

La Química de los Pioneros

La dinámica estructural de biomembranas. Medio siglo en la interfaz (¿o interfase?)...

Por Bruno Maggio

bmaggio@fcq.unc.edu.ar

Doctor en Bioquímica, Profesor Emérito, Investigador Superior del CONICET y Director del CIQUIBIC.

Resumen:

Las membranas celulares contienen una gran diversidad de lípidos y proteínas. Estas estructuras presentan un polimorfismo dinámico constituyendo uno de los estados más complejos de la materia lo cual determina reacciones bioquímicas y, por consiguiente, todas las funciones celulares. Cuando se combinan la estructura e interacciones de las moléculas de lípidos y proteínas auto-organizadas es inevitable la emergencia de tensiones viscoelásticas, de curvatura y diversas restricciones termodinámicas y estructurales que ello impone al sistema. A su vez, las tensiones desarrolladas en escala supramolecular condicionan y regulan las interacciones, reacciones enzimáticas, y la posibilidad de recombinación de membranas

Abstract:

Cell membranes contain a large diversity of lipids and proteins. They show a dynamic polymorphism and can be considered as one of the more complex states of matter that underlay biochemical reactions thus being the basis of all cellular functions. At the local level, the chemical structure and interactions among components influence the molecular shape and determine the overall structure, surface topography, enzymatic reactions and the possibility for membrane recombination (membrane fusion and fission). When these effects are taken into account the emergence of self-organized structures bearing viscoelastic and curvature tensions, with the

(fusión, fisión) en una compleja sinergia multivariable y multidireccional. Para describir y entender las estructuras y la dinámica de membranas biológicas se requieren elementos de topología y termodinámica de interfaces combinados, construidos sobre la base de resultados aportados por la biofísica molecular de lípidos y proteínas en meso-estructuras polimórficas. Aún mezclas relativamente simples de glicerofosfolípidos, esfingolípidos y esteroides con proteínas integrales y anfitrópicas tienen capacidad de transmitir y transducir información molecular y topológica que influyen el comportamiento de biomembranas.

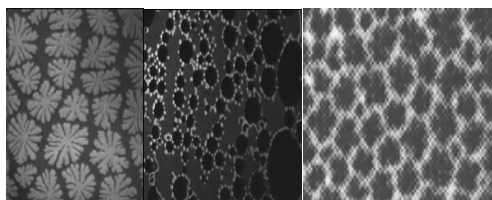
consequent thermodynamic and structural transductions, becomes inevitable. Conversely, the tensions developed at the supramolecular scale determine and condition the local molecular interactions in a complex multivariable synergy. In order to describe and understand the structural dynamics of biomembranes it is necessary to rely on elements of topology and surface thermodynamics derived from studies on the molecular biophysics of lipids and proteins in mesomorphic systems. Even simple systems of glycerol- and sphingo-lipids, sterols and amphitropic proteins are capable of transducing molecular and topological information at the membrane level.

Palabras clave

Biomembranas, interfaces lipídicas, esfingolípidos, monocapas, bicapas.

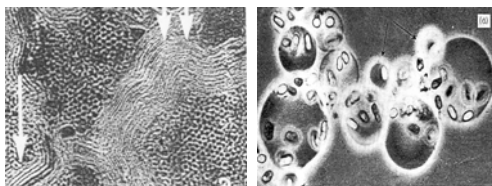
Resumen gráfico

Topografía de dominios segregados de diferente composición y estado de fase



Formación de redes organizadas de dominios segregados

Topología y coexistencia de estructuras de bicapa lamelar, H-II y cúbica bicontinua



