas con la solución de G-actina con 225 μ l de G-buffer con ATP, es decir, la solución de control; mientras que la figura 8.3(b) muestra las vesículas preparadas con la solución de G-actina con 230 μ l de G-buffer con ATP. A ambas muestras se les agregaron 5 μ l de $MgCl_2$ (0.2 M) para polimerizar la proteína.

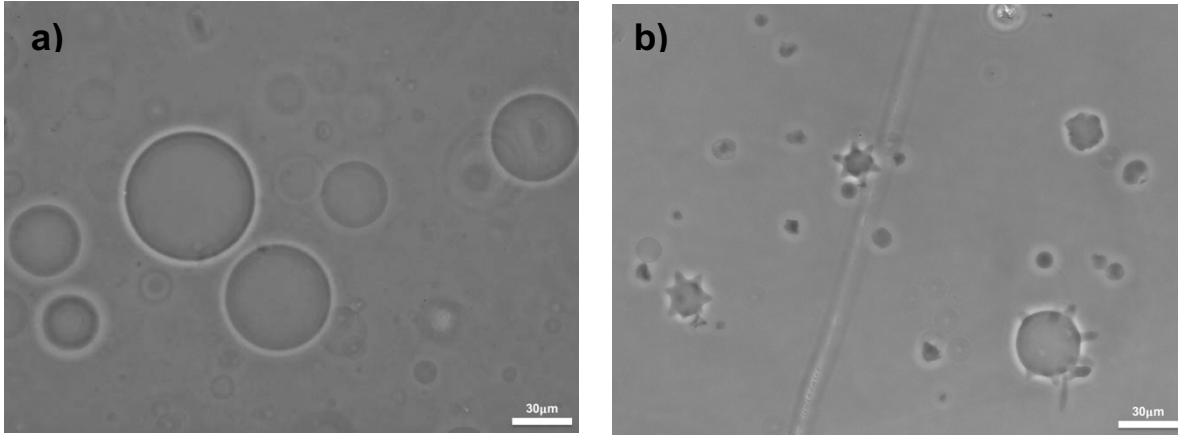


Figura 8.3. *a)* Vesículas de DMPC y actina encapsulada y polimerizada preparadas con la solución de control con 225 μl de G-buffer con ATP. Se observa la forma esférica característica de las vesículas. *b)* Vesículas de DMPC preparadas con la solución con 230 μl de G-buffer con ATP. Se presentan éstas formaciones con pequeñas protuberancias.

En el caso de la solución con 235 μl de G-buffer con ATP, también se presentaron estas estructuras, sólo que no se formaron tantas como en el caso anterior, esto podría deberse a que como el volumen de la solución de G-actina aumento, cambió la concentración molar de la solución interior a las vesículas (sacarosa a 0.2 M inicialmente), y al agregar glucosa en el exterior a 0.2 M las vesículas sufren un choque osmótico y revientan. La figura 8.4 muestra las vesículas preparadas con esta solución.

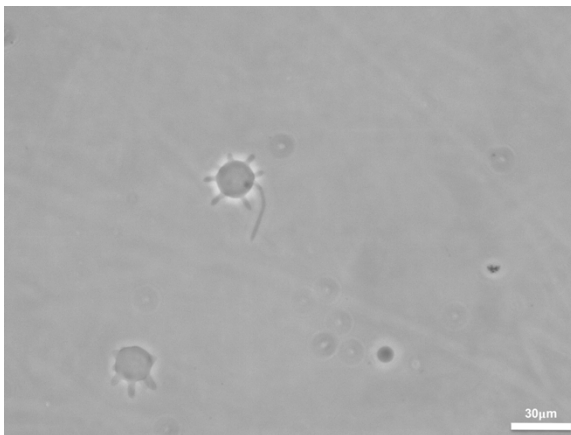


Figura 8.4. Vesículas de DMPC y actina encapsulada y polimerizada preparadas con la solución de G-actina con 235 μl de G-buffer con ATP. También se presentan las crenaciones.

Una hipótesis de por qué se forman estas estructuras es que, como se mencionó anteriormente, la G-actina se une con mayor afinidad al ATP y al añadir más de éste a la solución, los monómeros libres se saturan de ATP y con los cationes divalentes de Mg^{+2} , el cual inicia la polimerización y la acelera [102], se produce la hidrólisis de ATP, dando lugar a la formación de más filamentos de actina que al estar confinados dentro de las vesículas, se extienden sin romper la membrana de éstas, dando lugar a esas

protuberancias o crenaciones. En la figura 8.5 se muestran varias de estas formaciones más detalladamente.

