

Instituto de Investigación Médica
Mercedes y Martín Ferreyra
INIMEC - CONICET



Facultad de Astronomía
Matemática y Física
Universidad Nacional de Córdoba



Transiciones de fase en membranas lipídicas

**Tesina para optar al título de
Licenciado en Física**

**Diego Mateos
Dir: Dra. Dolores C. Carrer**

**Marzo 2011
Córdoba
Argentina**

A mis padres, por su apoyo en todos estos años de carrera.

A mi mujer, Patricia por estar a mi lado con Amor en todo los momentos.

Agradecimientos

A la Dra. Dolores Carrer, por permitirme trabajar en su laboratorio y el conocimiento brindado en todo momento

Al Dr Walter Lamberti, por el apoyo brindado en la carrera y en especial en mi tesina

A la Facultad de Astronomía, Matemática y Física , por todo el conocimiento que me ha brindado en estos años de carrera.

Al Instituto de Investigación Médica Mercedes y *Martín* Ferreira por permitirme hacer mi tesina y brindarme soporte en todo momento

A mis padres por el apoyo afectivo y económico que me permitió finalizar esta carrera.

A mi mujer Patricia que me dio todo su amor y fuerza, acompañándome en todo los momentos.

RESUMEN

Los lípidos son fundamentales para el funcionamiento de la membrana plasmática celular, sin embargo es poco lo que se conoce de los procesos físicos básicos que acompañan a esta función. Una hipótesis es que la membrana celular contiene pequeños dominios dinámicos enriquecidos con ciertos lípidos y proteínas, los cuales varían en respuesta a diferentes señales. En membranas modelo complejas (con tres componentes o más), ciertas mezclas de lípidos presentan coexistencia de fases líquidas, especialmente si contienen colesterol y una mezcla de lípidos saturados e insaturados. Este trabajo estudia la coexistencia de dominios de fase alrededor de la temperatura de transición de fase en mezclas conteniendo lípidos que han sido implicados en la cascada de señales que dispara la muerte celular por apoptosis. Se utilizaron como modelo Vesículas Unilamelares Gigantes (GUVs) compuestas por dioleoylPC (DOPC)-esfingomielina de cerebro (BSM)-ceramida de cerebro (BCer)-colesterol (CHOL) para diferentes proporciones de BSM:BCer . Se caracterizó este sistema mediante microscopia confocal de fluorescencia a diferentes temperaturas.

Palabras Claves: Membrana celular, Transición de fase, Vesículas Unilamelares Gigantes

Biblioteca: 87.10.Vg Biological information
87.14.Cc Lipids
87.15.Zg Phase transitions

INDICE:

INTRODUCCIÓN.....	8
Capitulo 1: MEMBRANA CELULAR	
1.1. Membrana celular	9
1.1.2 Composición Química.....	10
1.1.3 Estructura.....	11
1.1.4 Bicapa Lipídica.....	11
1.1.5 Funciones.....	11
1.2 Balsa Lipídica.....	12
Capitulo 2: LÍPIDOS	
2.1.1 Fosfolípidos.....	14
2.1.2 Ceramida.....	15
2.1.3 Glucolípidos.....	15
2.1.4 Esteroles.....	15
2.1.5 Composición Lipídica en Membranas Naturales.....	16
2.2 Formación de estructura Lipídica.....	17
2.3 Termodinámica de Lípidos.....	19
2.3.1 Características Físicas de las diversas Fases.....	19
2.3.2 Diagrama de Fases de Lípidos.....	20
2.3.3 Mezcla ternaria de lípidos exhibiendo separación de fases.....	21
2.3.4. El rol de las ceramidas en la señalización celular.....	22
Capitulo 3: MICROSCOPIO CONFOCAL	
3.1 Introducción y Antecedentes.....	23
3.2 Tipos y Características.....	24
3.2.1 Laser scanning confocal Microscopy.....	24
3.2.2 Disc Scanning Confocal Microscopy	26
3.3 Ventajas y Desventajas.....	27
3.4 Aplicación.....	28
Capitulo 4: MARCADO FLUORESCENTE DE VESÍCULAS	
4.1 Fluorescencia.....	29
4.2 Aplicaciones.....	30
4.3 Epifluorescencia con microscopia.....	31
4.4 Marcado fluorescente en las Vesículas unilamelares gigantes.....	32
Capitulo 5: MATERIALES	
5.1 Lípidos.....	33
5.2 Azúcares.....	33
5.3 Marcado fluorescente.....	33
5.4 Preparación de mezclas.....	34
5.5 Celda de Electroformación	35
5.6 Cámara portamuestra.....	35

5.7 Microscopio.....	36
5.8 Heater	36
5.9 Componentes anexados al calentador	37
5.10 Osmometro.....	37

Capitulo 6: PREPARACION DE LA GUVs

6.1 Electroformación	38
6.2 Montaje de la muestra.....	39
6.3 Montaje del microscopio.....	39
6.4 Proceso de Medición	40

Capitulo 7: RESULTADO Y DISCUSIÓN

7.1 Resultados.....	41
7.2 Discusión.....	49
7.3 Conclusión.....	50

REFERENCIAS.....	55
------------------	----

Introducción

La membrana plasmática cumple funciones fundamentales en la vida de las células, sin embargo es muy poco lo que se conoce de las bases físicas subyacentes al funcionamiento de la membrana. Una hipótesis actual y muy popular sostiene que la membrana plasmática contiene pequeños dominios dinámicos llamados “rafts” (balsas) los cuales están enriquecidos en ciertos tipos de lípidos y proteínas, estas balsas cambian de tamaño, forma, composición y estabilidad en respuesta a señales del ambiente. También se especula que la organización de la balsas surge de la tendencia de los lípidos en la membrana (que contiene colesterol) a separarse en 2 estados de fase coexistentes, líquido-ordenado (L_0) y líquido-desordenado (L_d). De hecho, existen numerosas observaciones experimentales de la membrana plasmática, mostrando partes más ordenadas y partes menos ordenadas ambas en la célula [1-3].

Las ceramidas son lípidos que han sido descritos como capaces de modificar la función de determinadas proteínas frente a estímulos de agresión o injuria celular, produciendo una cascada de señales que eventualmente culmina en la muerte de la célula por apoptosis. El mecanismo de acción de las ceramidas es sin embargo fuente de debate. Una de las posibilidades, la que da origen a este trabajo, es que el incremento de las concentraciones de ceramida en la membrana plasmática produzca una separación lateral de fases, modificando la concentración local, la difusión y las interacciones entre proteínas iniciadoras de la cascada de señales. [4-8]

En este trabajo utilizamos vesículas unilamelares gigantes (GUVs por sus siglas en inglés) con composiciones que reproducen de forma simplificada la composición de la membrana plasmática cuando se activa la producción de ceramidas. Este sistema modelo nos permite estudiar como la composición y la temperatura influyen en la estructuración de la membrana.

Utilizamos GUVs formados por cuatro componentes: un lípido saturado (esfingomielina), un lípido insaturado (dioleoilfosfatidilcolina), una ceramida y colesterol; en las mezclas la composición varía a medida que la esfingomielina es reemplazada por ceramida. Caracterizamos dicho sistema mediante la observación con microscopía confocal de fluorescencia a diferentes temperaturas.

Capítulo 1

1. La membrana celular

La membrana plasmática o celular es una estructura laminar formada por lípidos (con cabeza hidrofílica y cola hidrofóbica) y proteínas que engloba a la célula, define sus límites y contribuye a mantener el equilibrio entre el interior (medio intracelular) y el exterior (medio extracelular) de éstas. Además, se asemeja a las membranas que delimitan las organelas de células eucariotas. La membrana plasmática sirve de "contenedor" para el citosol y los distintos compartimentos internos de la célula, así como también otorga protección mecánica y regula el intercambio de materia con el exterior. Está formada principalmente por fosfolípidos, colesterol, glúcidos y proteínas.

La principal característica de esta barrera es su permeabilidad selectiva, lo que le permite seleccionar las moléculas que deben entrar y salir de la célula. De esta forma se mantiene estable el medio intracelular, regulando el paso de agua, iones y metabolitos, a la vez que mantiene el potencial electroquímico (haciendo que el medio interno esté cargado negativamente).

La membrana plasmática tiene un grosor aproximado de 7,5 nm y no es visible al microscopio óptico pero sí al microscopio electrónico, donde se pueden observar dos capas oscuras laterales y una central más clara. En las células procariotas (bacterias) y en las eucariotas osmótrofas como plantas y hongos, se sitúa bajo otra capa, denominada pared celular.

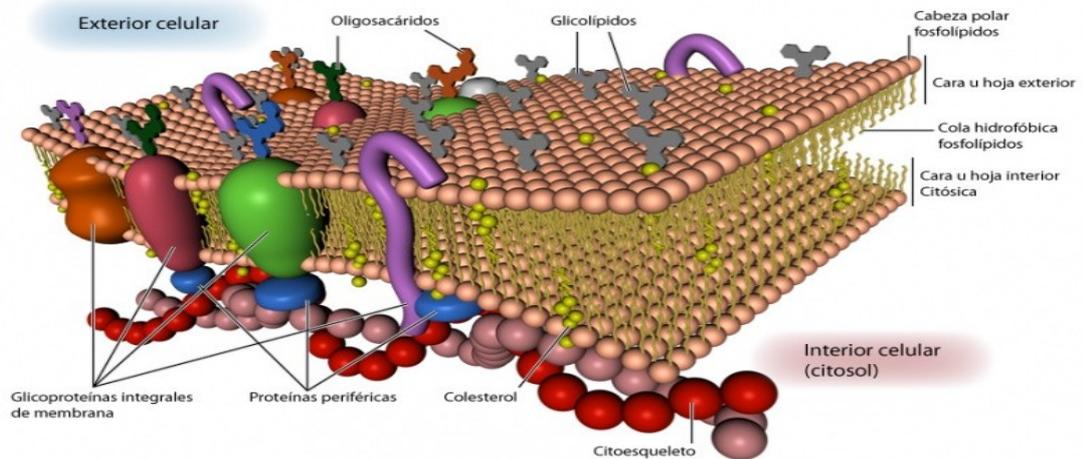


Figura 1: Esquema de una membrana celular. Según el modelo del *mosaico fluido*, las proteínas serían como "icebergs" que navegarían en un mar de lípidos. Nótese además que las cadenas de oligosacáridos se hallan siempre en la cara externa, pero no en la interna. Autor del gráfico J Pablo Cad

1.1.2 Composición química

La composición química de la membrana plasmática varía entre células dependiendo de la función o del tejido en la que se encuentren, pero se puede estudiar de forma general. La membrana plasmática está compuesta por una doble capa de fosfolípidos, por proteínas unidas no covalentemente a esa bicapa, y glúcidos unidos covalentemente a los lípidos o a las proteínas. Las moléculas más numerosas son las de lípidos, ya que se calcula que por cada 50 lípidos hay una proteína. Sin embargo, las proteínas, debido a su mayor tamaño, representan aproximadamente el 50% de la masa de la membrana.

Lípidos

El 98% de los lípidos presentes en las membranas celulares son anfipáticos, es decir que presentan un extremo hidrófilo (que tiene afinidad e interacciona con el agua) y un extremo hidrofóbico (que repele el agua). Los más abundantes son los fosfoglicéridos (fosfolípidos) y los esfingolípidos, que se encuentran en todas las células; le siguen los glucolípidos, así como esteroides (sobre todo colesterol). Estos últimos no existen o son escasos en las membranas plasmáticas de las células procariotas. Existen también grasas neutras, que son lípidos no anfipáticos, pero sólo representan un 2% del total de lípidos de membrana.

Proteínas

El porcentaje en peso de proteínas oscila entre un 20% en la vaina de mielina de las neuronas y un 70% en la membrana interna mitocondrial[1]; el 80% son intrínsecas (embebidas en la bicapa lipídica), mientras que el 20% restantes son extrínsecas (asociadas a la bicapa por interacciones electrostáticas o por unión covalente a un lípido). Las proteínas son responsables de las funciones dinámicas de la membrana, por lo que cada membrana tiene una dotación muy específica de proteínas; las membranas intracelulares tienen una elevada proporción de proteínas debido al elevado número de actividades enzimáticas que albergan. En la membrana las proteínas desempeña diversas funciones: transportadoras, conectoras (conectan la membrana con la matriz extracelular o con el interior), receptoras (encargadas del reconocimiento celular y adhesión) y enzimas (catalizadoras de diversas reacciones químicas).

Glúcidos

Están unidos en la membrana covalentemente a las proteínas o a los lípidos. Pueden ser polisacáridos u oligosacáridos. Se encuentran en el exterior de la membrana formando el glicocalix. Representan el 8% del peso seco de la membrana plasmática. Sus funciones principales son dar soporte a la membrana y el reconocimiento celular (colaboran en la identificación de las señales químicas de la célula).

1.1.3 Estructura

Antiguamente se creía que la membrana plasmática era un conjunto estático formado por las siguientes capas: proteínas/lípidos/lípidos/proteínas. Hoy en día se concibe como una estructura dinámica. El modelo estructural aceptado en la actualidad se conoce como "mosaico fluido". El mosaico fluido es un término acuñado por S. J. Singer y G. L. Nicolson en 1972. Consiste en una bicapa lipídica complementada con diversos tipos de proteínas. La estructura básica se mantiene unida mediante uniones no covalentes.

1.1.4 Bicapa lipídica

El orden de las cabezas hidrofílicas y las colas hidrofóbicas de bicapa lipídica impide que solutos polares, como aminoácidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, proteínas e difundan a través de la membrana, generalmente permite la difusión pasiva de las moléculas hidrofóbicas. permite a la célula controlar el movimiento de estas sustancias vía complejos de proteína transmembranal como poros y canales, que permiten el de por ejemplo glucosa e iones específicos como el sodio y el potasio.

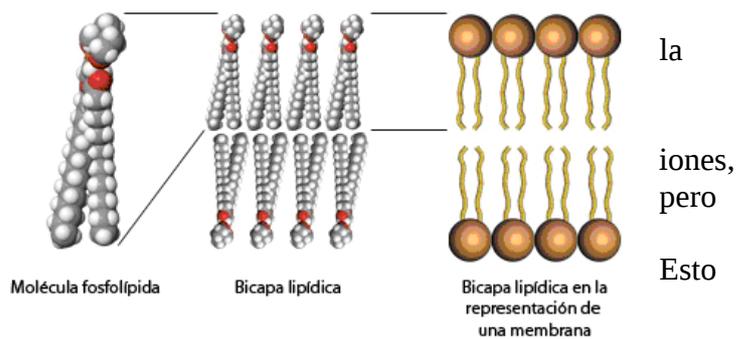


Diagrama del orden de los lípidos anfipáticos para formar una bicapa lipídica

Las moléculas de lípido forman un "sándwich" con las colas de ácido graso dispuestos hacia el centro de la membrana y las cabezas de fosfolípidos hacia los medios acuosos que se encuentran dentro y fuera de la célula.

1.1.5 Funciones

La función básica de la membrana plasmática es mantener el medio intracelular diferenciado del entorno. Esto es posible gracias a la naturaleza aislante en medio acuoso de la bicapa lipídica y a las funciones de transporte que desempeñan las proteínas. La combinación de transporte activo y transporte pasivo hacen de la membrana plasmática una barrera selectiva que permite a la célula diferenciarse del medio.

Los esteroides, como el colesterol, tienen un importante papel en la regulación de las propiedades físico-químicas de la membrana regulando su resistencia y fluidez.

1.2 Lipid rafts (balsas lipídicas)

Los lipid rafts son microdominios de la membrana que se encuentran enriquecidos en colesterol y esfingolípidos. Presentan una cantidad mayor de lípidos con cadenas de ácidos grasos saturados en comparación con el resto de la membrana plasmática. Parecen ser pequeños en tamaño pero pueden llegar a constituir una gran fracción de la membrana plasmática y por este motivo son visibles por microscopia de fuerza atómica (Pike L., 2003).

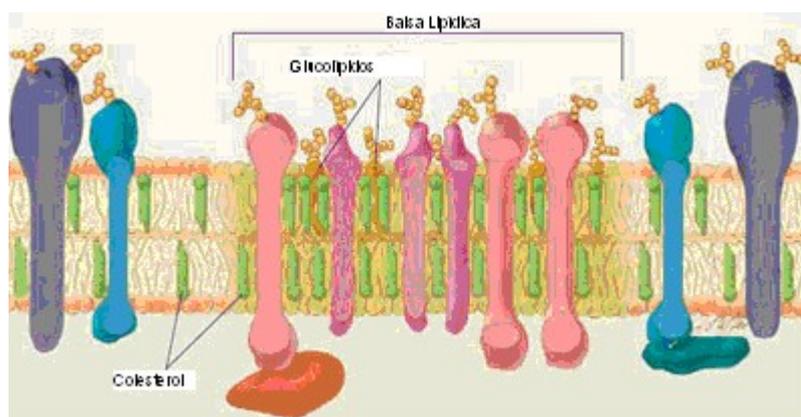


Figura 3: Diagrama de una Balsa Lipídica dentro de una membrana celular

Los grupos acilo largos saturados de los esfingolípidos pueden formar asociaciones más compactas y estables con el colesterol que con los fosfolípidos insaturados que los rodean. Por ello, se comportan como balsas de esfingolípidos de estructura líquido ordenada entre los fosfolípidos, de estructura líquido desordenada. Debido a la presencia de colesterol y lípidos saturados, estas regiones presentan menos fluidez y esta puede ser la causa de que sean insolubles en detergentes no iónicos (Lehninger, 2005).

Al realizar un diagrama de fases de composición *versus* temperatura de mezclas que contienen lípidos saturados, lípidos insaturados y colesterol se observa la aparición de un punto crítico. En un sistema multicomponente como es el estudiado en el presente trabajo, la “compresibilidad osmótica” diverge en el punto crítico, significando que se necesita muy poca energía para mantener las regiones en una composición inhomogénea. Se han observado fluctuaciones críticas en modelos de membrana que contienen colesterol y encontrado que estas fluctuaciones son consistentes con el modelo de Ising en 2D (3, 4). Se especula que, en la membrana plasmática, la composición es siempre mantenida por la célula cerca del punto crítico, de manera que pequeñas perturbaciones permitirían producir cambios importantes en la distribución espacial de los componentes de la membrana con un mínimo gasto energético. Este sería el fenómeno que daría origen a los lipid rafts.

Estos dominios de membrana pueden ser “aislados”, y su composición puede caracterizarse. Sin embargo, la composición de estos fragmentos de membrana aislados depende críticamente del protocolo utilizado (temperatura, presencia o no de detergentes, etc). Hay una gran variedad de proteínas que se han descrito como presentes en fracciones aisladas de rafts, como proteínas ancladas a GPI, quinasas de la familia src o sintasa de óxido nítrico endotelial (Pike L., 2003).

La importancia de los lipid rafts en transducción de señales ha sido demostrada en diversos experimentos en los cuales se ha eliminado el colesterol de la membrana mediante tratamientos químicos. La exclusión del colesterol conlleva la destrucción de los lipid rafts y,

como consecuencia, se observa la interrupción de la señalización a través de membrana (Pike L., 2003).

La existencia de heterogeneidad en la composición de los lipid rafts así como la presencia de moléculas implicadas en señalización, hacen de estas estructuras un punto fundamental de control de la transducción de señales (Pike L., 2003). Esta regulación de la señalización celular puede abordarse desde diferentes perspectivas.