Recombinación (fusión y fisión) de biomembranas

Introducción

El título de este ensayo ya comienza con una potencial controversia. Siempre han existido confusiones sobre como denominar esas fronteras que ponen en contacto dos o más regiones diferentes y cuyas propiedades físico-químicas adquieren características particulares y diferentes a aquellas de las regiones que contactan. El origen de tales confusiones quizás pueda atribuirse a cierta dependencia cultural, porque en lengua inglesa se las denomina usualmente "interfaces" (fonéticamente 'interfaeiss'es'), aunque a veces esas regiones son referidas también como "interphases" (fonéticamente 'interfaeizz'es'). Desde la lingüística, el español "interfaz" ó "interfaces" (análogo a la inglesa "interface(s)") significa literalmente "entre-cara(s)" o "entre-superficie(s)" mientras que "interfase(s)" (análogo a la inglesa "interphase(s)") significa literalmente una zona "entre-fases" o regiones de cierto volumen que tienen propiedades físicas diferentes. Después de discutir con colegas tan confundidos como yo, y dejando de lado ejercicios intelectuales que hasta podrían darnos una apariencia erudita, he concluido que en nuestra área ambas denominaciones se refieren esencialmente a la misma región. De cualquier manera que guste denominarlas, hace más de 45 años que trabajo en esa ambigua región, soportando variadas tensiones asimétricas frecuentemente intensas, tratando de comprender en términos moleculares a esos espacios supramoleculares prácticamente bidimensionales, formado por biomoléculas anfipáticas que reciben

el nombre de biomembranas. En esas elusivas y delgadas regiones, a las cuales corresponden todas las membranas celulares, las tensiones termodinámicas y visco-elásticas pueden relajarse sólo parcialmente a la tercera dimensión. En ellas, sinérgicamente se combinan, transforman, transducen y amplifican propiedades moleculares locales a supramoleculares y topológicas determinando la miscibilidad de sus componentes, su estado de fase, efectos electrostáticos y tensiones estructurales.

Relataré algunas contribuciones de manera aproximadamente cronológica, porque ello resalta su originalidad en relación al período en que se realizaron. Además, esta forma de presentación me permite una personal y somera historia del área de Biofísica Molecular de nuestra Facultad. En este punto, quisiera recordar que cuando yo ingresé en 1963, la Facultad de Ciencias Químicas era sólo un Instituto. Yo habría querido estudiar física en el Instituto Balseiro - Bariloche pero, por razones económicas, no me pude ausentar de Córdoba y terminé obteniendo el título de Bioquímico, sabiendo desde el comienzo que, aunque me gustaba la química, nunca me dedicaría a esa profesión. Además, el área de la bioquímica me fue pareciendo algo ambigua (como lo son todas las interfaces!...) y con el tiempo se me reveló cada vez más como frecuentemente simulando ser más química que biológica pero, en el fondo, sin atreverse a dejar de ser más biológica que química, probablemente incapaz de desprenderse de su

dominante origen biomédico. Gradualmente, me fui orientando hacia la Biofísica Molecular de Biomembranas.

¡AAhh...las membranas..! Pero, debo confesar que éstas tampoco constituyeron mi interés inicial (¡siempre incierto... como las interfaces!). En el segundo año de mi carrera, comencé a formarme científicamente en el Departamento de Físico-química como ayudante alumno pero luego, me sentí atraído por moléculas más complejas que las que participan en la cinética de reacciones en fase gaseosa o la electroquímica (por aquel entonces, los únicos temas de investigación con nivel internacional en ese Departamento) y en el último año de mi carrera me transferí al Departamento de Química Biológica. Allí, sí que encontré, desde moléculas y estructuras bien complejas, con muchas superficies y de cuya organización se conocía muy poco (estoy hablando de la década de 1960), hasta la estructura del DNA (que se había conocido sólo recientemente), la "biología molecular", la "ingeniería genética" o los incómodos, aunque redituables, "transgénicos" (ni se hablaba de ellos, pues en esa época los duraznos, tomates y naranjas todavía tenían gusanos y un muy buen gusto perfumado), luego todo cambió... Realicé mi tesis doctoral como becario del CONICET bajo la dirección del inolvidable Dr. Federico A. Cumar, pionero del comienzo de nuestra Facultad y de la Química Biológica (aquella de enfoque más químico que biológico, que aún era la mayor orientación de ese Departamento) sobre la química y metabolismo de glicoesfingolípidos. En mi trabajo de tesis logré, desde 1969, implementar por primera vez en Argentina (y en Sudamérica) el modelo de Encefalomielitis Alérgica (ó Autoinmune) Experimental (EAE) en ratas y cobayos (originado en USA alrededor de 1960 como modelo de enfermedades demielinizantes humanas como la Esclerosis Múltiple) para estudiar la bioquímica de lípidos de la membrana de mielina del sistema nervioso central.