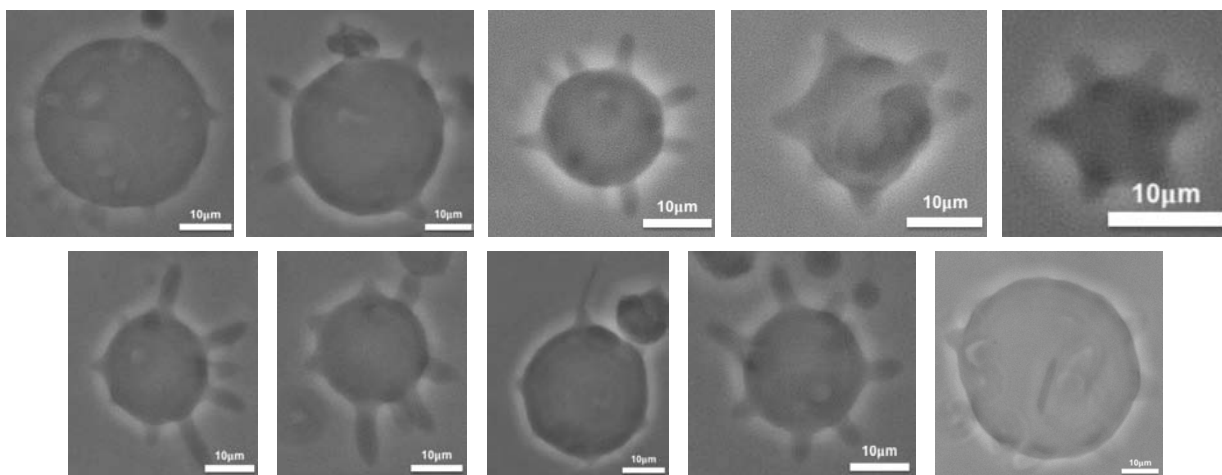


Figura 8.5. Vesículas de DMPC con actina encapsulada y polimerizada formadas con las soluciones de G-actina con mayor volumen de G-buffer.

En la literatura se ha reportado que el catión divalente Mg^{+2} además de iniciar la polimerización, acelera el proceso de hidrólisis, así como la formación de F-actina [102, 104, 105]. Para analizar si estas formaciones eran propiciadas por el $MgCl_2$ en la muestra, se prepararon nuevas muestras sin añadir $MgCl_2$, el resultado fue que aún sin Mg^{+2} estas estructuras seguían apareciendo, aunque en menor cantidad que cuando a la muestra se le añade $MgCl_2$, lo cual nos lleva nuevamente a la hipótesis de que el ATP se hidroliza y satura a los monómeros de actina haciendo que ésta forme filamentos. El hecho de que no contenga cationes divalentes Mg^{+2} sólo hace que el proceso de polimerización sea más lento. En la figura 8.6 se muestran las vesículas de DMPC con actina a las que no se les añadió $MgCl_2$.