Un modelo sencillo muestra los rafts como plataformas donde se agrupan componentes implicados en una misma vía de transducción. Esta agrupación evitaría la interacción inespecífica de moléculas implicadas en diferentes rutas y permitiría una rápida ejecución de la respuesta ante la llegada de una señal (Pike L., 2003).

Por el contrario, otros modelos sostienen que moléculas implicadas en una misma vía pueden situarse en diferentes rafts, capaces de asociarse ante la llegada de la señal apropiada (Pike L., 2003). De ese modo, la regulación se llevaría a cabo a través de la separación física de los componentes de la ruta en ausencia de señal. Existen numerosos ejemplos de fenómenos de reclutamiento de rafts para la iniciación de la transducción de señales. Uno de ellos es la activación de los linfocitos T a través de la interacción con células presentadoras de antígenos. La activación de las células T provoca la inmediata agrupación de los rafts para desencadenar la respuesta inmune (Simons K., 2000).

Por otro lado, los rafts pueden desempeñar su papel regulador creando un entorno especial en la membrana capaz de modificar la actividad de determinadas proteínas transductoras (Pike L., 2003). Este es el caso del receptor-1 de TNF α que, tras unirse al ligando, se introduce en los rafts para desencadenar la ruta de señalización. Sin embargo, si la entrada del receptor en la balsa lipídica se da en ausencia de ligando, la proteína es marcada para su destrucción por ubiquitinación (Lucero H., 2004).

Si al papel de regulación espacial de la señalización, se une el enorme dinamismo de formación y desaparición que presentan las balsas lipídicas (Pelkmans, 2005), obtenemos un eficiente sistema de regulación de la señalización tanto en el espacio como en el tiempo.

Los mecanismos de funcionamiento de los lipid rafts encierran todavía hoy gran cantidad de incógnitas. Estudios muy recientes relacionan de forma inequívoca determinadas actividades señalizadoras de rafts con enfermedades de gran impacto como cáncer y Alzheimer (Kumar S., 2007), o demuestran su implicación en la infección de las células por parte de virus (Pelkmans L., 2005). Estos hallazgos indican que el conocimiento de sus mecanismos de funcionamiento resulta fundamental para la obtención de nuevas dianas terapéuticas, así como nuevas estrategias de prevención de enfermedades víricas.

Capítulo 2

2.1 Lípidos

2.1.1 Fosfolípidos

Los fosfolípidos son un tipo de lípidos anfipáticos compuestos por a molécula de glicerol, a la que se unen dos ácidos grasos (1,2-diacilglicerol) y un grupo fosfato. El fosfato se une mediante un enlace fosfodiéster a otro grupo de átomos, que frecuentemente contienen nitrógeno como colina, serina o etanolamina y muchas veces posee una carga eléctrica. Todas las membranas activas de las células poseen una bicapa de fosfolípidos. Los fosfolípidos más abundantes son la fosfatidiletanolamina (o cefalina), fosfatidilinositol, ácido fosfatídico, fosfatidilcolina (o lecitina) y fosfatidilserina.

Los fosfolípidos son moléculas anfipáticas, es decir, tienen una región apolar hidrófoba que repele el agua y una región polar hidrófila que tienen afinidad por la misma. La región apolar de los fosfolípidos corresponde a las largas cadenas alquílicas de los ácidos grasos, que se denominan por ello "colas apolares"; la región polar corresponde al grupo fosfato, cargado negativamente, y a la molécula unida a él, que puede estar cargada positivamente o poseer grupos hidroxilo (-OH) polares; en conjunto forman la "cabeza" polar de la molécula (figuras 1 y 2).

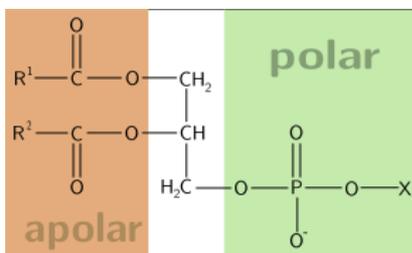


Figura1: Estructura general de un Fosfolípido

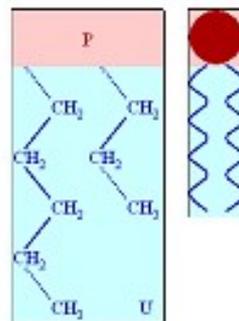


Figura 2. P, cabeza polar; U, colas apolares

Las cadenas de ácidos grasos usualmente contienen un número par de átomos de carbono entre 14 y 24, donde 16 a 18 son los más comunes. Ellos pueden ser saturados o contener una o más, dobles enlaces no conjugados en la configuración cis. Algunos nombres comunes para estas cadenas de acilo y algunas abreviaciones para los cabezas de grupo fosfolípídicas están dadas en la tabla 1.

2.1.2 Ceramidas

Las ceramidas son una familia de lípidos. Una ceramida se compone de un ácido graso unido mediante un enlace amida a una esfingosina, un alcohol insaturado de 18 carbonos. La ceramida es la molécula base de los esfingolípidos, muy abundantes en la bicapa lipídica de las membranas celulares.

Durante años se pensó que el papel de los esfingolípidos y por extensión de las ceramidas en la bicapa lipídica era puramente estructural. Más tarde se descubrió que esto no es del todo cierto, pues se sabe que los esfingolípidos de la superficie celular pueden actuar como moléculas de reconocimiento o señalización celular. Entre las funciones de señalización celular mejor conocidas de las ceramidas se encuentran la regulación de la diferenciación celular, la proliferación celular, la apoptosis y respuesta inmune, tanto para patógenos bacteriales como virales [1,5]. En respuesta a este estímulo específico, en el contexto fisiológico la concentración de ceramida puede alcanzar 10-20% del total del contenido de los lípidos, sin embargo la concentración local en membranas particulares puede ser superior.

Estudios biofísicos de modelos de membranas que contienen ceramidas muestran que su presencia da lugar, a temperaturas fisiológicas, a la coexistencia de dominios de distintas fases [8-10], promoviendo la formación de estructuras no laminares e induciendo flip-flop (la difusión de una molécula de lípido de una hemicapa a la otra de la membrana).

2.1.3 Glicolípidos

Los glicolípidos son esfingolípidos compuestos por una ceramida (esfingosina + ácido graso) y un glúcido de cadena corta; carecen de grupo fosfato. Los glucolípidos forman parte de la bicapa lipídica de la membrana celular; la parte glucídica de la molécula está orientada hacia el exterior de la membrana plasmática y es un componente fundamental del glicocáliz, donde actúa en el reconocimiento celular y como receptores antigénicos. Dependiendo del glucolípido, la cadena glucídica puede contener, en cualquier lugar, entre uno y quince monómeros de monosacárido. Al igual que la cabeza de fosfato de un fosfolípido, la cabeza de carbohidrato de un glucolípido es hidrofílica, y las colas de ácidos grasos son hidrofóbicas. En solución acuosa, los glucolípidos se comportan de manera similar a los fosfolípidos.

2.1.4 Esteroles

El colesterol es un esteroide (lípido) que se encuentra en los tejidos corporales y en el plasma sanguíneo de los vertebrados. Se presenta en altas concentraciones en el hígado, médula espinal, páncreas y cerebro. El nombre de «colesterol» procede del griego kole (bilis) y stereos (sólido), por haberse identificado por primera vez en los cálculos de la vesícula biliar por Michel Eugène Chevreul quien le dio el nombre de «colesterina», término que solamente se conservó en el alemán (Cholesterin). Abundan en las grasas de origen animal. La fórmula química del colesterol se representa de dos formas: $C_{27}H_{46}O$ / $C_{27}H_{45}OH$. En la molécula de colesterol se puede distinguir una cabeza polar constituida por el grupo hidroxilo y una cola o porción apolar formada por el carbociclo de núcleos condensados y los sustituyentes alifáticos. Así, el colesterol es una molécula tan hidrófoba que la solubilidad de colesterol libre en agua es de 10^{-8} M y, al igual que los otros lípidos, es bastante soluble en disolventes apolares como el cloroformo ($CHCl_3$).

2.1.5 Composición lipídica de membranas naturales

La composición de lípidos en una membrana natural depende de la célula y la organela. Una composición porcentual típica para la membrana plasmática de un eritrocito humano, la membrana plasmática de una célula perteneciente a un hígado de mamífero y la membrana de Golgi están listadas en la siguiente tabla. Note que el 20% en peso de colesterol corresponde aproximadamente a 50 mol% de colesterol para las masas moleculares dadas

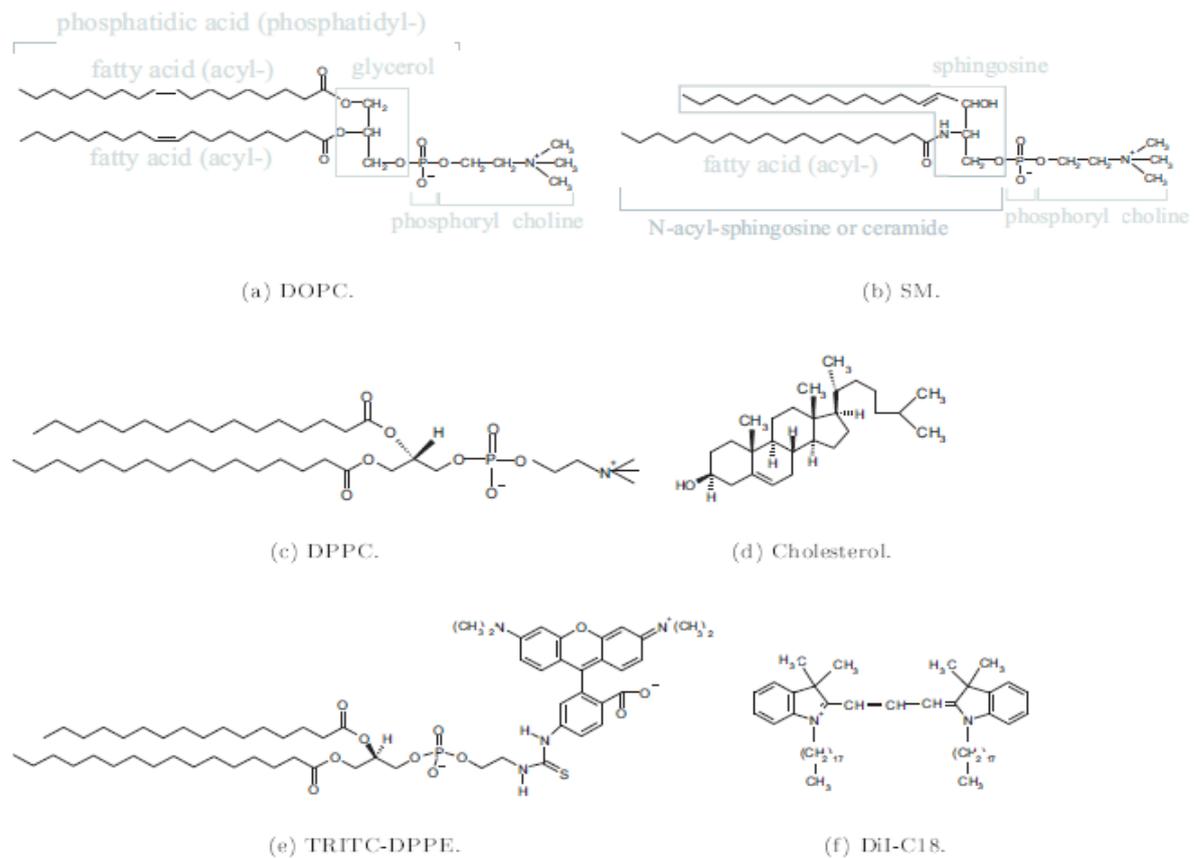


Figura 1 : Lípidos típicos (a,b,c,d) y analogos fluorescentes

*Graficos extraídos “Giant Unilamellar Vesicles” Kirsten Bacia, Jakob Schweizer , Dresden University

Number of carbons : Number of double bonds	Chain name	Full name	Abbreviation
12 : 0	lauroyl	phosphatidylcholine	PC
14 : 0	myristoyl	phosphatidylethanolamine	PE
16 : 0	palmitoyl	phosphatidylserine	PS
18 : 0	stearoyl	phosphatidylinositol	PI
18 : 1	oleoyl		

Tabla 1: Cadenas y nombres de las cabezas de grupo

Lipid name	Abbreviation
1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholine	DLPC
1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	DMPC
1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	DPPC
1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	DOPC
1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine	DPPE
1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-[phospho-L-serine]	POPS
1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-[phospho-L-serine]	DPSP

Tabla 2 : Nombres de Lípidos y sus abreviaciones

Membrane type	PC	PE	PS	PI	SM	Glycol.	Chol.	Others
(a) Human erythrocyte plasma membranes	20	18	7	3	18	3	20	11
(b) Mammalian liver plasma membranes	18	12	7	3	12	8	19	21
(c) Golgi membranes	25	9	3	5	7	0	8	43

Tabla 3: Composición de lípidos en membranas naturales en %

* Tablas extraídas de “Giant Unilamellar Vesicles” Kirsten Bacia, Jakob Schweizer , Dresden University

2.2 Estructuras de agregación de lípidos

En un entorno acuoso, las cabezas polares de los fosfolípidos tienden a orientarse hacia su entorno polar, mientras que las colas hidrofóbicas tienden a minimizar el contacto con el agua. Las colas no polares de los lípidos tienden a juntarse, formando una bicapa lipídica o una micela. Las cabezas polares (P) se orientan hacia el entorno acuoso. Las micelas se forman cuando lípidos con forma cónica (grupo polar grande, cola polar chica) son colocados en un entorno polar, mientras que las bicapas lipídicas se forman cuando lípidos de forma cilíndrica (grupo polar con una área seccional similar a la de la cola polar) son colocados en un ambiente polar. Las micelas pueden ser esféricas o tubulares y solamente pueden llegar hasta cierto tamaño, mientras que las bicapas pueden ser considerablemente más grandes. Las bicapas que se doblan sobre sí mismas forman una esfera vacía, creando así un compartimento acuoso separado, y es en esto en lo que consiste esencialmente la membrana plasmática (ver fig 4).

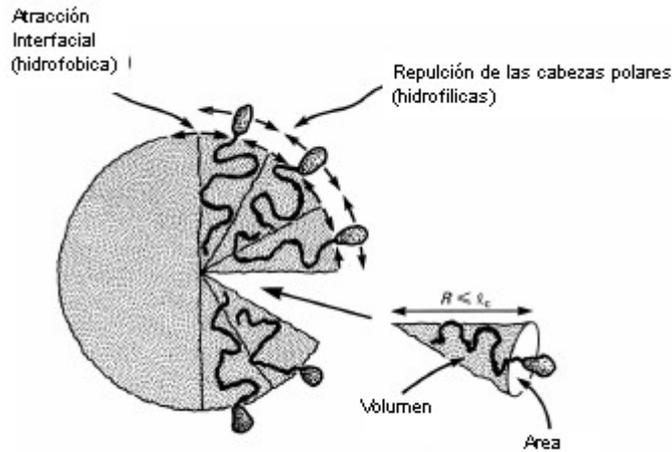


Figura 3: Para formas pequeñas el factor de forma de las micelas

Las micelas y las bicapas se separan del ambiente polar mediante un proceso conocido como “efecto hidrofóbico”. Cuando se disuelve una sustancia no polar en un entorno polar, las moléculas polares (por ejemplo agua en el caso de una solución acuosa) se acomodan de manera más ordenada alrededor de la sustancia no polar disuelta debido a que las moléculas polares no pueden formar enlaces de puente de hidrógeno con las moléculas no polares. Es por esto que, en un entorno acuoso, las moléculas polares del agua forman una caja ordenada de “clatrato” alrededor de la molécula no polar disuelta. De cualquier manera, cuando la molécula no polar se separa del líquido polar, la entropía (el estado de desorden) de la molécula polar en el líquido se incrementa. Esto es esencialmente una forma de separación de fase, similar a la separación espontánea que ocurre cuando se ponen juntos agua y aceite.

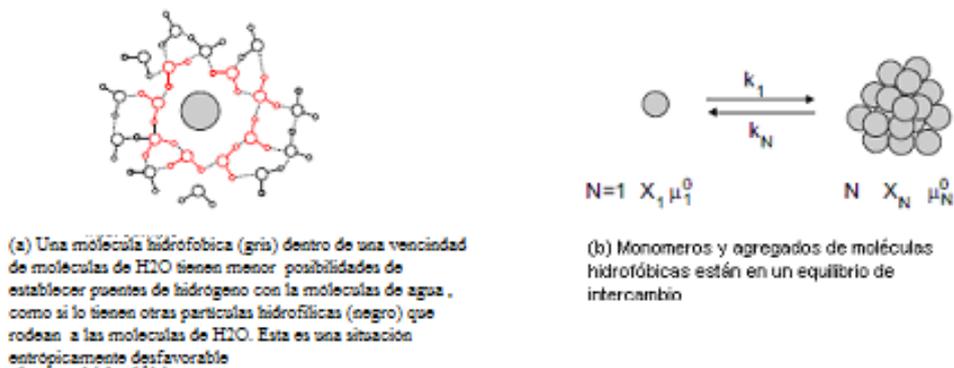


Figura 2 Principios de la fuerza hidrofóbica

Las bicapas usualmente están compuestas por lípidos con dos cadenas de hidrocarburos. En una bicapa plana las cadenas hidrofóbicas se acomodan muy bien en el medio de la estructura, estando en un ambiente hidrofóbico mientras que las cabezas se encuentran en las interfase acuosa. Pero en el borde de una bicapa plana las cadenas de hidrocarburos deben ser expuestas al agua (4 (c)). Por lo cual la estructura tenderá a proteger ese borde del entorno acuoso conectando los dos bordes abiertos uno con el otro. De esto resultan las vesículas, estructuras esféricas comparables con burbujas de jabón (fig 4 (d)). La fuerte presión lateral inhibe la formación de poros al menos que los poros estén estabilizados, por ejemplo por

péptidos. En la bicapa lipídica los componentes sostienen entre ellos muy eficientemente una interacción no covalente pero cooperativa.