Mi actividad referida a biomembranas comienza entre los años 1968-1972, cuando las molestas inconsistencias que revelaban los resultados de mi trabajo de tesis estaban ya sugiriendo la extraordinaria dinámica estructural de

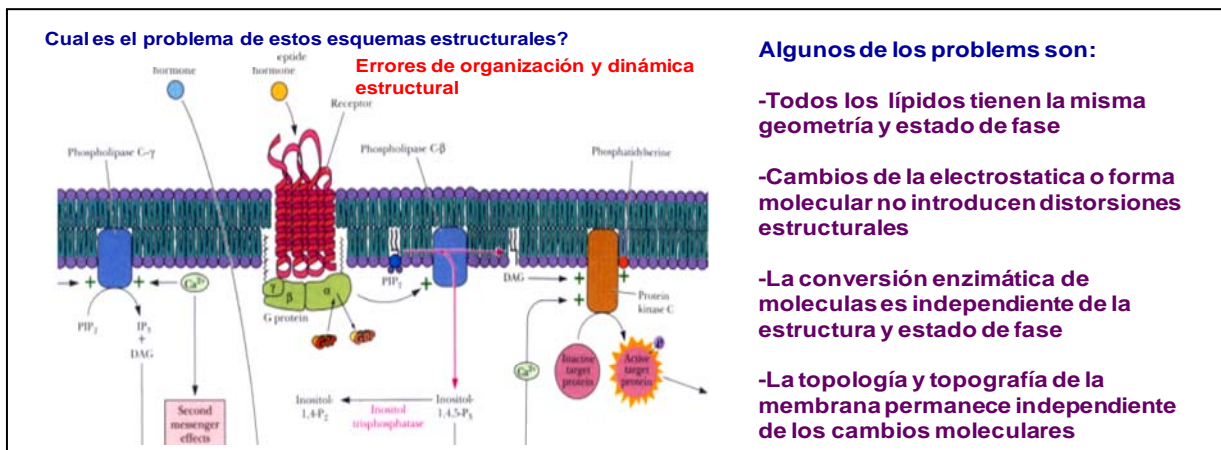
las biomembranas. Inicialmente, mis resultados fueron considerados erróneos por algunos de mis co-autores (¿cómo podrían los primeros resultados de un incipiente tesisista contradecir el dogma que el "marketing" del modelo de Davson-Danielli había impuesto por más de tres décadas?) y se tardaron tres años en aceptar que fueran publicados, siendo luego largamente confirmados en otros laboratorios. En resumen, los mismos indicaban que el contenido de lípidos típicamente mielínicos como cerebrósidos y sulfátidos se alteraba en el sistema nervioso central de animales con EAE, independientemente, de los síntomas neurológicos, pero otros lípidos también abundantes en la mielina (por ej. colesterol y glicero- o esfingo-fosfolípidos) no presentaban variaciones. En el contexto imperante del rígido modelo de membrana de Danielli, la pérdida o degradación de una membrana debiera reflejarse en la alteración de componentes de manera proporcional a su contenido. Otro de mis "extraños" resultados consistió en que la actividad de enzimas responsables de la biosíntesis y la degradación de los lípidos alterados, medidas en ensayos bioquímicos clásicos frente a sustratos exógenos, no revelaba variaciones, y sin embargo, esos lípidos estaban alterados. Esos resultados (comunicados a congresos desde 1968) también contradecían dogmas bioquímicos existentes demorándose su publicación hasta 1971-1975. En el año 1972, Singer y Nicolson presentaron el modelo de "mosaico fluido" para biomembranas, el cual (aunque ahora lo sabemos erróneo en la mayoría de sus características) permitió concebir a las membranas sobre mejores bases físico-químicas y con una organización estructural más dinámica.