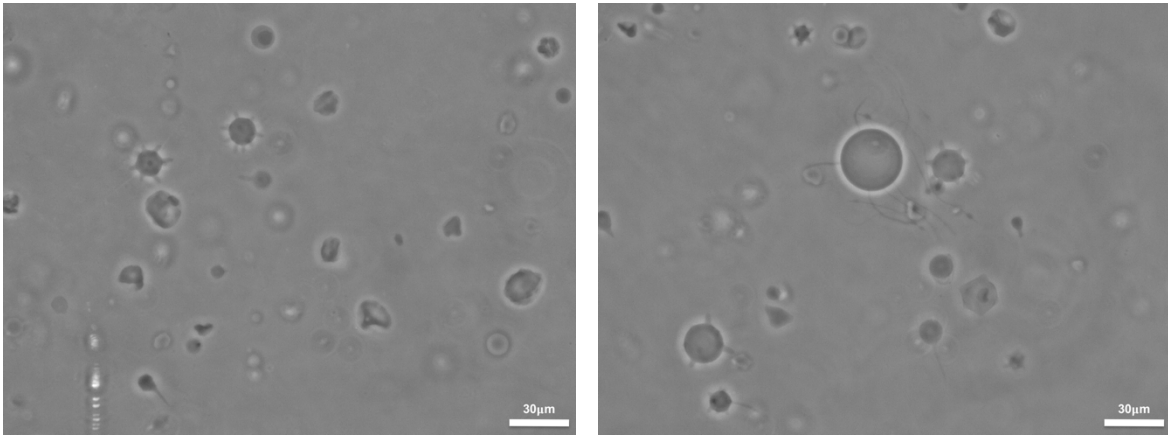


Figura 8.6. Vesículas de DMPC con actina encapsulada y polimerizada preparadas con la solución de G-actina con 230 μl de G-buffer con ATP. No se añadió MgCl_2 a la muestra. Sin MgCl_2 se observaron menos estructuras con extensiones y se presentaron más vesículas esféricas, en comparación con los casos anteriores, aun así, las estructuras con extensiones fueron dominantes.

Capítulo 9. Conclusiones

Se determinaron las durezas de doblado para GUVs (vesículas gigantes de una sola bicapa) puras formadas por el lípido de DMPC las cuales fueron del mismo orden de las reportadas en la literatura, esto es, 10^{19} - 10^{20} J.

Se establecieron los protocolos tanto de electroformación como electrodeformación de vesículas gigantes de una sola bicapa formadas por el lípido DMPC con G-actina y F-actina encapsulada en su interior, a tres diferentes concentraciones de esta última, las cuales fueron 0.05, 0.1 y 0.4 mg/ml. Para las GUVs con actina no polimerizada o G-actina encapsulada las durezas de doblado para las tres concentraciones analizadas fueron del mismo orden que las reportadas en la literatura, así como las reportadas aquí para GUVs puras de DMPC, esto es, nuevamente 10^{19} - 10^{20} J. Esto muestra que la G-actina dentro de las vesículas no afecta las propiedades mecánicas de las vesículas ni las vuelve más resistentes a deformaciones. En el caso de las vesículas con la proteína encapsulada y polimerizada (F-actina), para dos de las concentraciones estudiadas (0.1 y 0.4 mg/ml), las durezas de doblado fueron del orden de 10^{-18} J, un orden de magnitud mayor que las vesículas puras de DMPC y las vesículas de DMPC con G-actina encapsulada. Mientras que para la concentración de 0.05 mg/ml las durezas de doblado fueron del orden de 10^{-19} J. Lo cual es evidencia de que cuando la actina dentro de las GUVs tiene una concentración suficiente para que pueda llevarse a cabo la polimerización, se requerirá mayor energía para deformarlas, en pocas palabras, los filamentos de actina hacen más resistentes a las vesículas ante deformaciones. Tales filamentos se encuentran tanto cerca de la membrana como dispersos en su interior, y parecen alinearse con la membrana cuando se aplica el campo eléctrico AC, brindándole fuerza ante dicha deformación. Además, existe una relación entre la concentración de la proteína dentro de las GUVs y si ésta se encuentra polimerizada o no, ya que de las múltiples interacciones del ANOVA de dos vías se obtuvo que las interacciones significativas son entre los extremos importantes de las concentraciones y estado de dicha proteína, esto es, entre F-actina (0.4 mg/ml) – G-actina (0.05 mg/ml), y F-actina (0.4 mg/ml) – G-actina (0.4 mg/ml), lo cual indica que al aumentar la concentración y polimerizada, aumenta también la dureza de doblado de las GUVs, reforzando nuestro resultado de que los filamentos de actina hacen más fuertes a las membranas ante las deformaciones.

Finalmente, se obtuvo la viscosidad de GUVs puras de DMPC, GUVs de DMPC con G-actina encapsulada y GUVs de DMPC con F-actina encapsulada, mostrando un comportamiento Newtoniano. Los valores obtenidos están muy cerca del valor de la viscosidad del agua, lo cual puede deberse a las bajas concentraciones de actina en su interior, ya que se ha reportado en la literatura que la actina tiene propiedades viscoelásticas.