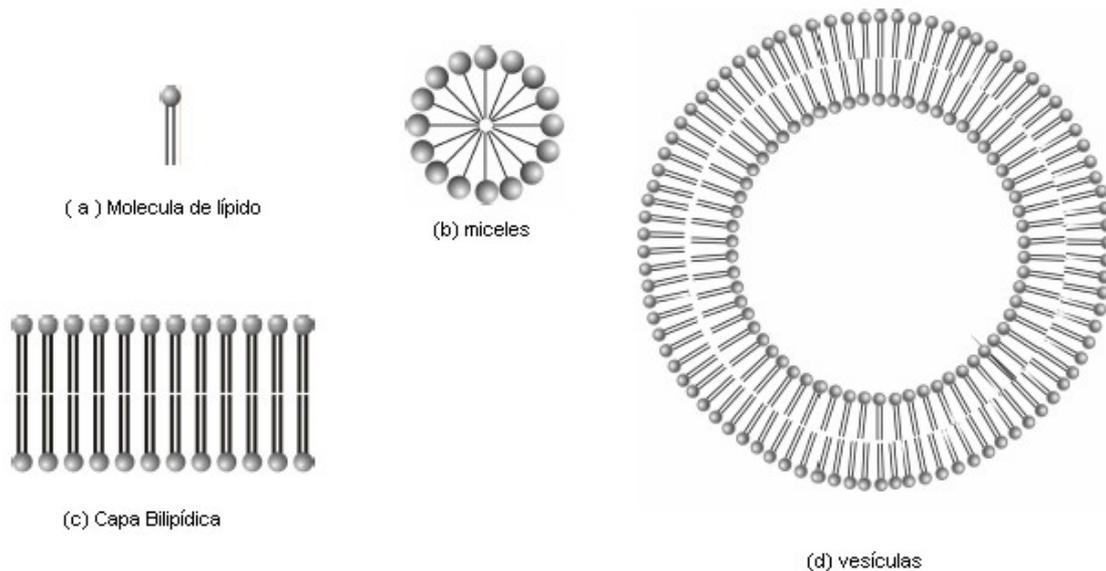


Figura 4: Estructuras Lipídicas

2.3 Termodinámica de lípidos

2.3.1 Características físicas de las diversas fases.

Los lípidos pueden adoptar una variedad de fases, pero el foco aquí será solo en las fases lamelares. Las transiciones de fase se pueden inducir de varias formas. Con frecuencia se estudian las transiciones inducidas por temperatura. Una variedad de fases de gel laminar con diferentes estructuras empaquetadas han sido identificadas mediante cristalografía de rayos X (L_{β} tienen cadenas de carbonos perpendiculares a la capa bilipídica plana, $L_{\beta'}$ es con cadenas de carbono inclinadas, $L_{\beta I}$ es una fase integrada y $P_{\beta'}$ es una estructura rizada), lo único en común de las características de la fase gel que debemos considerar aquí es que las cadenas de hidrocarburo están ordenada en una configuración todo-trans y que las moléculas están organizadas en una red cristalina, altamente organizada, donde no hay difusión lateral. Por esta razón, también se la llama fase sólido-ordenada (S_o).

Al incrementar la temperatura sobre el punto de fusión los terminos de la entropía se vuelven dominantes, resultando una fase liquido-cristalina L_{α} . La fase L_{α} esta caracterizada por un bajo orden conformacional en las cadenas de carbono (orden interno bajo) y un bajo orden de traslación (orden de empaquetamiento bajo, alta difusión). Por esta razón, se la ha llamado fase liquido-desordenada (L_d). El área de la cabeza de estos lípidos, que son del orden de 0.5nm^2 se incrementa aproximadamente del 15 al 30 % en la fusión debido al aumento de la hidratación y al incremento en la movilidad rotacional.

La adición de colesterol resulta en la pérdida de cooperatividad de la transición de fase gel-líquido. Estudios de RMN indican que esta es la causa de la introducción de otra fase en equilibrio, la fase liquido-ordenada L_o , en la cual todavía hay un orden conformacional alto como el la fase gel, pero el orden de traslación se ha perdido (alta difusión traslacional) al igual que en la fase L_{α} ([6], [7], [8]). Estudios teóricos [9] predicen que la transición orden -

desorden de las cadenas de carbono y la transición orden- desorden de los empaquetamientos no necesariamente debe ser acoplado, esto soporta que se pueda formar la fase L_o

Sin embargo, experimentalmente, la fase L_o no es encontrada en lípidos simples, solo en sistemas de lípidos binarios que contienen ciertos esteroides.

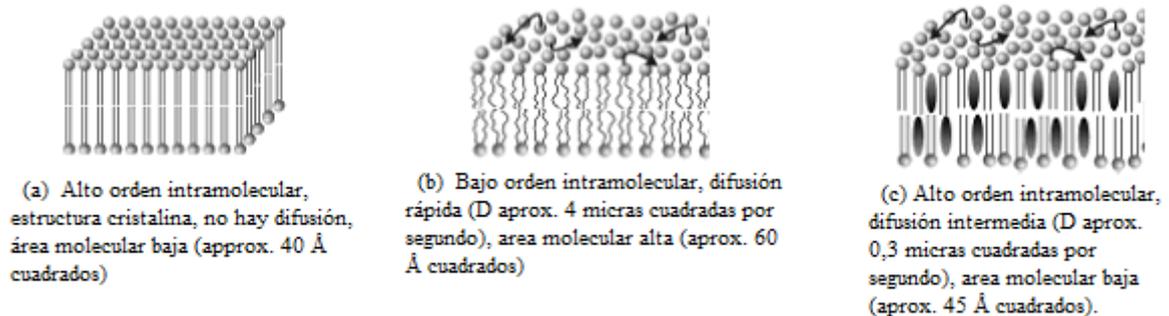


Figura 7 :fases de las bicapas lipídicas

2.3.2 Diagrama de fases de lípidos

Los diagramas de fases de lípidos describen que fase del lípido existe en equilibrio para una combinación de parámetros termodinámicos como la temperatura, presión y la composición. Estos solo pueden construirse para sistemas simples. Sistemas binarios de mezclas de lípidos puede ya mostrar complejidad en el diagrama de fases y mezclas ternarias mucho más aun. La regla de fases de Guibbs es aplicable para determinar el número de grados de libertad $F^\#$ para un sistema de C componentes, exhibiendo P fases diferentes: $P+F^\# = C+2$.

Dado que solo las fases lipídicas formadas con un exceso de agua son consideradas biológicamente relevantes, el agua es omitida: la concentración de agua no cuenta como componente y no es un grado de libertad. Más aún, la presión puede usualmente ser considerada de igual manera (excepto en sistemas monocapa), por eso el número que recuerda el grado de libertad es:

$$F = C - P + 1$$

Es imposible producir un diagrama de fases de una mezcla compleja como la que se encuentra en una membrana celular nativa. En principio, de acuerdo a la regla de fases de Guibbs, un gran número de fases pueden ser permitidas. Lo que aparentemente ocurre especialmente con las membranas eucariotas que contienen colesterol, es que la transición no es una transición medible del todo [10]

. (El prerequisite para formar un diagrama de fase es que estas fases sean distinguibles, y la transición entre ellas sea aproximadamente de primer orden). Sin embargo el estudio de sistemas simples con fases identificables es la esperanza de dar una mejor percepción a este fenómeno el cual puede ser pertinente a la membrana celular real. Aun cuando no sean posibles las transiciones de fase cooperativas sobre el total de la membrana, pueden ser locales, como la formación de “fases de lípidos dominantes”, balsas lipídicas o “lipid melting” en la vecindad de las proteínas de la membrana.

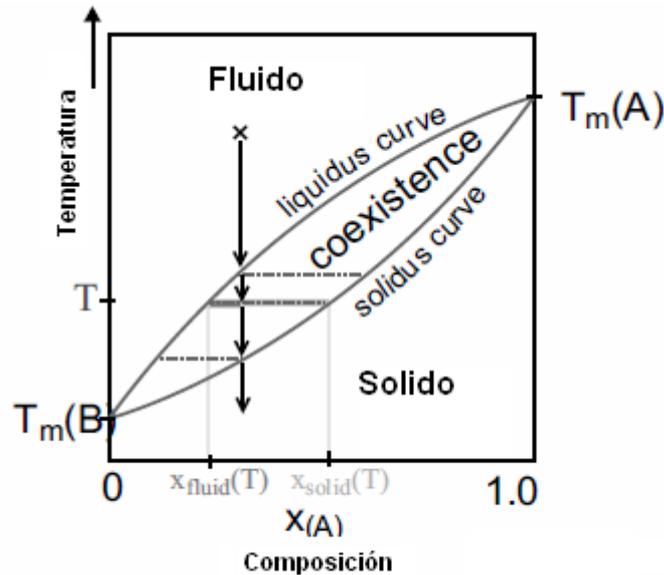


Figura 7 : Diagrama de fases de una mezcla binaria de una fosfatidilcolina saturada

2.3.3 Mezclas ternarias de lípidos exhibiendo separación de fase fluido-fluido

La mezcla consistida por un fosfolípido insaturado, un esfingolípidio saturado y colesterol ha sido estudiado en detalle como modelo de la composición de la membrana plasmática que puede dar origen a coexistencia de fases líquido-ordenado/líquido desordenado, y por lo tanto a la aparición de balsas lipídicas. Para cierto rango de composiciones, las bicapas lipídicas formadas por estas mezclas exhiben una coexistencia de dos fases fluidas (líquidas), la fase líquido-desordenada L_d y la fase líquido-ordenada L_o (indicada en la figura 9). Esta separación de fases se puede visualizar por microscopía óptica en las Vesículas Unilamelares Gigantes (GUVs) usando un marcador fluorescente que permita distinguir una fase de otra. En este trabajo producimos GUVs con cuatro componentes: un fosfolípido insaturado (DOPC), un esfingolípidio saturado (SM), otro esfingolípidio saturado (ceramidas) y colesterol. El diagrama de fases de una mezcla cuaternaria como esta debería ser tridimensional.

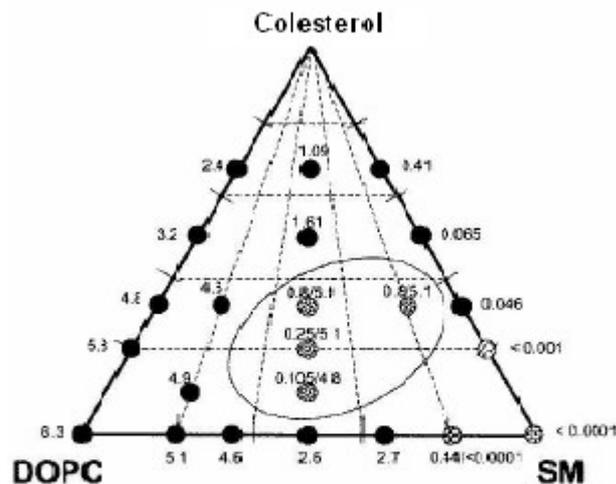


Figura 8 : Coexistencia y movilidad en bicapas lipídicas constituidas por DOPC, SM y colesterol a temperatura ambiente: los números denotan los coeficientes de difusión para un marcador DIC18 [11]

2.3.4. El rol de las ceramidas en la señalización celular

Las ceramidas son lípidos que han sido descritos como capaces de modificar la función de determinadas proteínas frente a estímulos de agresión o injuria celular, produciendo una cascada de señales que eventualmente culmina en la muerte de la célula por apoptosis. El mecanismo de acción de las ceramidas es sin embargo fuente de debate. Una de las posibilidades, la que da origen a este trabajo, es que el incremento de las concentraciones de ceramida en la membrana plasmática produzca una separación lateral de fases, modificando la concentración local, la difusión y las interacciones entre proteínas iniciadoras de la cascada de señales.

La cascada de señales se inicia cuando un estímulo agresivo (luz UV, shock térmico, infección bacteriana o viral, etc) produce la traslocación a la membrana plasmática de un pool de esfingomielinasa que normalmente se encuentra encerrado en vesículas en el citoplasma. Una vez presente en el lado exterior de la membrana plasmática, la esfingomielinasa transforma la esfingomielina en ceramida por medio del corte de la unión covalente del grupo fosforilcolina al grupo glicerol. El grupo fosforilcolina se pierde por difusión al medio extracelular, mientras que la ceramida, por ser altamente hidrofóbica, permanece en la membrana, produciendo un cambio dramático a nivel local ya que por sus características físicas es capaz de inducir la formación de fases ordenadas, cambiar la curvatura local de la membrana, inducir la formación de fases hexagonales no bicapa, desplazar colesterol, modificar la partición de proteínas de membrana, etc (12-14).

En este trabajo utilizamos mezclas que simulan este proceso iniciador de la cascada de señales. En las mezclas, la concentración de esfingomielina disminuye a medida que se incrementa la concentración de ceramida, mientras que la proporción de los restantes lípidos se mantiene constante.

Capítulo 3

3 Microscopio Confocal

3.1 Introducción y antecedentes

La microscopía confocal es una mejora sustancial de las técnicas clásicas de microscopía óptica (campo claro y fluorescencia), resultando de gran interés para diversas ramas de la ciencia tales como medicina, biología, materiales, geología, etc. Su éxito se debe a la obtención de imágenes de mayor nitidez y contraste, mayor resolución vertical y horizontal y a la posibilidad de obtener “secciones ópticas” de la muestra, permitiendo su estudio tridimensional. En las técnicas clásicas de observación en microscopía óptica, la luz interacciona con la muestra a varias profundidades por lo que la imagen que llega al observador presenta áreas borrosas debido a la luz procedente de zonas fuera del plano de enfoque, lo que produce una degradación en el contraste y resolución de la imagen. El principio de la microscopía confocal se basa en eliminar la luz reflejada o fluorescente procedente de los planos fuera de foco. Para ello se ilumina una pequeña zona de la muestra y se toma el haz luminoso que proviene del plano focal, eliminándose los haces procedentes de los planos inferiores y superiores.

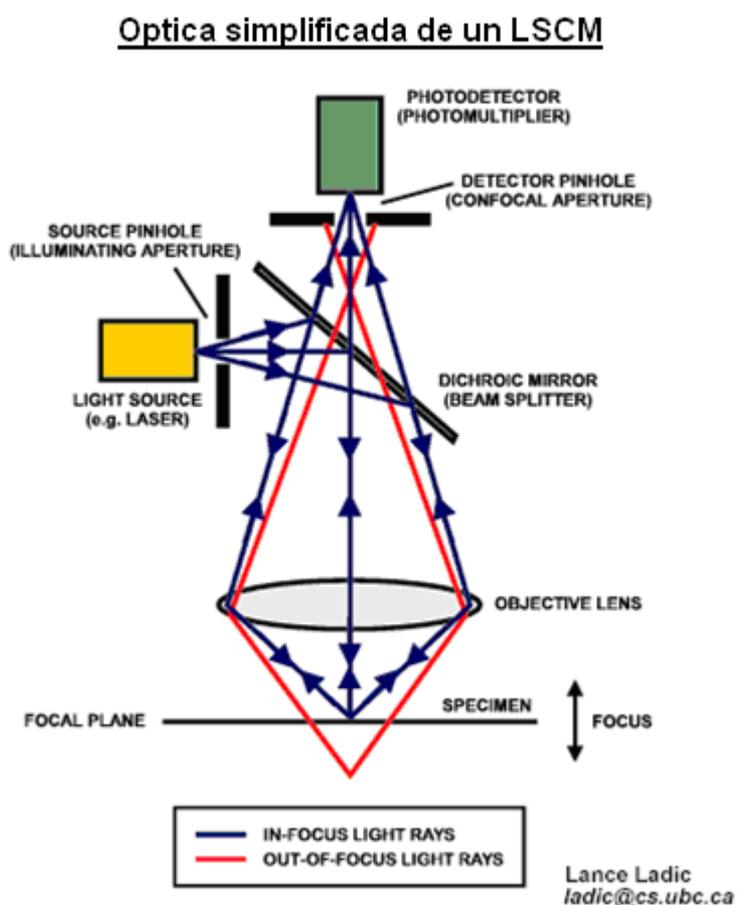


Figura 1: Diagrama simplificado de un microscopio LSCM

La invención del primer microscopio confocal se le suele atribuir a Marvin Minsky, quien en 1955 diseñó un microscopio que le permitía observar redes neuronales en preparaciones de

tejido nervioso no teñidas. La mayoría de los sistemas confocales modernos se basan en el principio por él patentado en 1957 (<http://web.media.mit.edu/~minsky>). Su diseño original se basaba en la presencia de dos “pinholes”: uno situado entre la fuente de luz y el objetivo, y otro entre el objetivo y un fotomultiplicador (Fig.1). Ambos debían estar perfectamente alineados (confocalizados), de manera que el segundo de ellos no dejará pasar nada de luz al fotomultiplicador, “fuera del plano focal”, que es la base de todo sistema confocal. Sin embargo, la tecnología aún no disponible por entonces no le permitió demostrar todo el potencial de esta nueva técnica de microscopía, sobre todo en lo referente a muestras biológicas. Ha sido el espectacular desarrollo de la tecnología láser, de la informática y de los sistemas de adquisición digital de imagen lo que ha permitido conocer todas las posibilidades de la microscopía Confocal e implantar su uso generalizado en el campo de la biología durante los últimos veinte años.

3.2 Tipos y Características

Básicamente existen las siguientes técnicas de microscopía confocal:

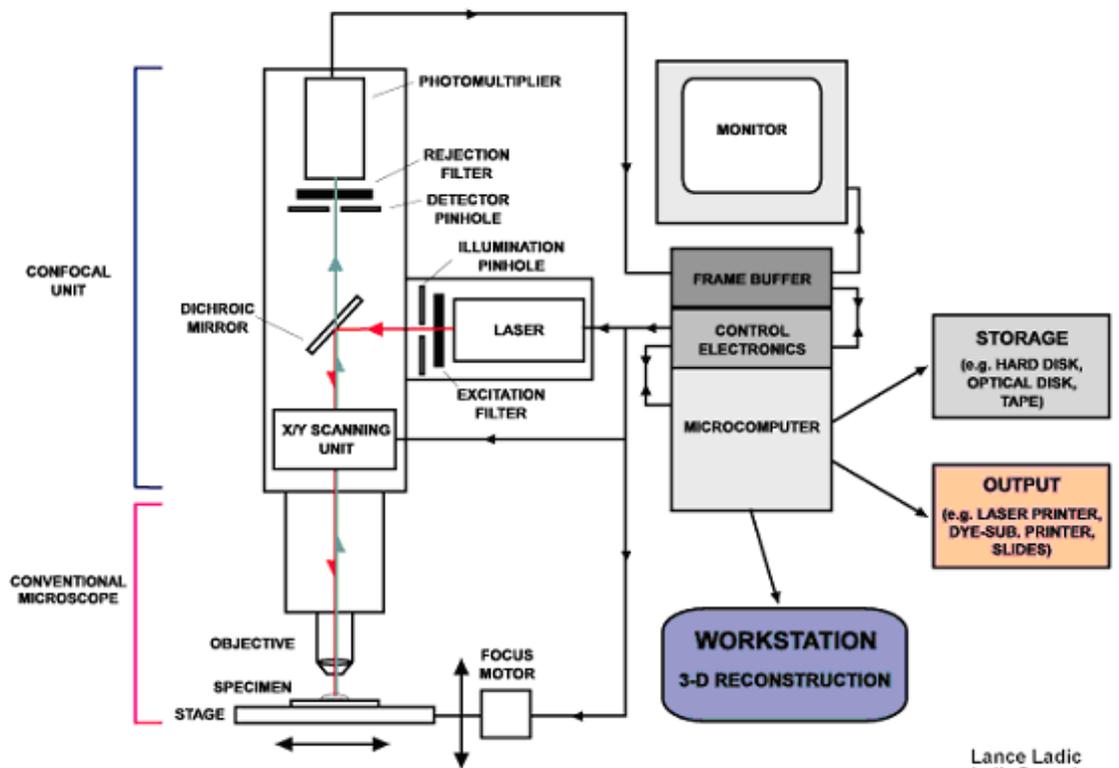
- 1) De un único haz o punto de iluminación, que requieren un sistema de barrido de la preparación. Existen dos modalidades: el Láser Scanning Confocal Microscopy (LSCM) (de “Escaneo de láser”) y el Stage Scanning Confocal Microscopy (SSCM) (de “escaneo de platina”);
- 2) Multi-haz, que incluye Disc Scanning Confocal Microscopy (DSCM) (de “Escaneo de disco”).

