

Tesis de Posgrado

Estudio espectrofluorométrico de las propiedades de la interfaz bicapa-solución acuosa en membranas lipídicas modelo

Bernik, Delia Leticia

1994

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Bernik, Delia Leticia. (1994). Estudio espectrofluorométrico de las propiedades de la interfaz bicapa-solución acuosa en membranas lipídicas modelo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2651_Bernik.pdf

Cita tipo Chicago:

Bernik, Delia Leticia. "Estudio espectrofluorométrico de las propiedades de la interfaz bicapa-solución acuosa en membranas lipídicas modelo". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1994.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2651_Bernik.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad
de Buenos Aires

Facultad de Ciencias
Exactas y Naturales

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO ESPECTROFLUOROMETRICO DE LAS
PROPIEDADES DE LA INTERFAZ
BICAPA-SOLUCION ACUOSA
EN MEMBRANAS LIPIDICAS MODELO**

Director:
Dr. E. Aníbal Disalvo

Doctorando
Delia Leticia BERNIK

1993

*tesis
2651
Ej. 2*

**Al Negro y a Sofia,
quienes supieron esperar...**

El presente trabajo de tesis se realizó con la dirección del Dr. E. Aníbal Disalvo, grupo de Biofísica de Membranas, INIFTA.

Los resultados presentados en el capítulo III han sido publicados: Bernik D.L. y Disalvo E.A. (1993) *Biochimica et Biophysica Acta* 1146, 169.

Quiero agradecer en forma general a todas las personas que de algún modo brindaron su apoyo para que este trabajo de tesis se llevase a cabo.

En particular, agradezco

- A mi Director de Tesis, Dr. E. Aníbal Disalvo, por su dedicación permanente y por transmitir su entusiasmo para superar obstáculos;
- A la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC), que me otorgó una Beca de Estudio;
- Al Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), que constituyó mi lugar de trabajo;
- A la Universidad Católica de Lovaina (Bélgica) y al Prof. Dr. F.C. De Schryver, por otorgarme una beca como investigador libre;
- Al grupo de Fotoquímica del DQIAQF, UBA, en particular al Dr. E. San Román, que apoyó la realización y presentación en dicho departamento de esta tesis interdisciplinaria;
- Al Dr. Claudio Colombano por permitirme utilizar reiteradas veces el espectrofluorómetro instalado en su laboratorio;
- Y al Dr. R. Martín Negri por su entusiasmo, sus enseñanzas y su permanente disposición para las discusiones interdisciplinarias.

INDICE GENERAL

Página

CAPITULO I**INTRODUCCION GENERAL**

I.1 Membranas lipídicas modelo.	7
I.1.a Descripción general y estructura molecular de sus componentes.	7
I.2 Espectroscopía de absorción y fluorescencia en interfases de membranas lipídicas.	12
I.3 Propósitos de esta Tesis.	13

CAPITULO II**MATERIALES Y METODOS GENERALES**

II.1 Materiales.	14
II.2 Métodos generales.	14
II.2.a Espectroscopía de absorción.	14
II.2.b Espectroscopía de fluorescencia.	15
II.2.c Preparación de liposomas.	15
II.2.c.1 Multilamelares (MLV).	
II.2.c.2 Unilamelares grandes (LUV).	
II.2.c.3 Unilamelares pequeños (SUV).	

CAPITULO III**ESTUDIOS ESPECTROSCOPICOS EN MEMBRANAS EMPLEANDO LA SONDA MEROCIANINA 540. RELACION DE CAMBIOS ESPECTROSCOPICOS CON PROPIEDADES TOPOLOGICAS**

III.1	Introducción.	17
III.2	Estudios previos realizados con merocianina 540 en membranas lipídicas.	18
III.3	Métodos.	21
III.4	Resultados.	23
III.5	Discusión.	33
III.6	Conclusiones.	40

CAPITULO IV**ESTUDIOS ESPECTROSCOPICOS EN MEMBRANAS EMPLEANDO LA SONDA MEROCIANINA 540. ASIGNACION DE LAS BANDAS DE ABSORCION Y EMISION.**

IV.1	Introducción.	41
IV.2	Métodos.	42
IV.2.a	Marcación de las membranas con MC540.	42
IV.2.b	Cálculo de la constante de equilibrio de dimerización.	42

membrana es mucho menor que la componente paralela ($\epsilon_{\text{perpendicular}} = 25 \ll \epsilon_{\text{paralela}} = 420$) (Raudino y Mauzerall, 1986). Estos autores discuten entonces que el empleo de sondas en la estimación de constantes dieléctricas en la interfase dependerá de la ubicación de la sonda y de cual sea la alineación de su momento dipolar respecto de la superficie de la membrana.

I.3 PROPOSITOS DE ESTA TESIS

El propósito de esta tesis es estudiar comparativamente la interfaz membrana-solución de membranas lipídicas de fosfatidilcolina por medio de sondas ópticas y fluorescentes adsorbidas a la membrana o ligadas covalentemente a los fosfolípidos.

El objetivo es establecer los cambios estructurales que se producen en esa zona en virtud del estado de fase, la incorporación de colesterol, la longitud de las cadenas de ácidos grasos y la presencia de fosfatidilglicerol.

Se conoce la existencia de drásticos cambios en la topología de la membrana, el grado de libertad de las cadenas hidrocarbonadas, el área por molécula, el espesor de la bicapa y el estado de hidratación de los lípidos cuando se produce la transición de fase principal gel-líquido cristalino o cuando se incorpora colesterol.

Sin embargo, los cambios en las propiedades que se producen en la interfaz como por ejemplo la orientación y movilidad del grupo polar, redistribución del agua y polaridad efectiva de la zona interfacial es tema de discusión.

Un mejor conocimiento de las propiedades de la interfaz acuosa en membranas lipídicas según su composición y estado de fase permitirá entender en mayor detalle los mecanismos de adsorción de diversos compuestos: péptidos, azúcares, alcoholes; y las modificaciones introducidas por cambios en la temperatura, composición lipídica, densidad de carga superficial y radio de curvatura de la bicapa. Este estudio permitirá comparar cambios a nivel macroscópico con las modificaciones de carácter local a nivel interfacial.

modo que las propiedades y estructura de esta región no están totalmente establecidas.

Teniendo en cuenta que esta zona se pone en juego para procesos relevantes en la función de membrana como por ejemplo interacción membrana-membrana en fusión y adhesión, interacción membrana-proteína, adsorción de péptidos y azúcares y procesos de permeabilidad, es de interés caracterizar con mayor detalle esta región.

I.2 ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN Y FLUORESCENCIA EN INTERFASES DE MEMBRANAS LIPÍDICAS

En el estudio de la región interfacial se han empleado dos tipos principales de sondas.

- Por un lado, aquellas cuya adsorción y ubicación en la membrana es función de su polaridad y afinidad por determinada zona de la bicapa (por ejemplo MC540);
- Por otro lado, aquellas sondas cuyo grupo cromofórico está ligado covalentemente a la porción polar de la molécula fosfolipídica en distintas ubicaciones (entre otras DPE).

Existe un tercer grupo constituido por cromóforos ligados covalentemente a ácidos grasos de cadena larga (ej: n-(9-anthroyloxy-ácido graso). Este conjunto de sondas tiene características intermedias, ya que por su estructura anfipática se insertan en la bicapa paralelamente a los lípidos pero cuyo comportamiento global no es comparable al de los fosfolípidos constituyentes. Dentro de este grupo puede encontrarse la sonda DA empleada en esta tesis (capítulo V).

Una revisión de los resultados experimentales realizados empleando diversas sondas demuestra una notable dispersión de los valores de ϵ informados (Tocanne y Teissié, 1990), lo cual indica la dependencia de la información obtenida con la localización de las sondas espectroscópicas.

Modelos teóricos recientes sugieren, por ejemplo, que la región interfacial en membranas compuestas por fosfatidilcolina es altamente anisotrópica. Dicho estudio estima que la componente dieléctrica perpendicular a la superficie de la

polares (Casal y Mantsch, 1984; Ruthven et al., 1990; Mendelsohn et al., 1989; y referencias citadas).

Por otro lado, la técnica de resonancia magnética nuclear (RMN) permite mediante el empleo de ^{31}P y ^2H como núcleos paramagnéticos localizados en la interfase, estudiar específicamente la región del grupo fosfatídico. Estudios de ^2H -RMN y relajación dieléctrica indican que el tiempo de correlación para la reorientación del dipolo P-N en fase líquido-cristalina en membranas de fosfatidilcolina es del orden del nanosegundo (Davis, 1983). Por otra parte, estudios de ^{31}P -RMN (Dufourc, 1992) indican que en fase $\text{L}\beta'$ (a $T < T_{\text{pt}}$) la rotación de la cabeza polar y las fluctuaciones moleculares son lentas, con tiempos de correlación del orden microsegundo-milisegundo. Esta técnica permite estudiar la orientación de los grupos polares (Bechinger y Seelig, 1991 y referencias allí citadas).

La información que esta técnica puede brindar incluye la fijación y movimiento de iones o moléculas en la interfase: se ha podido determinar que los iones se mueven de una cabeza polar a otra con un tiempo de residencia del orden del microsegundo (Yoshida et al., 1989; Cametti et al., 1985).

El estudio específico a nivel mesoscópico (figura I-2, parte B) de la región interfacial y sus propiedades se ha intensificado recién en las dos últimas décadas gracias a la mejora en la sensibilidad y resolución de técnicas como las mencionadas (RMN, FTIR), fluorescencia estacionaria y resuelta en el tiempo. Paralelamente, la síntesis de nuevas sondas derivadas de grupos cromóforos localizados mediante uniones covalentes en diferentes zonas de la bicapa ha facilitado la interpretación de la información obtenida.

La constante dieléctrica en el seno de la zona no polar de la membrana (región de las cadenas de ácidos grasos) es $\epsilon = 2$, en contraste con la alta constante dieléctrica de la solución acuosa: $\epsilon = 78$. Esto implica que en la zona de interfase existe un agudo gradiente de polaridad en un espesor de sólo 4-10 Å. Si bien se ha estimado que ϵ en dicha región variaría entre 10 y 70 (Cevc, 1991), la determinación de la misma mediante distintos tipos de sondas espectroscópicas no dan valores mayores de 40 (Tocanne y Teissié, 1990). De

Desde el punto de vista macroscópico, existe en toda bicapa lipídica una temperatura crítica característica para cada fosfolípido, denominada temperatura de transición de fase T_t . A temperaturas mayores que T_t el empaquetamiento de los lípidos es más desordenado y los movimientos moleculares en la bicapa son mayores que a temperaturas menores que dicha T_t (Dufourc et al., 1992). Dichas fases han sido denominadas fase líquido-cristalina y fase gel, respectivamente.

Dentro de la fase gel se han caracterizado mediante diversos métodos dos subfases principales: fases $L_{\beta'}$ y $P_{\beta'}$ (ver figuras I-1 y I-2). La interconversión entre dichas fases se produce a la temperatura denominada de pretransición T_{pt} , la cual es altamente sensible al grado de hidratación, a la fuerza iónica del medio y a la longitud de las cadenas de ácidos grasos. Un incremento en el área/cabeza polar, en la movilidad y en el grado de hidratación caracterizan el cambio de $L_{\beta'}$ y $P_{\beta'}$ (Cevc, 1987/1991). Adicionalmente se ha determinado mediante diversos tipos de microscopía la existencia de una estructura macroscópica ondulada en fase gel, cuya formación depende de los volúmenes relativos de la cabeza polar respecto de la región hidrocarbonada (Copeland y McConnell, 1980; Mortensen et al., 1988; Pascher et al., 1992).

La región interfacial microscópica detallada en la parte C comprende la zona del grupo glicerol, el grupo fosfato y su grupo sustituyente (ver esquema en tabla I-1), los cuales debido a su alta polaridad generan un potencial intrínseco. A este potencial determinado por los grupos constituyentes de los fosfolípidos se le suma el determinado por la orientación de los dipolos de agua de la capa de hidratación de la interfase. La ionización de los fosfolípidos y la adsorción de iones a las cabezas polares determinan a su vez un potencial electrostático.

La conformación de los grupos polares que determinan los potenciales descritos se han estudiado por medio de espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) en membranas con distinto estado de hidratación. Las más importantes bandas de IR pueden separarse en las correspondientes a la cabeza polar y las cadenas hidrofóbicas.

Las primeras son bandas de estiramiento ("stretching") de C=O a 1750-1700 cm^{-1} , de CH₃ en el grupo colina a 3050 cm^{-1} , 1250 y 1085 cm^{-1} . Estas bandas son sensibles a cambios en la hidratación y conformación de los grupos

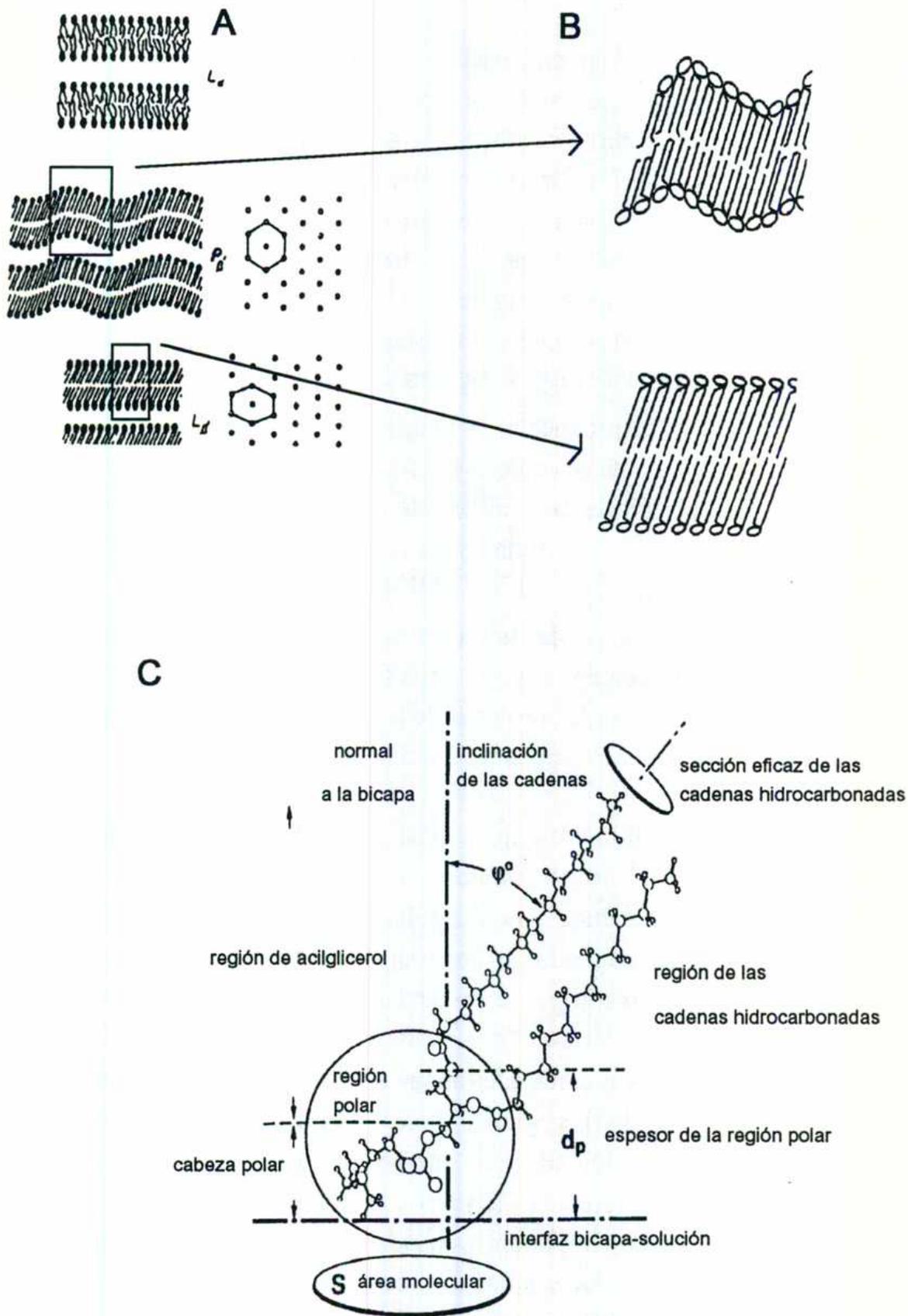
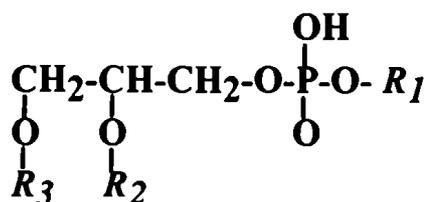


Figura I-2: Arreglo espacial de las moléculas de fosfolípidos en bicapas de DMPC a distintos niveles. A: macroscópico; B: mesoscópico; C: microscópico.

TABLA I-1: Estructura química de los principales fosfolípidos componentes de las membranas biológicas.



R_1	NOMBRE	DERIVADOS MAS COMUNES
-H	ácido fosfatídico (PA)	$R_2=R_3=$ ácido palmítico DPPA (ác. graso saturado, 16 át de C)
$-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$	fosfatidiletanolamina (PE)	$R_2=R_3=$ ácido miristoico DMPE dimiristoilfosfatidiletanolamina (ác. graso saturado, 14 át de C)
$-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N} \begin{array}{l} / \text{CH}_3 \\ - \text{CH}_3 \\ \backslash \text{CH}_3 \end{array}$	fosfatidilcolina (PC)	$R_2=R_3=$ ácido palmítico DPPC dipalmitoilfosfatidilcolina (ác. graso saturado, 16 át de C)
$-\text{CH}_2\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{-C} \begin{array}{l} // \text{O} \\ \backslash \text{OH} \end{array}$	fosfatidilserina (PS)	$R_2=R_3=$ ácido láurico DLPS dilauroilfosfatidilserina (ác. graso saturado, 12 át de C)
$-\text{CH}_2\text{-CH}(\text{OH})\text{-CH}_2\text{-OH}$	fosfatidilglicerol (PG)	$R_2=R_3=$ ácido oleico DOPG dioleoilfosfatidilglicerol (ác. graso monoinsaturado, 18 át. de C)
$-\text{CH}(\text{CHOH})_4\text{-CH-OH}$	fosfatidilinositol (PI)	$R_2=R_3=$ ácido esteárico DSPI diestearoilfosfatidilinositol (ác. graso saturado, 18 át. de C)

En la figura I-2 se muestra el arreglo espacial de las distintas fases gel a diferentes niveles: macroscópico (parte A, fase lamelar en membranas completamente hidratadas), mesoscópico (parte B, estructura en el entorno de primeros vecinos) y microscópico (parte C, conformación de una molécula y de los parámetros empleados para describir dicho arreglo: área molecular, espesor de la región polar, inclinación de las cadenas respecto de la normal a la bicapa, etc.).

I.1 MEMBRANAS LIPIDICAS MODELO

I.1.a Descripción general y estructura molecular de sus componentes.

Las membranas lipídicas constituyen una barrera selectiva cuya estructura posee una región central hidrocarbonada de aproximadamente 20-40 Å de espesor dependiendo de la longitud de la cadena de ácidos grasos, flanqueada por dos regiones polares de 4-10 Å de espesor cada una. En esta zona están localizados los grupos polares de los fosfolípidos y gran parte del agua de hidratación (Flewelling y Hubbell, 1986). La estructura química de los principales fosfolípidos componentes de las membranas biológicas se describe en la tabla I-1, destacando las características de los grupos polares y de las cadenas hidrocarbonadas.

Los fosfolípidos se agregan espontáneamente en agua debido a su carácter anfipático, y el arreglo que adoptan depende de la relación de áreas cabeza polar/cadena hidrocarbonada. Para lípidos de doble cadena cuya área de la región polar es mayor que la de la región hidrocarbonada (cono truncado) el arreglo es de bicapa (Israelachvili, 1992).

En la figura I-1 se describen las fases adoptadas por bicapas compuestas por dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) para diferentes grados de hidratación (Janiak et al., 1979). Las fases adoptadas a distintas temperaturas cuando el grado de hidratación es máximo son denominadas $L_{\beta'}$, $P_{\beta'}$ (fases gel) y L_{α} (fase líquido cristalina).

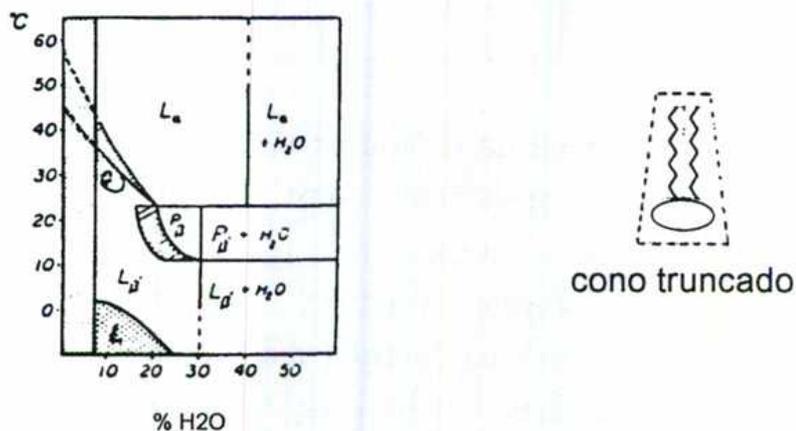


Figura I-1: Diagrama de fases correspondiente a liposomas multilamelares compuestos por DMPC en función del grado de hidratación.

CAPITULO I

INTRODUCCION

GENERAL

SIMBOLOS:

ϵ : coeficiente de absorción molar.

ϵ : constante dieléctrica.

ϕ_f : rendimiento cuántico de fluorescencia.

η : viscosidad.

λ : longitud de onda.

μ : momento dipolar.

n : índice de refracción.

ν : frecuencia.

$\langle r \rangle$: anisotropía estacionaria.

ρ : densidad superficial de carga.

τ : tiempo de vida de fluorescencia.

ψ : potencial dipolar de membrana.

ABREVIATURAS

DA:	dansildihexadecilamina.
DMPC:	dimiristoilfosfatidilcolina.
DMPG:	dimiristoilfosfatidilglicerol.
DPE:	dansilfosfatidiletanolamina.
DPPC:	dipalmitoilfosfatidilcolina.
DPPG:	dipalmitoilfosfatidilglicerol.
EPC:	fosfatidilcolina de yema de huevo.
LUV:	vesículas unilamelares grandes.
MC540:	merocianina 540.
MLV:	vesículas multilamelares.
SUV:	vesículas unilamelares pequeñas.