Referencias

- [1] Cooper, G. M. The cell: A molecular approach. Segunda edición. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000.
- [2] García-Rubio, R., de Oliveira, H. C., Rivera, J. y Trevijano-Contador, N. The fungal cell wall: *Candida Cryptococcus* and *Aspergillus* species. *Front. Microbiol.* 10:2993. 2020.
- [3] Lima, S. L., Colombo, A.L. y de Almeida Junior, J. N. Fungal cell wall: emerging antifungals and drug resistance. *Front. Microbiol.* 10:2573. 2019.
- [4] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J. *et al.* Molecular biology of the cell. 4th Edition. New York, Garland Science. 2002.
- [5] Houston, K., Tucker, M. R., Chowdhury, J., Shirley, N. y Little, A. The plant cell wall: a complex and dynamic structure as revealed by the responses of genes under stress conditions. *Front. Plant Sci.* 7:984. 2016.
- [6] Silhavy, T. J., Kahne, D. y Walker, S. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* Vol. 2, No. 5. 2010.
- [7] Dörr, T., Moynihan, P. J. y Mayer, C. Editorial: Bacterial cell wall structure and dynamics. *Front. Microbiol.* 10:2051. 2019.
- [8] Megías, M., Molist, P. y Pombal, M. A. Atlas de histología vegetal y animal: la célula. 7. Citoesqueleto. Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Facultad de Biología. Universidad de Vigo. 2015.
- [9] Gorter, E. y Grendel, F. On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. *J. Exp. Med.* Vol. 41, No. 4, 439-443. 1925.
- [10] Lodish *et al.* Molecular Cell Biology. 6th Edition. Freeman. 2008.
- [11] Janmey, P. A. y Kinnunen, P. K. J. Biophysical properties of lipids and dynamic membranes. *Trends in Cell.* Vol. 16, No. 10, 538-546. 2006.
- [12] Phillips, R.; Ursell, T.; Wiggins, P. y Sens, P. Emerging roles for lipids in shaping membrane-protein function. *Nature.* Vol. 429, 379-385. 2009.

- [13] Bartolák-Suki, E., Imsirovic, J., Nishibori, Y., Krishnan, R. y Suki, B. Regulation of mitochondrial structure and dynamics by the cytoskeleton and mechanical factors. *Int. J. Mol. Sci.* Vol. 1, No. 18. 2017.
- [14] Schell, C. y Huber, T. B. The evolving complexity of the podocyte cytoskeleton. *J. Am. Soc. Nephrol.* Vol. 28. 3166-3174. 2017.
- [15] Tang, D. D. y Gerlach, B. N. The roles and regulations of the actin cytoskeleton, intermediate filaments and microtubules in smooth muscle cell migration. *Respir. Res.* 18, 54. 2017.
- [16] Desai, A. y Mitchison, T. J. Microtubule polymerization dynamics. *Annual Review of Biochemistry.* Vol. 13. 83-117. 1997.
- [17] Nogales, E. Structural insights into microtubule function. *Annual Review of Biochemistry.* Vol. 69. 277-302. 2000.
- [18] Valiron, O., Caudron, N. y Job, D. Microtubule Dynamics. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* Vol. 58. 2069-2084. 2001.
- [19] Steinert, P. M., Jones, J. C. y Goldman, R. D. Intermediate filaments. *J. Cell Biol.* Vol. 99. 22s-27s. 1984.
- [20] Fuchs, E. y Weber, K. Intermediate filaments: structure, dynamics, function and disease. *Annual Review of Biochemistry.* Vol. 63. 345-382. 1994.
- [21] Fuchs, E. y Cleveland, D. W. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science.* Vol. 279, Iss. 5350. 514-519. 1997.
- [22] Fletcher, D. A. y Mullins, R. D. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature.* Vol. 463, No. 7280. 485-492. 2010.
- [23] Revenu, C., Athman, R., Robine, S. y Louvard, D. The co-workers of actin filaments: from cell structures to signals. *Nat. Mol. Cell Biol.* 5, 635-646. 2004.
- [24] Svitkina, T. The actin cytoskeleton and actin-based motility. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 10. 2018.
- [25] Akil, C., Kitaoku, Y., Tran, L. T., Lieb, D., Choe, H., Muengsoen, P., et al. Mythical origins of the actin cytoskeleton. *Current Opinion in Cell Biology.* 68, 55-63. 2021.
- [26] Pollard, T. D. y Cooper, J. A. Actin, a central player in cell shape and movement. *Science.* Vol. 326, No. 5957, 1208-1212. 2009.