El Stage Scanning Confocal Microscopy (SSCM) es el modelo inicialmente diseñado por Marvin Minsky. En este caso se emplea un haz de láser fijo y la preparación se “rastrea” mediante la utilización de una platina motorizada en el microscopio. Esto supone una adquisición lenta de imágenes (alrededor de 10” por imagen adquirida) y, por tanto, su uso se limita a preparaciones biológicas fijadas y en la microelectrónica. Presenta como principal ventaja el permitir la observación de una zona tan grande como se desee sin tener que ceñirse al campo visual del objetivo. Por otra parte, debido a que el haz permanece estacionario, se tiene una iluminación axial constante, lo que minimiza las aberraciones debidas al objetivo y al condensador, proporcionando la misma respuesta óptica a lo largo de todo el campo de muestra. La utilización de un láser como fuente de luz permite enfocar la iluminación en una región muy pequeña de la muestra y con una gran intensidad.

3.2.1 Láser Scanning Confocal Microscopy (LSCM)

Es con diferencia el más utilizado en biología. En este caso el barrido de la preparación se realiza moviendo el haz de láser, gracias a unos espejos galvanométricos que permiten modificar el punto de incidencia del haz de láser en la preparación. De esta manera se pueden alcanzar velocidades de adquisición entorno a 5 imágenes/segundo. Además, el espécimen no necesita ser movido durante el barrido por lo que se hace especialmente interesante para el estudio de muestras vivas.

Sistema típico de un microscopio LSCM



Lance Ladic
ladic@cs.ubc.ca

Figura 2: descripción de un microscopio tipo LSCM

Tal y como se muestra en la figura 2, este sistema está básicamente compuesto por: microscopio (vertical o invertido) con eje Z motorizado, láser (Argón, Argón/Kriptón, Helio/Neón, Diodo, etc), fotomultiplicadores, “pinholes”, espejos dicróicos, filtros de fluorescencia y estación de trabajo (PC o Macintosh). La configuración más normal incluye dos o más líneas de láser y un fotomultiplicador para cada una de ellas con sus correspondientes “pinhole de detección”. Además se suele disponer de un fotomultiplicador adicional (sin “pinhole”) para capturar imágenes de luz transmitida (campo claro, contraste de fases, Nomarski, etc.). Dentro de esta configuración básica existen varias modificaciones tales como el sistema espectral o el de múltiples fotomultiplicadores (Figura 3) que permiten una mejor y más personalizada separación de los espectros de emisión de los fluoróforos.

El funcionamiento básico es el que sigue: la luz procedente de un láser que atraviesa el “pinhole de iluminación” es reflejada mediante un espejo dicróico y enfocada en un punto del espécimen a través del objetivo. La señal emitida por el punto iluminado (fluorescencia o luz reflejada) vuelve por el mismo camino óptico, pasa a través del espejo dicróico y es enfocada en un fotomultiplicador a través del “pinhole de detección” que elimina la señal procedente de la zona fuera de foco. Un conjunto de filtros de emisión colocados delante del fotomultiplicador permiten seleccionar la longitud de onda de emisión del fluoróforo deseada. La luz emitida es recogida en un fotomultiplicador donde se transforma en una señal de vídeo. Algunos sistemas cuentan con dos o tres fotomultiplicadores y un sistema óptico que permite recoger en cada uno de ellos diferentes longitudes de onda. El ordenador dispone de una tarjeta digitalizadora que recoge las señales de vídeo generadas por los fotomultiplicadores y mediante sendos convertidores analógico/digitales las transforma en imágenes digitalizadas que son visualizadas en un monitor RGB. Un ordenador con su correspondiente software de adquisición y procesamiento es utilizado para capturar, procesar y analizar las imágenes.

La mayoría de los sistemas permiten modificar los siguientes parámetros de adquisición:

1) Línea de excitación de láser. Existe un gran número de líneas de láser: Kriptón-Argón (488, 568nm), Argón (457, 477, 488, 514nm), Kriptón (568nm), Diodo rojo (637nm), Helio-Neón (543nm), Diodo azul (405nm), Helio-Cadmio (442nm), etc. Normalmente un sistema dispone de 2 ó 3 láseres con 4 ó más líneas de excitación disponibles.

2) Intensidad del láser. Esta se realiza a través de filtros atenuadores intercambiables colocados delante del láser o mediante el sistema acústico AOTF (Acoustic Optical Tunable Filter), que mediante ondas acústicas modifica la intensidad de salida del láser de manera continua.

3) Apertura del “pinhole de detección”. Esto permite modificar la cantidad de luz que incide en los fotomultiplicadores, modificando la cantidad de señal fuera del plano focal que será integrada. Es el principal mecanismo que permite regular el grosor del plano focal que queremos observar y, por tanto, el nivel de “confocalidad” con el que queremos trabajar. Aumentando el tamaño del “pinhole” aumentamos la cantidad de señal que puede integrar el fotomultiplicador, disminuyendo los requerimientos del láser. Sin embargo, también aumentamos el grosor del plano adquirido al aumentar la señal fuera del plano focal que llega al fotomultiplicador, disminuyendo con ello la confocalidad y resolución de las imágenes.

4) Voltaje del fotomultiplicador (ganancia). Esto permite modificar la sensibilidad del fotomultiplicador, su capacidad de transformar y amplificar la señal que recibe en forma de fotones a corriente de electrones. Un aumento del voltaje aumenta su sensibilidad pero a costa de disminuir la relación señal/ruido y, con ello, la calidad de la imagen.

5) Resolución de salida de la imagen. Con ello modificamos el número y tamaño de los píxeles que tendrá la imagen.

6) Velocidad de barrido. Se puede cambiar la velocidad a la que se adquiere la imagen modificando la velocidad de acción del sistema galvanométrico. Un aumento de la velocidad de barrido suele llevar consigo una disminución de la relación señal/ruido.

7) Zona de barrido. La mayoría de los sistemas confocales permiten que el barrido se realice exclusivamente en una pequeña porción del campo recogido por el objetivo y que sólo se visualice dicha región, que se denomina ROI (Region Of Interest). Esta posibilidad presenta ventajas tales como: reducción del fotoquemado (photobleaching) a una pequeña porción del campo, observación de zonas de la preparación a aumentos superiores a los que permite el objetivo (“zoom”), disminución del tamaño del píxel.

3.2.2 Disc Scanning Confocal Microscopy (DSCM)

En este caso el “pinhole de detección” es sustituido por un disco giratorio con cientos de aperturas agrupadas en pares (Disco de Nipkow) (Figura 4), lo que permite barrer la muestra con múltiples puntos de luz simultáneamente. Presenta varias ventajas frente al LSCM: se puede utilizar láser o lámparas de Mercurio o Xenón como fuente de luz., permite la utilización de filtros convencionales de fluorescencia, la imagen confocal se puede visualizar directamente en los oculares, la velocidad de adquisición aumenta hasta 360 imágenes/segundo. Como principales inconvenientes tiene, que el disco transmite sólo el 1% de la iluminación, lo que genera imágenes de muy débil intensidad, y que el espesor mínimo de las secciones ópticas es superior al alcanzado con el LSCM.

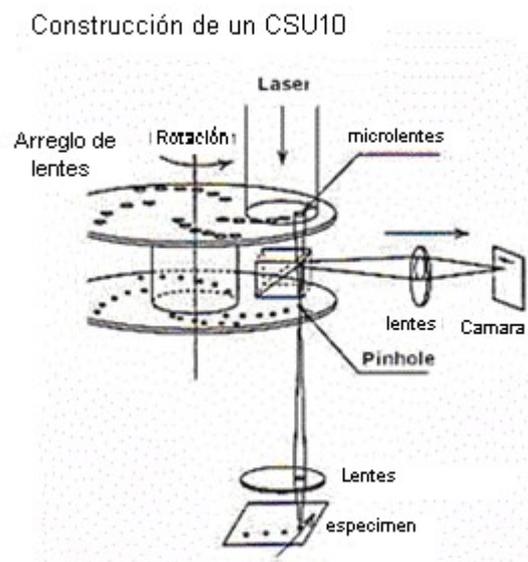


Figura 3: Diagrama básico de un microscopio DSCM

3.3 Ventajas y desventajas

En resumen podemos establecer las siguientes ventajas de la microscopia confocal frente a la microscopia óptica tradicional:

- Mayor resolución. Para un objetivo de inmersión en aceite con una apertura numérica de 1.4 y una longitud de onda de 442 nm es posible alcanzar resoluciones de 0.13 mm en horizontal y 0.47 mm en vertical. Los límites de resolución (distancia mínima entre dos objetos para que sean distinguidos) vienen dados por las siguientes fórmulas: $[0.8\lambda/2NA]$ en XY y $[1.4\lambda h/NA^2]$ en Z, donde h es el índice de refracción del medio, λ es la longitud de onda de excitación y NA es la apertura numérica del objetivo. Por lo tanto, la resolución del sistema disminuye al aumentar la longitud de onda de excitación (máxima resolución en azul) y aumenta con la apertura numérica del objetivo (máxima resolución con objetivos 60-63X ó 100x Plan-Apo con aperturas numéricas de 1.4).

No hay que confundir este concepto de resolución, que implica la capacidad de distinguir estructuras o detalles muy próximos en una preparación, con el concepto de resolución de imagen, que suele hacer referencia al nº de píxeles que contiene y, en algunos casos, también a la profundidad de dichos píxeles (8, 12 y 16 bit).

- Mayor contraste. Debido a que se elimina la luz procedente de las zonas fuera de foco.

- Posibilidad de realizar secciones ópticas. Restringiendo el tamaño del “pinhole” y variando el plano de enfoque mediante un eje Z motorizado, el sistema es capaz de tomar secciones ópticas a diferente profundidad, lo que permite obtener información tridimensional de la muestra. Esto a su vez tiene la ventaja de poder observar preparaciones de gran grosor (más de 100 μm), lo que en un microscopio de fluorescencia convencional resultaría imposible (normalmente se requieren grosores en torno a 10-20 μm).
- Reconstrucción 3D. A partir de esas secciones ópticas es posible visualizar las estructuras subcelulares en 3D.
- Reconstrucciones 4D. También es posible hacer estudios en 3D a lo largo del tiempo, tomando secciones ópticas durante un determinado tiempo a intervalos programados. Posteriormente, mediante el procesamiento de las imágenes, es posible realizar una película de video.
- Análisis de imágenes. La obtención de imágenes digitalizadas permite la aplicación de técnicas de análisis de imágenes como mejora de la calidad y combinación de imágenes, estudios de cambios en el tiempo (TimeLapse), medida de intensidades, medidas morfológicas, estereología, etc.

Las principales desventajas se pueden resumir en:

- La velocidad de captura de imágenes es inferior a la de los microscopios de fluorescencia convencionales,
- Al utilizar un “pinhole de detección” se selecciona una zona restringida del plano focal, con lo que la señal que pasa al fotomultiplicador es inferior a la detectada en microscopios de fluorescencia convencionales,
- Es necesario por tanto el uso de intensidades de excitación superiores, que son alcanzadas por los láser,
- Si a todo esto añadimos que se suelen adquirir secciones ópticas, el tiempo de exposición de las preparaciones a una fuente de luz de gran intensidad es superior al utilizado en microscopía convencional,

3.4 Aplicaciones de un microscopio confocal

- Marcaje con un único fluoróforo.

Es el caso más sencillo. Presenta las ventajas de no tener que restringir tanto el uso de los filtros y de las líneas de láser. Es posible además utilizar intensidades de láser y ganancias superiores al no estar presente el problema del sangrado espectral (bleed through). Sin embargo, es importante tener en cuenta la autofluorescencia que pueda tener el espécimen. Por último, permite el uso de un mayor número de fluoróforos que en el caso del uso simultáneo de diversas moléculas fluorescentes no se podrían utilizar.

Existen otras aplicaciones que no vamos a desarrollar ya que no las hemos utilizado, solo las vamos a nombrar:

- Fluorescencia y transmisión.
- Marcajes con múltiples fluoróforos
- Recuperación de la Fluorescencia Después del Fotoquemado (FRAP).
- Transferencia de Energía de Resonancia Fluorescente (FRET).
- Contaje de fotones (“Photon counting”)
- Barrido de una sola línea

Capítulo 4

4 Marcado de las vesículas

4.1 Fluorescencia

Cuando un fotón excita a un fluoróforo, sus niveles de energía electrónica y vibracional son elevados. Cuando el fluoróforo se relaja a su estado cero, el fluoróforo libera energía en forma de un fotón. Algo de la energía se pierde durante el proceso, así el fotón emitido por el fluoróforo es de menor energía (mayor longitud de onda) que el fotón absorbido (conocido como cambio Stokes o ley de Stokes). La intensidad y longitud de onda de la luz emitida dependerá tanto del fluoróforo como de su ambiente químico.

Cuando una luz de alta energía (longitud de onda corta por ejemplo UV o azul) es directamente enfocada en la preparación, la misma emite una longitud de onda mas larga de menor energía (por ej. verde o roja). El Diagrama de Jablonski que se ve a continuación (Figura 1) muestra las posibles rutas por las cuales una molécula excitada puede retornar a su estado basal, incluido el caso de existir un estado triplete inestable. Un rápido retorno resulta en fluorescencia y un retorno mas retardado resulta en fosforescencia.

Excitación: $S_0 + h\nu_{ex} \rightarrow S_1$

Fluorescencia (emisión): $S_1 \rightarrow S_0 + h\nu_{em}$; aquí, $h\nu$ es un término genérico para la energía del fotón con h = constante de Planck y ν = frecuencia de la luz.

Existen varios fluoróforos comercialmente disponibles para obtener imágenes microscópicas (por ejemplo, proteínas fluorescentes, puntos cuánticos (Quantum Dots), análogos lipídicos fluorescentes) los cuales difieren en sus características de excitación y emisión. Los fluoróforos se pueden describir también en términos de eficiencia del proceso fluorescente por ejemplo su rendimiento cuántico (el cociente del número de fotones emitidos entre el número de fotones absorbidos) y su tiempo de vida fluorescente (el tiempo que la molécula se mantiene en su estado de excitación antes de emitir un fotón). Los fluoróforos pueden ser dirigidos hacia estructuras específicas para la obtención de imágenes por transfección (por ejemplo, en el caso de la Proteína Fluorescente Verde en células vivas), por inmunohistoquímica, o por interacción de grupos químicos específicos con grupos objetivos en el espécimen (por ejemplo, el DAPI se une al DNA, y el grupo de isotiociano en fluoresceína isotiocianato se une a los amino grupos en las proteínas).

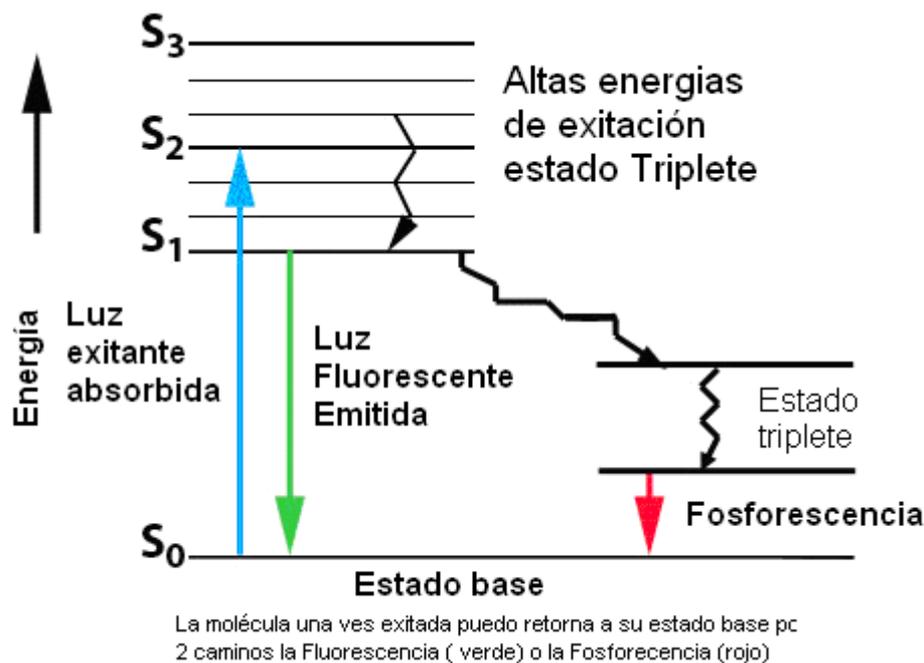


Figura 1: Diagrama de Jablonski

4.2 Aplicaciones

Los fluoróforos y su fluorescencia resultante brindan una forma extremadamente poderosa para brindar contraste en imágenes microscópicas, especialmente en ambientes biológicos. Se pueden obtener imágenes simultáneamente de diferentes estructuras celulares y moléculas usando fluoróforos múltiples mientras sus emisiones o tiempos de vida fluorescente se puedan distinguir claramente. Los fluoróforos habilitan el rastreo de moléculas sencillas usando TIRF, y la energía de transferencia entre fluoróforos se puede explotar en la identificación de moléculas que están interactuando cercanamente (FRET). El fotoquemado de fluoróforos es una técnica explotada en técnicas como FLIP y FRAP para monitorear el tráfico molecular en células vivas. Los fluoróforos también son importantes en identificación de minerales, contaminantes e impurezas en la ciencia de materiales, geología, inspección de semiconductores, y aplicaciones de ciencias ambientales.