En la interpretación de mis resultados estaba ya el germen de ideas que continúan siendo exploradas internacionalmente. Algunas de las más importantes se refieren a que los resultados obtenidos entre 1968 y 1972 permitieron concebir a las biomembranas como estructuras dinámicas que deben necesariamente contener dominios lipídicos de diferente composición, segregados entre sí, pasibles de degradaciones lipolíticas selectivas e independientes en el plano lateral de la membrana dependiendo de variaciones sutiles de la

organización molecular. El estudio biofísico de esos efectos ocuparía el resto de mi actividad científica, abandonando la temática de EAE.

Debe enfatizarse que, prácticamente, todo el conocimiento que tenemos sobre la estructura y dinámica de biomembranas, sobre bases bien definidas y controladas al nivel molecular requerido, **NO se obtuvo primeramente con membranas de sistemas celulares** (incluyendo la idea misma de "bicapa lipídica" originada en 1935, a partir de experimentos en interfaces agua-aire de Gorter y Grendel) sino, mediante sistemas simplificados de biomembranas reconstituidos con lípidos y proteínas de manera que permiten un control riguroso a nivel molecular, lo cual, no es posible con

sistemas celulares (con cierto peyorativo dogmatismo vitalista, el fundamentalismo biológico determinista denomina usualmente a estos sistemas como "artificiales", como si en el universo hubiera sistemas que no sean "naturales"). También, debe tenerse muy en cuenta de que la mayoría de los modelos de membrana que figuran en populares libros de texto de Bioquímica y Biología Celular, son profundamente erróneos a nivel molecular por no tomar en cuenta varios aspectos, algunos de los cuales se puntualizan someramente en el siguiente esquema:



Las dimensiones supramoleculares de estos sistemas abarcan una escala espacial desde decenas de nanómetros hasta micrómetros. Es en ese rango "mesoscópico" (¿aparecerá la "meso-ciencia"?) donde las propiedades moleculares locales se traducen, amplifican, amortiguan o son abolidas cuando las moléculas forman parte de un ensamble multimolecular. El rango *micrométrico* incluye estructuras y transiciones de forma que pueden visualizarse mediante microscopías convencionales. En el rango *mesoscópico superior*, que abarca decenas a centenas de nanómetros, se vuelven importantes numerosos factores sinérgicos de la dinámica estructural, cuya exploración requiere técnicas con mayor resolución espacial y temporal. Para estudiar el rango *mesoscópico inferior*, de nanómetros a decenas de nanómetros, se requieren

técnicas, equipos y modelizaciones especializadas, debido a que ese nivel es influido directamente por las propiedades moleculares, las que son altamente dinámicas y experimentan rápidas fluctuaciones.

Para el estudio de los diferentes niveles en el área de Biofísica Molecular empleamos diversas metodologías, algunas de las cuales implementadas o desarrolladas por primera vez en Sudamérica, en nuestro laboratorio. Para el rango *mesoscópico inferior*, hemos utilizado calorimetría diferencial de barrido (DSC) o de titulación (ITC) de alta sensibilidad, termodinámica estadística de transiciones de fase bi- y tri-dimensionales, medidas de empaquetamiento y áreas moleculares seccionales promedio en interfaces, densidad molecular de superficie, energía libre de superficie, visco-elasticidad bidimensional, diferencia de potencial dipolar, cinética enzimática bidimensional

en tiempo real, aplicación de campos electrostáticos internos y externos a superficies autoorganizadas, microscopía electrónica (ME) y de fuerza atómica (AFM), espectroscopía de fluorescencia en estado estacionario y resuelta en el tiempo, espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) y de reflexión atenuada (ATR), espectroscopía infrarroja de absorbancia y reflexión con polarización modulada (PM-IRRAS), dispersión dinámica de radiación (DLS), espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR) y paramagnética de spin (EPR), difracción de rayos X a pequeño ángulo (SAXS) y ángulo amplio (WAXS). Para el rango *mesoscópico superior*, hemos desarrollado técnicas para reconstituir sistemas biomiméticos lípido-proteína autoensamblados en condiciones de organización vectorial conocida y controlada. Entre otras situaciones, utilizamos visualización directa en tiempo real de la forma y dinámica de dominios segregados en estados de fase coexistentes y con diferente composición lípido-proteína, mediante microscopía de fluorescencia (FM), microscopía de ángulo de Brewster (BAM), elipsometría de superficie, inmunomarcación específica y marcación con sondas fluorescentes, fusión de biomembranas y células inducida químicamente, encapsulamiento/liberación de compuestos bioactivos en micelas y vesículas lípido-proteína uni- y multi-lamelares.