- [27] Jen, C.; Jhiang, S. J. y Chen, H. L. Cellular responses to mechanical stress. Invited review: effects of flow on vascular endothelial intracellular calcium signalling of rat aortas ex vivo. *J. App. Physiol.* Vol. 89, No. 4, 1657-1662. 2000.
- [28] Wang, H.; Ip, W.; Boissy, R. y Grood, E. Cell orientation response to cyclically deformed substrates experimental validation of a cell model. *J. Biomech.* Vol. 28, No. 12, 1543-1552. 1995.
- [29] Zhao, M.; Song, B.; Tai, G. *et al.* Electrical signals control wound healing through phosphatidylinositol-3-OH kinase gamma and PTEN. *Nature.* Vol. 442, No. 7101, 457-460. 2006.
- [30] Huand, S. y Ingber, D. The structural and mechanical complexity of cell growth control. *Nat. cell Biol.* Vol. 1, No. 5, E131-E138. 1999.
- [31] Li, J., Nandagopal, S., Wu, D., Romanuik, S. F., Paul, K., Thomson, D. J. *et al.* Activated T lymphocytes migrate toward the cathode of DC electric fields in microfluidic devices. *Lab. Chip.* Vol. 11, 1298-304. 2011.
- [32] Iwasa, S. N., Babona-Pilipos, R. and Morshead, C. M. Environmental factors that influence stem cell migration: an electric field. *Stem Cells Internationals.* 2017:4276927. 2017.
- [33] Li, Y., Xu, T., Zou, H., Chen, X., Sun, D. and Yang, M. Cell migration microfluidics for electrotaxis-based heterogeneity study of lung cancer. *Biosens. Bioelectron.* Vol. 89, 837-845. 2017.
- [34] Ross, C. L. The use of electric, magnetic, and electromagnetic field for directed cell migration and adhesion in regenerative medicine. *Biotechnol. Prog.* Vol. 33, 5-16. 2017.
- [35] Cho, Y., Son, M., Jeong, H. and Shin, J. H. Electric field-induced migration and intracellular stress alignment in a collective epithelial monolayer. *Mol. Biol. Cell.* Vol. 29, 2292-2302. 2018.
- [36] Thrivikraman, G., Boda, S. K. and Basu, B. Unraveling the mechanistic effects of electric field stimulation towards directing stem cell fate and function: a tissue engineering perspective. *Biomaterials.* Vol. 150, 60-86. 2018.
- [37] Markx, G. H. and Davey, C. L. The dielectric properties of biological cells at radiofrequencies: applications in biotechnology. *Enzyme Microb. Technol.* Vol. 25, 161-171. 1999.

- [38] Radu, M., Ionescu, M., Irimescu, N., Illiescu, K., Pologea-Moraru, R. and Kovacs, E. Orientation behaviour of retinal photoreceptors in alternating electric fields. *Biophys. J.* Vol. 89, 3548-3554. 2005.
- [39] Pavesi, A., Adriani, G., Tay, A., Warkiani, M. E., Yeap, W. H., Wong, S. C., et al. Engineering a 3D microfluidic culture platform for tumour-treating field application. *Sci. Rep.* 6:26584. 2016.
- [40] Long, Y., Wei, H., Li, J., Yao, G., Yu, B., Ni, D., et al. Effective wound healing enable by discrete alternative electric fields from wearable nanogenerators. *ACS Nano.* Vol. 12, 12533-12540. 2018.
- [41] Tai, G., Tai, M. and Zhao, M. Electrically stimulated cell migration and its contribution to wound healing. *Burns & Trauma.* Vol. 6, 20. 2018.
- [42] Goshal, K., Chakraborty, S., Das, C., Chattopadhyay, S., Chowdhury, S., Battacharyya, M. Dielectric properties of plasma membrane: a signature for dyslipidaemia in diabetes mellitus. *Arch. Biochem. Biophys.* Vol. 635, 27-36. 2017.
- [43] Zimmermann U., G. Pilwat, F. Beckers, and F. Riemann. Effects of External Electric Fields on Cell Membranes. *Bioelectrochem. Bioenerg.* Vol. 3, 58-83. 1976.
- [44] Zimmermann, U. Electrical breakdown, electroporation and electrofusion. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* Vol. 105, 175–256. 1986.
- [45] Bai, H., Colin D., McCaig, J., Forrester V., and Zhao M. DC Electric Fields Induce Distinct Proangiogenic Responses in Microvascular and Macrovascular Cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* Vol. 24, No.7, 1234-1239. 2004.
- [46] Chao, P. H., Lu, H. H., Hung, C. T., Nicoll, S. B. and Bulinsky, J. C. Effects of applied electric field on ligament fibroblast migration and wound healing. *Connect. Tissue Res.* Vol. 48, 188-197. 2007.
- [47] Kinoshita, K. Jr. and Tsong, T. Y. Formation and resealing of pores of controlled sizes in human erythrocyte membrane. *Nature.* Vol. 268, 438-441. 1977.
- [48] Teissié, J., Escoffre, J. M., Rolls, M. P. and Golzio, M. Time dependence of electric field effects on cell membranes. A review for a critical selection of pulse duration for therapeutical applications. *Radiol. Oncol.* Vol. 42, 196-206. 2008.
- [49] Teissié, J. Electroporation of the cell membrane. *Methods Mol. Biol.* Vol. 1121, 25-46. 2014.