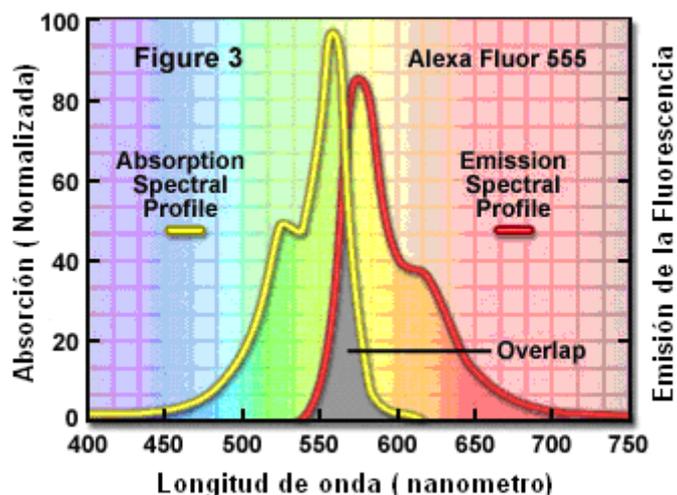


Figura 2: Ejemplo de la longitud de onda de absorción de un fluoróforo (amarillo) y la longitud de onda de emisión del mismo

4.3 Epi-fluorescencia con el microscopio

La microscopía de Epi-Fluorescencia es una técnica muy usada por los biólogos ya que es relativamente barata (comparada con la microscopía confocal) y rápida de utilizar en la inspección inmediata de una muestra. Involucra la marcación de la muestra con un fluoróforo. Una luz de alta energía (longitud de onda corta, por ejemplo UV o azul) es directamente enfocada en la preparación que emite una longitud de onda mas larga de menor energía (por ejemplo verde o roja)

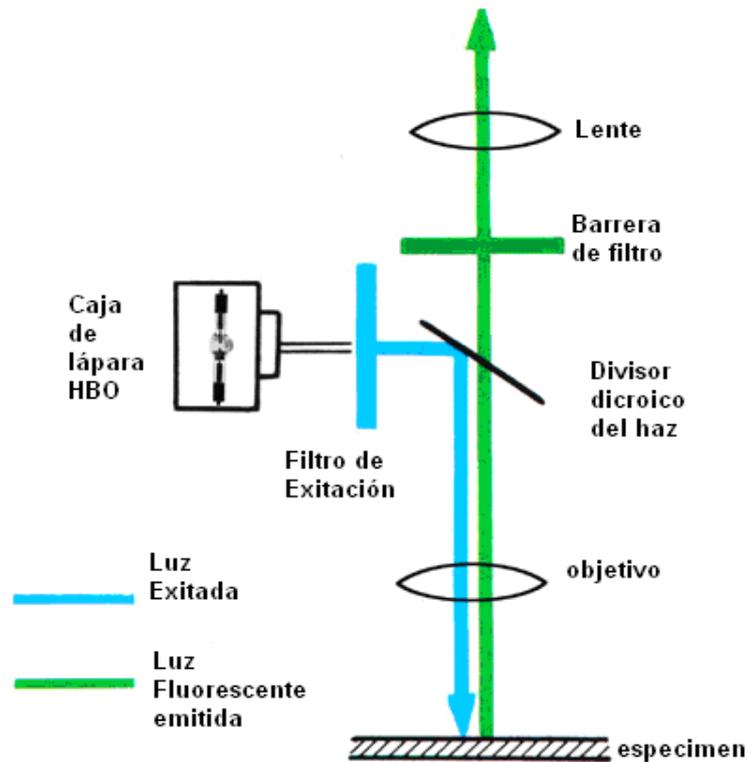


Figura 3: configuración de un microscopio de Epi-Fluorescencia

Los microscopios tradicionales usaban luz transmitida, inicialmente con fuentes de carbon o con lámparas de super-presión de mercurio de 200 watts. Actualmente se utiliza la epi-iluminación con una pequeña lámpara de mercurio o xenón de 50 a 100 watts, que es mucho más eficiente.

4.4 Marcado fluorescente en las Vesículas Unilamelares Gigantes.

El coeficiente de reparto (K) de una sustancia, también llamado coeficiente de distribución (D), o coeficiente de partición (P), es el cociente o razón entre las concentraciones de esa sustancia en las dos fases de la mezcla formada por dos disolventes inmiscibles en equilibrio. Por tanto, ese coeficiente mide la solubilidad diferencial de una sustancia en esos dos disolventes.

$$K = \frac{[sustancia]_1}{[sustancia]_2} \text{ donde}$$

[sustancia]₁ es la concentración de la sustancia en el primer disolvente y, análogamente **[sustancia]₂** es la concentración de la misma sustancia en el otro disolvente.

En el caso de una membrana que presenta coexistencia de fases, cada una de las fases en equilibrio puede considerarse como un disolvente con características fisicoquímicas distintas. En las Vesículas Unilamelares Gigantes a las que se ha añadido una pequeña cantidad de un análogo lipídico fluorescente, se observa que cuando hay coexistencia de fases la molécula fluorescente se particiona preferiblemente en una fase, es decir que por lo general K es distinto de uno.

En este trabajo utilizamos como marcador fluorescente el análogo lipídico DiIC18 (ver estructura química en la Figura 1). A pesar de contener dos cadenas saturadas largas (de 18 carbonos), la cabeza polar fluorescente de DiI resulta difícil de empaquetar en la fase líquido-ordenada, y en cambio puede disolverse sin mayores problemas en la fase líquido-desordenada. De esta manera, observamos en nuestras mezclas que los dominios de fase líquido-desordenado contienen una mayor concentración de DiI y por lo tanto se ven más brillantes que los dominios de fase líquido-ordenado.

Capítulo 5

5 Materiales y métodos

5.1 Lípidos

Los lípidos utilizados fueron

- 1,2- dioleoil-sn-glicero-3fosfocolina (DOPC)
- Esfingomielina de cerebro porcino (SM)
- Ceramidas de cerebro porcino (Cer)
- Colesterol (Chol)

Todos comprados a la empresa Avanti (EEUU) como polvo liofilizado y utilizados sin posterior tratamiento.

5.2. Azúcares

Se utilizaron glucosa y sacarosa de Merck.

5.3 Marcador fluorescente

Se utilizó como marcador el análogo lipídico DiIC18 (3) de Invitrogen la cual posee las siguientes características

Name(s): DiIC18(3), DiI
IUPAC-name:
CAS-Number: 41085-99-8
Substance Class:
Molecular weight: 933,88 g/mol
Chemical formula: C₅₉H₉₇ClN₂O₄
References:
Internal Substance ID: 234

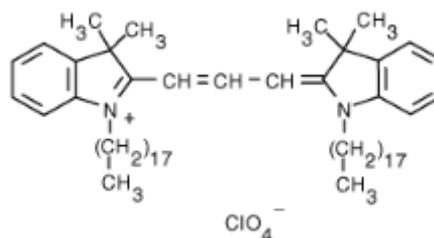


Figura 1: estructura química de DiIC18

La cual posee una banda de Emisión y Absorción mostradas en la siguiente tabla:

Excitación		Emisión	
λ_{\max} [nm]	ϵ [l mol ⁻¹ cm ⁻¹]	λ_{\max} [nm]	Rendimiento Quántico [%]
520.0		569.0	20%
551.0			
Solventes/Buffer: Membranas lipídicas		Solventes/Buffer: Membranas lipídicas	

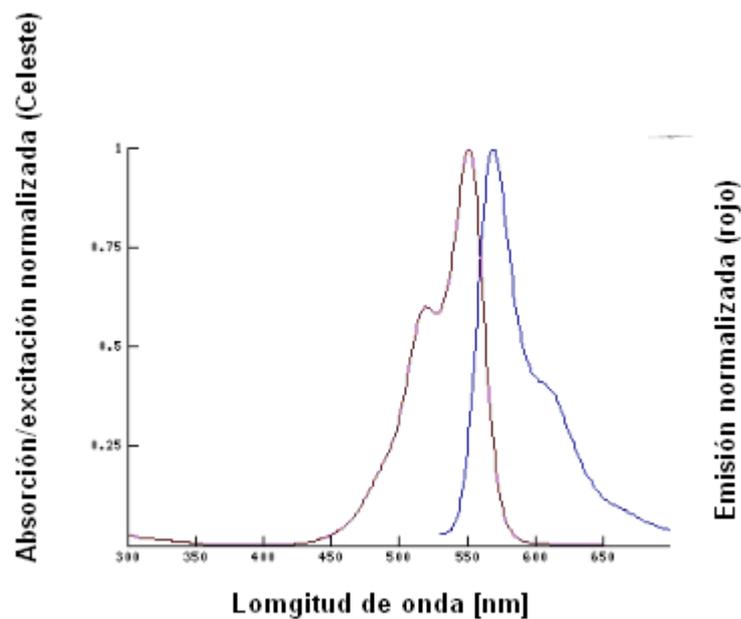


Figura 1: Diagrama de emisión y absorción del marcador DiIC18

5.4 Preparación de mezclas lipídicas

Se prepararon soluciones stock (3-5mM) de los lípidos en cloroformo: metanol 2:1.

Se realizaron 7 mezclas diferentes en cloroformo: metanol 2:1 a partir de las soluciones stock. La concentración final de lípidos en las mezclas fue de 1,64 mM. Se agregó a las mezclas la sonda fluorescente DiI en una relación lípido: sonda 100:0,1 mol:mol.

Las mezclas realizadas fueron las detalladas mas abajo según la proporción de moles de cada lípido DOPC:BSM:BCer:Chol

- 1) 4 : 4 : 0 : 2 (0% Bcer)
- 2) 4 : 3,5 : 0,5 : 2 (5% Bcer)
- 3) 4 : 3 : 1 : 2 (10% Bcer)
- 4) 4 : 2,75 : 1,25 : 2 (12,5% Bcer)
- 5) 4 : 2,5 : 1,5 : 2 (15% Bcer)
- 6) 4 : 2,25 : 1,75 : 2 (17,5% Bcer)
- 7) 4 : 2 : 2 : 2 (20% Bcer)

5.5 Celda de electroformación

Estas celdas son las utilizadas para formar las vesículas (GUVs), las mismas son de material de teflón para que no se adhieran las vesículas una vez formadas y poseen dos alambres de platino para colocar los lípidos que formaran la vesícula. Más adelante se explicará su funcionamiento.



Figura 2: foto de las celdas utilizadas en el Laboratorio

5.6 Cámara portamuestra

Las cámaras o chambers son recipientes circulares de metal. Constan de 2 partes: una base sobre la cual se le coloca el vidrio (un cubreobjetos circular) en donde se depositarán las vesículas, una vez formadas, para observarlas en el microscopio y una tapa a rosca en la cual se coloca un segundo cubreobjetos, entre medio de ambos vidrios se coloca un O-ring que es como una arandela de goma que se utiliza para que quede un espacio donde depositar la muestras y no se escape el material por los lados. Ver en la figura 2.

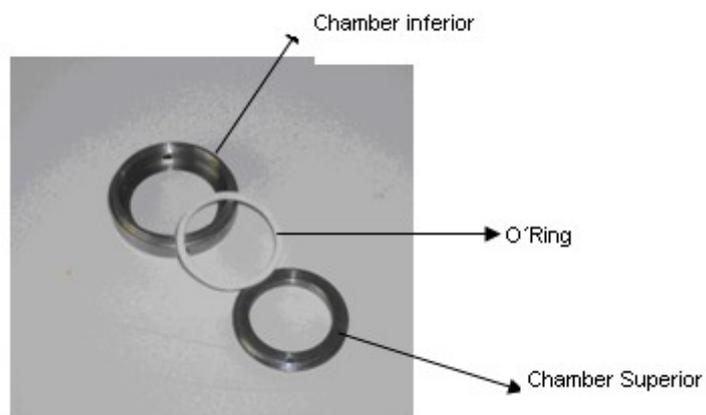


Figura 3: Chambers y O'ring usados en el laboratorio

5.7 Microscopio

Se utilizó un microscopio Multi-haz, que incluye Disc Scanning Confocal Microscopy (DSCM) (de “Escaneo de disco”) marca Olympus Modelo IX81



Figura 4: microscopio Olympus usado en el laboratorio

5.8 Control de la temperatura en el microscopio

Para poder mantener la temperatura de la muestra a los valores deseados se utilizó un controlador de temperatura Harvard modelo TC-202A como se puede apreciar en la fotografía.



Figura 5: Baño para las muestras

5.9 Componentes anexados al Calentador

En la puesta a punto del equipo de medición (microscopio y calentador) se presentó un inconveniente. A pesar de que los calentadores estuvieran calibrados para temperaturas mayores a los 40°C, al pasar ésta temperatura los mismos empezaban a perder calor y la temperatura que indica el display no era la que realmente alcanzaba la muestra.

Para solucionar este problema se ideó una caja aislante de telgopor la cual cubrió por encima el calentador y en la base del mismo se colocó una capa fina de telgopor para aislarlo del contacto con el microscopio, ésta capa debía ser muy fina ya que si no los objetivos de inmersión no llegan hacer foco con la muestra.

Para tener una lectura exacta de la temperatura de la muestra se le colocó a ésta un termómetro eléctrico (se explicará mejor más adelante), (ver foto).



Figura 6: arreglo experimental en el microscopio para conservar la temperatura

5.10 Osmómetro

Se denomina osmómetro al aparato utilizado para determinar la osmolaridad de las soluciones, es decir, las concentraciones efectivas de solutos que causan la presión osmótica. Algunos osmómetros, como el que utilizamos, no emplean medidas de presión osmótica sino otras propiedades coligativas que conducen a resultados más exactos.

Mediante el osmómetro se midió la osmolaridad de las soluciones de glucosa y sacarosa utilizadas en la preparación de las vesículas. El equipo utilizado es un osmómetro de vapor marca WESCOR - VAPRO (vapor- pressure – osmometer) modelo 5520



Figura 7: Osmómetro de vapor

Capítulo 6

6. Preparación de las GUVs

6.1 Electroformación:

Primero se procede a la limpieza de las celdas de teflón con alcohol y posteriormente se las deja sonicando uno 20 minutos. Una vez secas completamente se procede a colocar la parte superior de las celdas, las cual posee los alambres de platino, en un baño seco a 40°. Con una micropipeta de 20 ul, se procede a extraer la muestra y con mucha precisión se colocan 3 gotas de aproximadamente 10ul en cada alambre separadas las unas de las otra (ver figura) y se deja evaporar el cloroformo-metanol unos minutos, quedando adherido al alambre de platino una capa de lípido concentrado. Una vez evaporado el solvente se coloca en la otra parte de la capsula (la parte hueca) una solución de sucrosa 200 mM, se cierra la cápsula quedando sumergido los alambres en la solución de sucrosa.

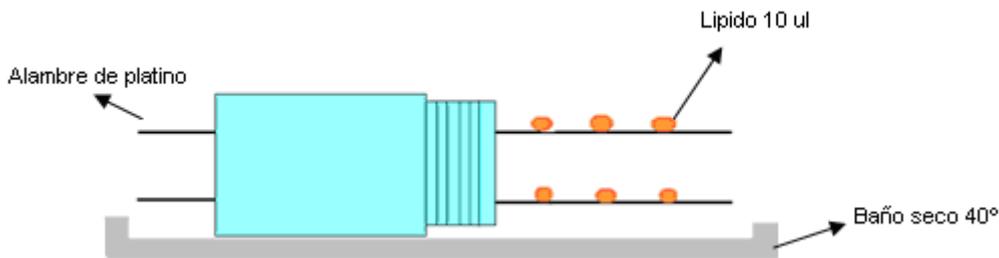


Figura 1: parte superior de las celdas montadas sobre un baño seco

Luego procedemos a envolver las cápsulas con cinta de teflón para evitar la evaporación del buffer durante la electroformación. Se colocan las cápsulas en un baño seco a unos 65° de temperatura aproximadamente. Los extremos de los alambres de platino que quedan en el exterior se los conecta a un generador de onda senoidal a una frecuencia de 10-12 Hz y una amplitud de 2.5 V y se lo deja a electroformar por aproximadamente 3hs.

Esta onda alterna a que se someten los lípidos hace que estos se muevan ligeramente, facilitando la penetración de agua dentro de la película de lípido seca. Al hidratarse los lípidos, se forman espontáneamente vesículas unilamelares gigantes (1-100 micras de diámetro).

Se utilizan concentraciones de lípidos muy grandes por que cuando la cantidad de lípido es muy baja, las vesículas formadas no son homogéneas. Por ejemplo algunas tienen mucho colesterol y otras poco. Esto ocurre porque cuando las concentraciones de lípidos son bajas, al evaporarse el cloroformo inicialmente antes que el metanol, hace que el colesterol se vaya precipitando sobre el alambre antes que los otros componentes de la muestra, quedándonos en vez de una mezcla homogénea, tres capas separadas de lípidos en los alambres. Con altas concentraciones nos aseguramos la homogeneidad de las vesículas.

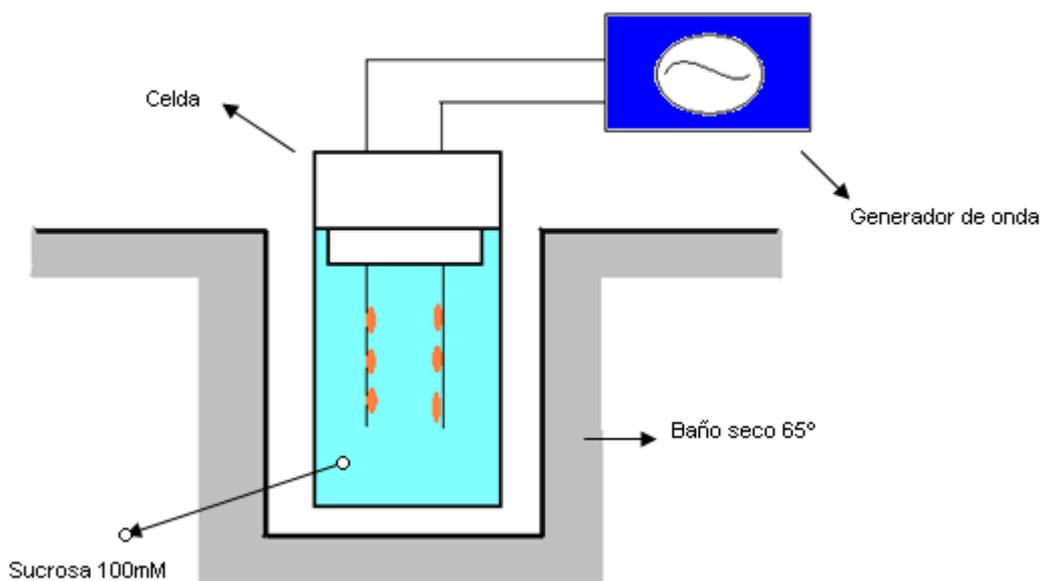


Figura 2 : la celda cerrada con la sucrosa, colocada a electroformar

6.2 Montaje de la muestra

Una vez pasadas las 3 hs de electroformación se disminuye la frecuencia del generador de ondas a 2 Hz y se lo deja actuar por 5 min, esto es para que las vesículas ya formadas se despeguen del alambre y queden suspendidas en la sucrosa. Después se sacan las celdas y se abren las mismas notando que se han formado pequeños cúmulos de lípidos en la sucrosa.

Por otro lado se preparan las cámaras con los correspondientes cubre objetos y se le coloca un O-ring que servirá de contenedor de la muestra (ver figura) , sobre el vidrio se coloca una muestra de las vesículas ya preparadas en las celdas, esto se hace mediante el pipeteo de las vesículas cuidadosamente para no romperlas y luego se le agrega una solución de glucosa 200 mM , los volúmenes utilizados deben ser tal que el volumen final de la solución vesículas-glucosa sea 4 veces mayor al volumen de la muestra de vesículas sola. Por último se coloca el cubre objetos en la parte superior encapsulando la solución glucosa-vesículas y se cierra la cámara.

Al agregar la solución de glucosa lo que hacemos es que las vesículas se precipiten en el fondo del porta objeto para poder observarlas mejor, esto ocurre gracias a que la glucosa es menos densa que la sacarosa.

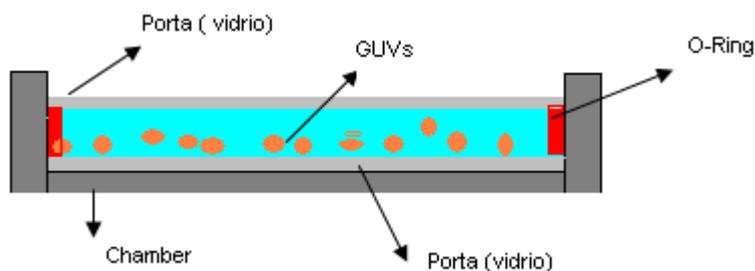


Figura 3: montaje de las vesículas en los chamber

6.3 Montaje en el microscopio

Ya teniendo las muestras preparadas procedemos a montar en el microscopio.