	Página
V.4.a Resultados.	84
V.4.b Discusión.	90
V.5 Estudios en función de la composición lipídica.	97
V.5.a Resultados.	97
V.5.a.1 Influencia de la temperatura a composición lipídica fija.	
V.5.a.2 Influencia de la composición lipídica a temperatura constante.	
V.5.b Discusión.	99
V.5.b.1 Análisis de los cambios observados a composición lipídica constante.	
V.5.b.2 Análisis de los cambios observados a temperatura constante en función de la composición lipídica.	
V.6 Efecto de la introducción de moléculas con distinto momento dipolar: colesterol y floretina.	103
V.6.a Resultados.	103
V.6.b Discusión.	105
V.7 Conclusiones generales.	107
<u>CAPITULO VI</u>	
DISCUSION GENERAL Y CONCLUSIONES.	108
<u>CAPITULO VII</u>	
REFERENCIAS	115

	Página
IV.3 Resultados y Discusión.	45
IV.3.a Estudios en MLV.	45
IV.3.b Estudios en LUV.	57
IV.3.c Estudios en mezclas de lípidos.	62
IV.4 Fluorescencia de dímeros en membranas.	66
IV.4.a Cálculo de rendimientos cuánticos de fluorescencia.	69
IV.5 Conclusiones.	73

CAPITULO V

GRUPOS CROMOFOROS UNIDOS A FOSFOLIPIDOS: DERIVADOS DEL GRUPO DANSILO.

V.1 Introducción.	75
V.2 Métodos.	78
V.2.a Corrimiento de Stokes y relajación del solvente.	78
V.2.b Anisotropía estacionaria: definición y cálculo.	79
V.3 Propiedades espectroscópicas en solventes orgánicos.	80
V.3.a Resultados y discusión.	80
V.4 Estudios en función del tipo de liposoma.	84

CAPITULO II

MATERIALES Y

METODOS

GENERALES

III.6 CONCLUSIONES

En conclusión, la espectroscopía de absorción y emisión de fluorescencia de la sonda merocianina 540 muestra que el arreglo de moléculas fosfolipídicas similares puede sin embargo presentar propiedades superficiales diferenciales.

La alta sensibilidad de esta sonda frente a cambios de orden microscópico la convierten en un potencial sensor superficial, a través de la modificación de su estado de agregación y consecuentemente sus características espectrales.

La banda de fluorescencia a 630 nm es observada para membranas de DPPC en condiciones en que el pico de absorción a 450 nm no se observa para ninguna de las cuatro relaciones sonda/lípido ensayadas en este estudio. Este hecho podría atribuirse a tres causas:

- Una mayor relación señal/ruido en las medidas de fluorescencia en comparación con las de absorción;
- Para las concentraciones de sonda estudiadas la absorción a 450 nm es muy baja en comparación con la del dímero en fase acuosa a 510 nm, quedando la banda a 450 nm oculta por la señal del dímero en agua;
- Los requerimientos estructurales para la existencia de emisión a 630 nm no son exactamente los mismos que para el pico de absorción a 450 nm.

colesterol es reducir marcadamente la compresibilidad de la membrana conduciendo a una mayor cohesión y a una reducida permeabilidad. Esta disminución en la permeabilidad también fue observada anteriormente por Papahadjopoulos et al. (1973).

Esto implica que la fase "líquida ordenada" no tiene las mismas propiedades superficiales que la conocida fase L_{α} existente en ausencia de colesterol.

Un esquema del tipo de interacción propuesta en base a diversos estudios se muestra en la figura III-10.

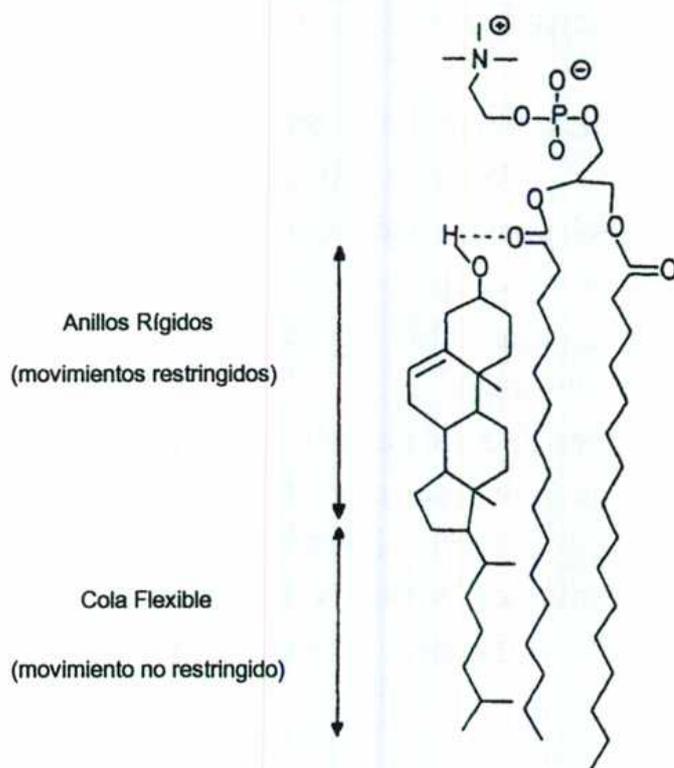


Figura III-10: Esquema representativo del tipo de interacción propuesta entre colesterol y fosfolípido en bicapa lipídica.

Básicamente, los anillos de colesterol restringen el movimiento de la cadena hidrocarbonada, especialmente los primeros 8 carbonos. A la vez, disminuye las interacciones entre cabezas polares, permitiendo a ese nivel una mayor movilidad, y de ese modo eliminando probablemente las características estructurales que dan origen a la señales de MC540 a 450nm en absorción y 630 nm en emisión de fluorescencia.

De hecho, los espectros de otros lípidos de fosfatidilcolina puros o incluso DPPC a temperaturas mayores muestran también dicha banda de absorción. Por ejemplo el comportamiento del lípido di 15:0 PC de cadena intermedia entre DMPC y DPPC muestra una proporción de pico a 450 nm también intermedia, como se observa en la tabla III-2.

Los estudios en monocapas revelan que las membranas en fase gel poseen un potencial superficial sensiblemente mayor que en fase líquido-cristalina (Simon et al., 1986a). A este respecto, la interacción de MC540 con membranas lipídicas ha mostrado obedecer a una isoterma de Langmuir con una constante de fijación influenciada por el potencial superficial. Parte de ese potencial se origina en la orientación de los dipolos de los grupos fosfocolina y las moléculas de agua a nivel de interfaz.

Es interesante observar que el cambio de fase gel a fase líquido-cristalina promueve paralelamente a la disminución del potencial superficial la desaparición de los picos a 450 y 630 nm; así como la introducción de un 30% de colesterol en una membrana de DMPC en fase gel (comparar figuras III-8D y III-4A), cuya presencia ha demostrado disminuir el potencial superficial y la capa de hidratación de la interfaz (Simon et al., 1986b; McIntosh et al., 1989; Saito et al., 1991).

Otro aspecto adicional es que el espectro de absorción y emisión de fluorescencia de una mezcla 65% DMPC / 35% colesterol reproduce a todas temperaturas desde 10°C hasta 30°C el mismo espectro observado para membranas de DPPC en fase L_{β} , a su vez similar al espectro de MC540 en solución acuosa (figuras III-4A y III-3A respectivamente).

Esto sugiere que MC540 está impedida de ingresar al interior de la bicapa, ya que no se obtiene la señal espectroscópica correspondiente al monómero en membrana: 570 nm en absorción y 587 nm en emisión de fluorescencia. La sonda es "excluida" de la membrana, tal como se ha observado en estudios anteriores (Humpries et al., 1983).

A altas proporciones de colesterol (mayores de 20%), los diagramas de fase reportados por Ipsen et al. (1987), Copeland y McConnell (1980) y Mortensen et al. (1988), muestran una única fase a todas temperaturas. Bloom y Mouritsen (1988) y Needham et al. (1988) entre otros autores mencionan que el efecto del

el caso de liposomas mixtos compuestos por 35% DMPC / 65% DPPC, el pico de absorción a 450 nm se observa claramente para la mayor relación sonda/lípido.

Las mezclas 35% DMPC/ 65% DPPC a 30°C están en fase gel, pero cerca de la zona de coexistencia gel-líquido-cristalina (Shimshick y McConnell, 1973). Por otra parte, la figura III-6C muestra un hombro a 450 nm para la mayor proporción de sonda en DPPC a 30°C, donde los lípidos están prácticamente en la zona de pretransición $L_{\beta}' \rightarrow P_{\beta}'$.

Por lo tanto, los presentes resultados indican que la característica estructural que da origen a dichos nuevos picos no puede ser relacionada estrictamente con un estado de fase determinado y fortalece la interpretación de que las regiones de transición en fase gel no obedecen a cambios abruptos, sino más bien graduales, como fuera postulado por Mortensen et al. (1988). La sonda MC540 demuestra ser altamente sensible a estos cambios estructurales a nivel molecular.

En las mezclas DMPC/DPPC el pico a 450 nm disminuye a medida que aumenta la proporción de DPPC a una temperatura dada (figura III-4 y tabla III-2). Podría sugerirse entonces que este pico estaría particularmente relacionado con la presencia de dominios de DMPC en la membrana en fase gel. Sin embargo, diversos autores han informado que el sistema DMPC/DPPC constituye una mezcla lipídica binaria que presenta miscibilidad cercana a la ideal (Van Dijk et al., 1977; Mabrey y Sturtevant, 1976), aunque los diagramas de fase simulados para dicho caso no reproducen completamente los diagramas experimentales. Silver (1985) desarrolla un tratamiento termodinámico para mezclas regulares y encuentra de este modo un mejor ajuste de los datos empíricos. Por lo tanto, el hecho de que las mezclas DMPC/DPPC se comporten como soluciones regulares descarta la posible formación de dominios de DMPC que den origen a la señal de 450 nm.

La absorción a 450 nm en dichas mezclas debe entonces estar relacionada a alguna propiedad parcial molar de DMPC, probablemente relativa a características de empaquetamiento dependientes de la longitud de las cadenas de ácidos grasos.

resultante modifica su arreglo espacial en la membrana para obtener una bicapa estable (Pascher et al., 1992; figura I-1).

Así, a 14°C, la membrana compuesta por DMPC se encuentra en fase $P\beta'$, mientras que a esa temperatura el arreglo estructural de DPPC corresponde a fase $L\beta'$ (Lipka et al., 1984).

Esta diferencia en empaquetamiento parece ser la responsable de la diferencia en el comportamiento espectroscópico de MC540.

La introducción de colesterol en bajas proporciones induce también la formación de una superficie corrugada. En bicapas mezcla de DMPC y colesterol, Knoll et al. (1985) y Mortensen et al. (1988) han encontrado que las características de la estructura ondulada (periodicidad y amplitud de la ondulación) dependen de la temperatura y de la concentración de colesterol. A altas concentraciones de colesterol (15-20%) la estructura se distorsiona, probablemente por separación de fases y existencia de dominios de determinada composición.

A mayores concentraciones, la estructura ondulada desaparece y la membrana se vuelve completamente plana. En estas condiciones, para concentraciones de colesterol de 30 mol% no se observan ni el pico de absorción a 450 nm ni la banda de emisión de fluorescencia a 630 nm (figuras III-8D y III-9B). Tampoco se observan en el caso de espectros registrados para membranas en fase líquido-cristalina.

Es razonable por lo tanto relacionar la aparición de estos picos con la existencia de una estructura corrugada.

A pesar de que la mayor probabilidad de existencia de una estructura corrugada se atribuye a la fase gel $P\beta'$, la correlación entre los espectros de MC540 obtenidos y los diagramas de fase reportados en literatura muestran que los nuevos picos son también observados en algunos casos de membranas en fase $L\beta'$. Este hecho no contradice la correlación establecida previamente, ya que algunos autores (Mortensen et al., 1988; Sackman et al., 1980; Copeland y McConnel, 1980) han establecido la existencia de ondulaciones en fase $L\beta'$ diferentes de las que se observan en fase $P\beta'$.

Por ejemplo, los diagramas de fase de 14:0/18:0 PC indican que dicho fosfolípido está en fase $L\beta'$ a 13°C. En presencia de estos lípidos y también en

origen a dicho pico disminuye con el incremento en la longitud de las cadenas. El incremento en la longitud de sólo una de las dos cadenas como en el caso del fosfolípido 14:0-18:0 produce un cambio menos pronunciado pero en el mismo sentido cuando se compara con el di-14:0 (DMPC). En contraste, la inclusión de una ramificación lateral en el carbono 15 de las cadenas de 16:0 (di-17:0i) produce un efecto similar al obtenido cuando la cadenas son 1 carbono más cortas (di-15:0).

Cuando la cabeza polar de los fosfolípidos en fase gel está suficientemente hidratada, el debilitamiento del empaquetamiento intercadena con el aumento de temperatura genera la transición a una estructura lamelar ondulada: $L_{\beta}' \rightarrow P_{\beta}'$ (Cevc, 1991, Pascher et al., 1992). Este nuevo arreglo permite mantener una estructura de bicapa que conserva sus propiedades dieléctricas y de permeabilidad selectiva (ver figura I-1). DMPC en exceso de agua se encuentra en fase P_{β}' para temperaturas entre 10 °C y 21 °C aproximadamente (McIntosh et al., 1989). En estas condiciones el pico a 450 nm se observa claramente (figura III-4B). El espectro de la figura III-6A para DMPC en fase líquida (30°C) no muestra diferencias significativas con los espectros característicos de MC540 en solventes medianamente polares (fig. III-3C). En cambio el pico a 450 nm no se observa para membranas de DPPC a 13°C (fase gel L_{β}' , figura III-4A), pero a 30°C se observa un suave hombro a dicha longitud de onda para la mayor proporción de sonda ensayada (figura III-6C).

Como se ha discutido previamente, MC540 no accede al interior de la bicapa de DPPC cuando la sonda se adiciona a la solución externa de un liposoma en equilibrio térmico a temperaturas correspondientes a la fase gel (compárese figuras III-4A y III-3A).

Es por lo tanto razonable inferir que el nuevo pico de absorción a 450 nm debería estar relacionado con alguna característica estructural de la superficie externa del liposoma. En base a los estudios discutidos hasta el momento, este carácter distintivo parece estar relacionado con el empaquetamiento de los lípidos.

A temperatura constante, la disminución de la interacción cadena-cadena en un fosfolípido disminuye el balance de fuerzas hidrofóbico-hidrofílico, en favor del grado de hidratación de la cabeza polar (Cevc, 1991). La estructura

Hay dos procesos que causan dicha modificación en los espectros. Uno es la gran afinidad que la sonda posee por la fase lipídica, de modo que una vez que ha ingresado a la zona no polar de la bicapa prefiere dicho medio a la fase acuosa. La ubicación como monómero en la bicapa es energéticamente muy favorable: la zona no polar del cromóforo es adecuadamente solvatada por las cadenas de ácidos grasos, mientras la carga negativa localizada en el grupo sulfónico permanece en la interfaz altamente polar. Esta permanencia de la sonda dentro de la bicapa una vez que ha ingresado puede emplearse para marcar liposomas con MC540, y mediante cromatografía de filtración molecular separar dichos liposomas del remanente de sonda en fase acuosa. La solubilidad, es decir la cantidad máxima de MC540 que puede ser incorporada por la membrana en fase líquida, es alta. Sikurova et al.(1988) informan que la relación lípido:sonda donde se alcanza la saturación es 29:1 para membranas de EPC en fase líquido-cristalina.

Cuando se realiza un ciclo de temperaturas en presencia de la sonda como el indicado en la figura III-7, es probable que exista penetración y redistribución de la misma en el interior del liposoma. Esto es debido al incremento de permeabilidad que las membranas lipídicas experimentan al atravesar la transición de fase principal (Cruzeiro-Hansson y Mouritsen, 1988; Szoka y Papahadjopoulos, 1980 y referencias allí citadas; Biondi et al., 1990). Por otra parte, Waggoner y Grinvald (1977) y Dragsten y Webb (1978) han informado que si la sonda se adiciona a la membrana y el sistema no pasa a través de la temperatura de transición de fase, MC540 no permea la bicapa sino que permanece en la región de la monocapa externa.

Por lo tanto, de acuerdo a la evolución de las señales espectroscópicas mostradas en la figura III-7, los espectros obtenidos en las condiciones descritas para las figuras III-7A y III-7D reflejan las propiedades de la interfaz externa de la bicapa, mostrando las señales espectroscópicas de la MC540 en fase acuosa y adsorbida a la superficie presentada por el liposoma en fase gel.

Los datos de tabla III-2 muestran que la proporción del pico de absorción a 450 nm depende de la longitud de las cadenas de ácidos grasos. El pico decrece en la secuencia 14:0, 15:0 y 16:0 indicando que el sitio estructural que da

III.5 DISCUSION

El presente estudio muestra la existencia de dos nuevas señales espectroscópicas en los espectros de MC540 en presencia de liposomas en fase gel, una de absorción a 450 nm y una de emisión de fluorescencia a 630 nm, las cuales dependen de la composición lipídica, de la relación lípido/sonda y de la temperatura.

Las características topológicas de membranas en fase gel han sido estudiadas mediante rayos X, calorimetría diferencial, difracción de neutrones y microscopía electrónica utilizando liposomas multilamelares como sistema modelo (Mortensen et al., 1988; Chen et al., 1980; van Dijck et al., 1977; McDaniel et al., 1983). En esta discusión se compararán los cambios espectroscópicos observados con MC540 con los diagramas de fase y estudios estructurales realizados con liposomas multilamelares en condiciones similares.

Ambas señales desaparecen cuando los espectros se registran en presencia de liposomas en fase líquido-cristalina, mostrando los espectros característicos de absorción y fluorescencia para MC540 en solventes medianamente polares (compárese figuras III-3B/D y figuras III-7B/III-7E).

Para relacionar los cambios espectroscópicos de MC540 con las propiedades topológicas es necesario conocer la localización de la sonda respecto de la membrana en cada caso, de acuerdo a la situación en la cual se agrega la misma al sistema.

En los estudios mostrados en la figura III-7, la sonda se agrega a la solución externa al liposoma luego que éste ha alcanzado el equilibrio térmico a la temperatura deseada en fase gel. Seguidamente se realiza un ciclo de temperatura en que los liposomas de DMPC son llevados a fase líquido-cristalina en presencia de la sonda y nuevamente a fase gel, pasando dos veces a través de la transición de fase principal. La comparación de las figuras III-7A con III-7C y III-7D con III-7F muestra que el pico de emisión a 630 nm y el de absorción a 450 nm han disminuído y que el hombro de absorción a 570 nm del espectro III-7A se ha transformado en un pico mucho más pronunciado desplazado a 585 nm.

Cuando la proporción de colesterol es de 35%, tanto el pico a 450 nm como el hombro a 570 nm desaparecen por completo (figura III-8D). Este último espectro es similar al observado para MC540 en presencia de liposomas de DPPC 100% en fase gel L_{β}' .

Los espectros de fluorescencia de liposomas en presencia de colesterol también muestran cambios dependientes de la proporción del mismo. En mezclas de 10% de colesterol la emisión a 630 nm aumenta notoriamente (comparar la figura III-9A con el espectro de DMPC pura, figura III-7D). Para 30% de colesterol, el pico de emisión a 630 nm desaparece dejando sólo un pequeño hombro y la emisión de fluorescencia principal está centrada en 575 nm.

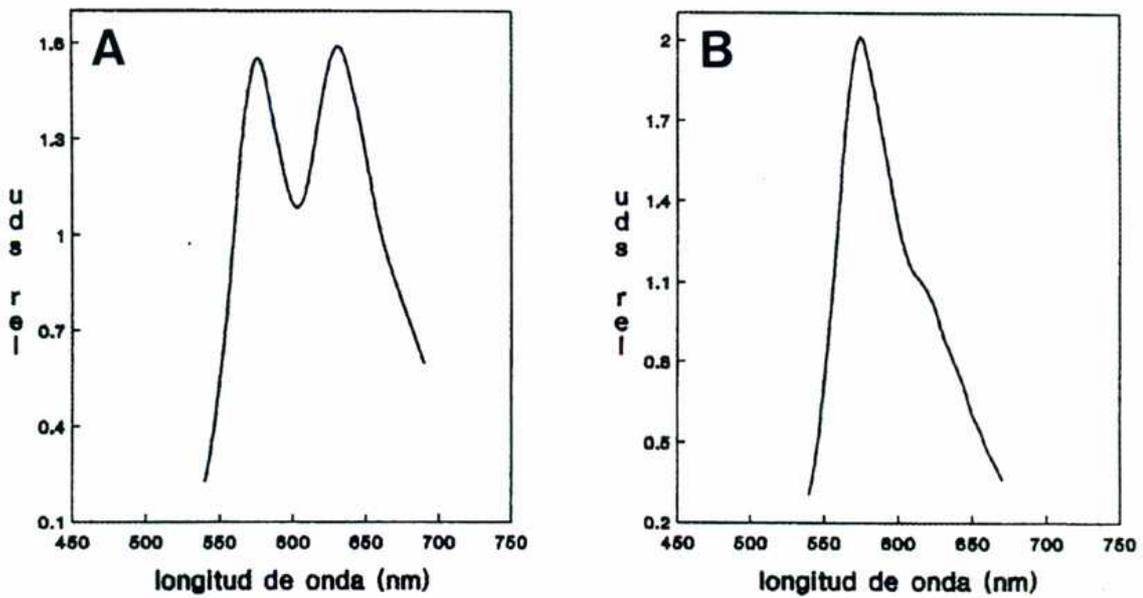


Figura III-9: Espectros de emisión de fluorescencia de MC540 en liposomas de DMPC conteniendo diferentes porcentajes de colesterol. (A): 10%; (B): 30%. $\lambda_{exc} = 440$ nm. $T = 8$ °C. Relación lípido/sonda: 200:1.