- [50] Bonakdar, M., Graybill, P.M., and Davalos, R.V. A microfluidic model of the blood-brain barrier to study permeabilization by pulses electric fields. *RSC Advances*. Vol. 7, No. 68, 42811-42818. 2017.
- [51] Hanna, H., Denzi, A., Liberti, M., André, F. M. and Mir, I. M. Electroporation of inner and outer cell membranes with microsecond pulsed electric field: quantitative study with calcium ions. *Sci. Rep.* 7:13079. 2017.
- [52] Pakhomov, A. G., Semenov, L., Casciola, M. and Xiao, S. Neuronal excitation and permeabilization by 200-ns pulsed electric field: an optical membrane potential study with fluovolt dye. *Biochim. Biophys. Acta*. Vol.1859, 1273-1281. 2017.
- [53] Dermol-Černea, J., Vidmarb, J., Ščančarb, J., Uršičc, K., Seršac, G., and Miklavčič, D. Connecting the in vitro and in vivo experiments in electrochemotherapy -a feasibility study modelling cisplatin transport in mouse melanoma using the dual-porosity model. *Journal of Controlled Release*. 289, 33-45. 2018.
- [54] Needham, D. y Evans, E. Structure and mechanical properties of giant lipid (DMPC) vesicle bilayers from 20°C below to 10°C above the liquid-crystal-crystalline phase transition at 24°C. *Biochemistry*. Vol. 27, No. 21, 8261-8269. 1988.
- [55] Duwe, H. P.; Kaes, J. y Sackmann, E. Bending elastic moduli of lipid bilayers: modulation by solutes. *J. Phys. France*. Vol. 51, No. 10, 945-961. 1990.
- [56] Sackmann, E. Membrane bending energy concept of vesicle- and cell-shapes and shape-transitions. *FEBS Letters*. Vol. 346, No. 1, 3-16. 1994.
- [57] Mell, M., Moleiro, L. H., Hertle, Y., Fouquet, P. *et al.* Bending stiffness of biological membranes: what can be measured by neutron spin echo? *Eur. Phys. J. E*. Vol. 36, No.7, 75. 2013.
- [58] Sreij, R., Dargel, C., Geisler, P. *et al.* DMPC vesicle structure and dynamics in the presence of low amounts of the saponin aescin. *Phys. Chem. Chem. Phys.* Vol. 20, Iss. 14, 9070-9083. 2018.
- [59] Drabik, D., Chodaczek, G., Kraszewski, S. y Langner, M. Mechanical properties determination of DMPC, DPPC, DSPC and HSPC solid-ordered bilayers. *Langmuir*. Vol. 36, No. 14, 3826-3835. 2020.
- [60] Helfrich, W. Deformation of lipid bilayer spheres by electric fields. *Z. Naturforsch. C. Biosci.* Vol. 29, 182-183. 1974.