Se utiliza un baño térmico (descrito mas arriba). Como debemos medir temperaturas por encima de 40°C, a medida que se fue midiendo se observó que la temperatura del baño no era la que indicaba el mismo. Para solucionar este problema se decidió colocar una base de un aislante fino en la base del calentador con un orificio que permitiese pasar el objetivo del microscopio, y en la superficie se le fabricó una caja de telgopor para aislarlo del ambiente. Para tener una lectura exacta de la temperatura de las vesículas en el microscopio se colocó una termocupla dentro de la muestra como se puede observar en la figura.

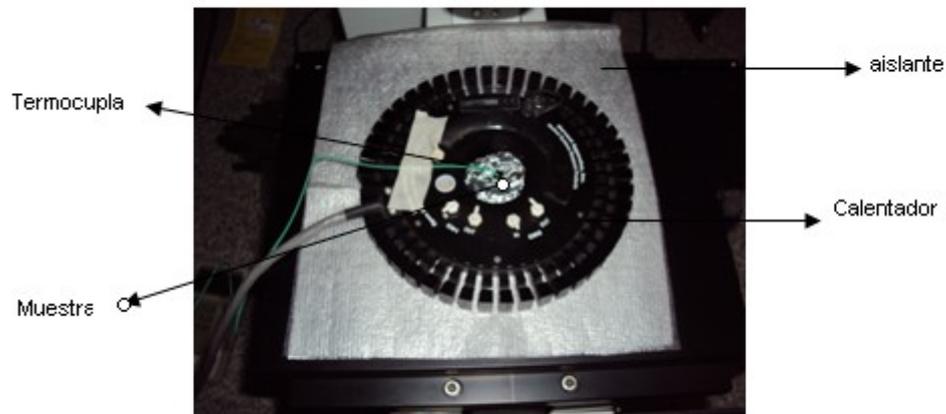


Figura 4: fotografía del arreglo experimental en el microscopio

6.4 Proceso de Medición

El proceso de medición se realizó de la siguiente manera:

Una vez preparado todo el montaje del microscopio, a las muestras (vesículas) se las colocó a una temperatura a la cual se las iba a fotografiar, al alcanzar la temperatura deseada se dejó estabilizar unos minutos y se procedió a la fotografía de las mismas. Este procedimiento se repitió en cada temperatur

Capítulo 7

7 Resultados y Discusión

7.1 Resultados

Para registrar los cambios de fase producidos por temperatura, se modificó la temperatura de la muestra utilizando un baño térmico (ver detalles del instrumental en la sección Materiales y Métodos). Se procedió a registrar la población de vesículas a cada temperatura por medio de fotografías confocales en el plano del polo inferior de las vesículas (cerca del vidrio) y en el plano del ecuador de las vesículas, para cada muestra y cada temperatura. La temperatura se varió en pasos de dos grados centígrados, comenzando en 28° C. La temperatura máxima que nos permitió alcanzar nuestro equipo y los anexos que instalamos fue de 44°C. Luego de cada modificación de la temperatura, se incubó la muestra durante 5 minutos para alcanzar el equilibrio antes de tomar las fotografías.

A continuación se muestran los resultados obtenidos para cada muestra. Se grafica el porcentaje de vesículas con dominios sobre el total de vesículas que pueden distinguirse adecuadamente en cada muestra y cada temperatura. El número total de vesículas analizadas para cada punto del gráfico es de aproximadamente 80. A modo de ilustración se muestra en cada gráfico una fotografía típica obtenida a una temperatura baja (aprox 28°C) y a una temperatura alta (aprox. 44°C).

En general observamos que a temperaturas bajas el número de vesículas con dominios es de alrededor de 90%. Alcanzada una cierta temperatura, de un valor cada vez mayor a medida que aumenta la concentración de ceramidas en la muestra, el porcentaje de vesículas con dominios disminuye bruscamente, hasta alcanzar valores alrededor del 5%. Esta temperatura es la correspondiente a la T_m , la temperatura de transición de fase de la muestra.

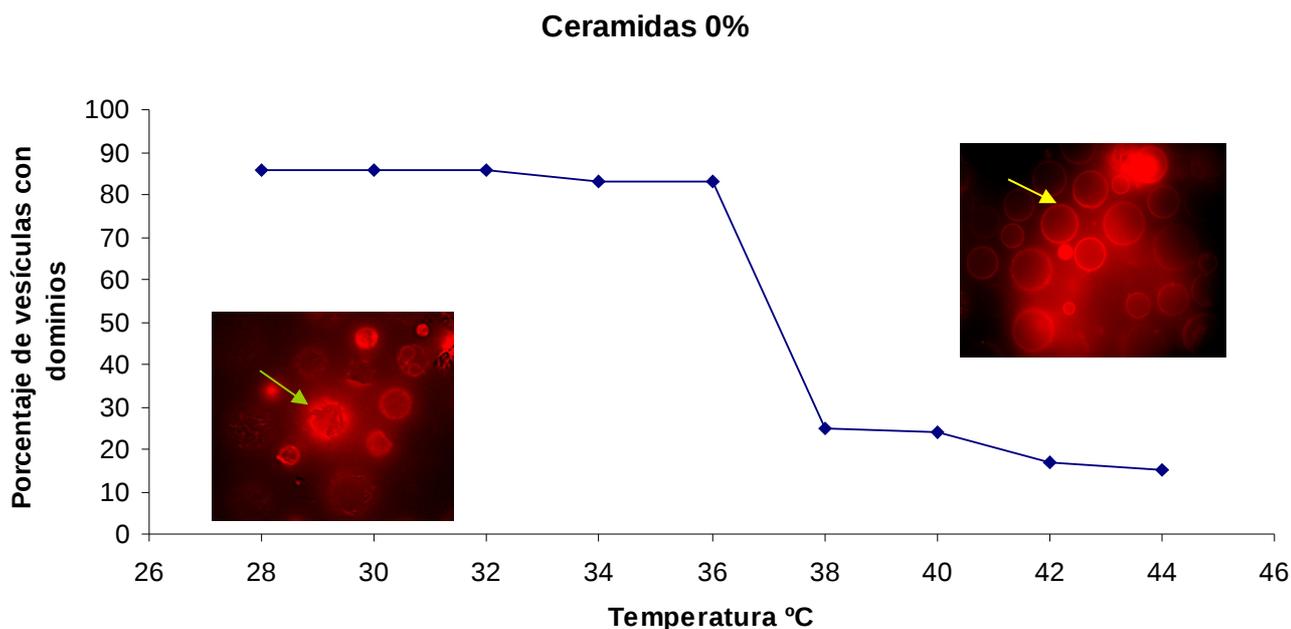


Figura 1. Porcentaje de GUVs que muestran dominios en función de la temperatura para la muestra conteniendo DOPC:BSM:Cer:Chol (4: 4 : 0: 2). En los insertos, imágenes representativas de microscopía confocal de fluorescencia a temperaturas bajas y altas. En la imagen a T alta, se muestra lo que típicamente se observa en el ecuador de las vesículas. Las muestras contienen 0,2% de DiIc18. La flecha verde indica una vesícula con dominios, la flecha amarilla indica una vesícula sin dominios.

Como se observa en la Fig. 1, el porcentaje de vesículas con dominios es de aproximadamente 90% a todas las temperaturas por debajo de 36°C. Entre 36°C y 38°C tiene lugar la transición de fase. Por encima de estas temperaturas el porcentaje de vesículas con dominios es de entre 30 y 10% disminuyendo a medida que aumenta la temperatura. Este rango de temperaturas para la transición de fase coincide con lo observado por calorimetría para estas mismas mezclas [1], ver (Anexo II), excepto que por calorimetría las transiciones de fase parecen ocurrir en un rango de temperaturas mas amplio, de aproximadamente 20 grados centígrados, mientras que aquí la transición aparece muy cooperativa y se completa en un rango de 2 grados centígrados.

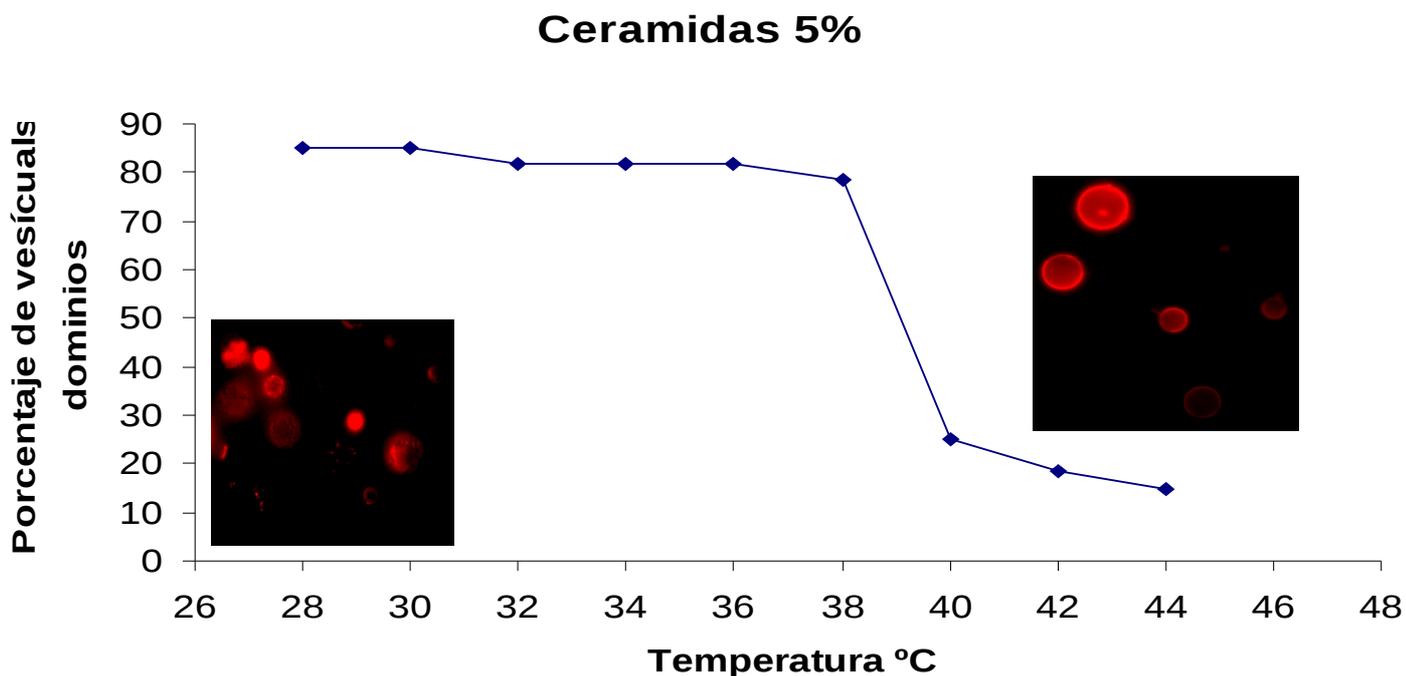


Figura 2. Porcentaje de GUVs que muestran dominios en función de la temperatura para la muestra que contiene DOPC:BSM:Bcer:Chol (4: 3,5: 0,5: 2).En los insertos, imágenes representativas de microscopía confocal de fluorescencia a temperaturas bajas y altas. Las muestras contienen 0,2% de DiIC18

Como se observa en la Fig. 2, el porcentaje de vesículas con dominios es de aproximadamente 90% a todas las temperaturas por debajo de 38°C. Entre 38°C y 40°C tiene lugar la transición de fase. Por encima de estas temperaturas el porcentaje de vesículas con dominios es de entre 30 y 10% disminuyendo a medida que aumenta la temperatura. Observamos que T_m ha aumentado en 2°C con respecto a la observada en la muestra que no contiene ceramidas.

Ceramidas 10%

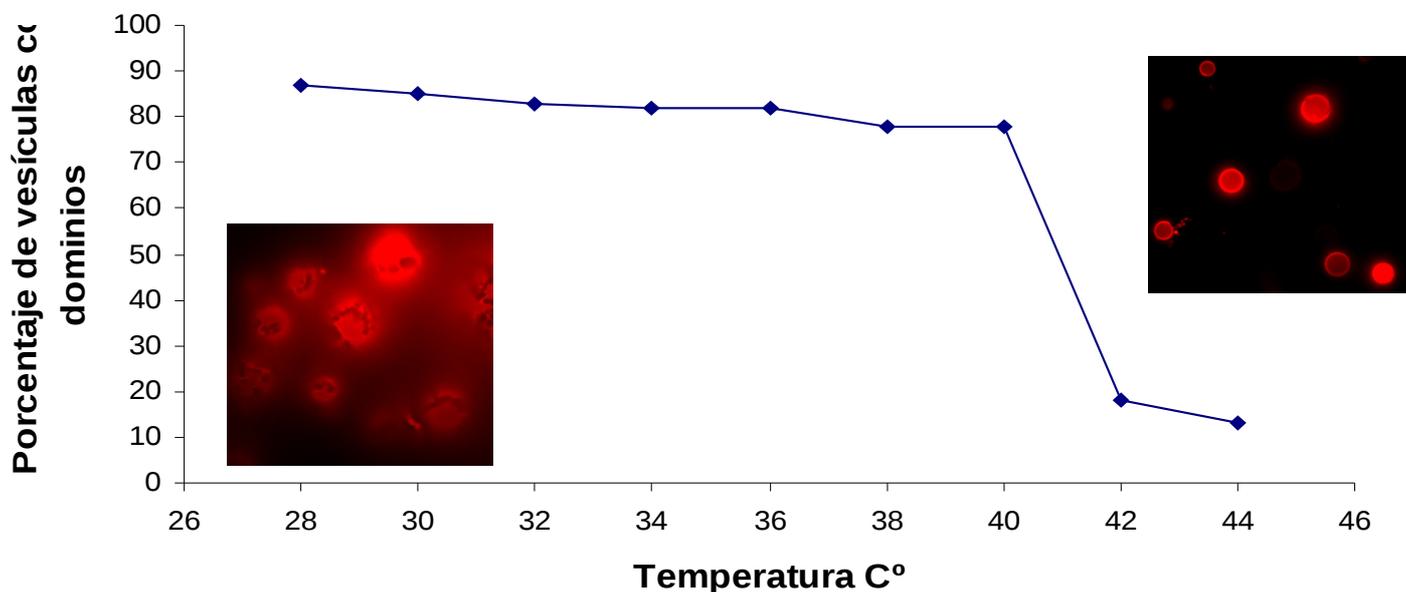


Figura 3. Porcentaje de GUVs que muestran dominios en función de la temperatura para la muestra que contiene DOPC:BSM:Bcer:Chol (4: 3 : 1: 2) . En los insertos, imágenes representativas de microscopía confocal de fluorescencia a temperaturas bajas y altas. Las muestras contienen 0,2% de DiIC18. En el inserto a T bajas, se muestra una imagen obtenida en el polo de las vesículas.

Como se observa en la Fig. 3, el porcentaje de vesículas con dominios es de aproximadamente 90% a temperaturas bajas y disminuye hasta el 80% justo antes de la transición de fase. Entre 40°C y 42°C tiene lugar la transición de fase. Por encima de estas temperaturas el porcentaje de vesículas con dominios es de entre 20 y 10% disminuyendo a medida que aumenta la temperatura. Observamos que T_m ha aumentado en 2°C con respecto a la observada en la muestra que contiene 5% de ceramidas. La T_m coincide bien con la medida por calorimetría para esta misma muestra [1], (ver Anexo II), excepto que por calorimetría las transiciones de fase parecen ocurrir en un rango de temperaturas de aproximadamente 20 grados centígrados, mientras que aquí la transición aparece muy cooperativa y se completa en un rango de 2 grados centígrados

Ceramidas 12,5%

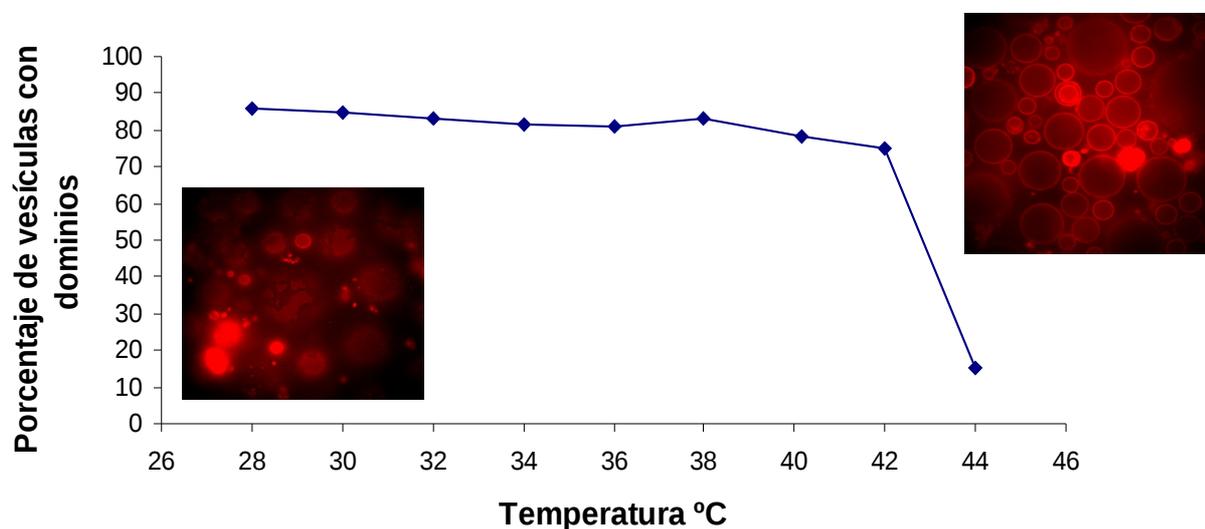


Figura 4. Porcentaje de GUVs que muestran dominios en función de la temperatura para la muestra que contiene DOPC:BSM:Bcer:Chol (4: 2,75: 1,25: 2). En los insertos, imágenes representativas de microscopía confocal de fluorescencia a temperaturas bajas y altas. Las muestras contienen 0,2% de DiIC18.

° Como se observa en la Fig. 4, el porcentaje de vesículas con dominios es de aproximadamente 90% a temperaturas bajas y disminuye hasta el 80% justo antes de la transición de fase. Entre 42°C y 44°C tiene lugar la transición de fase. Por encima de estas temperaturas nuestro equipo ya no nos permite medir. Observamos que T_m ha aumentado en 2°C con respecto a la observada en la muestra que contiene 10% de ceramidas.