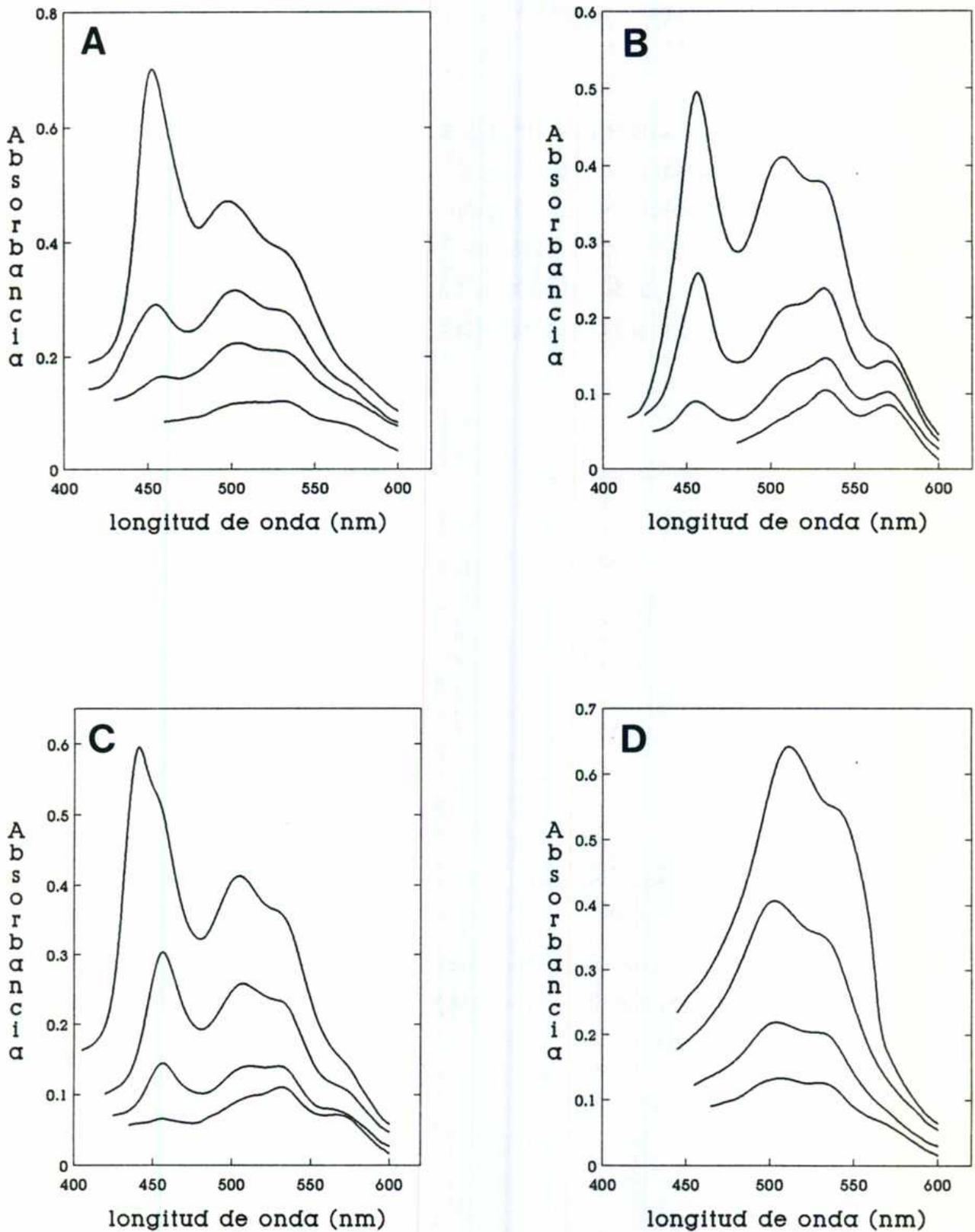
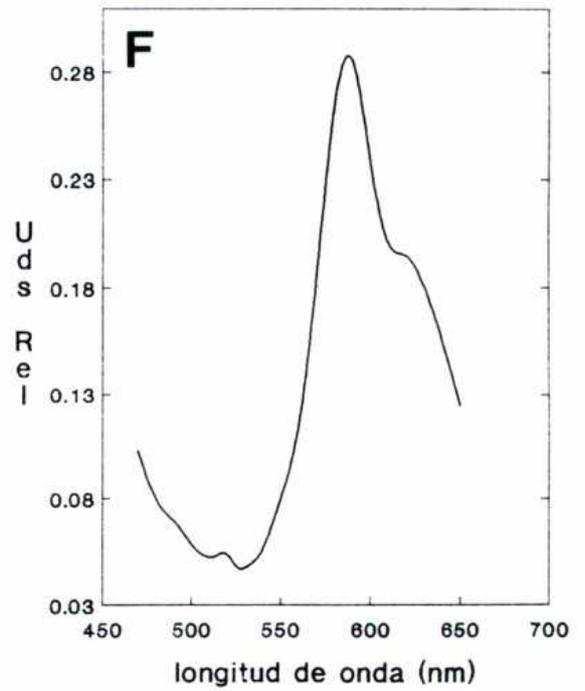
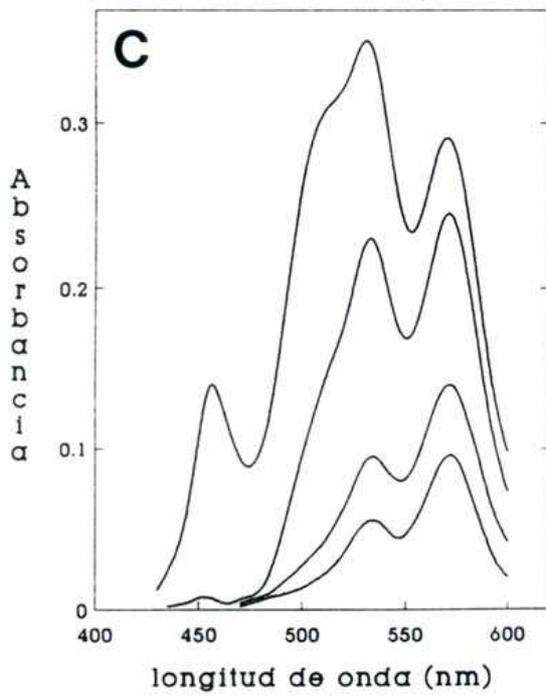
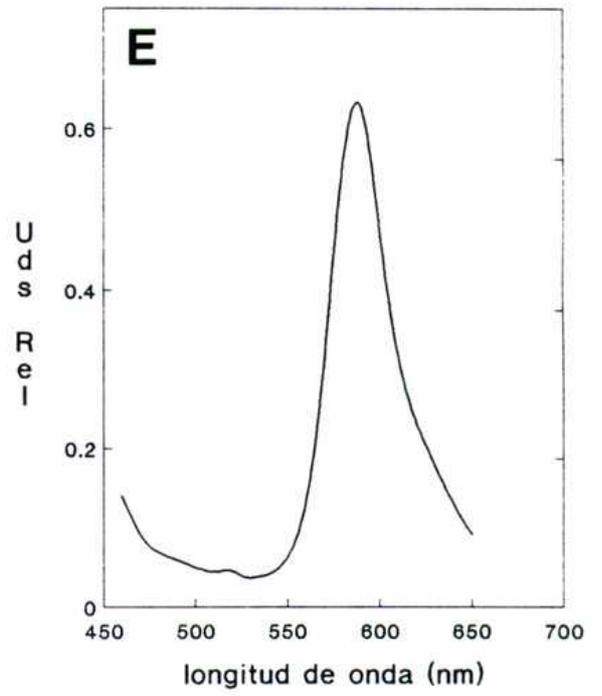
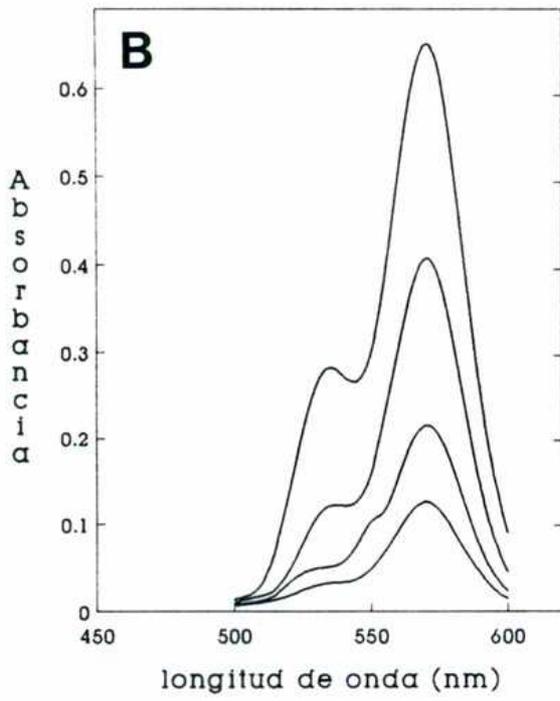
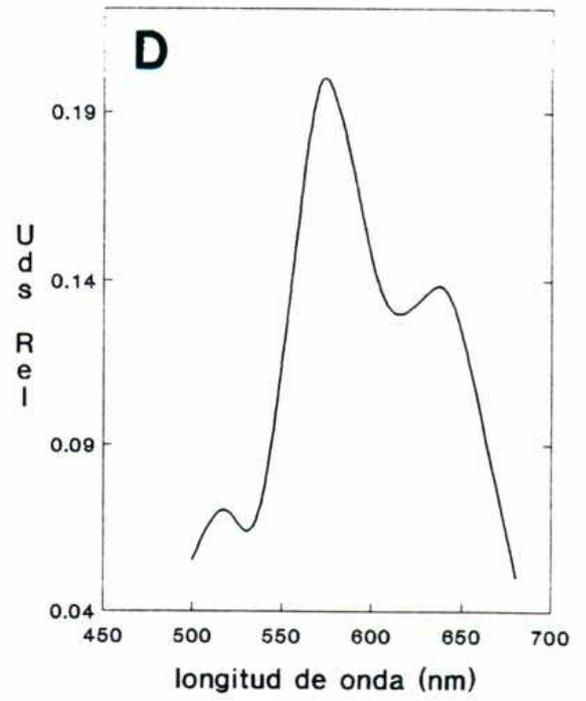
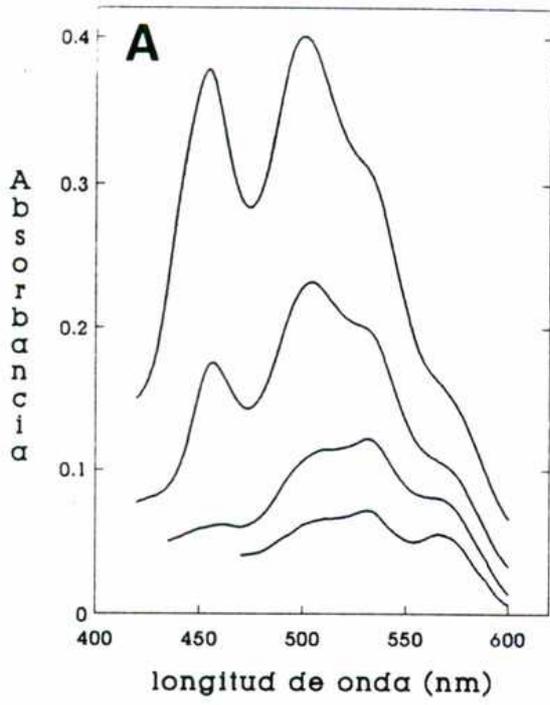


Figura III-8: Efecto de la introducción de distintos porcentajes de colesterol en los espectros de absorción de MC540 en liposomas de DMPC con: (A): 0%; (B): 5%; (C): 10% y (D): 35% de colesterol. Relaciones lípido/sonda descritas en la figura III-6. MC540 se adicionó a las dispersiones lipídicas previamente equilibradas a $T=13^{\circ}\text{C}$.



Los espectros de absorción muestran que el pico a 450 nm desaparece en fase líquido-cristalina y reaparece al volver el sistema a fase gel. Sin embargo, la comparación entre los espectros III-7A y III-7C muestra notables diferencias en la distribución y peso relativo de los picos de absorción.

La banda de fluorescencia que se observa en el espectro III-7D a 630 nm desaparece gradualmente cuando la temperatura se incrementa y luego de la transición de fase está por completo ausente. En dicha fase líquido-cristalina el pico observado previamente a 570 nm se desplaza a 590 nm y la intensidad de fluorescencia aumenta significativamente (figura III-7E).

Cuando la temperatura vuelve a valores por debajo de la transición de fase principal, la señal a 630 nm se observa nuevamente.

Los picos de absorción a 450 nm y de emisión a 630 nm están sin embargo notablemente reducidos en comparación con los observados antes de realizarse el ciclo de temperaturas a través de la transición de fase.

Las figuras III-8 y III-9 muestran la evolución de los espectros de absorción y emisión cuando a liposomas compuestos por DMPC se adicionan distintas proporciones de colesterol.

La proporción del pico a 450 nm a 13°C disminuye ligeramente cuando se incluye un 5% mol/mol de colesterol en la bicapa de DMPC (figuras III-8A y III-8B), y en cambio aumenta cuando la proporción de colesterol es 10% (fig. III-8C). El casi imperceptible hombro a 570 nm en DMPC 100% sufre una evolución inversa a la anterior: aumenta con 5% de colesterol y disminuye en presencia de un 10% del mismo.

Figura III-7: Cambios en los espectros de absorción y de emisión de fluorescencia de MC540 en liposomas de DMPC producidos por el ciclo de calentamiento-enfriamiento a través de la temperatura de transición de fase principal. Los espectros de absorción fueron obtenidos a: (A): T = 13 °C; (B): T = 26 °C; (C): T = 13 °C luego de enfriar la muestra desde 26 °C (relaciones lípido/sonda iguales a las indicadas en la leyenda de la figura III-6). Los espectros de fluorescencia fueron obtenidos a: (D): T = 8 °C; (E): T = 28 °C; (F): T = 7 °C luego de enfriar la muestra desde 28 °C. En todos los casos fue $\lambda_{exc} = 440$ nm y relación lípido/sonda 200:1. 

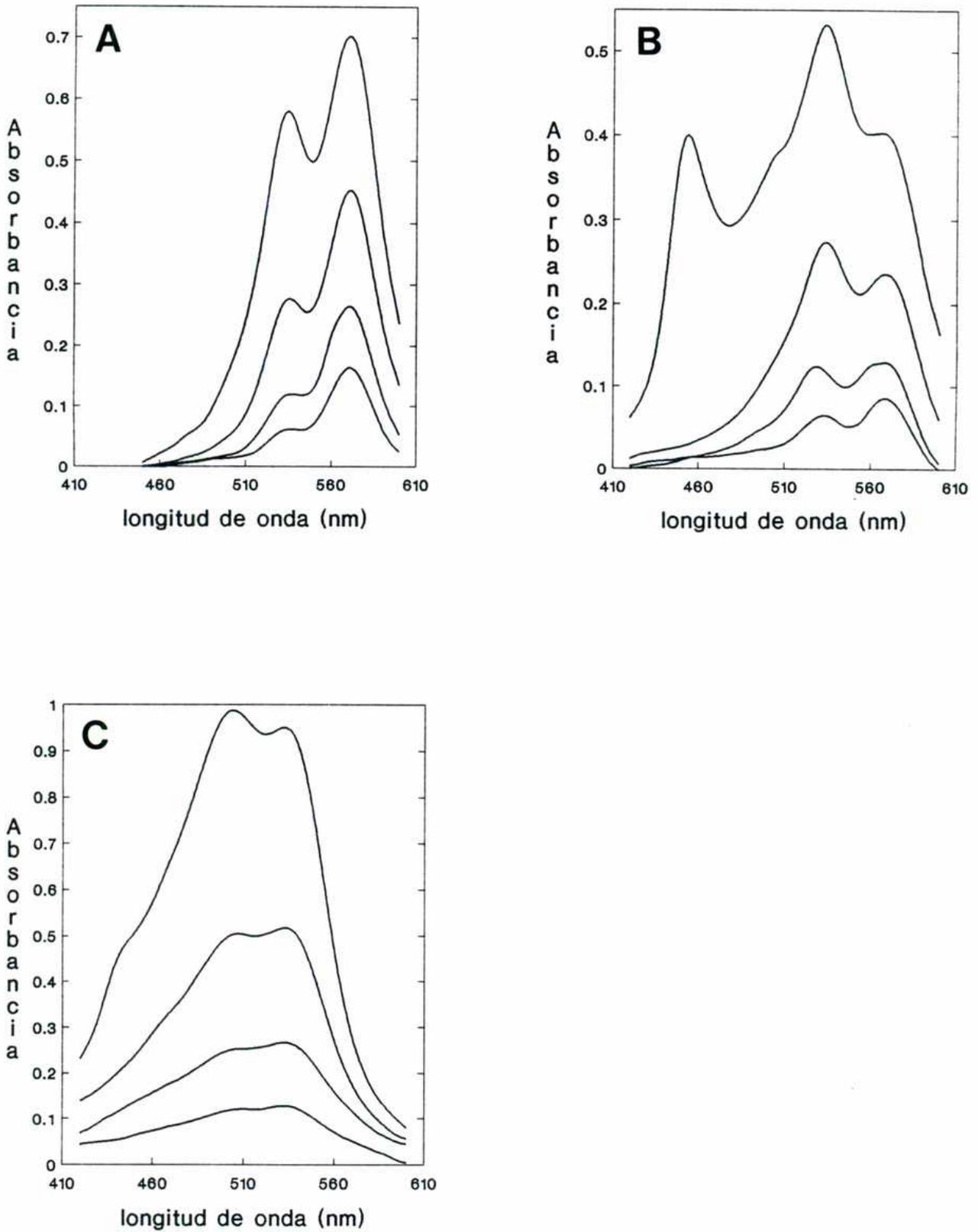


Figura III-6: Espectros de absorción de MC540 en presencia de liposomas compuestos por mezclas DMPC/DPPC, a 30 °C. (A): 100% DMPC; (B): 35% DMPC/65%DPPC, (C) 100% DPPC. En los tres casos las relaciones lípido/sonda fueron 200:1, 100:1, 50:1 y 25:1, desde el espectro inferior hasta el superior. MC540 fue adicionada a la dispersión lipídica luego de que ésta alcanzara el equilibrio a la temperatura indicada.

TABLA III-2: Efecto de la longitud de cadena y grado de ramificación de los ácidos grasos sobre el espectro de absorción de MC540 en liposomas en fase gel.

FOSFOLIPIDO	TEMPERATURA (°C)	RELACION 450/530
Di (14:0) PC	13	2.75
Di (15:0) PC	13	0.61
Di (16:0) PC	25	0.50
(18:0)-(14:0) PC	14	0.62
Di 17:0i- PC	25	0.65

Relación s/l: 0.04 mol/mol.

A 30°C liposomas compuestos por DMPC pura se encuentran en fase líquido-cristalina. En dichas condiciones, el espectro característico de MC540 puede verse en la figura III-6A. Las bandas de absorción características están centradas a 530 y 568 nm, aproximadamente. Un espectro completamente análogo se obtiene para liposomas constituidos por una mezcla 65% DMPC/ 35% DPPC a la misma temperatura (espectro no mostrado). Las mezclas 35% DMPC/ 65% DPPC se encuentran en fase gel a 30°C (van Dijck et.al., 1977; Shimshick y McConnell, 1973). El espectro de absorción correspondiente (figura III-6B) muestra un notable pico a 450 nm y un hombro a 505 nm para la relación sonda/lípido más alta.

En la figura III-6C, el espectro de absorción de liposomas compuestos por DPPC 100% a 30°C muestra un suave hombro a 450 nm. A dicha temperatura, la bicapa de DPPC se encuentra en los límites de la pretransición entre fases gel $L_{\beta'}$ y $P_{\beta'}$ (la T_{pt} reportada varía entre 34 y 35°C de acuerdo a la técnica empleada (Davis, 1983; Chen et al., 1980).

En la figura III-7 puede verse el cambio de los espectros de absorción y emisión de fluorescencia cuando liposomas de DMPC 100% en fase gel en presencia de MC540 (espectros III-7A y III-7D) son llevados a fase líquido-cristalina (espectros III-7B y III-7E) y luego nuevamente a fase gel (espectros III-7C y III-7F).

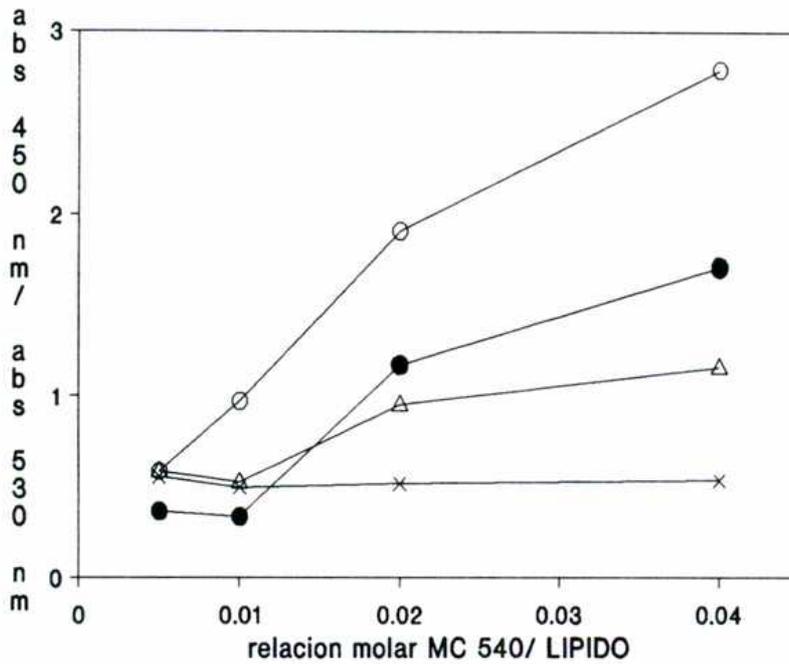


Figura III-5: Influencia de la relación sonda/lípido sobre el cociente de absorbancias medidas a 450 nm y 530 nm para MC540 en liposomas de diferente composición. Composición lipídica: 100% DMPC (O); 50% DMPC-50% DPPC (●); 65% DPPC-35% DMPC (Δ); 100% DPPC (X). T = 13 °C. Los ensayos se realizaron en iguales condiciones a las descritas en la figura III-4.