- [61] Winterhalter, M. and Helfrich, W. Deformation of spherical vesicles by electric fields. *J. Colloid Interface Sci.* Vol. 122, 583-586. 1988.
- [62] Kummrow, M. and Helfrich, W. Deformation of giant lipid vesicles by electric fields. *Phys. Rev. A.* Vol. 44, 8356-8360. 1991.
- [63] Hyuga, H., Kinoshita, K. Jr. And Wakabayashi, N. Steady-state deformations of a vesicle in alternating electric fields. *Bioelectrochem. Bioenerg.* Vol. 32, 15-25. 1993.
- [64] Dimova, R., Riske, K. A., Aranda S., Bezlyepkina, N., Knoee, R. L. and Lipowsky, R. Giant vesicles in electric fields. *Soft Matter.* Vol. 3, 817-827. 2007.
- [65] Dimova, R., Bezlyepkina, N., Jordö, M. D., Knorr, R. L., Riske, K. A., Staykova, M., et al. Vesicles in electric fields: some novel aspects of membrane behavior. *Soft Matter.* Vol. 5, 3201-3212. 2009.
- [66] Yamamoto, T., Aranda-Espinoza, S., Dimova, R. and Lipowsky, R. Stability of spherical vesicles in electric fields. *Langmuir.* Vol. 26, No. 14, 12390-12407. 2010.
- [67] Dimova, R. and Riske, K. A. Electrodeformation, electroporation, and electrofusion of giant unilamellar vesicles. In: *Handbook of Electroporation.* Springer. 235-252. 2017.
- [68] Perrier, D. L., Rems, L. and Boukany, E. B. Lipid vesicles in pulsed electric fields: fundamental principles of the membrane response and its biomedical applications. *Adv. Colloid Interface Sci.* Vol. 249, 248-271. 2017.
- [69] Karal, M. A. S., Ahamed, Md. K., Rahman, M., Ahmed, M., Shakil, M. and Siddique-e-Rabbani, K. Effects of electrically-induced constant tension on giant unilamellar vesicle using irreversible electroporation. *Eur. Biophys. J.* Vol. 48, 731-741. 2019.
- [70] Aranda Espinoza, Said Eduardo. Deformation of model membranes subjected to electric fields. Tesis de Doctorado. Universidad de Potsdam. 2008.
- [71] Evans, E. and Rawicz, W. Entropy driven tension and bending elasticity in condensed-fluid membranes. *Phys. Rev. Lett.* Vol. 64, 2094-2097. 1990.
- [72] Bangham, B. D., Standish, M. M. y Watkins, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology.* Vol. 13, Iss. 1, 238-252. 1965.
- [73] Torres, D. y Seijo, B. Nanosistemas lipídicos. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela. p. 133, 135.

- [74] Angelova, M. I. and Dimitrov, D. S. Liposome electroformation. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* Vol. 81, 303-311. 1986.
- [75] Reed, P. W. and Lardy, H. A. A23187: A divalent cation ionophore. *J. Biol. Chem.* Vol. 247, 6870-6977. 1972.
- [76] Case, G. D., Vanderkooi, J. M. and Scarpa, A. Physical properties of biological membranes determined by the fluorescence of the calcium ionophore A23187. *Arch. Biochem. Biophys.* Vol.162, 174-184. 1974.
- [77] Reed, P. W. Effects of the divalent cation ionophore A23187 on potassium permeability of rat erythrocytes. *J. Biol. Chem.* Vol. 245, 3489-3494. 1976.
- [78] Flatman, P. W. and Lew, V. L. Magnesium buffering in intact human red blood cells measured using the ionophore A23187. *J. Physiol.* Vol. 305, 13-30. 1980.
- [79] Moronne, M. M. and Cohen, J. A. Electrical measurement of electroneutral fluxes of divalent cations through charged planar phospholipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* Vol. 688, No.3, 793-797. 1982.
- [80] Alatossava, T., Jüte, H., Kuhn, A. and Kellenberger, E. Manipulation of intracellular magnesium in polymyxin B nanopptide-sensitized *Escherichia coli* by ionophore A 23187. *J. Bacteriol.* Vol. 162, 413-419. 1985.
- [81] Antonenko, Y. N. and Yaguzhinsky, L. V. The ion selectivity to nonelectrogenic ionophores measured on a bilayer lipid membrane: nigericin, monensin, A23187 and lasalocid A. Vol 938, No. 2, 125-130. 1988.
- [82] De, B. K. and Friedberg, I. Effect of ionophore A23187 on the membrane permeability in mouse fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol. 178, 830-841. 1991.
- [83] Erdahl, W. L., Chapman, C. J., Taylor, L., W. and Pfeiffer, D. R. Ca²⁺ transport properties of ionophores A23187, ionomycin, and 4-BrA23187 in a well defined model system. *Biophys. J.* Vol. 66, No. 5, 1678-1693. 1994.
- [84] Graber, Z. T., Gericke, A. and Kooijman, E. E. Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate ionization in the presence of cholesterol, calcium or magnesium ions. *Chem. Phys. Lipids.* Vol. 182, 62-72. 2014.
- [85] Lomora, M., Itef, F., Dinu, I. A. and Palivan, C. G. Selective ion-permeable membrane by insertion of biopores into polymersomes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* Vol. 17, 15538-15546. 2015.