La Biofísica en Córdoba fue iniciada entre 1969 y 1972 por el Dr. Luís Beaugé, desde el Instituto de Investigaciones Médicas Mercedes y Martín Ferreyra, y fue su primer profesor en el Departamento de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Químicas. Nuevas circunstancias docentes en este Departamento requirieron que en el año 1973 se me encargara el área de Biofísica Molecular. Redefiné su enfoque hacia la dinámica estructural de biomembranas, temática en la que implementé el sistema de vesículas multilamelares y unilamelares o liposomas (técnica que introduje por primera vez en Argentina entre 1969 y 1972) utilizando lípidos y proteínas de mielina. Para profundizar estudios a nivel molecular de la organización supramolecular de esos sistemas no existía equipamiento en el país. Debido a ello, a fines del año 1973 obtuve una beca del Consejo

Británico en el Department of Biochemistry & Chemistry, Royal Free Hospital School of Medicine, University of London, U.K., con el Prof. Jack A. Lucy, y con el Dr. Alec. Bangham en el Institute of Animal Physiology Cambridge University, donde investigué aspectos moleculares referidos a la inestabilización y fusión de biomembranas.

Mis trabajos allí, demostraron por primera vez que cambios de la organización intermolecular y del campo eléctrico asociado a interfaces de fosfolípidos, con formación de dominios segregados con una topología particular, eran capaces de reducir la asimetría de la membrana. Estos efectos estructurales son imprescindibles para permitir la formación de fases no-bicapas, lo cual es esencial para el proceso de fusión de biomembranas. Esos resultados fueron las primeras evidencias moleculares directas sobre el tipo de interacciones responsables de la formación de estructuras no-bicapa, en procesos de recombinación de membranas inducida por lípidos y proteínas.

A mediados de la década de 1970, me reintegré al Departamento de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Químicas como investigador Adjunto de la carrera del investigador científico del CONICET y, al año siguiente, fui designado Profesor Adjunto (DE) para el área de Biofísica. Por no disponer de fondos para adquirir el equipamiento necesario diseñé y construí un equipo para el estudio de films monomoleculares de lípidos y proteínas en interfaces utilizando elementos de descarte de equipos obsoletos (con la invaluable ayuda del Sr. DiVito, encargado del taller mecánico que disponía nuestra Facultad en esos años). A juzgar por publicaciones internacionales, ese fue el primer equipo de este tipo en Sudamérica. Entre 1978 y 1980 demostramos que varios glicoesfingolípidos pueden regular la fusión de membranas y en 1979, describimos a la proteína básica de mielina como la primera proteína de mamíferos para la que se demostró su capacidad de inducir fusión celular. En ese período, también se demostró definitivamente que, a diferencia de la concepción corriente de la época, la cadena oligosacárido de glicoesfingolípidos se orienta en el medio acuoso de manera perpendicular al plano de

la interfaz; esto afecta propiedades de hidratación, diferencia de potencial electrostático, estado de fase, curvatura y capacidad de interacción con ligandos, enzimas y otras membranas. Alrededor de 1980, propuse que las interacciones y estado físico de interfaces que contienen esfingolípidos y proteínas deben considerarse de manera integrada lo cual determina su organización espacial y temporal termodinámicamente espontánea, conceptos que se fueron comprobando y reforzando en la literatura internacional. En esos años, iniciamos por primera vez estudios de interacción de proteínas y lípidos empleando monocapas, espectroscopías de absorción y de fluorescencia.