La influencia de la longitud de la cadena de ácidos grasos del lípido se ve en la tabla III-2. La relación $\text{abs}(450\text{nm}) / \text{abs}(530\text{nm})$ para el di-15:0 PC es intermedia entre DMPC (di-14:0 PC) y DPPC (di-16:0 PC), para la misma relación sonda/lípido. Comparando con DMPC (di-14:0 PC) el reemplazo de una de sus cadenas de ácidos grasos por otra más larga de 18 carbonos en la posición 2 (14:0/18:0 PC) decrece notablemente la proporción del pico a 450 nm.

Por otra parte, una ramificación en la cadena de ácidos grasos en la región hidrofóbica como es el caso del lípido análogo de DPPC, diisomerganoilfosfatidilcolina (di-17:0i PC), el cual tiene un grupo metilo en la posición 15, origina la aparición del pico a 450 nm.

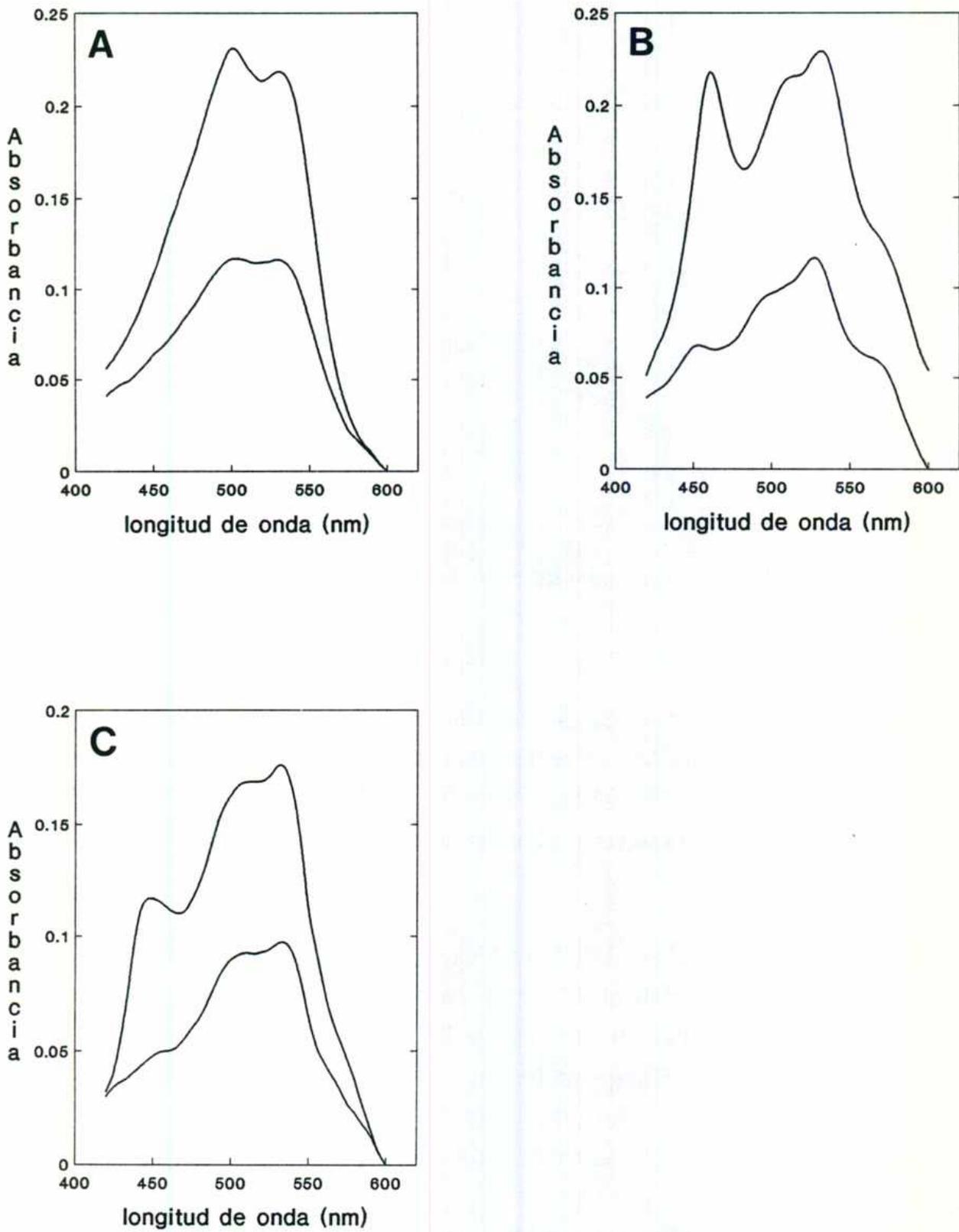


Figura III-4: Espectros de absorción de MC540 en liposomas de DMPC y DPPC. Mc540 se adicionó a 13°C a la solución externa de una dispersión de liposomas de diferentes composiciones lipídicas: (A): 100% DPPC; (B): 100% DMPC; (C): 50% DMPC/50% DPPC. Relación lípido/sonda 200:1 (espectros superiores) y 100:1 (espectros inferiores).

En cloroformo, la absorción del monómero está centrada a 568 nm y no se observa la banda del dímero a 502 nm. El espectro de emisión en cloroformo corresponde a la especie monómero. Los espectros de emisión en agua y en cloroformo que se muestran en las figuras III-3 C y D fueron obtenidos bajo idénticas condiciones instrumentales y por lo tanto las respectivas escalas son comparables. Se observa que la emisión en agua es mucho menos intensa que en cloroformo, aún cuando las absorbancias de ambas muestras a la longitud de onda de excitación son similares ($A(530 \text{ nm}) \cong 0.03$, ver figuras II-3 A y B). Esto indica que el rendimiento cuántico de fluorescencia del monómero en agua es mucho menor que en cloroformo.

La figura III-4A muestra el espectro de absorción de MC540 en contacto con liposomas de DPPC en fase gel (13°C , fase L_{β}').

Se observan dos bandas de absorción centradas a 500 y 530 nm para las dos relaciones lípido sonda empleadas (200:1 y 100:1). El espectro registrado a la misma temperatura y relaciones lípido sonda para el fosfolípido DMPC (fase gel P_{β}') muestra en su espectro un pico adicional a 450 nm y un hombro de absorción aproximadamente a 570 nm (figura III-4B).

La inclusión de DPPC en un 50 % en una membrana de DMPC decrece el pico a 450 nm, mientras el hombro a 570 nm resulta casi imperceptible (figura III-4C).

En la figura III-5 se grafica el crecimiento relativo del pico a 450 nm respecto de la banda a 530 nm (tomando como línea de base el valor de absorbancia a 600 nm) en función de la relación MC540/lípido. Cada curva representa una composición lipídica diferente cuyos espectros fueron registrados en fase gel a 13°C . El pico a 450 nm aumenta notablemente en membranas de DMPC puras. Las membranas de DMPC mixtas con DPPC muestran una disminución del crecimiento relativo del pico a 450 nm, que en el caso de membranas de DPPC pura es nulo.

III.4 RESULTADOS

La figura III-3 muestra los espectros de absorción y emisión de fluorescencia de una solución de concentración 5×10^{-6} M de MC540 en agua (A y C) y en cloroformo (B y D). En agua, MC540 dimeriza aún a muy bajas concentraciones, y las bandas de absorción a 503 y 535 nm corresponden a dímero y monómero, respectivamente. En el espectro de emisión de fluorescencia sólo se observa una banda ancha correspondiente a la emisión del monómero, centrada a 578 nm.

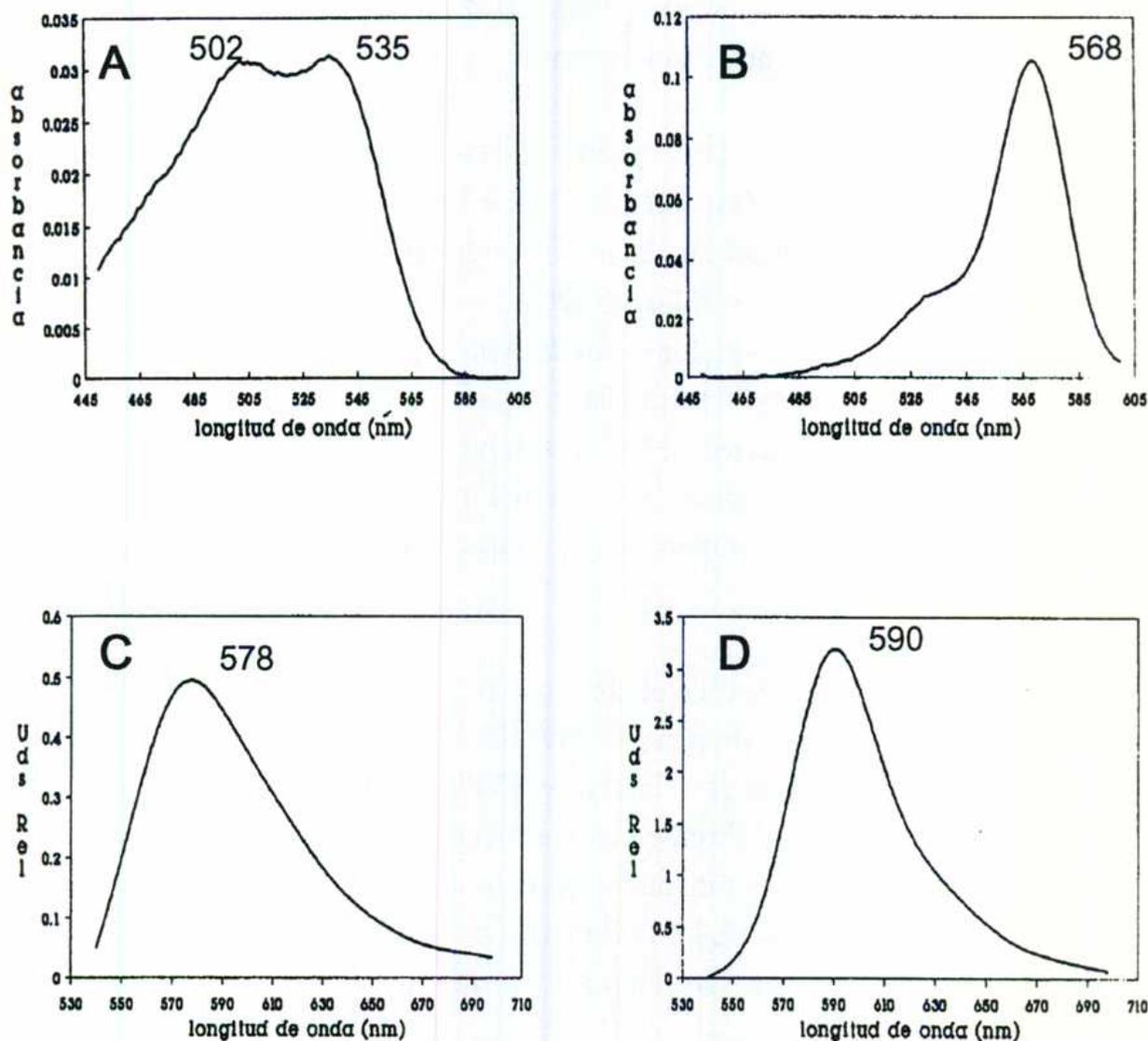


Figura III-3: Espectros de absorción y emisión de fluorescencia de una solución 5×10^{-6} M de MC540 en agua (A y C) y cloroformo (B y D). En cada espectro se indica λ (nm) del máximo de absorción o de emisión, según corresponda. En C y D es $\lambda_{exc} = 530$ nm.

TABLA III-1: Datos espectroscópicos de MC540 en distintos sistemas.

λ_{abs} : longitud de onda del máximo de absorción; ϵ_{λ} : coeficiente de extinción molar a longitud λ (λ se indica entre paréntesis); $\lambda_{\text{emis}}^{\text{max}}$: longitud de onda del máximo de emisión; ϕ_f : rendimiento cuántico de fluorescencia; K_d : constante de dimerización.

Sistema	Especie	λ_{abs} (nm)	ϵ_{λ} ($M^{-1}cm^{-1}$)	$\lambda_{\text{emis}}^{\text{max}}$ (nm)	ϕ_f	K_d (M^{-1})	Referencia
EPC SUV	dímero monóm.	532 568	6.0×10^3 (571) 1.7×10^5 (571)				Waggoner & Grinvald (1977)
EPC SUV	monóm.		1.6×10^5 (567)				Lelkes & Miller (1980)
H ₂ O SDS CTAB	monóm.	533 558	4.7×10^4 (533) 1.0×10^5 (558)	572 585 586	0.05 0.39 0.62		Dixit & Mackay (1983)
EPC LUV						6.8×10^4	Sikurova et al. (1988)
EPC SUV						6.4×10^4	Verman & Frosch (1985)
EPC SUV						2.6×10^5	Ehrenberg & Pevzner (1993)
DMPC LUV	dímero	532	5.4×10^3 (568)			4.3×10^3	Sikurova et al. (1989)
DMPC LUV: 5°C 20°C 30°C	monóm.	568 568 568		586 586 586	0.60 0.60 0.60		Aramendia et al. (1988)

EPC y DMPC en fase líquido-cristalina y la influencia de la temperatura en el equilibrio de dimerización. Es interesante observar que los autores obtienen un valor para la constante determinada en EPC ($6.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, 1988) muy similar al obtenido por Verkman y Frosch ($6.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$; 1985), calculadas ambas a la misma temperatura en base a los coeficientes de extinción de monómero y de dímero reportados previamente por Waggoner y Grinvald (1977). La constante determinada en DMPC da un valor considerablemente menor: $4.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$.

Todos estos estudios de caracterización del comportamiento espectroscópico de MC540 en membranas lipídicas en fase líquido-cristalina han mostrado la alta sensibilidad de la sonda para detectar cambios estructurales y/o eléctricos en membranas biológicas y modelo.

En la tabla III-1 puede consultarse un resumen de los datos espectroscópicos concernientes a dicha sonda de interés para los estudios realizados en esta tesis.

En base a esta caracterización previa, los estudios posteriores han centrado su atención en el empleo de MC540 como sensor de potencial superficial (Biondi et al., 1991); ampliamente como fotosensitizador (producción de oxígeno singlete; Feix et al., 1988; Hoebeke et al., 1991 y referencias allí citadas) y sensor de potencial transmembrana (Kalenak et al., 1991 y referencias allí citadas). A nivel estructural, MC540 ha demostrado ser sensible a cambios en el empaquetamiento de los lípidos producido por cambios de área en isotermas presión lateral/área en monocapas (Yu y Hui, 1992) y en zonas de coexistencia gel/líquido-cristalina (Stilwell et al., 1993).

III.3 METODOS

Se prepararon liposomas MLV por el método descrito en el capítulo II. Los liposomas obtenidos se estabilizaron a la temperatura del experimento durante 15-20 minutos antes de agregar la alícuota correspondiente de una solución stock recientemente preparada de MC540 en el mismo buffer. Los liposomas se incubaron entonces a dicha temperatura durante un período adicional de 20-30 minutos en presencia de la sonda antes de registrar los espectros.

constante en el mismo sistema empleando los coeficientes de extinción anteriormente determinados.

El proceso global de dimerización propuesto por Waggoner (1979) se divide en dos pasos: el primero de ellos corresponde a la reorientación de la sonda y el segundo a la dimerización propiamente dicha. Verkman y Frosch indican que el paso limitante correspondería a la reorientación del monómero desde la posición perpendicular hacia la paralela a la superficie de la bicapa lipídica (ver figura III-2).

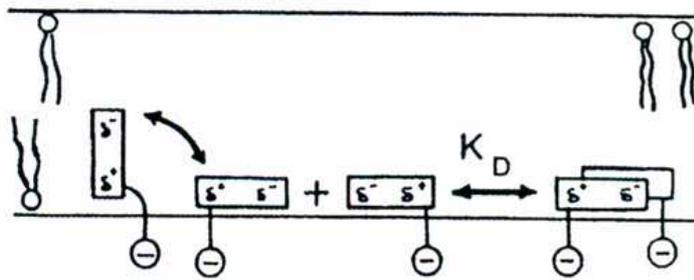


Figura III-2: Esquema propuesto para el proceso de reorientación y dimerización de MC540 en bicapas lipídicas.

Verkman posteriormente modifica su modelo y basado en experimentos de quenching de fluorescencia propone que el dímero se orienta paralelo a los lípidos en la membrana (Verkman, 1987). Dicha sugerencia contradice la mayor parte de los estudios y es discutible ya que estos estudios fueron realizados para relaciones extremadamente altas de sonda: aproximadamente dos moléculas de lípido por cada molécula de sonda. Esta proporción impide sacar conclusiones ya puede existir perturbación de la membrana por la alta proporción de sonda.

Un estudio reciente sobre las características fotofísicas de merocianina 540 en liposomas unilamelares grandes de DMPC es el realizado por Aramendía et al. (1988). Este estudio ofrece además datos concernientes al comportamiento de la sonda asociada a membranas en fase gel.

Sikurova et al. determinaron en varios estudios consecutivos (1988, 1989, 1990 y 1991) las constantes de equilibrio monómero-dímero en liposomas de

Ross et al. (1974) y Tasaki et al. (1974) fueron los primeros en demostrar, en base a espectros de absorción, emisión y excitación de fluorescencia, que la sonda se adsorbe en membranas tanto como monómero o como dímero, existiendo entre ellos un equilibrio.

Ambos autores sugirieron que el mecanismo de respuesta espectroscópica de MC540 en membranas sometidas a un cambio de potencial proviene de la interconversión de dímero (muy poco fluorescente) en monómero altamente fluorescente.

Posteriores trabajos de Tasaki et al. (1976) y Ross et al. (1977), descartan que la causa de dicho cambio espectroscópico sea electrocromismo, es decir, que el cambio en el campo eléctrico induzca una variación del coeficiente de extinción de la especie. Se sugiere en cambio que el proceso consiste en una reorientación de la sonda acoplada a un cambio en la agregación, el cual sería favorecido por la diferencia entre los momentos dipolares de monómero y dímero. Según Ross et al. (1974) el monómero estaría orientado en posición perpendicular a la superficie de la membrana y el dímero en forma paralela.

Dos estudios inmediatos apoyaron el mecanismo descrito. En primer lugar, Waggoner y Grinvald (1977) determinaron la existencia de un equilibrio monómero-dímero en base a experimentos de titulación de vesículas de fosfatidilcolina siguiendo el método de West y Pearce (1965).

Posteriormente, estudios realizados por Dragsten y Webb (1978) empleando luz polarizada en membranas orientadas, reafirman el mecanismo de reorientación y dimerización.

Lelkes (1979) observa que el modo de acción de MC540 es marcadamente similar cuando se emplea para detectar cambios estructurales originados tanto en la transición de fase como por la acción de un potencial transmembrana.

El primer estudio sistemático de parámetros espectroscópicos de MC540 en varios solventes fue realizado por Dixit y Mackay (1983). Este trabajo involucra también medios microheterogéneos (micelas y emulsiones) en los cuales la sonda presenta un gran aumento en su fotoestabilidad y rendimiento cuántico de fluorescencia.

Si bien Waggoner et al. (1977) calcularon por primera vez los coeficientes de extinción de monómero y dímero en vesículas de EPC, no informaron el valor de la constante de dimerización. Verkman y Frosch (1985) calculan dicha

colesterol. Los resultados obtenidos mediante las técnicas antes mencionadas muestran algunas controversias sobre la interpretación de las modificaciones introducidas por colesterol en la membrana.

La sonda espectroscópica merocianina 540 (MC540) es sensible a los cambios de fase, a las propiedades eléctricas de una membrana y a la presencia de colesterol en la bicapa. Los estudios hasta ahora realizados con esta sonda no han explorado la información que podría obtenerse concerniente a membranas en fase gel.

En este capítulo por medio de estudios espectroscópicos con MC540 se analizan las propiedades superficiales de membranas en función de la composición lipídica (longitud de cadena de ácidos grasos, presencia de colesterol) y de la temperatura (fase $L_{\beta'}$, $P_{\beta'}$ y L_{α}).

Los resultados obtenidos se comparan con la información precedente en literatura obtenida mediante diversas técnicas.

III.2 ESTUDIOS PREVIOS REALIZADOS CON MEROCIANINA 540 EN MEMBRANAS LIPIDICAS

MC540 es una sonda espectroscópica que ha sido estudiada exhaustivamente en las dos últimas décadas por su sensibilidad para detectar cambios de diversa naturaleza en membranas lipídicas. La estructura química de esta sonda se representa en la figura III-1.

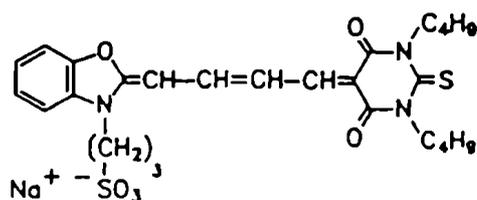


Figura III-1: Estructura molecular de MC540.

III.1 INTRODUCCION

Las características topológicas de la fase gel que los fosfolípidos adoptan a temperaturas por debajo de la transición de fase principal T_t han sido exhaustivamente estudiadas en las dos últimas décadas mediante diferentes técnicas. En liposomas multilamelares, existen dos subfases principales dentro de la fase gel: por debajo de la denominada temperatura de pretransición (T_{pt}) la fase $L_{\beta'}$ y entre dicha temperatura y la de transición principal (T_t) la fase llamada $P_{\beta'}$ (figura I-1).

La fase $P_{\beta'}$ se caracteriza por la presencia de una superficie corrugada acompañada por una inclinación de las cadenas de ácidos grasos con respecto de la normal a la superficie de la membrana (Janiak et al., 1979; figura I-2).

Se postula que esta estructura espacial facilita el empaquetamiento de lípidos cuya región de la cabeza polar hidratada es más voluminosa que la correspondiente a las cadenas de ácidos grasos. En este arreglo pueden encontrarse membranas compuestas por PC o por PG (Pascher et al., 1992; figura I-1).

En la fase $L_{\beta'}$ las cadenas de ácidos grasos están también inclinadas respecto de la normal con un ángulo ligeramente mayor del observado en fase $P_{\beta'}$, al menos para el caso de membranas compuestas por DPPC (Janiak et al., 1979).