Ceramidas 15%

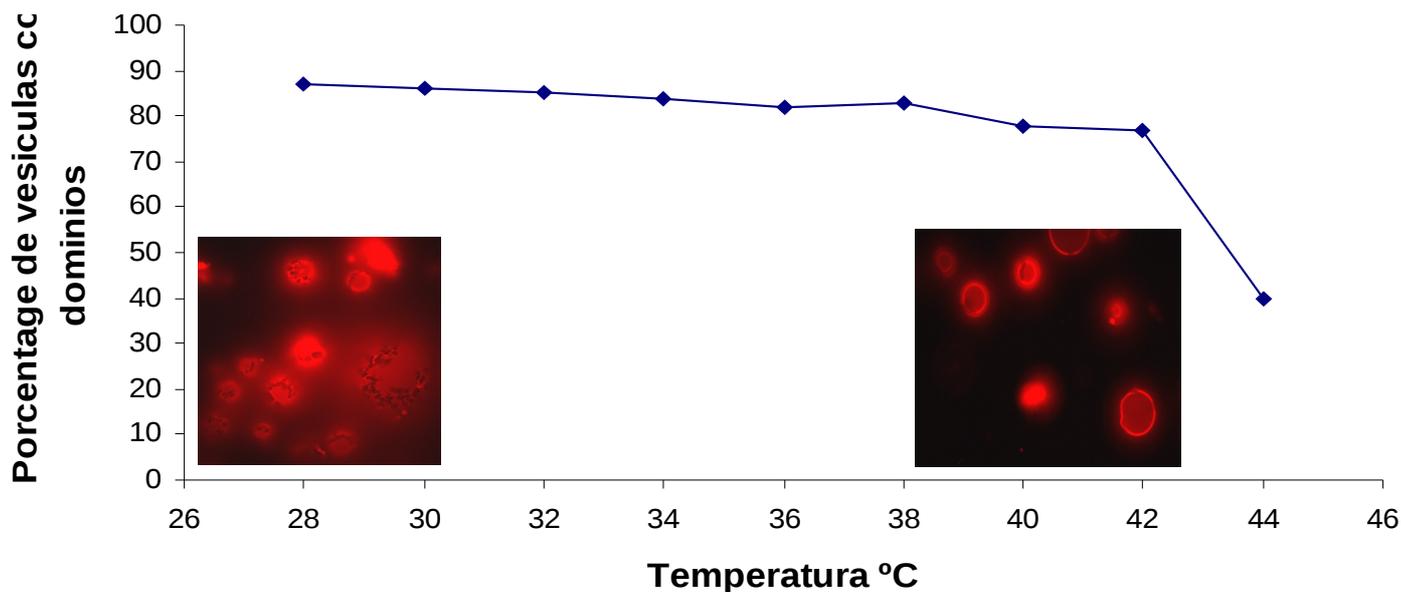


Figura 5. Porcentaje de GUVs que muestran dominios en función de la temperatura para la muestra que contiene DOPC:BSM:Bcer:Chol (4: 2,5: 1,5: 2). En los insertos, imágenes representativas de microscopía confocal de fluorescencia a temperaturas bajas y altas. Las muestras contienen 0,2% de DiIC18.

Como se observa en la Fig. 5, el porcentaje de vesículas con dominios es de aproximadamente 90% a temperaturas bajas y disminuye hasta el 80% justo antes de la transición de fase. Entre 42°C y 44°C parece comenzar la transición de fase. Por encima de estas temperaturas nuestro equipo ya no nos permite medir. A pesar de esto, los datos obtenidos permiten deducir que la transición es menos cooperativa en este caso (parecen ser necesarios más de dos grados centígrados para completar la transición). Observamos que la transición de fase comienza a la misma temperatura que en la muestra que contiene 12,5% de ceramidas, sin embargo no alcanza a completarse en el rango de temperaturas observada. La menor cooperatividad de la transición, en este caso, coincide con lo observado por calorimetría, donde la transición de fase transcurre en un pico amplio que comienza a 25 y termina a 44 grados centígrados.

Además, las imágenes muestran la presencia de dominios que excluyen por completo a la sonda lipídica fluorescente y que deforman la superficie de las vesículas como si fueran objetos rígidos. Esto indica la presencia de dominios de fase gel, sólidos y de alta viscosidad.

Ceramidas 17,5%

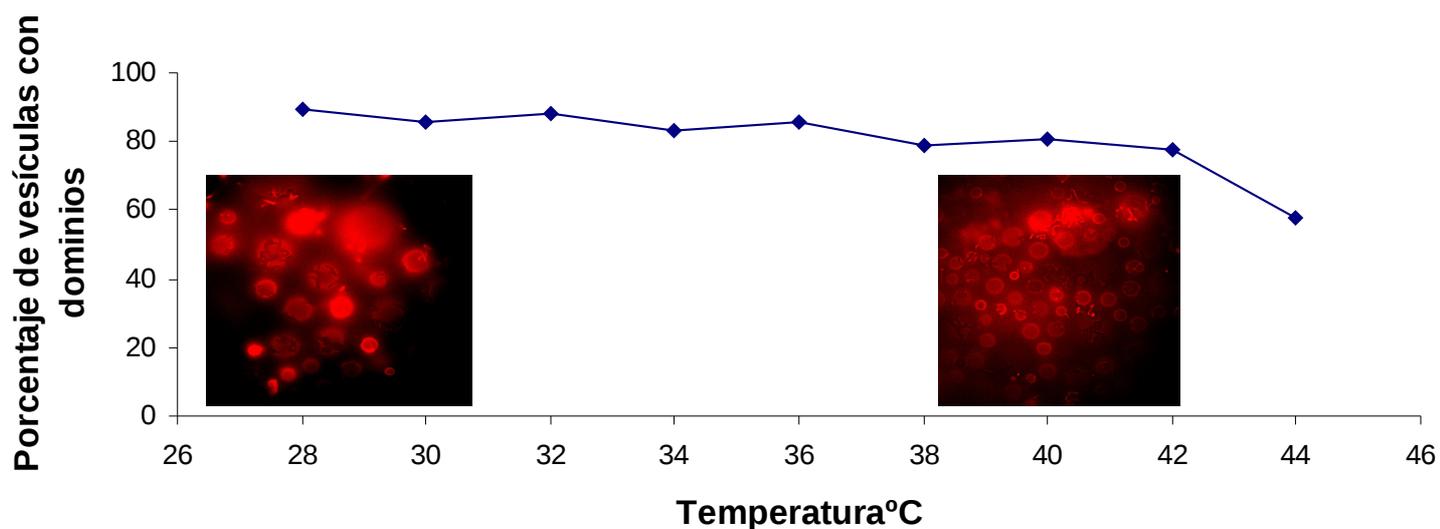


Figura 6. Porcentaje de GUVs que muestran dominios en función de la temperatura para la muestra que contiene DOPC:BSM:Bcer:Chol (4: 2,25: 1,75: 2). En los insertos, imágenes representativas de microscopía confocal de fluorescencia a temperaturas bajas y altas. Las muestras contienen 0,2% de DiIC18.

Como se observa en la Fig. 6, el porcentaje de vesículas con dominios es de aproximadamente 90% a temperaturas bajas y disminuye hasta el 80% a 42°C. Entre 42°C y 44°C parece comenzar la transición de fase. Por encima de estas temperaturas nuestro equipo ya no nos permite medir. Observamos que la transición de fase comienza a la misma temperatura que en la muestra que contiene 15% de ceramidas, sin embargo no sólo no alcanza a completarse en el rango de temperaturas observada, sino que a 44°C todavía un 60% de las vesículas presentan dominios, comparado con un 40% en el caso de la muestra con 15% de Ceramidas. Esto indica que T_m es más alta en el caso de la muestra con más ceramidas.

Nuevamente las imágenes muestran la presencia de dominios que excluyen por completo a la sonda lipídica fluorescente y que deforman la superficie de las vesículas como si fueran objetos rígidos, indicando la presencia de dominios de fase gel, sólidos y de alta viscosidad.

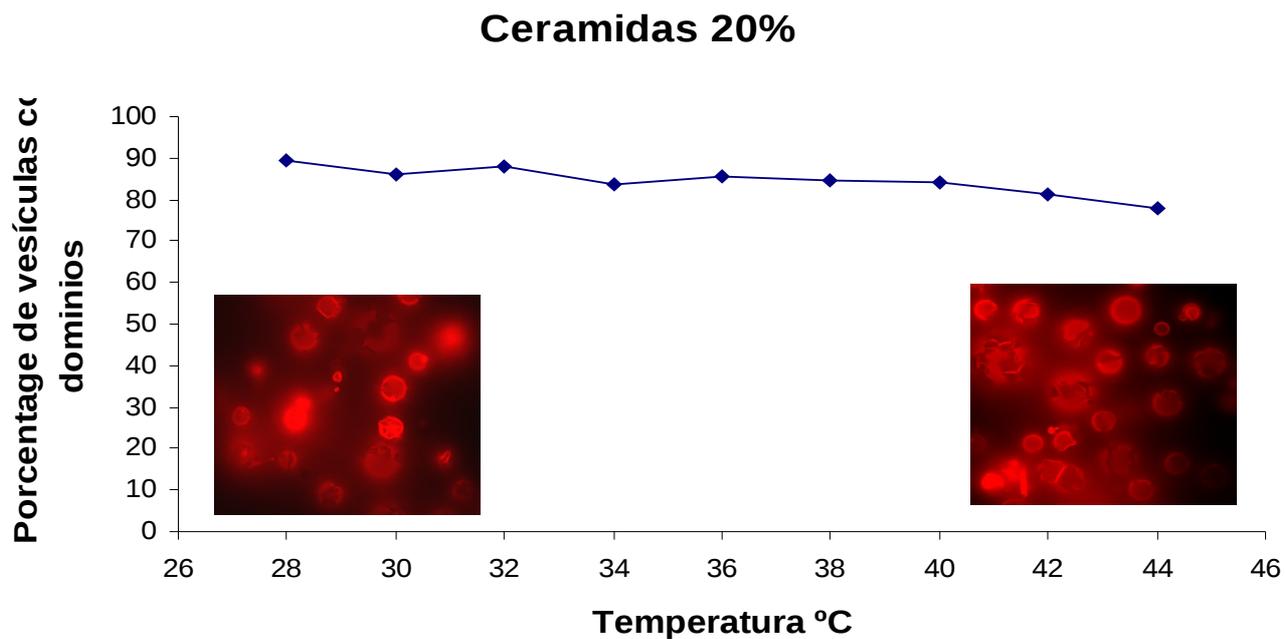


Figura 7. Porcentaje de GUVs que muestran dominios en función de la temperatura para la muestra que contiene DOPC:BSM:Bcer:Chol (4: 2: 2: 2). En los insertos, imágenes representativas de microscopía confocal de fluorescencia a temperaturas bajas y altas. Las muestras contienen 0,2% de DiIC18.

Como se observa en la Fig. 7, el porcentaje de vesículas con dominios es de aproximadamente 90% a temperaturas bajas y disminuye hasta el 80% a 44°C. En esta muestra nuestro equipamiento no nos permite observar el comienzo de la transición de fase. Esto está solo parcialmente en consonancia con lo observado por calorimetría, donde la transición de fase comienza a 30 grados y termina a 50 grados centígrados aproximadamente.

Las imágenes muestran la presencia de dominios que excluyen por completo a la sonda lipídica fluorescente y que deforman la superficie de las vesículas como si fueran objetos rígidos, indicando la presencia de dominios de fase gel, sólidos y de alta viscosidad. Para ver la morfología de las vesículas con más detalle, ver Apéndice I.

7.2 Discusión

Como hemos visto, los experimentos antes realizados observamos que: las temperaturas de las transiciones de fase son dependientes de la concentración de ceramidas. Para las concentraciones de 0% , 5% , 10% , 12,5% se ha podido observar bien marcada dicha transición , no siendo así para las concentraciones de 15%, 17,5%, 20 % ya que el sistema experimental no lo permitía , se podrían medir dichas transiciones en un futuro teniendo un baño térmico con el cual se pudiese alcanzar temperaturas por encima de los 44 grados.

La forma geométrica de los dominios y su capacidad de excluir a la sonda fluorescente también depende de la concentración de ceramidas en la muestra. Para mas detalles, ver Apéndice I.

No hemos podido realizar películas para observar la dinámica de los dominios en la temperatura de transición de fases ya que era muy difícil el medir rangos de temperaturas por debajo del grado centígrado de apreciación, con nuestros instrumentos de medición, para poder hacer ese tipo de trabajo de requiere de un equipo de más precisión, el cual se pueda variar la temperatura de la muestra en menor escala, manteniendo la temperatura estable de la muestra para poder fotografiarla.

Otro cosa que se podría hacer para tener una mejor medición en el futuro es el optar por usar otro marcador, el cual para concentraciones de ceramidas altas pueda mostrar mejor los dominios de las vesículas.

7.3 Conclusiones

Dominios: Mediante los experimentos podemos concluir para una muestra de DOPC:Bsm: Bcer : Chol: por debajo de la transición de fase las vesículas exhiben dos fases bien diferenciadas una mayormente con lípido saturados y otra insaturados, donde la forma de los dominios varía al cambiar la temperatura y también con el porcentaje de ceramidas .

Transiciones de fase: En los experimentos se pudo observar que la transición de fase es dependiente de la cantidad de ceramidas en una muestra, dando que a mayor cantidad de ceramidas mayor es la temperatura de la transición de fase. Al contrario de lo observado por calorimetría, las transiciones de fase parecen ocurrir en un rango muy angosto de 2 grados centígrados de temperatura, en especial para las muestras con bajas concentraciones de ceramidas. En las muestras con una mayor cantidad de ceramidas la consonancia con la calorimetría es mejor. Queda por resolver el porqué de esta discrepancia.