Nuevamente, por carecer de equipos necesarios en Córdoba, obtuve fondos de la National Multiple Sclerosis Society, U.S.A. en el año 1983, para realizar estudios calorimétricos sobre el mesomorfismo termotrópico de sistemas de membrana que contienen esfingolípidos en el Department of Neurology y en el Department of Chemistry, Molecular Biophysics and Biochemistry de la Universidad de Yale, U.S.A. con los Dres- R.K. Yu y J. Sturtevant.

Posteriormente, entre 1989 y 1995, me desempeñé como Full Professor en la Virginia Commonwealth University, USA. En esos períodos, publiqué los únicos datos existentes que explican la influencia del grupo polar en el estado de fase de esfingolípidos. Obtuve los diagramas de fase completos de más de 30 tipos de esfingolípidos y sus mezclas con fosfolípidos así como su topología estructural. Fue muy importante la demostración que cantidades muy pequeñas de gangliósidos (< 2 mol %) tienen un efecto extraordinario sobre la formación de fases no-bicapas tipo H_{II} , estructuras esenciales para la fusión de biomembranas y cuál es la influencia del tipo de grupo polar sobre ese proceso.

Desde 1996, en el grupo de Biofísica iniciamos por primera vez en Argentina, el estudio de interfaces lípido-proteína con técnicas de microscopía (ángulo de Brewster y epifluorescencia de monocapas de Langmuir, interfaces de Gibbs y films Langmuir-Blodgett transferidos a soportes sólidos) lo cual permitió visualizar en tiempo real la

topografía lateral y transversal de superficies lípido-proteína. Demostramos desde 1989, que los esfingolípidos son capaces de modular la actividad de enzimas fosfolíticas (las que generan lípidos intermediarios en la transducción de señales celulares) a través de cambios de interacciones y de la topografía de superficie. Se describió por primera vez que existe intercomunicación mutuamente regulada entre la actividad biocatalítica y la dinámica de la topografía interfacial, lo cual explica las razones moleculares y cinéticas por las que se originan dominios segregados de diferente forma y composición. Estos estudios se extendieron a la organización molecular y estado de fase de dominios enriquecidos de ceramidas. Desde 2005, implementamos técnicas originales para aplicar campos eléctricos externos sobre monocapas lipídicas, con lo que se demostró directamente la naturaleza dipolar de dominios segregados y la posibilidad de alterar la topografía de las interfaces sin cambiar la composición lipídica.

Desde la década de 1990, somos uno de los pocos grupos en el mundo que desarrollamos una técnica original para la formación, caracterización y transferencia sobre soportes sólidos y líquidos de capas monomoleculares formadas con membranas celulares completas de origen neuronal y glial de mamífero. Esto permitió estudiar la expresión, exposición de antígenos y el reconocimiento de superficie de células neurales como respuestas al contacto inter-membrana en condiciones conocidas de organización molecular.

Fui afortunado en contar con la colaboración de brillantes becarios tesis y postdoctorales, lo que nos permitió realizar avances originales sobre la compleja estructuración de interfaces hidrofílico-hidrofóbicas como biomembranas. No he mencionado a ninguno de mis colaboradores en particular para evitar énfasis u omisiones indebidas (sus nombres pueden encontrarse en la lista de referencias y en las citas de esos trabajos). Como es común para científicos que trabajan en países latinoamericanos, combinado con nuestra natural tendencia de no sobre-enfatizar una propaganda de nuestros logros, la originalidad de nuestros avances no siempre fue debida y oportunamente reconocida por la ciencia

de los “países centrales” (así llamados...) aunque corresponde decir que existieron colegas honestos que así lo hicieron, lo cual redundó en que, actualmente, nos constituyéramos en **el grupo de referencia sobre biofísica molecular de biomembranas en Sudamérica**, y uno de los pocos reconocidos a nivel internacional en esta temática: hasta la fecha, se publicaron unos 160 trabajos en las mejores revistas internacionales indexadas, merecimos 6207 citaciones totales, 2371 desde 1999; figuro con índice H - Scopus de 23 e índice H -

ISI de 37 que se cuentan entre los más altos de Argentina).