- [86] Wade, L. G., Química orgánica. 5ª Edición. Prentice Hall. 2003.
- [87] Milano, G., Kawakatsu, T. y De Nicola, A. A hybrid particle-field molecular dynamics approach: a route toward efficient coarse-grained models for biomembranes. *Phys. Biol.* Vol. 10, No. 4, 45007. 2013.
- [88] Lu, L., Doak, W. J., Schertzer, J. W. y Chiarot, P. R. Membrane mechanical properties of synthetic asymmetric phospholipid vesicles. *Soft Matter.* Vol. 12, Iss. 36, 7521-7528, 2016.
- [89] Martinez-Seara, H. *et al.* Effects of double bond position on lipid bilayers properties: insight through atomistic simulations. *J. Phys. Chem. B.* Vol. 111, Iss. 38, 11162-11168. 2007.
- [90] Seelig, A. y Seelig, J. Effects of a single cis double bond on the structure of a phospholipid bilayer. *Biochemistry.* Vol. 16, No. 1, 45-50. 1977.
- [91] Davis, J. H. The description of membrane lipid conformation, order and dynamics by ²H-NMR. *Biochim. Biophys. Acta.* Vol. 737, No.1, 117-171. 1983.
- [92] Kaneko, F., Yano, J. y Sato, K. Diversity in the fatty-acid conformation and chain packing of cis-unsaturated lipids. *Curr. Opin. Struct. Biol.* Vol. 8, Iss. 4, 417-425. 1998.
- [93] Schmid-Schönbein, H., Wells, R. y Goldstone, J. Influence of deformability of human red blood cells upon blood viscosity. *Cir. Res.* Vol. 25, Iss. 2. 131-143. 1969.
- [94] Keith, A. D. y Snipes, W. Viscosity of cellular protoplasm. *Science.* Vol. 183, Iss. 4125. 666-668. 1974.
- [95] Kuimova, M. K., Yahioğlu, G., Levitt, J. A. y Suhling, K. Molecular rotors measures viscosity of live cells via fluorescence lifetime imaging. *J. Am. Chem. Soc.* Vol. 130, No. 21. 6672-6673. 2008.
- [96] Kuimova, M. K. Mapping viscosity in cells using molecular rotors. *Phys. Chem. Chem. Phys.* Vol. 14. 12671-12686. 2012.
- [97] Korn, E. D. actin polymerization and its regulations by proteins from nonmuscle cells. *Physiol. Rev.* Vol. 62, No. 2, 672-737, 1982.
- [98] Pollar, T. D. y Weeds, A. G. The rate constant for ATP hydrolysis by polymerized actin. *FEBS Lett.* Vol. 170, No. 1, 94-98. 1984.
- [99] Brenner, S. L. y Korn, E. D. On the mechanism of actin monomer-polymer subunit exchange at steady state. *J. Biol. Chem.* Vol. 258, No.8, 5013-5020. 1982.

- [100] Wegner, A. Head to tail polymerization of actin. *J. Mol. Biol.* Vol. 108, Iss. 1, 139-150. 1976.
- [101] Pardee, J. D. y Spudich, J. A. Mechanism of K⁺-induced actin assembly. *J. Cell Biol.* Vol. 93, No. 3, 648-654. 1982.
- [102] Blanchoin, L. y Pollard, T. D. Hydrolysis of ATP by polymerized actin depends on the bound divalent cation but not profilin. *Biochem.* Vol. 41, No. 2, 597-602. 2009.
- [103] Pollard, T. *et al.* Cell Biology. 3rd Edition. Elsevier. 2017.
- [104] Cooper, J. A., Buhle, E. L. Jr., Walker, S. B., Tsong, T. Y. y Pollard, T. D. Kinetic evidence for a monomer activation step in actin polymerization. *Biochemistry.* Vol. 22, No. 9, 2193-2202. 1983.
- [105] Scipion, C. P. M. *et al.* Structural evidence for the role of divalent cations in actin polymerization and activation of ATP hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* Vol. 115, No. 41, 10345-10350. 2018.