La existencia de superficies corrugadas en fase gel se ha investigado mediante técnicas de microscopía electrónica de criofractura, rayos X y difracción de neutrones a ángulos pequeños. Los primeros estudios atribuyeron la estructura ondulada exclusivamente a la fase $P_{\beta'}$ (Luna y McConnell, 1977; Janiak et al., 1976; Gebhardt et al., 1977). Estudios posteriores realizados por los mismos autores mostraron sin embargo que la estructura ondulada se observa también por debajo de la T_{pt} , aunque el espacio repetitivo entre las ondulaciones es mayor y la amplitud y correlación de las mismas es menor (Copeland y McConnell, 1980; Mortensen et al., 1988).

La presencia de colesterol en la bicapa afecta la periodicidad y organización de esa estructura rugosa. Un detallado estudio reciente realizado mediante dispersión de neutrones a ángulos pequeños (SANS) por Mortensen et al. (1988) muestra complejos diagramas de fases para las mezclas colesterol/fosfatidilcolina en función de la temperatura, hidratación y porcentaje de

CAPITULO III

***ESTUDIOS ESPECTROSCOPICOS
EN MEMBRANAS
EMPLEANDO LA SONDA
MEROCIANINA 540.***

***RELACION DE CAMBIOS
ESPECTROSCOPICOS CON
PROPIEDADES TOPOLOGICAS***

unilamellaridad de las vesículas obtenidas se corroboró mediante microscopía electrónica.

II.2.c.3 Unilamelares pequeños (SUV):

La suspensión de liposomas multilamelares de concentración deseada se sonicó mediante un sonicador de punta de titanio W-375 Heat systems-Ultrasonic Inc., a temperaturas superiores a las de transición gel-líquido cristalina y bajo atmósfera de nitrógeno, hasta obtener una suspensión completamente clara y traslúcida. Las partículas de titanio remanentes fueron removidas mediante centrifugación.

Una dispersión de liposomas procedentes de la misma solución stock que las muestras fue empleada para corrección por dispersión de luz y turbidez en los espectros de fluorescencia y absorción.

La concentración final de los lípidos se mantuvo en todos los casos entre 8×10^{-4} M y 1.2×10^{-3} M.

En el caso de MC540 la sonda se adiciona a los liposomas previamente preparados agregando alícuotas de una solución madre del mismo buffer Tris-HCl 10 mM pH 7.4. Las relaciones lípido/sonda se indican en cada caso. El procedimiento seguido para marcar los liposomas con MC540 se especifica detalladamente en los capítulos correspondientes (III y IV).

En el caso de las sondas DPE y DA la única diferencia es que la sonda se agrega a la solución clorofórmica del lípido en la proporción deseada antes de preparar el film. La relación molar sonda/lípido empleada en este caso fue menor que 1:400.

La termostatación se realizó mediante circulación de una mezcla etanol/agua empleando un criotermostato Lauda RUL 480; la temperatura se controló (precisión ± 0.2 °C) dentro de la cubeta mediante una termocupla en los experimentos de absorción y mediante un termómetro de resistencia Pt-100 en los experimentos de fluorescencia.

II.2.b Espectroscopía de emisión de fluorescencia.

Los espectros de fluorescencia estacionaria fueron registrados en un espectrofluorómetro Perkin Elmer LS5 y en un SLM 8000C en cubetas de 1 y 3 ml respectivamente (1 cm camino óptico). Las medidas de anisotropía estacionaria fueron obtenidas en el espectrofluorómetro SLM, provisto de polarizadores de excitación y emisión en formato L.

En todos los casos, las medidas se realizaron empleando un tiempo de 0.5-1 s de integración de la señal y ranuras angostas de 0.5 nm, para minimizar problemas de dispersión de luz y depolarización por turbidez (Faucon y Lussan, 1973).

El voltaje del fotomultiplicador, ranuras, tiempo de integración y suavizado de curvas fueron mantenidas constantes durante el experimento a fin de poder comparar los valores de intensidad de fluorescencia en función de la temperatura y/o composición, según corresponda.

II.2.c Preparación de liposomas.

II.2.c.1 Multilamelares (MLV):

Los liposomas multilamelares fueron preparados mediante el método descrito por Bangham et al. (1974). Una solución clorofórmica del lípido es evaporada en las paredes de un balón bajo vacío o mediante flujo de nitrógeno. El film seco se dispersa mediante agitación mecánica en buffer Tris-HCl 10 mM, pH 7.4 (fuerza iónica 0.01) a temperaturas superiores a la de transición de fase del o de los lípidos presentes.

II.2.c.2 Unilamelares grandes (LUV):

Los liposomas unilamelares se obtuvieron mediante extrusión de liposomas multilamelares a través de membranas de policarbonato de 100 nm de poro empleando el extruder LIPOSOFAST (Vancouver, Canada), según el procedimiento descrito por MacDonald et al. (1991). El tamaño y la

II.1 MATERIALES

Dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) y dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG) fueron obtenidos de Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, AL) y Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) indistintamente.

Dipentadecanoilfosfatidilcolina (di 15:0 PC) y 1-miristoil-2-estearoilfosfatidilcolina (14:0/18:0 PC) fueron obtenidas de Avanti Polar Lipids, Inc (Birmingham, AL). Diisomarganoilfosfatidilcolina (di 17:0i PC) fue un obsequio del Dr. Mc Elhaney (Edmonton, Canadá). Todos los lípidos fueron del más alto grado de pureza disponible y mostraron una única mancha mediante cromatografía en capa delgada, empleando como solvente de desarrollo cloroformo:metanol: agua 65:5:5. Por lo tanto fueron utilizados sin purificación adicional.

Merocianina 540 (MC540), colesterol, floretina y Trizma fueron obtenidos de Sigma Chemical Co (St. Louis, MO). La pureza de MC540 fue chequeada mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

Dansil (N-[5-(dimetilamino)naftaleno-1sulfonil]fosfatidiletanolamina (DPE) y dansildihexadecilamina (DA) fueron obtenidas de Molecular Probes Inc. y usadas sin purificación adicional.

Los solventes empleados fueron de grado analítico y el agua para preparación de la solución buffer fue destilada y luego purificada empleando un filtro Millipore Super-Q.

II.2 METODOS GENERALES

II.2.a Espectroscopía de absorción.

Los espectros de absorción fueron obtenidos en un espectrofotómetro Hitachi 100-60 de doble haz (2 nm de ancho de banda) y en un Perkin Elmer Lambda 6. Se emplearon celdas de cuarzo de 2 ml (1 cm de camino óptico).

CAPITULO IV

***ESTUDIOS ESPECTROSCOPICOS
EN MEMBRANAS
EMPLEANDO LA SONDA
MEROCLANINA 540.***

***ASIGNACION DE LAS
BANDAS DE ABSORCION
Y EMISION***

IV.1 INTRODUCCION

La asignación de bandas de absorción y emisión de fluorescencia de MC540 a una determinada localización de la sonda en la membrana se ha hecho sólo para bicapas en estado líquido-cristalino. En dicha fase se han determinado las constantes de equilibrio monómero-dímero en membranas de fosfatidilcolina (Waggoner y Grinvald, 1977; Verkman y Frosch, 1985; Sikurova et al., 1988). Estos últimos autores han estudiado también la influencia de la temperatura en el equilibrio de dimerización (ver revisión de estudios previos en capítulo III).

En el capítulo anterior se describieron las características de la sonda espectroscópica merocianina 540 interactuando con membranas de fosfatidilcolina en fase gel. La aparición de nuevas bandas de absorción a 450 nm y de emisión de fluorescencia a 630 nm fueron correlacionadas con las propiedades topológicas superficiales.

La identificación de las especies que dan origen a las nuevas bandas espectroscópicas es indispensable para la comprensión de los procesos de interfase. Asimismo, presenta gran interés la determinación de constantes de equilibrio entre las especies en fase membrana en función de los distintos factores que puedan afectar la estructura de la misma. Este puede ser un método de estudio directo de los fenómenos interfaciales desde un punto de vista estático.

A tal fin se diseñaron dos tipos de experimentos:

- En condiciones en que la sonda se adiciona externamente en distintas relaciones sonda/lípido a liposomas en fase gel se obtuvieron los espectros de absorción, excitación y emisión de fluorescencia y se estudió la evolución de los mismos en función de la temperatura.
- En condiciones de muy baja relación sonda/lípido en las cuales toda la sonda se encuentra insertada o adsorbida en la membrana se analizaron los espectros en comparación con los obtenidos mediante el procedimiento anterior.

El análisis conjunto de ambos tipos de estudios permite asignar las nuevas bandas de absorción y emisión mencionadas, y en base a ello se discute la utilidad diagnóstica de dichas señales espectroscópicas.

IV.2 METODOS

Los liposomas multilamelares y unilamelares se prepararon en la forma descrita en el capítulo II de Métodos Generales.

IV.2.a Marcación de las membranas con MC540.

La marcación de ambos tipos de liposomas con MC540 se realizó siguiendo dos procedimientos diferentes:

PROCEDIMIENTO 1:

Los liposomas se estabilizaron en fase gel a la temperatura establecida para el experimento durante no menos de 20 minutos antes de adicionar la sonda.

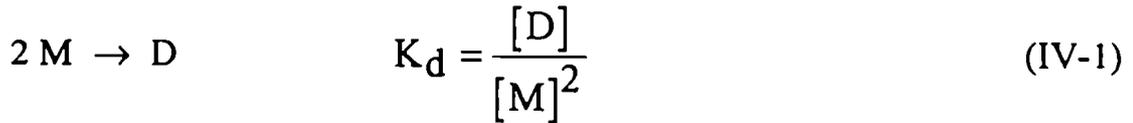
PROCEDIMIENTO 2:

La MC540 se adicionó en la proporción deseada a la suspensión de liposomas a temperaturas superiores a la de transición de fase gel/líquido-cristalina. Luego de una incubación de 20 minutos, los liposomas se llevaron a la temperatura deseada para el correspondiente estudio.

Luego de aplicar el procedimiento elegido de adición de la sonda se incubó el sistema durante no menos de 20 minutos antes de registrar los espectros. La importancia y utilidad de cada procedimiento se discutirá detalladamente más adelante.

IV.2.b Cálculo de la constante de equilibrio de dimerización.

Los cambios espectrales observados al variar la concentración de MC540 fueron interpretados suponiendo un equilibrio de dimerización para relaciones s/l menores que un cierto valor de saturación, con una constante de dimerización K_d :



donde [M] y [D] son las concentraciones molares de monómero y dímero respectivamente. Definimos "valor de saturación" al valor límite de relación sonda/lípido a partir del cual un incremento en la proporción de sonda hace que el sistema deje de cumplir con las leyes de masa para el equilibrio monómero-dímero.

La expresión logarítmica de la ecuación (1) es

$$\log [D] = 2 \log [M] + \log K_d \quad (\text{IV-2})$$

Cuando la totalidad de la sonda está asociada a la membrana, el siguiente balance de masa es válido,

$$C = [M] + 2 [D] \quad (\text{IV-3})$$

luego,

$$[D] = \frac{(C - [M])}{2} \quad (\text{IV-4})$$

donde C representa la concentración total de sonda.

La absorbancia total de la solución, por unidad de camino óptico, a la longitud de onda λ_1 está dada por la expresión:

$$A(\lambda_1) = \epsilon_M^{\lambda_1} [M] + \epsilon_D^{\lambda_1} [D] \quad (\text{IV-5})$$

Donde $\epsilon_x^{\lambda_1}$ representa el coeficiente de absorción molar de la especie x indicada por el subíndice, a la longitud de onda λ_1 .

Reemplazando la ecuación (IV-4) en (IV-5) se obtiene

$$A(\lambda_1) = \epsilon_M^{\lambda_1} [M] + \epsilon_D^{\lambda_1} \left(\frac{C - [M]}{2} \right) \quad (\text{IV-6})$$

y entonces:

$$[M] = \frac{\left(A^{\lambda_1} - \frac{\epsilon_D^{\lambda_1}}{2} \times C \right)}{\left(\epsilon_M^{\lambda_1} - \frac{\epsilon_D^{\lambda_1}}{2} \right)} \quad (\text{IV-7})$$

[M] puede calcularse de (IV-7) si se miden $A(\lambda_1)$ y se conocen C y los coeficientes de absorción molar a la longitud de onda λ_1 de ambas especies. Mediante la ecuación (IV-2) es posible además verificar la existencia de sólo dos especies en equilibrio de dimerización. Dicha relación predice que en tal caso $\log[M]$ y $\log[D]$ calculadas mediante (IV-4) y (IV-7) deberían estar relacionadas linealmente, con pendiente igual a 2 y ordenada al origen $\log K_D$.

IV.3 RESULTADOS Y DISCUSION

IV.3.a Estudios en MLV.

La figura IV-1 muestra los espectros de emisión de fluorescencia de MC540 en presencia de liposomas multilamelares en fase gel marcados mediante el procedimiento 1 (ver Métodos/liposomas). La longitud de onda de excitación fue 530 nm. En DMPC a 8°C se observan dos bandas de emisión de fluorescencia centradas a 585 y 625 nm para la relación sonda/lípido (s/l) 1:150 (fig. IV-1A, espectro inferior). Un incremento en la concentración externa de sonda (s/l 1:100) produce un ligero desplazamiento del pico de 585 nm a 580 nm y del pico de 625 a 630 nm. Paralelamente se observa un aumento en la intensidad relativa del pico a 630 respecto del de 580 nm (6%). Para la mayor concentración de sonda ensayada las longitudes de onda de emisión se desplazan nuevamente a 575 y 633 nm, pero en este caso la intensidad relativa del pico a 633 nm es un 15% menor. En el caso de DPPC a la misma temperatura y similares relaciones sonda/lípido (parte B) los espectros muestran también dos bandas de emisión a 580 y 630 nm. El incremento en la concentración externa de sonda produce también un desplazamiento del pico a 580 nm hacia 575 nm. El gran incremento de esta señal finalmente oculta la banda a 630 nm para las mayores proporciones de sonda (s/l 1:50). La banda de 585-580 nm en ambos espectros se debe a la emisión superpuesta de monómero en agua y monómero en membrana.

Los espectros descriptos indican que la emisión a 630 nm se favorece preferentemente en la superficie en fase gel de MLV DMPC más que en DPPC. Esto puede deberse a una mayor adsorción de la especie que emite a 630 nm y/o a un mayor rendimiento cuántico de fluorescencia de la misma en DMPC que en DPPC. Recién para relaciones sonda/lípido tan altas como 1:50 el pico a 630 nm ya no aumenta su proporción respecto del de 575 nm. Los sitios disponibles para la adsorción de dicha especie estarían saturados y en consecuencia un incremento en la concentración de sonda sólo aumenta la señal de fluorescencia del monómero de MC540 en fase acuosa. Por esa razón se observa un desplazamiento gradual de la señal de 585 nm hacia 575 nm.

En el caso de DPPC para relaciones s/l 1:200 la proporción del pico a 630 es

alta (espectro inferior). Sin embargo cantidades crecientes de sonda sólo favorecen el aumento de la señal de monómero en fase acuosa, que tiende a ocultar el pico a 630 nm. Para relaciones s/l 1:50 el espectro global es similar al de un espectro de fluorescencia de MC540 en fase acuosa en ausencia de membranas lipídicas (ver fig. III-3C). Este hecho es consecuente con la forma de los espectros de absorción de MC540 en presencia de liposomas de DPPC en fase gel: a relaciones altas s/l, sólo parecen existir las bandas de absorción de la sonda en fase acuosa (fig. III-3A).

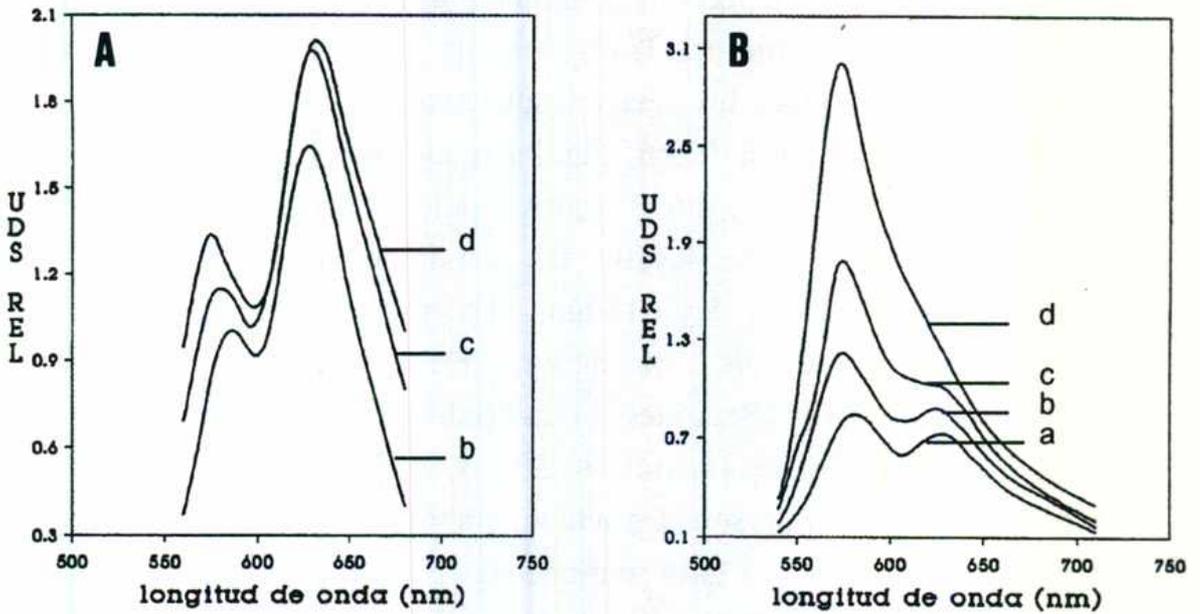


Figura IV-1: Espectros de emisión de fluorescencia de MC540 en contacto con liposomas multilamelares de DMPC (A) y DPPC (B) marcados mediante el procedimiento 1 (ver Métodos) a $T = 8^{\circ}\text{C}$. Las relaciones molares sonda/lípido son: a-1:200; b-1:150; c-1:100 y d-1:50. $\lambda_{\text{excit}} = 530 \text{ nm}$.

Los espectros de excitación de muestras similares (figuras IV-2 B y D; igual temperatura y relación s/l 1:200), confirman la existencia de monómero en fase acuosa y en membrana (530 y 570 nm absorción-excitación de monómero en agua y en membrana respectivamente), y la presencia adicional de dímero en fase acuosa (señal a 515 nm). Los espectros de emisión A y C en este caso excitando a 440 nm, muestran la emisión del monómero (580-584 nm), la intensa emisión a 630 nm y una pequeña señal a 490 nm. La emisión debida al dímero en agua (520 nm) es muy débil, aún cuando los espectros de excitación B y D indican una alta proporción de dicha especie en el sistema.

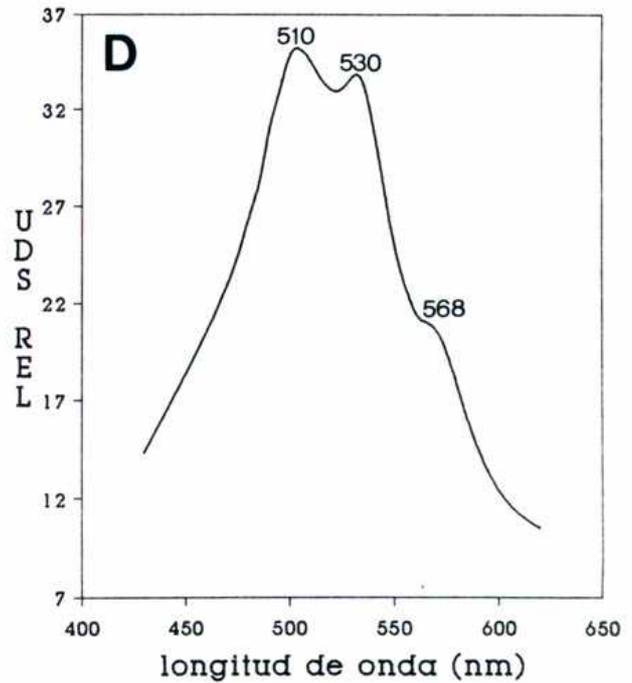
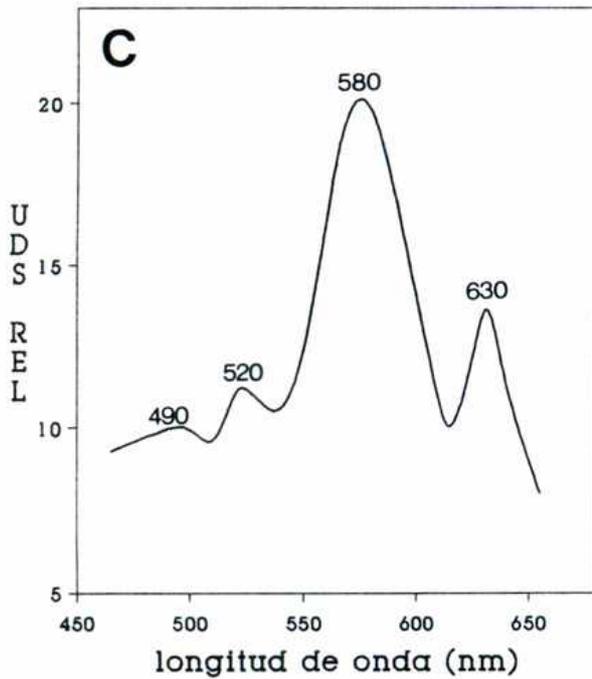
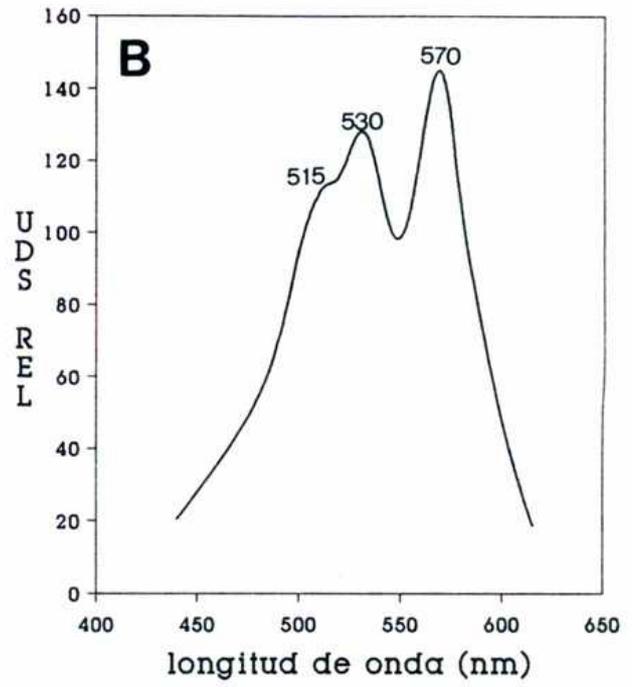
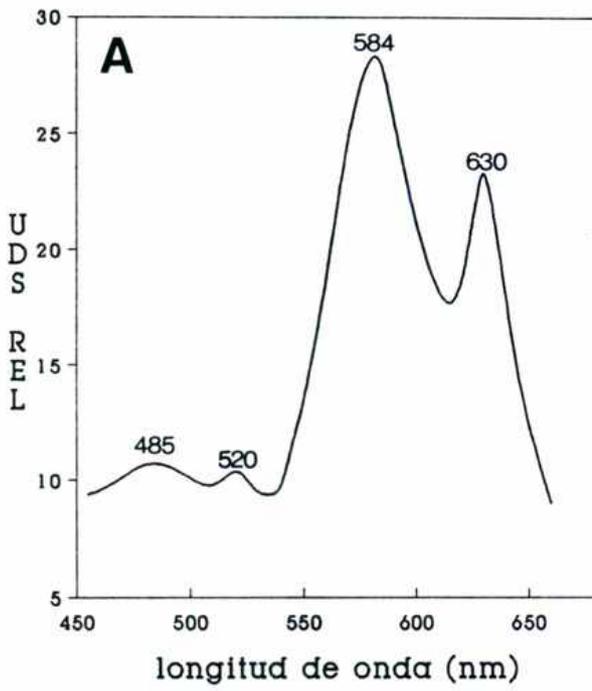


Figura IV-2: Espectros de excitación ($\lambda_{emisión} = 630 \text{ nm}$) y emisión de fluorescencia ($\lambda_{excit.} = 440 \text{ nm}$) de Mc540 en presencia de liposomas multilamelares de DMPC (A,B) y DPPC (C,D). Mc540 se adicionó mediante el procedimiento 1 al sistema en equilibrio a 8°C en relación sonda/lípido 1:200. La longitud de onda del máximo de cada banda se asigna en el espectro.