Agradecimientos

Los trabajos fueron realizados mediante aportes de fondos de CONICET, MINCyT, SECyT-UNC, FONCyT, Fund. Antorchas (Argentina); Natl. Multiple Sclerosis Soc. (USA), NIH (USA), AD. Williams Fund (USA); Fidia Res. Found. (Italy-USA), CICOPS (Italy), CAPES-SECyT (Brasil-Argentina), MINCyT-DST (Argentina-SudAfrica), Biotox-CYTED (Argentina-Cuba-UE).

Referencias

- (1) Lipid content in brain and spinal cord during Experimental Allergic Encephalomyelitis in rats. Maggio, B., Cumar, F.A. & Maccioni, H.J. (1972) *J. Neurochem.* 19:1031-1037.
- (2) Experimental Allergic Encephalomyelitis: dissociation of neurological symptoms from lipid alterations in the brain. Maggio, B. & Cumar, F.A. (1975) *Nature* 253:364-365
- (3) Polar group behaviour in mixed monolayers of phospholipids and fusogenic lipids. Maggio, B. & Lucy, J.A. (1976) *Biochem. J.* 155:353-364
- (4) Induction of membrane fusion by polysialogangliosides. Maggio, B., Cumar, F.A. & Caputto, R. (1978) *FEBS Lett.* 90:149-152.
- (5) Molecular behaviour of glycosphingolipids in interfaces. Possible participation in some properties of nerve membranes. Maggio B., Cumar, F.A. & Caputto, R. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 650:69-87.
- (6) The surface behavior of glycosphingolipids in Biomembranes. A new frontier of molecular ecology. Maggio, B. (1994). *Progr. Biophys. Mol. Biol.* 62:55-117
- (7) The surface behavior of axolemma monolayers Physico-chemical characterization and use as supported planar membranes for cultured Schwann cells. Calderon, R.O., Maggio, B., Neuberger, T.J. and DeVries, G.H. (1993) *J. Neurosci. Res.* 34: 206-218.
- (8) Interfacial behavior of glycosphingolipids and related sphingolipids. Maggio, B., Carrer, D.C., Fanani, M.L., Oliveira, R.G. and Rosetti, C.M. (2004). *Current Opinions in Colloid and Interface Science* 8:448-458.
- (9) Biophysics of sphingolipids II. Glycosphingolipids: An assortment of multiple structural information transducers at the membrane surface. Maggio B., Fanani M.L., Rosetti C.M. and Wilke N. (2006) *Biochim. Biophys. Acta.* 1758:1922-1944.
- (10) Protein-induced surface structuring in myelin membrane monolayers. Rosetti, C.M. and Maggio, B. (2007) *Biophys. J.* 93:4254-4267.
- (11) Composition-driven surface domain structuring mediated by sphingolipids and membrane/active proteins. Above the Nano-but under the Micro-scale: mesoscopic biochemical/structural cross-talk in biomembranes. Maggio, B., Borioli, G.A., Del Boca, M., De Tullio, L., Fanani, M.L., Oliveira, R.G., Rosetti, C.M. and Wilke, N. (2008) *Cell Biochemistry and Biophysics* . 50: 79-109.
- (12) The action of sphingomyelinase in lipid monolayers as revealed by microscopic image analysis Fanani, M. L., Hartel, S., Maggio, B., De Tullio, L., Jara, J., Olmos, F., Oliveira, R.G. (2010) *Biochim. Biophys. Acta* 1798(7):1309-1323
- (13) Ceramide N-Acyl Chain Length: A Determinant of Bidimensional Transitions, Condensed Domain Morphology, and Interfacial Thickness. Dupuy, F., Fanani, M.L. and Maggio, B. (2011). *Langmuir* 27: 3783-3791.
- (14) Controlled lateral packing of insulin monolayers influences neuron polarization in solid-supported cultures. Grasso, E. J.; Oliveira, R. G.; Oksdath, M.; Quiroga, S.; Maggio, B. (2013) *Colloids Surf. B Biointerfaces* 107, 59-67.
- (15) The hydrophobic mismatch determines the miscibility of ceramides in lipid monolayers. Dupuy F, Maggio B. (2012) *Chem Phys Lipids.* 165:615-629.