Anexo I

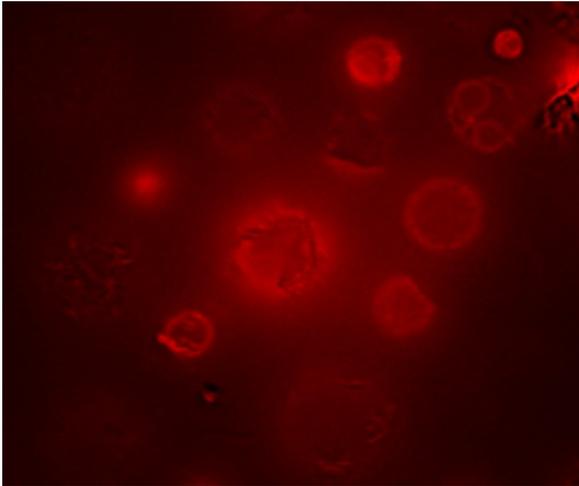


Figura 1 GUVs DOPC:BSM:Cer:Chol (4: 4 : 0: 2)
a 28° C

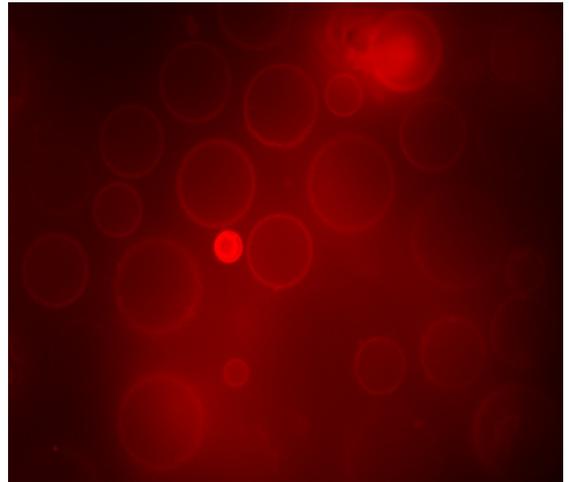


Figura 2 GUVs DOPC:BSM:Cer:Chol (4: 4 : 0: 2)
a 44° C

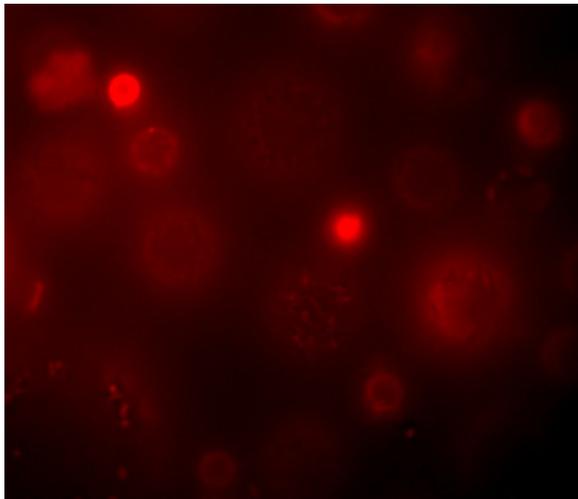


Figura 3 GUVs DOPC:BSM:Cer:Chol (4: 3,5 : 0,5: 2)
a 28° C

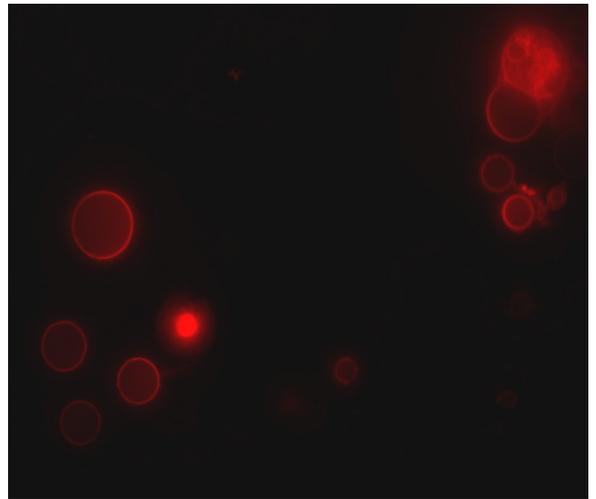


Figura 4 GUVs DOPC:BSM:Cer:Chol (4: 3,5 : 0,5: 2)
a 44° C

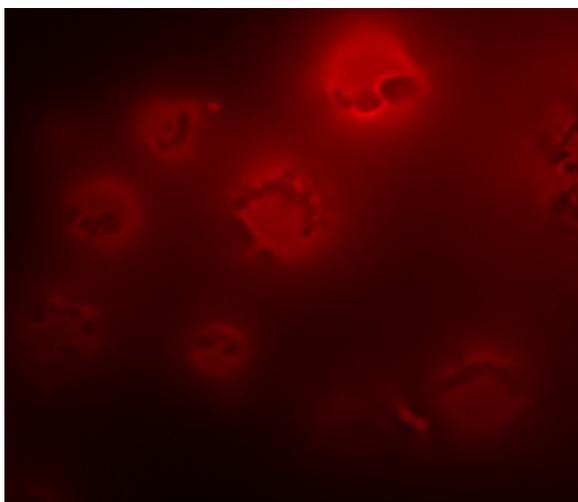


Figura 5: GUVs DOPC:BSM:Cer:Chol (4: 3 : 1: 2)
a 28° C

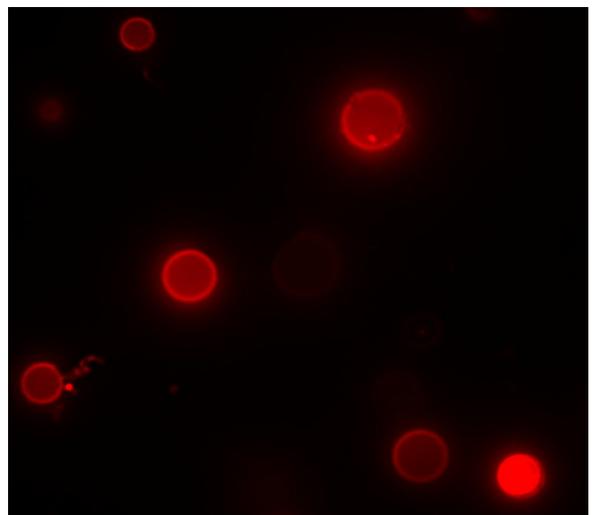


Figura 6: GUVs DOPC:BSM:Cer:Chol (4: 3 : 1: 2)
a 44° C

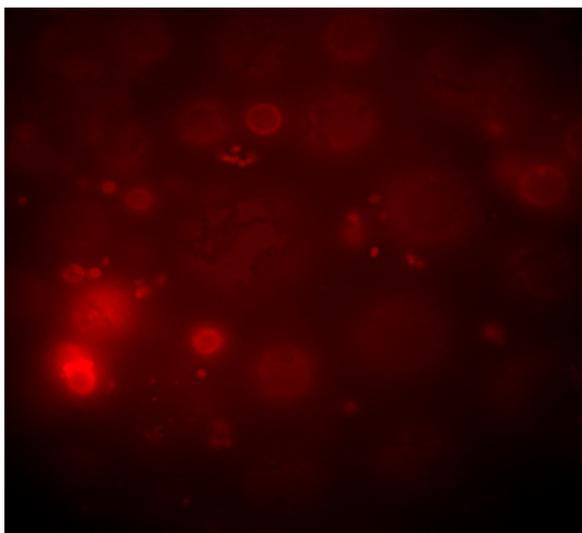


Figura 7: GUVs DOPC:BSM: Cer: Chol (4: 2,75 : 1,25: 2) a 28° C

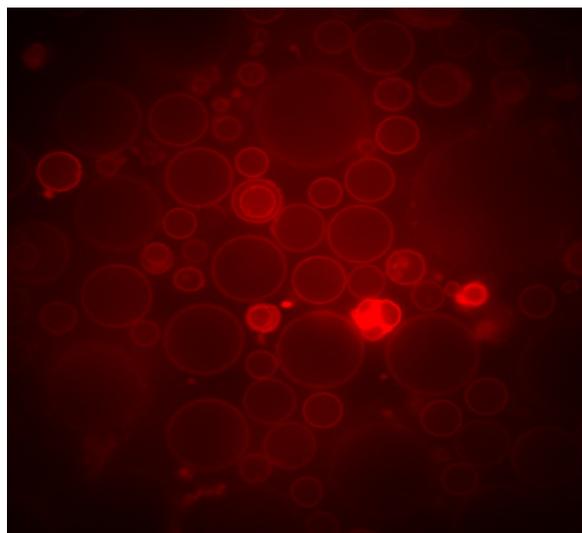


Figura 8: GUVs DOPC:BSM: Cer: Chol (4:2:,75:1,25:2) a 44° C

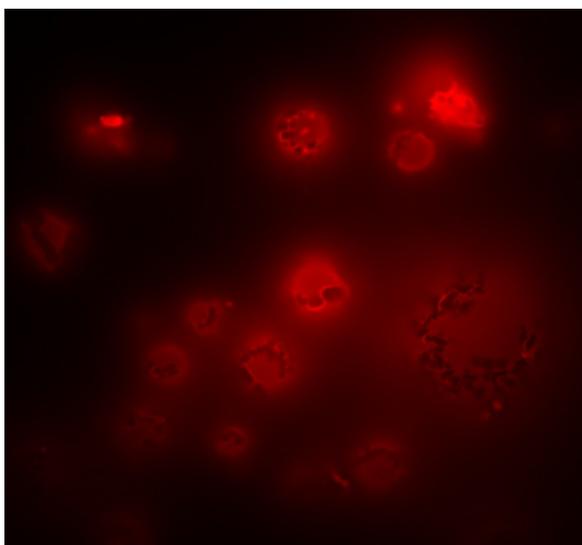


Figura 10: GUVs DOPC:BSM: Cer: Chol (4: 2,5 : 1,5: 2) a 28° C

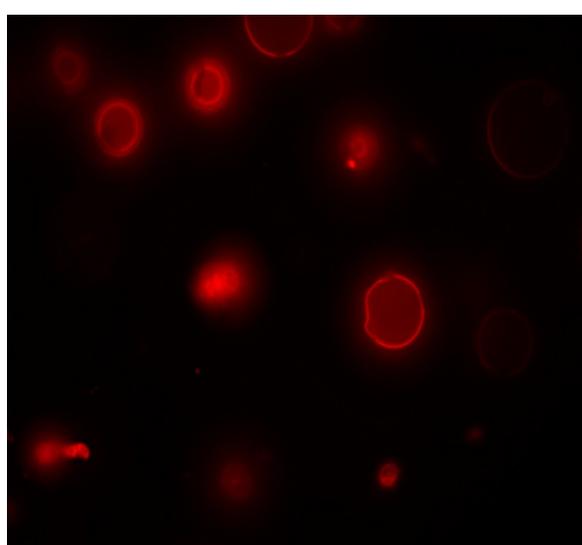


Figura 9: GUVs DOPC:BSM: Cer: Chol (4:2,5:1,5:2) a 44° C

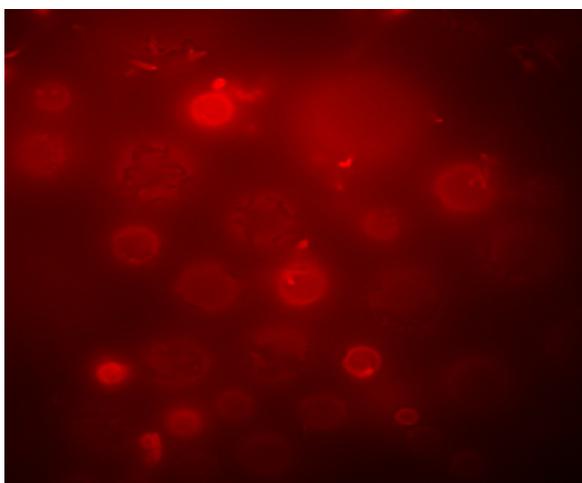


Figura 11 GUVs DOPC:BSM: Cer: Chol (4: 2,25 : 1,75: 2) a 28° C

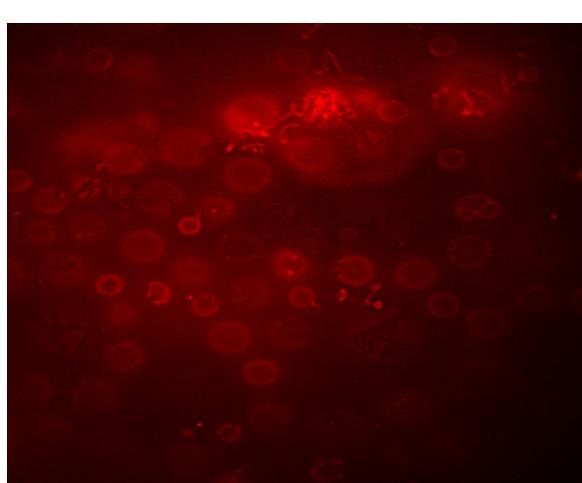


Figura 12 GUVs DOPC:BSM: Cer: Chol (4:2:2,25:1,75:2) a 44° C

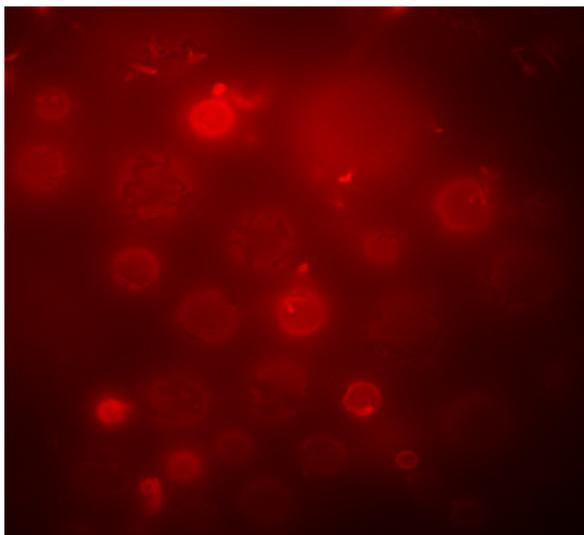


Figura 13 GUVs DOPC:BSM:Cer:Chol (4: 2 : 2 : 2)
a 28° C

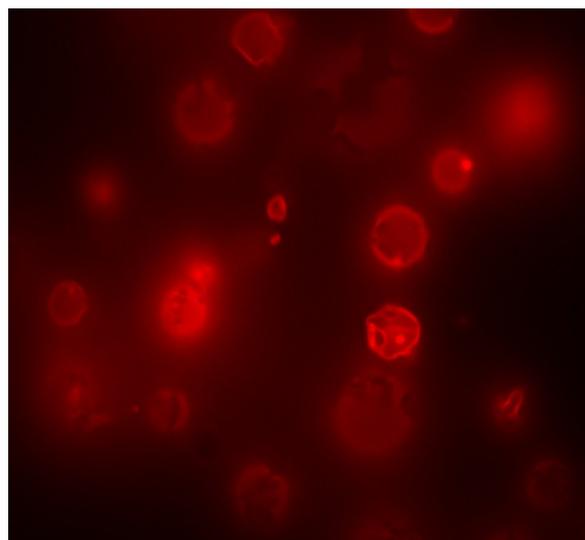


Figura 14 GUVs DOPC:BSM:Cer:Chol (4: 2 : 2 : 2)
a 44° C

Anexo II

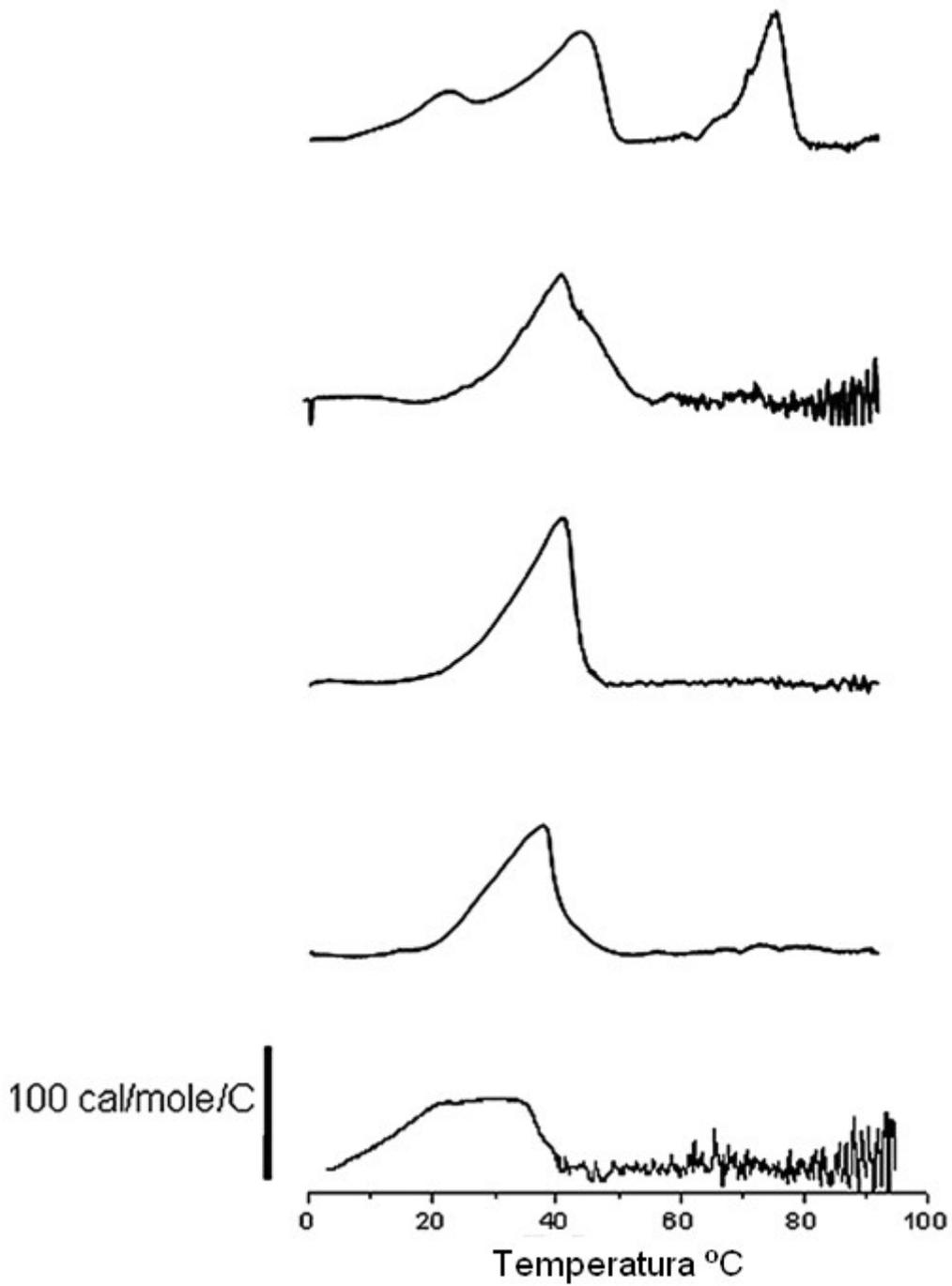


Figura 1: Calorimetría de mezcla de lípidos conteniendo BCer . La composición de la mezcla fue DOPC:SM:BCer:Chol 2 : (2-X) : X : 1 . El número en la derecha indica la cantidad de ceramida en mole%

Referencias

Introducción

- [1] Widom, B Surface tension and molecular correlation near a critical point . J , Chem . Phys. 43 , 3892-3897, 1965
- [2] Veatch , S.I , Sourbias, Keller , S.L, and Gawrisch. K. Critical Fluctuation in domain forming lípido mixtures, *Pro . Natl . Acad. Sci. U.S.A* 104, 17650-17655, 2007
- [3] Honerkamp- Smith A.R , Cicuta P Collins. M, Veatch, S, L, Schick. M den Nijs, and Keller S.L .Line tension , correlation lengths, and critical exponents in lipids membranas near critical point. *Biophys . J* ,in Press, 2008
- [4] M. Nikolova-Karakashian, A. Karakashian and K. Rutkute, *SubcelBiochem.*, 2008, 49, 469–8, 2008
- [5] H. Grassme, V. Jendrossek, A. Riehle, G. von Kurthy, J. Berger, H. Schwarz, M. Weller, R. Kolesnick and E. Gulbins, *Nature Medicine*, 9, 322–330, 2005
- [6] H. Grassme, A. Riehle, B. Wilker and E. Gulbins, *J. Biol. Chem.*, 280, 26256–262., 2005
- [7] B. Ogretmen and Y. Z. Hannun, *Nat. Rev. Cancer*, 4, 604–616. 2005
- [8] C. R. Bollinger, V. Teichgraber and E. Gulbins, *Biochim. Biophys. Acta* , 1746, 284–94, 2005

Capítulo 1

- [1] Alberts et al, *Introducción a la Biología Celular*, pág. 375-376, 2ª edición, Ed. Médica Panamericana
- [2] Devlin, T. M. 2004. *Bioquímica*, 4ª edición. Reverté, Barcelona
- [3] Burgueño Hurtado J. Regulación de receptores de neurotransmisores y neuromoduladores por proteínas estructurales.
- [4] Kai Simons K, Toomre D Lipid rafts and signal transduction, *Nature reviews in molecular cell biology*, Vol. 1, 2005
- [5] Lucero H, Robbins P. Lipid rafts–protein association and the regulation of protein activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 426, 208–224, 2005
- [6] Nelson D., Cox M. Membranas biológicas y transporte. Lehninger, *Principios de Bioquímica*. Ediciones Omega. 369- 420, 2005
- [7] Pelkmans L. Secrets of caveolae- and lipid raft-mediated endocytosis revealed by mammalian viruses, *Biochimica et Biophysica Acta* 1746, 295 – 304. 2005
- [8] Pike L. Lipid rafts: bringing Order to Chaos. *Journal of Lipid Research* 44(4):655-67, 2003

Capitulo2

- [1] Walter Hoppe. Biophysik. Springer Verlag, 1982.
- [2] S.J. Singer and G.L. Nicolson. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175(23):720_31, Feb 1972.
- [3] K. Simons and D. Toomre. Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 1(1):31_9, Oct 2000.
- [4] Bray D. Alberts, B. Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing, 1994.
- [5] Jacob Israelachvili. Intermolecular & Surface Forces. Academic Press Limited, 1991.
- [6] H. W. Meyer, K. Semmler, and P. J. Quinn. The effect of sterols on structures formed in the gel/subgel phase state of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers. *Mol. Membr. Biol.*, 14(4):187_93, 1997.
- [7] M. R. Vist and J. H. Davis. Phase equilibria of cholesterol/dipalmitoylphosphatidylcholine mixtures: ²H nuclear magnetic resonance and differential scanning calorimetry. *Biochemistry*, 29(2):451_64, Jan 1990.
- [8] J. H. Ipsen, G. Karlström, O. G. Mouritsen, H. Wennerström, and M. J. Zuckermann. Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system. *Biochim. Biophys. Acta.*, 905(1):162_72, Nov 1987.
- [9] M. Nielsen, L. Miao, J. H. Ipsen, M. J. Zuckermann, and O. G. Mouritsen. O₂-lattice model for the phase behavior of lipid-cholesterol bilayers. *Phys. Rev. E. Stat. Phys. Plasmas. Fluids. Relat. Interdiscip. Topics*, 59(5 Pt B):5790_803, May 1999.
- [10] P.L. Yeagle. The Structure of Biological Membranes. CRC Press, 1991.
- [11] Nicoletta Kahya, Dag Scherfeld, Kirsten Bacia, Bert Poolman, and Petra Schwille. Probing lipid mobility of raft-exhibiting model membranes by Fluorescence correlation spectroscopy. *J. Biol. Chem.*, 278(30):28109_15, Jul 2003.
- [12] Chiantia S., Ries S., Chwastek G., Carrer D. C., Li Z., Bittman R., Schwille P. Role of ceramide in membrane protein organization investigated by simultaneous AFM and FCS. *Biochim. Biophys. Acta*, 1778:1356-64, 2008
- [13] Carrer D. C., Kummer E., Chwastek G., Chiantia S., Schwille P. Asymmetry determines the effects of natural ceramides on model membranes. *Soft Matter*, 5: 3279-3286, 2009
- [14] Carrer D. C. and Maggio B. Transduction to self assembly of molecular geometry and local interactions in mixtures of ceramide and ganglioside GM1, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1514: 87-99, 2001

Capítulo 3

[1] B. Herman. Fluorescence microscopy. Royal microscopical society: Microscopy handbooks. Edited by J. Leonard. Bios Scientific Publishers, Oxford. 1998

[2] Diaspro, A, et al. Confocal and two-photon microscopy. Foundations, applications and advances. Edited by A. Diaspro. Wiley-Liss, New York. 2002

[3] Hibbs, A.R. Confocal microscopy for biologists: an intensive introductory course. Edited by A.R. Hibbs. Biocon, Ringwood East. 2002

[4] Paddock, S.W., et al. Confocal microscopy. Methods and protocols. Methods in Molecular Biology. Vol.122. Edited by S.W Paddock. Humana Press, New Jersey. 1999

[5] Pawley et al. Handbook of biological confocal microscopy. Edited by J.Pawley. Plenum Press, New York, 1995

Capítulo 4

[1] Atkins, P.W.; "Físicoquímica" Ed. Addison-Wesley Iberoamericana 3º Ed. 1999. . Reverté, Barcelona

[2] Serway , R. ; "Física Moderna " Ed. Internacional Thomson Editores 3º Ed 2006

Capítulo 6

[1] Dolores C. Carrer, Eva Kummer, Grzegorz Chwastek, Salvatore Chiantia and Petra Schwille, Asymmetry determines the effects of natural ceramides on model membranes, The Royal Society of Chemistry, Soft Matter, 5, 3279–3286 | 3279, 2009