Es importante recalcar que los espectros de fluorescencia de las figuras IV-1 y IV-2 se obtuvieron adicionando la sonda a liposomas previamente estabilizados en fase gel, e indican por lo tanto la interacción de MC540 con la interfase externa de la membrana.

En la figura IV-3 A-D se muestra la evolución con la temperatura del espectro de emisión de fluorescencia de MC540/DMPC mostrado en la figura IV-1A para la relación s/l 1:150. Cuando la temperatura aumenta desde 8° a 18°C, lo cual representa a nivel membrana un cambio de fase $L\beta'$ a fase $P\beta'$, el pico a 585 nm se desplaza a 590 nm. La intensidad de emisión de ambos picos aumenta, pero en mucha mayor proporción para el pico a 590 nm (un 500% contra un 200% del pico 625 nm). La interacción de la sonda con la membrana aumenta, y MC540 comienza a ingresar al interior de la bicapa en fase gel pero ya en las cercanías de la transición de fase principal (el máximo de emisión se desplaza a 590 nm). Esto sugiere que la transición gel-líquido cristalina comienza a nivel de interfase de la membrana como etapa previa a la fusión de las cadenas hidrocarbonadas. Este punto será discutido más detalladamente en el capítulo V.

Un incremento de la temperatura a 28°C lleva la bicapa a fase líquido-cristalina, la sonda ingresa a la membrana y sólo se observa su emisión a 590 nm como monómero, 30 veces más intensa que la original (comparar figuras IV-3C y IV-3A). Cuando la misma muestra se lleva a la temperatura inicial de 8°C y los liposomas vuelven a fase gel, se observa la reaparición del pico a 630 nm en alta proporción, y la permanencia pico del monómero dentro de la bicapa (Fig. IV-3D, emisión a 590 nm).

El análisis de estos espectros, de los cambios en los máximos de emisión o excitación, y la aparición de pequeñas señales (emisión a 490 nm), demuestra la importancia que la concentración total de sonda tiene en la visualización de la señal de cada especie presente.

Con el fin de confirmar los datos obtenidos, se estudiaron liposomas de DPPC en fase gel agregando inicialmente la sonda mediante el mismo procedimiento que en las figuras 1 y 2 (procedimiento 1), pero ahora en proporciones sonda/lípido mucho menores.

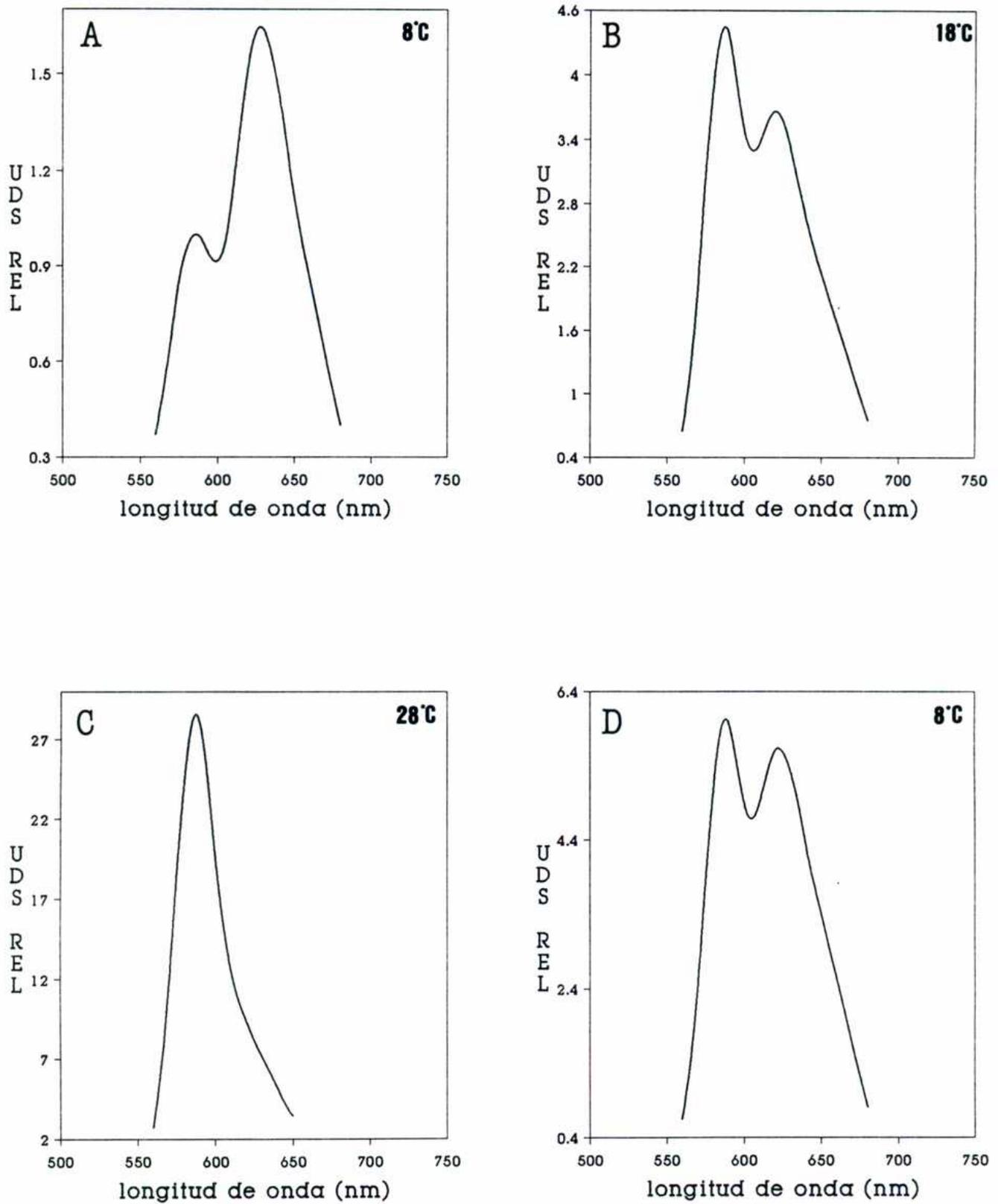


Figura IV-3: Evolución del espectro de emisión de fluorescencia de Mc540 en contacto con liposomas multilamelares de DMPC (correspondiente al de la figura IV-1A) en función de la temperatura. Relación s/l 1:150.

En la figura IV-4A los espectros de emisión de fluorescencia para relaciones desde 1:1000 hasta 1:100 son cualitativamente similares a los registrados en la figura IV-1B, a la misma longitud de onda de excitación ($\lambda_{exc} = 530$ nm). En la figura IV-4B, el cambio a $\lambda_{exc} = 560$ nm decrece notablemente la proporción de la emisión a 630 nm, sugiriendo que la especie emisora absorbe a longitudes de onda menores de 560 nm. Los espectros de absorción de la parte C (s/l 1:1000 a 1:600) muestran que hay una pequeña proporción de sonda que ingresa al interior de la membrana (hombro a 570 nm), una banda principal a 535 nm perteneciente al monómero en fase acuosa y dímero en membrana, que absorben a similares longitudes de onda (ver Capítulo III); un hombro casi imperceptible de dímero en fase acuosa (hacia 510 nm) y un pequeño pico a 445 nm, que fue descrito en el capítulo anterior, pero no detectado previamente para membranas de DPPC, sino de DMPC.

El aumento de sonda a relaciones 1:400-1:100 oculta ambos hombros a 450 y 568 nm (ver parte D), y la banda principal se delinea como absorción a 510 nm y 530 nm. Estos últimos espectros son similares a los de MC540 en fase acuosa (ver fig. III-3A) y a los obtenidos en el capítulo III para DPPC en fase $L\beta'$ (fig. III-4A). Sin embargo, los espectros desde s/l 1:1000 a 1:600 demuestran que DPPC da lugar a las mismas especies que DMPC en fase gel, pero en mucho menor proporción. Esto hace que queden absolutamente ocultas por la intensidad de las otras bandas al aumentar la relación MC540/lípido.

Las mismas muestras, correspondientes a los espectros de la figura IV-4, se llevaron a temperaturas superiores a la de transición gel-líquido cristalina. Se mantuvo la temperatura durante 15-20 minutos para permitir al sistema llegar al equilibrio térmico y luego se descendió la misma al valor inicial en fase gel (25°C). Finalmente se dejó termostatar a dicha temperatura final durante 20-30 minutos. Esta secuencia es la misma descrita para la muestra de la Figura IV-3, y permite la redistribución de la sonda en el interior de la membrana al pasar la bicapa por la fase líquido-cristalina.

Este tratamiento dió lugar a los espectros de la figura IV-5.

Los nuevos espectros de absorción de la parte A muestran notorias diferencias respecto de los descritos en la figura anterior. Sólo dos bandas de absorción centradas a 568 y 531 nm se observan ahora para todas las concentraciones de

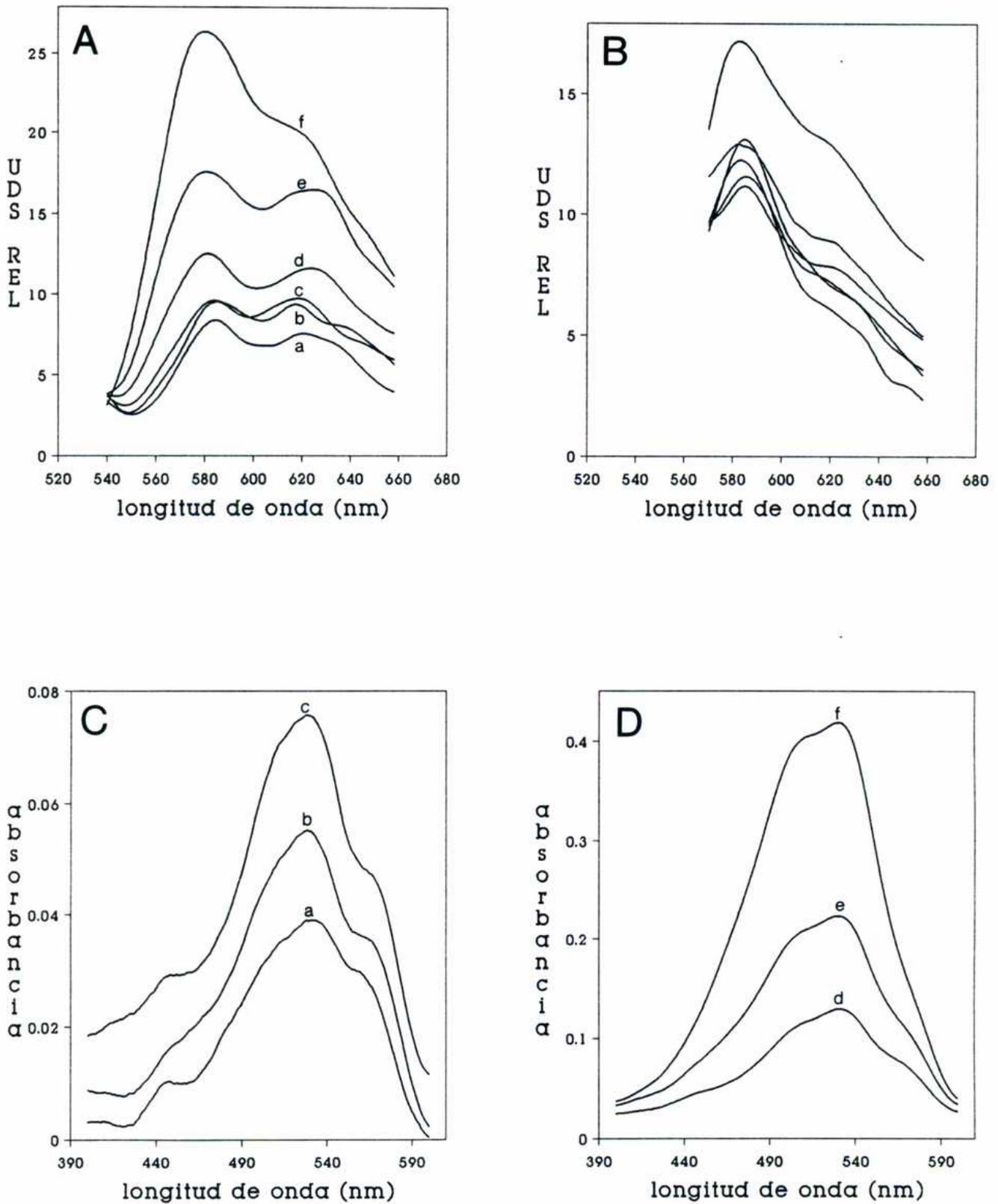


Figura IV-4: Espectros de emisión de Mc540/DPPC, procedimiento de marcación 1, T= 25°C. A) $\lambda_{excit} = 530$ nm; B) $\lambda_{excit} = 560$ nm. Espectros de absorción de las mismas muestras (C y D). Relaciones sonda/lípido a-1:1000; b-1:800; c-1:600; d-1:400; e-1:200 y f-1:100.

MC540. La primera corresponde a la absorción de monómero en membrana. La segunda corresponde a dímero en membrana y probablemente a monómero en fase acuosa conjuntamente. Dicha banda a 531 nm aumenta en mayor proporción relativa a concentraciones mayores de 1:600. La figura IV-5B muestra los espectros de emisión de fluorescencia cuando la longitud de onda de excitación es 530 nm. Se observan dos bandas de emisión centradas a 588 y a 630 nm y la aparición de un punto isoemisivo aproximadamente a 605 nm para las relaciones s/l 1:1000 a 1:600.

El análisis conjunto de las partes A y B sugiere la posibilidad de que la especie que emite a 630 nm corresponda a la banda de absorción a 530 nm asignada al dímero en membrana, ya que la banda de emisión a 590 nm corresponde a monómero en membrana (absorción a 568 nm), y/o monómero en fase acuosa, dado que esta última se produce a 575-580 nm y podría quedar oculta por la alta intensidad de la emisión del monómero en membrana.

La normalización de los espectros de absorción de la parte A (figura IV-5C) muestra la aparición de un punto isosbético a 544 nm para las cuatro menores relaciones s/l. Los espectros correspondientes a las dos relaciones s/l mayores no pasan por dicho punto. Esto indica que para relaciones s/l < 1:600 se puede considerar que sólo dos especies están presentes: monómero y dímero en membrana. La desviación del punto isosbéticos para relaciones s/l > 1:600 indica la aparición de especies monómero en agua por encima de dicho límite.

Asumiendo entonces para s/l < 1:600 la existencia de sólo dos especies (monómero y dímero en membrana) y asumiendo la existencia de un equilibrio de dimerización, se procedió a calcular las concentraciones de cada especie y el valor de la constante de equilibrio en base a las ecuaciones (IV-7), (IV-4) y (IV-1) descritas en métodos. La tabla IV-1A muestra los resultados obtenidos, con valores individuales de K_D similares para las relaciones s/l 1:1000 hasta 1:400. Las regresiones lineales basadas en la ecuación (IV-2) indican sin embargo que sólo las tres primeras concentraciones de sonda dan un adecuado valor de la pendiente, y el valor de la K_D obtenido de la ordenada al origen es similar al valor promedio de los cálculos individuales (tabla IV-1B y fig. IV-5D). Probablemente para relaciones s/l mayores de 1:600 existe contribución de otras especies no visualmente detectables en los espectros. Para s/l mayores que 1:600 la membrana alcanza entonces el valor de saturación para MC540 y el

exceso de sonda permanece en fase acuosa como monómero, el cual absorbe a 530 nm y emite a 575 nm, quedando oculto por las señales de monómero y dímero en membrana.

TABLA IV-1:

A) Cálculo de concentraciones de monómero y dímero y de la K_d mediante las ecuaciones (7), (4) y (1) detalladas en métodos.

Relación sonda/lípido	C (molar) ($\times 10^7$)	Absorbancia a 568 nm	[M] (molar) ($\times 10^7$)	[D] (molar) ($\times 10^7$)	K_d ($\times 10^{-6}M$)
1:1000	7.5	0.0395	2.525	2.487	3.90
1:800	9.4	0.0436	2.767	3.317	4.33
1:600	12.5	0.0538	3.398	4.551	3.94
1:400	18.8	0.0751	4.719	7.041	3.16
1:200	37.5	0.1298	8.064	14.718	2.26

B) Verificación del equilibrio de dimerización y cálculo de la constante de equilibrio mediante regresión lineal (ecuación IV-2), empleando los valores obtenidos en parte A.

Curva relac.sonda/lípido	Pendiente(*)	K_d (*) ($\times 10^{-6}M^{-1}$)	Corr. (*)	K_d (#) ($\times 10^{-6}M$)
a: s/l 1:1000-1:600	1.94	4.3 ± 0.3	0.982	4.1 ± 0.2
b: s/l 1:1000-1:400	1.60	6.1 ± 0.6	0.989	3.8 ± 0.5
c: s/l 1:1000-1:200	1.40	7.7 ± 1.3	0.997	3.2 ± 1.1

(*) Valores obtenidos en la regresión lineal correspondiente a la ecuación 2 (ver métodos).

(#) Valor de K_d obtenido como promedio de los valores individuales reportados en A).

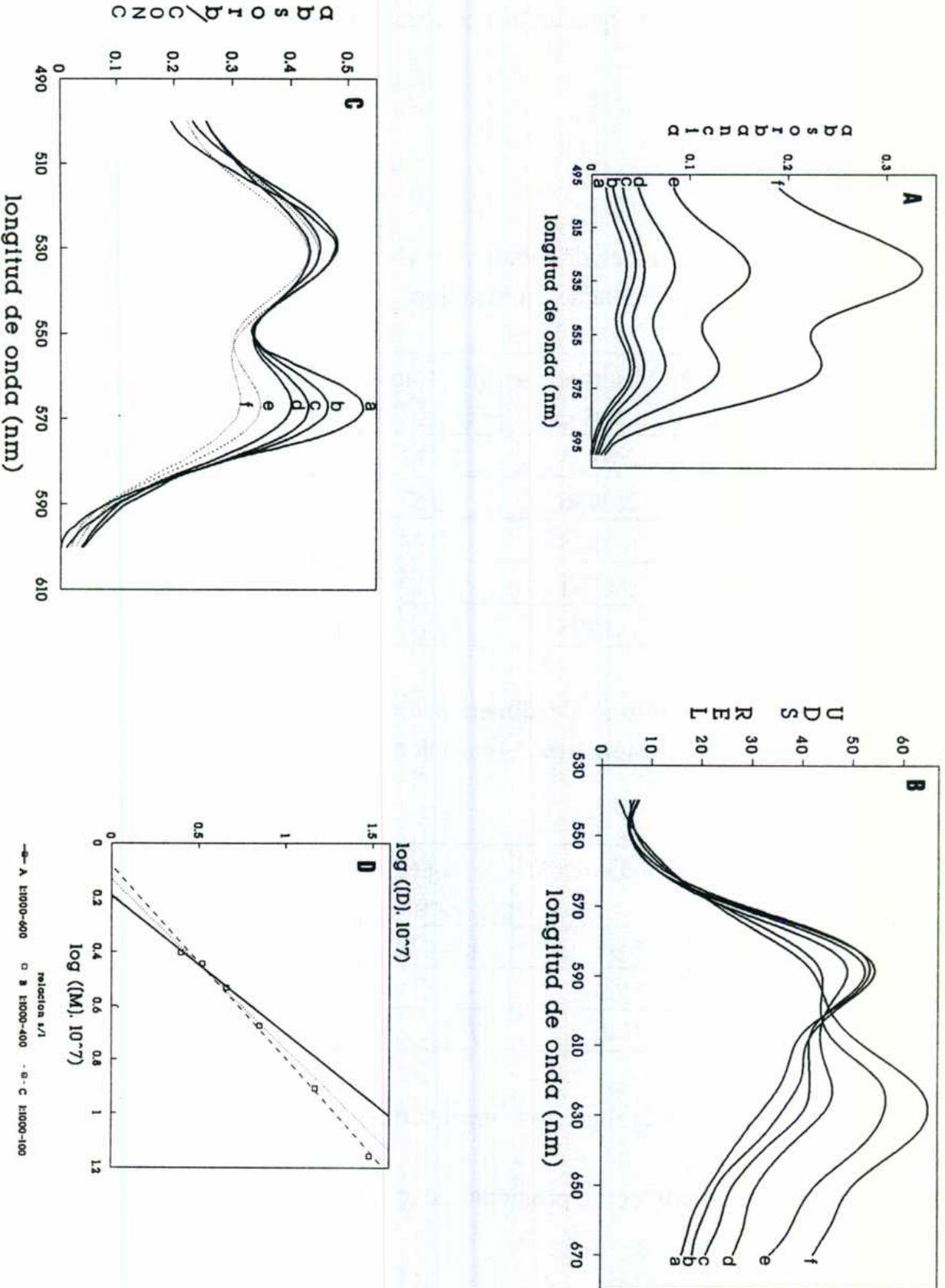


Figura IV-5: Espectros de absorción (A), absorción normalizada (C), emisión de fluorescencia (B, $\lambda_{excit}=530$ nm) y regresiones lineales obtenidas mediante ecuación IV-2 (ver Métodos), de las mismas muestras descritas en la figura IV-4 pero luego de aplicar un ciclo de calentamiento-enfriamiento a través de T_f .

Para confirmar estos resultados, se realizó una nueva preparación de liposomas de DPPC, ahora mediante el procedimiento 2 y en un amplio rango de relaciones sonda/lípido entre 1:3800 y 1:600. Esta segunda determinación también a 25°C dió valores de K_d similares a los anteriores. Desde 1:3800 hasta 1:1050 (Tabla IV-2), el valor de K_d obtenido mediante la ecuación (IV-2) es similar al promedio de los valores individuales, la pendiente 2.01 y la correlación de la recta 0.995 indican un alto valor de confianza de la regresión. La inclusión de relaciones s/l mayores (1:820 y 1:600, curva b) no altera significativamente la pendiente ni el valor de K_d , pero la correlación baja notablemente a 0.975.

Estos resultados sugieren que la membrana muestra indicios de saturación ya para relaciones 1:800, mientras que en el caso anterior relaciones 1:600 estaban aún por debajo de la saturación de los MLV. Este hecho se debe probablemente a que el método de marcación de los liposomas en esta segunda medición fue diferente (ver procedimiento 2 en Métodos) comparado al caso anterior (procedimiento 1, aplicando luego un ciclo de calentamiento-enfriamiento). Los liposomas en la primera medición (tabla IV-1) pasan dos veces a través de la temperatura de transición de fase en presencia de la MC540, y en el segundo caso sólo una vez. El cambio de fase gel a líquido-cristalino produce un brusco aumento de permeabilidad de la bicapa durante la transición (Szoka y Papahadjopoulos, 1980 y referencias allí citadas). Esto probablemente permite una redistribución de la sonda hacia las monocapas internas, y da como consecuencia un valor de saturación menor dado que hay más lípido disponible para interactuar con MC540 que si la membrana pasa por la transición de fase sólo una vez en presencia de la sonda.

TABLA IV-2:

A) Cálculo de concentraciones de monómero y dímero y de K_d en liposomas marcados mediante el procedimiento 2, empleando las ecuaciones (IV-7), (IV-4) y (IV-1) detalladas en métodos.

Relación sonda/lípido	C (molar) ($\times 10^7$)	Absorbancia a 568 nm	[M] (molar) ($\times 10^8$)	[D] (molar) ($\times 10^8$)	K_d ($\times 10^{-6}M$)
1:3800	2.10	0.0176	11.48	4.76	3.61
1:2300	3.49	0.0248	16.08	9.41	3.64
1:1530	5.23	0.0336	21.69	15.31	3.25
1:1050	7.66	0.0401	25.63	25.49	3.89
1:820	9.73	0.0407	25.66	35.82	5.44
1:600	13.17	0.0602	38.17	46.77	3.21

B) Verificación del equilibrio de dimerización y cálculo de la constante de equilibrio mediante regresión lineal (ecuación 2), empleando los valores obtenidos en parte A.

Curva relac. sonda/lípido	Pendiente(*)	K_d (*) ($\times 10^{-6}M$)	Corr. (*)	K_d (#) ($\times 10^{-6}M$)
a: s/l 1:3800-1:1050	2.01	3.5 ± 0.4	0.995	3.6 ± 0.3
b: s/l 1:3800-1:600	2.01	3.6 ± 1.0	0.975	3.8 ± 0.8

(*) Valores obtenidos en la regresión lineal correspondiente a la ecuación 2 (ver métodos).

(#) Valor de K_d obtenido como promedio de los valores individuales reportados en A).

A fin de verificar la relación asignada entre las bandas de absorción y emisión deducida en base a los espectros de la figura IV-5, se registraron adicionalmente los espectros de fluorescencia a distintas longitudes de onda de excitación y emisión. En la figura IV-6 A y C se muestran espectros de excitación

registrados a longitudes de onda de emisión 630 y 586 nm, respectivamente. En el primer caso, aparecen dos claras bandas centradas a 532 y 568 nm. Para las cuatros menores concentraciones de sonda se observa un punto isobéptico a 550 nm. Cuando la emisión se detecta a 586 nm (fig. IV-6C), la banda de 532 nm desaparece del espectro.

Los espectros de emisión de las figuras B y D se registraron a longitudes de onda de excitación correspondientes a cada banda del espectro A: 530 y 568 nm. Al excitar a 568 nm (parte D), la banda de emisión a 630 nm desaparece. Las bandas a 568 y 590 nm en A y B corresponden al monómero de MC540 inserto en la membrana.

Este análisis confirma que la banda de emisión a 630 nm corresponde a la especie cuya banda de absorción está centrada a 530 nm. Ambas bandas aumentan con la concentración de sonda, lo cual corresponde al aumento en la concentración de dímero.

IV.3.b Estudios en LUV.

Con el fin de estudiar la influencia del tipo de liposoma sobre el proceso de dimerización de MC540, se realizó un estudio similar al descrito para MLV empleando liposomas unilamelares grandes de DPPC, marcados con la sonda mediante el procedimiento 2.

Los resultados de las determinaciones a 25°C se detallan en la tabla IV-3.

La pendiente de la regresión lineal empleando la ecuación (IV-2) es cercana al valor esperado de 2 para s/l hasta 1:351. El valor de K_D individual correspondiente a la relación s/l 1:182 difiere notoriamente del promedio obtenido para menores concentraciones de sonda. Por lo tanto esto sugiere que existe contribución de otras especies en fase acuosa. En base a estos resultados el valor de saturación hallado para liposomas unilamelares se encontraría para relaciones s/l entre 1:1:350 y 1:182.

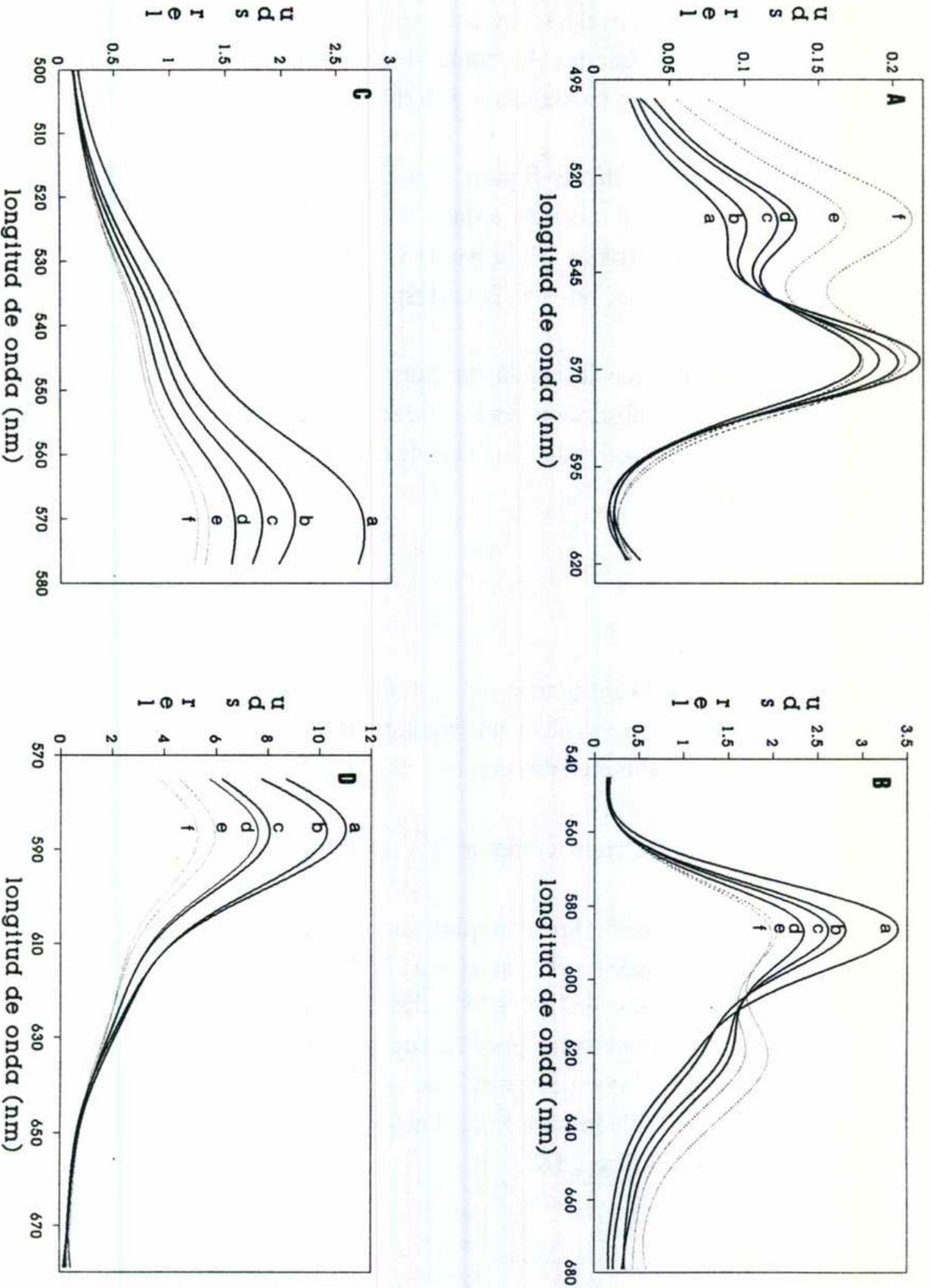


Figura IV-6: Espectros de excitación (A, $\lambda_{excit} = 630$ nm; C, $\lambda_{excit} = 586$ nm) y emisión de fluorescencia (B, $\lambda_{excit} = 530$ nm; D, $\lambda_{excit} = 568$ nm) de las muestras marcadas mediante el procedimiento 2, descritas en la Tabla IV-2. Las relaciones sonda/lípido son: a-1:3800; b-1:2300; c-1:1530; d-1:1050; e-1:820; f-1:600.

TABLA IV-3:

A) Valores de concentraciones de monómero [M] y dímero [D] y de la constante de dimerización K_d en LUV mediante las ecuaciones (IV-7), (IV-4) y (IV-1) detalladas en métodos.

Relación sonda/lípido	C (molar) ($\times 10^7$)	Absorbancia a 568 nm	[M] (molar) ($\times 10^7$)	[D] (molar) ($\times 10^7$)	K_d ($\times 10^{-6}M$)
1:1740	4.60	0.0423	2.769	0.914	1.19
1:1300	6.16	0.0516	3.367	1.396	1.23
1:973	8.22	0.0650	4.233	1.993	1.11
1:644	12.43	0.0781	5.040	3.696	1.46
1:507	15.79	0.0924	5.943	4.925	1.39
1:351	22.77	0.1242	7.960	7.407	1.17
1:182	43.87	0.1572	10.05	16.91	1.67

B) Verificación del equilibrio de dimerización y cálculo de la constante de equilibrio mediante regresión lineal (ecuación IV-2), empleando los valores obtenidos en parte A.

Curva relac. sonda/lípido	Pendiente (*)	K_d (*) ($\times 10^{-6}M$)	Corr. (*)	K_d (#) ($\times 10^{-6}M$)
a: s/l 1:1740-1:351	2.06	1.0 ± 0.2	0.992	1.3 ± 0.1
b: s/l 1:1740-1:182	2.19	0.6 ± 0.4	0.993	1.3 ± 0.2

(*) Valores obtenidos en la regresión lineal correspondiente a la ecuación 2 (ver métodos).

(#) Valor de K_d obtenido como promedio de los valores individuales reportados en A).

La diferencia entre el valor de saturación hallado para liposomas multilamelares (1:800) y unilamelares marcados con MC540 mediante el mismo procedimiento es esperable dado que las lamelas o bicapas internas de los MLV no son accesibles a la MC540 mediante los procedimientos de adición de la sonda empleados. En el caso de los liposomas unilamelares todo el lípido está disponible para la fijación de MC540.

El valor de saturación expresado como s/l hallado para LUV es a su vez menor en fase gel que en fase líquido-cristalina: en membranas de fosfatidilcolina oscila entre 1:15 (Verkman y Frosch, 1985), 1:25 (Waggoner y Grinvald, 1977) y 1:73 (Sikurova et al., 1988).

La constante de dimerización de MC540 reportada por los autores mencionados es del orden de $\cong 5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ en fase líquida, mientras que para liposomas multilamelares de DPPC a 25°C el valor promedio de las tablas IV-1 y IV-2 es $3.9 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ y para liposomas unilamelares es $1.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. Ambos valores son dos órdenes mayores que los hallados en fase líquido-cristalina.

Estas diferencias, tanto en el valor de saturación de la membrana como en el valor de K_D entre ambas fases, pueden deberse a factores tales como:

- a- disminución de la solubilidad del monómero en fase membrana, dado que la disminución del área por molécula a bajas temperaturas dificulta su inserción.
- b- mayor adsorción del dímero favorecida por las propiedades de interfase en estado gel.

Diversos valores de K_D han sido encontrados para colorantes orgánicos en distintos sistemas: para el caso de ftalocianina tetracarboxilada de Zn en micelas de CTAC K_D es del orden de 10^6 M^{-1} (Daraio et al., 1993); Kemnitz et al. (1991) reportan un valor de 10^8 M^{-1} para la constante de dimerización de Rodamina 6G en tolueno a 230°C. Por lo tanto, los valores de K_D hallados para MC540 en liposomas en fase gel se encuentran dentro del rango de valores reportados en literatura para colorantes en diversos medios.

La figura IV-7 muestra espectros de excitación y emisión para la muestra de relación sonda/lípido 1:351 indicada en tabla IV-3.

Los espectros de excitación fueron registrados para longitudes de onda de emisión desde 650 nm (curva inferior en figura IV-7A) hasta $\lambda=590$ nm. El progresivo cambio a longitudes de detección más cortas incrementa el peso relativo de la banda centrada a 568 nm, a expensas de la banda a 530 nm. Como se mencionó anteriormente, estas bandas corresponden a monómero y dímero en membrana, respectivamente.

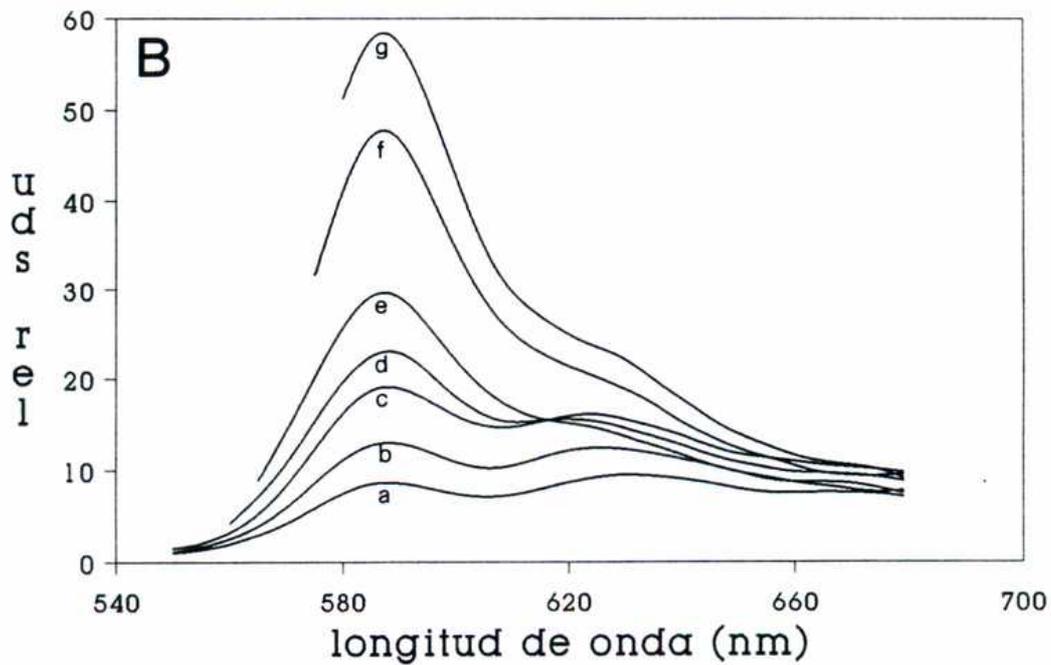
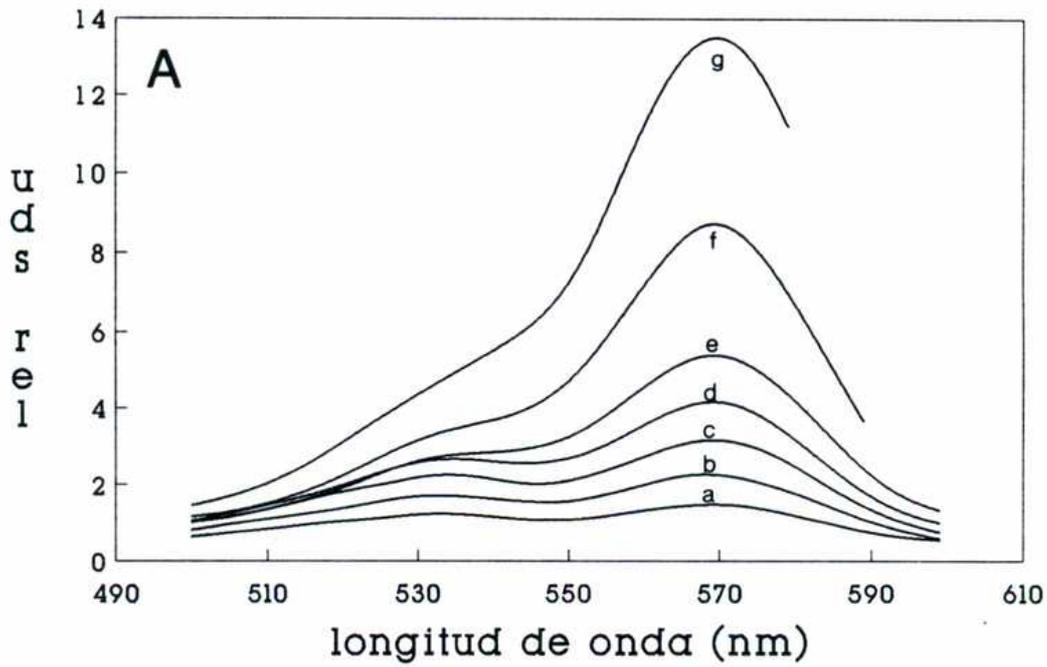


Figura IV-7: Espectros de excitación (A) y emisión (B) correspondientes a la muestra de relación sonda/lípido 1:351 indicada en la Tabla III-3.

	a	b	c	d	e	f	g
A: $\lambda_{emisión}$ (nm) :	650	640	630	620	610	600	590
B: $\lambda_{excit.}$ (nm) :	510	520	530	540	550	560	570

Los espectros de emisión variando la longitud de onda de excitación de la muestra muestran en principio un predominio de la banda a 630 nm para λ de excitación menores de 530 nm, para longitudes de onda de excitaciones mayores, la banda de emisión a 586 nm predomina en el espectro.

IV.3.c Estudios en mezclas de lípidos.

Una vez confirmado el equilibrio monómero-dímero existente en la bicapa en fase gel, cuya constante se midió en forma reproducible para bajas relaciones sonda/lípido, se estudió la influencia de un cambio en la densidad de carga superficial de los liposomas en los espectros de MC540.

Se registraron los espectros de absorción, excitación y emisión de fluorescencia de MC540 en liposomas multilamelares mixtos de fosfatidilcolina/ fosfatidilglicerol (DPPC/DPPG) 50:50 a $T=25^{\circ}\text{C}$. DPPG posee carga neta -1 para el valor de $\text{pH}=7.3$ empleado en los experimentos (Totukomi et al., 1980), es completamente miscible en todas proporciones con fosfatidilcolina y posee la misma temperatura de transición de fase gel-líquido cristalina que las fosfatidilcolinas con ácidos grasos de la misma longitud de cadena (Szoka y Papahadjopoulos, 1980; Sixl y Watts, 1982; Blume, 1983).

La figura IV-8A muestra los espectros de emisión de fluorescencia de los liposomas mixtos (marcados por el método 2) para 530 nm de longitud de onda de excitación. Ninguna de las tres relaciones s/l empleadas dan espectros comparables a los descritos en las figuras anteriores; los espectros muestran una ancha banda centrada entre 570 y 590 nm aproximadamente, y sólo puede observarse un pequeño hombro a 615 nm para la relación s/l 1:360. Los espectros de excitación de la parte B, registrados para λ de emisión 620 nm, son irregulares, presentan dos picos, uno de ellos centrado a 568 nm, y el otro a longitudes de onda más cortas: 530 nm para s/l 1:440, 515 nm para s/l 1:360 y 535 nm para s/l 1:280. Los espectros de esta figura indican la presencia de monómero en membrana y monómero en agua. La banda a 515 nm podría corresponder a dímero en fase acuosa.

Los espectros de absorción correspondientes en la figura IV-9 son también irregulares, con una banda ancha centrada alrededor de 535 nm, y un pequeño

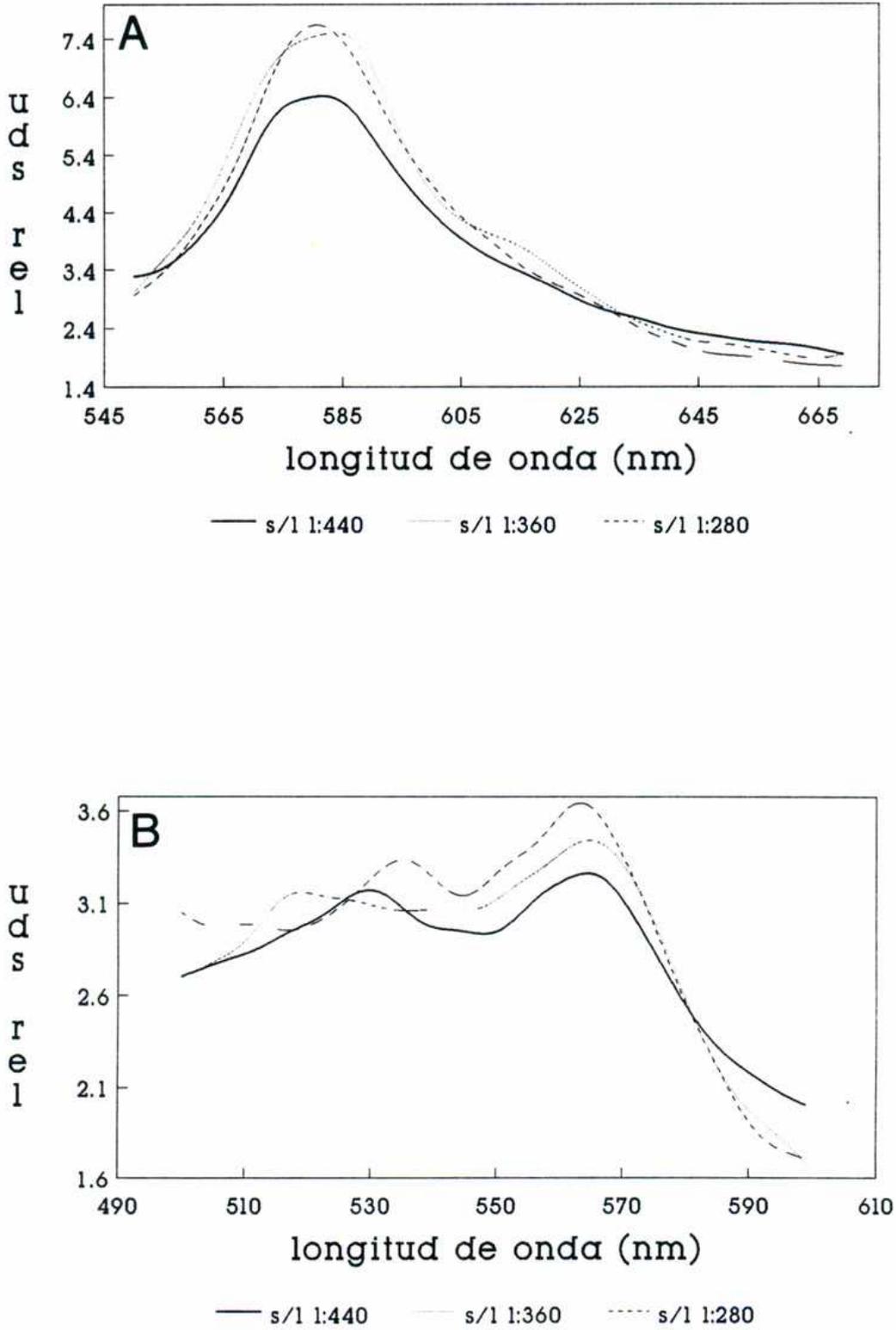


Figura IV-8 : Espectros de excitación (B, $\lambda_{emis} = 620$ nm) y emisión (A, $\lambda_{excit} = 530$ nm) de fluorescencia de Mc540 en liposomas mixtos de DPPC/DPPG 50%/50% marcados mediante el procedimiento 2. Las relaciones sonda/lípido se indican en la figura. $T = 25^\circ\text{C}$.

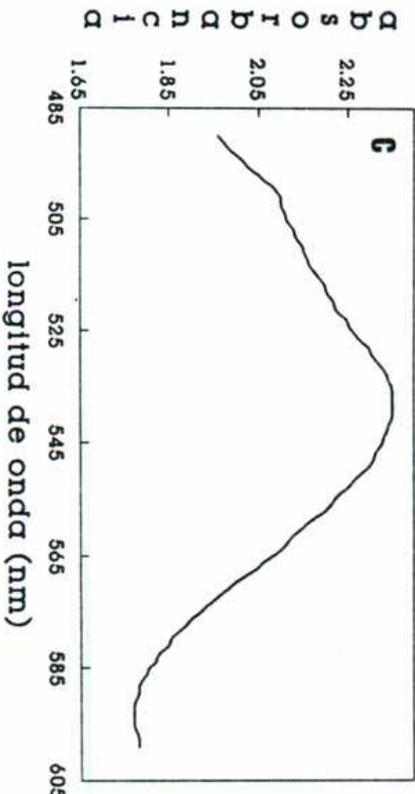
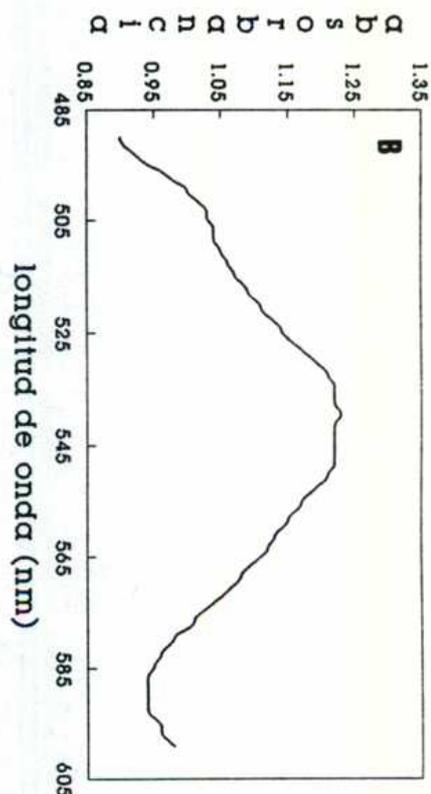
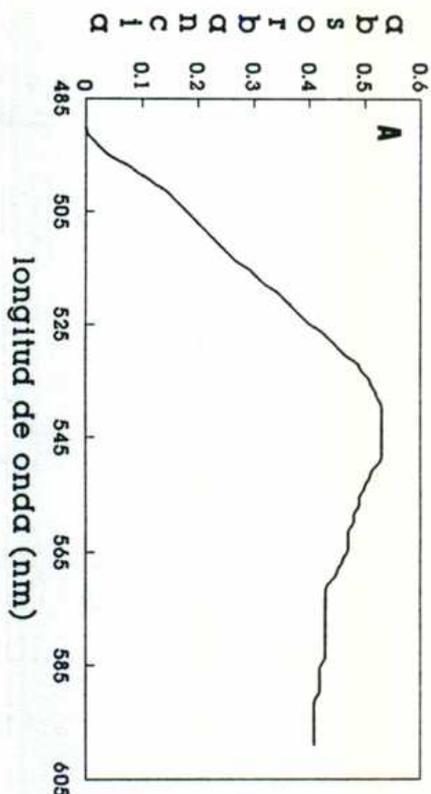


Figura IV-9 : Espectros de absorción de Mc540 en liposomas mixtos de DPPC/DPPG correspondientes a las muestras descritas en la figura anterior.

hombro a 510 nm (dímero en agua) para s/l 1:360 y 1:280. Estos espectros tampoco son comparables a los que se observan en la figura IV-5A, obtenidos por el mismo procedimiento de adición de sonda (2) y con relaciones s/l inclusive mayores a las empleadas con los liposomas mixtos.

Los espectros obtenidos parecen indicar que la repulsión electrostática entre la carga del DPPG y la de la MC540 (ambas con carga -1) fuerza a la sonda a permanecer en fase acuosa en gran proporción.

Es difícil extraer mayor información debido a la irregularidad de los espectros, pero el estudio indica la alta sensibilidad de la sonda a cambios en la densidad de carga superficial. Es evidente que un cuidadoso estudio en función de muy bajos porcentajes de inclusión de DPPG en la membrana puede brindar interesante información sobre la variación de la fijación de MC540 y su constante de dimerización en función de densidad de carga superficial.

IV.4 Fluorescencia de dímeros en membrana.

La existencia de un equilibrio de dimerización de MC540 en membranas lipídicas no es sorprendente, ya que ha sido reportado por varios autores en membranas en fase líquido-cristalina. Sin embargo, dicha sonda sólo se ha estudiado exhaustivamente en fase líquida, en donde la emisión del dímero no se observa. La única mención a la posible existencia de un dímero fluorescente fue realizada por Aramendía et al. (1988). Los autores observan un hombro de emisión alrededor de 620 nm al registrar espectros de fluorescencia excitando a 530 nm, a temperaturas por debajo de la transición de fase gel-líquido cristalina en liposomas unilamelares de DMPC.

Generalmente los dímeros de colorantes orgánicos no son fluorescentes cuando se disuelven en agua o en solventes orgánicos a temperatura ambiente. Sin embargo dímeros fluorescentes han sido reportados en solventes de baja polaridad (Selwyn y Stey, 1972; Muto, 1976; Kemnitz et al., 1991), en etanol (Ojeda et al, 1988; Arbeloa et.al, 1988) y en el estado adsorbido (Kemnitz et al., 1986). Dichos autores indican que el estado adsorbido suprime transiciones no radiativas inducidas por reorientaciones moleculares y por colisiones difusionales con el solvente, favoreciendo de este modo el proceso radiativo.

En nuestro caso, las bandas de emisión y excitación correspondientes al dímero en membrana sólo se observan en fase gel. Esto podría deberse a que la fluorescencia del dímero depende del estado de fase, siendo el rendimiento cuántico de fluorescencia mucho mayor en fase gel. También podría suceder que la fluorescencia existiese, pero quedase oculta por la emisión dominante del monómero. Esta posibilidad está fundamentada por el hecho de que la concentración del dímero en membrana es mucho menor en fase líquida (la constante de dimerización disminuye dos órdenes respecto de fase gel), y adicionalmente el rendimiento cuántico de fluorescencia del dímero se estima al menos 10 veces menor que el del monómero en membrana (ver parágrafo IV.4.a siguiente).

Sin embargo existe un dato en favor de que la fluorescencia del dímero depende de las propiedades de la interfase a bajas temperaturas, y es que la inclusión de colesterol en fase gel elimina la fluorescencia a 630 nm (figura II-

9). En éste caso, no se puede atribuir la desaparición del pico fluorescente a un ocultamiento por la intensidad de la banda del monómero (ver escala de intensidad en la figura II-9). Como se discute en el capítulo III, se conoce que la introducción de colesterol aumenta notablemente la movilidad de las cabezas polares en la interfaz a valores similares a los de la fase líquido- cristalina (Saito et al., 1991). Esto sugiere que la fluorescencia del dímero en fase gel está relacionada a las propiedades diferenciales de la interfaz en fase gel, en relación con las razones mencionadas por Kemnitz et al. (1986).

La teoría excitónica de Kasha (McRae y Kasha, 1958; Kasha et.al, 1965) se emplea habitualmente para describir e interpretar las características espectrales de dímeros. Kemnitz et al. (1986, 1991) han utilizado la teoría excitónica para describir las propiedades fluorescentes de dímeros de Rodamina B y 6G en estado adsorbido y en soluciones no polares, respectivamente.

En la teoría excitónica el carácter fluorescente o no de un dímero es determinado por la orientación relativa de los monómeros constituyentes. En la siguiente discusión nos referiremos exclusivamente al caso de transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ de moléculas planas cuyo momento dipolar de transición se halla en el plano de la molécula. Cuando dos unidades de monómero se unen para formar un dímero se produce un desdoblamiento energético del primer estado singulete excitado S1 del monómero (figura IV-10), dando lugar a dos niveles con energías E2 y E1, que corresponden a dos estados excitados del dímero. La diferencia de energía entre ambos estados excitados, ΔE , se expresa como función del ángulo \emptyset que forma el momento de transición del monómero con la línea que une los centros de ambos monómeros. Si los momentos de transición del monómero se suponen paralelos, ΔE está dado por la siguiente ecuación:

$$\Delta E = E2 - E1 = 2 \left(\mu^2 / r^3 \right) (1 - 3\cos^2 \emptyset) \quad (\text{IV-8})$$

Para dímeros coplanares de estructura "cabeza con cola", denominados dímeros J en la literatura, corresponde $\emptyset = 0^\circ$. Para dímeros con estructura de tipo "sandwich", llamados dímeros H, corresponde $\emptyset = 90^\circ$. El desdoblamiento de energía es cero para el ángulo mágico $\emptyset = 54.7^\circ$.

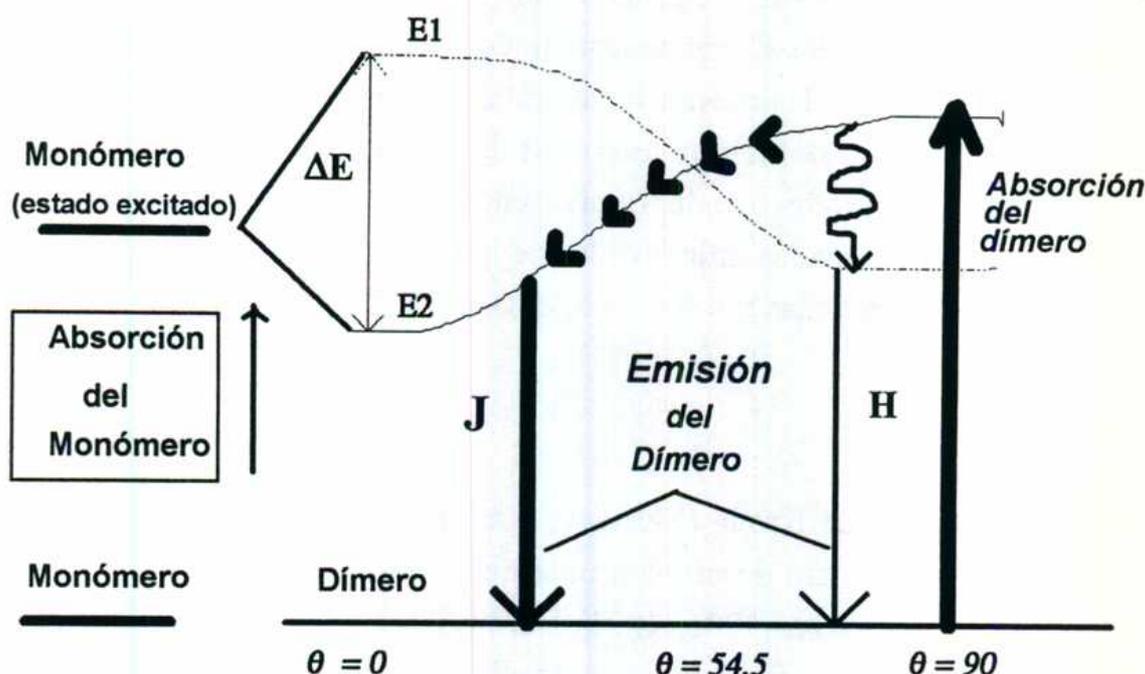


Figura IV-10: Diagrama de energía correspondiente a las especies monómero, dímero H y dímero J, de acuerdo con la teoría excitónica.

Las reglas de selección para las transiciones entre el estado fundamental y excitado dependen del valor de θ . La teoría excitónica predice que solamente las transiciones entre el estado fundamental del dímero y el estado de energía E2 son permitidas. Transiciones con el estado de energía E1 son prohibidas. En nuestro caso, el dímero de MC540 en membrana absorbe a longitudes de onda menores que el monómero ($\Delta E > 0$, banda de absorción desplazada hacia el azul). Por lo tanto la teoría predice que la geometría del dímero de MC540 en el estado fundamental correspondería al caso $\theta > 54.7$, es decir a la de un dímero H más que a la de un dímero J. Dímeros de carbocianinas con banda de absorción desplazada hacia el azul con respecto a la del monómero han sido reportados por West y Pearce (1965). De hecho, la geometría del dímero de MC540 asociado a membranas lipídicas propuesta por Waggoner (1979), corresponde a un dímero de tipo H, con un ángulo θ ligeramente menor que 90° .

El caso opuesto de dímeros con banda de absorción desplazada hacia el rojo con respecto a la del monómero, ha sido reportado en films de Langmuir-Blodgett (Yamada et.al, 1993; Kajikawa et.al, 1993; Miyata et.al, 1993), y se

atribuyen a agregados de tipo J.

En base a las reglas de selección, la emisión fluorescente de un dímero H que absorbe hacia el azul respecto del monómero, podría explicarse en base a dos procesos:

a) Existe un cambio de geometría en el estado excitado tal que θ cambia a valores menores de 54.7, donde la emisión es permitida (ver Fig. IV-10). Esto implicaría la conversión de un dímero de tipo H a un dímero de tipo J durante el tiempo de vida del estado excitado del dímero, estimado menor que el del monómero (cuyo valor es $\cong 1$ ns en DMPC, fase gel; Aramendía et al., 1988).

b) Existe una conversión interna desde el estado E2 al estado E1 (de acuerdo con la regla de Kasha), seguida de emisión fluorescente desde el estado de menor energía, E1 (ver fig. IV-10). Si bien la teoría excitónica predice que dicha emisión es muy débil (transición prohibida), es posible que la emisión se favorezca en el estado adsorbido sobre una membrana rígida en fase gel.

En ambos casos la banda de emisión del dímero se encontraría desplazada hacia el rojo respecto a la banda de emisión del monómero, tal como fue observado experimentalmente.

Se realizaron cálculos estimativos del rendimiento cuántico de fluorescencia de la solución y del dímero. Los valores obtenidos figuran la sección siguiente.

IV.4.a Cálculo de rendimientos cuánticos de fluorescencia.

Se calcularon valores del rendimiento cuántico de fluorescencia de MC540 en liposomas MLV y LUV de DPPC a 25°C y para distintas relaciones s/l. Dichos valores se obtuvieron mediante el método descrito por Parker (1968) según la ecuación IV-8:

$$\phi_f = \phi_f^r \frac{a_s (1 - 10^{-A_r})}{a_r (1 - 10^{-A_s})} \quad (\text{IV-9})$$

donde ϕ_f representa el rendimiento cuántico de fluorescencia de la muestra y los

índices s y r se refieren a la muestra a determinar y a una solución de referencia, respectivamente. Como referencia se empleó una solución de MC540 en etanol ($\phi_f = 0.15$ a 25°C ; Aramendía et al., 1988). a representa el área bajo el espectro de emisión corregido y A es la absorbancia a la λ de excitación.

Solamente se calculó ϕ_f para las muestras consideradas en las tablas IV-2 y IV-3 cuya absorbancia máxima (a 568 nm) fuese menor o igual que 0.05, con el fin de evitar efectos de autoabsorción (Eaton, 1988). No se consideraron correcciones por diferencias entre los índices de refracción de muestra y referencia.

Los rendimientos cuánticos de monómero y dímero ϕ_f^M y ϕ_f^D respectivamente se relacionan con ϕ_f por medio de la relación (IV-10):

$$\phi_f = b_m \phi_f^M + b_d \phi_f^D \quad (\text{IV-10})$$

b_m es la fracción de radiación total absorbida por el monómero a la longitud de onda de excitación

$$b_m = \frac{\epsilon_m [M]}{A} \quad (\text{IV-11})$$

donde ϵ_m y A representan el coeficiente de absorción molar del monómero y la absorbancia de la solución, respectivamente (correspondientes a la longitud de onda de excitación) (R.M.Negri, tesis doctoral); y $b_d = 1 - b_m$ representa la fracción de radiación absorbida por el dímero.

En un trabajo previo, Aramendía et al. determinaron ϕ_f^M en membranas LUV de DMPC. Para ello consideraron relaciones s/l menores que 1:520, y longitud de onda de excitación igual a 560 nm. A dicha longitud de onda el coeficiente de absorción molar del dímero es dos órdenes de magnitud menor que el del monómero, y por lo tanto en las condiciones empleadas por Aramendía et al. es $\phi_f \cong \phi_f^M$. En fase gel, debido a la presencia de dímeros fluorescentes, se espera que ϕ_f sea dependiente de la longitud de onda de excitación. Por dicha razón se decidió emplear en el presente estudio una longitud de onda diferente con el fin de estimar el rendimiento cuántico de fluorescencia del dímero, ϕ_f^D . Se utilizó $\lambda_{\text{exc}} = 530$ nm, que corresponde al máximo de absorción del dímero. Es de

destacar que si bien Aramendía et al. no estudiaron las propiedades fotofísicas de los dímeros de MC540, observaron que la forma del espectro de emisión es dependiente de la longitud de onda de excitación, mencionando que ello podría deberse a la posible presencia de dímeros fluorescentes.

Los valores de ϕ_f obtenidos en MLV y LUV de DPPC a diferentes relaciones s/l se representan en las tabla IV-4 A y B respectivamente. Para valores similares de b_m se obtuvieron valores similares de ϕ_f en liposomas MLV y LUV (ver tablas IV-4 y IV-5).

En dicha tabla se observa que ϕ_f disminuye al disminuir la relación s/l. este resultado es compatible con la presencia de dos especies en equilibrio, absorbiendo respectivamente una fracción de la radiación total incidente, e indica que es $\phi_r^D < \phi_r^M$.

Aramendía et al. (1988) y Krieg (1993) obtuvieron $\phi_r^M = 0.6$ en liposomas de DMPC y DPPC en fase gel. Sin embargo los valores de ϕ_f de las tablas IV-4 A y B son sistemáticamente menores que el producto $0.6 \times b_m$ que correspondería al primer término de la ecuación (IV-10). Este resultado parece indicar que en las condiciones utilizadas en el presente trabajo, donde la presencia de dímeros es importante, el valor de ϕ_r^M es menor que el obtenido en ausencia de dímeros, sugiriendo un efecto de quenching de la emisión del monómero al aumentar la relación s/l.

Finalmente, considerando la relación (IV-10) y la dependencia de ϕ_f con b_m , se concluye que es $\phi_r^D < \phi_f < \phi_r^M$. Por lo tanto, si bien es difícil establecer si ϕ_r^D varía o no con la relación s/l, los datos obtenidos indican que $\phi_r^D \leq 0.07$, teniendo en cuenta los valores de ϕ_f obtenidos para s/l=1:351 en LUV DPPC.

TABLA IV-4: Rendimientos cuánticos de fluorescencia, ϕ_f , de MC540 en MLV (A) y LUV (B) de DPPC a 25°C. b_m = fracción de la radiación absorbida por el monómero.

A) MLV DPPC

s/l	b_m	ϕ_f
1:3800	0.42	0.25
1:2300	0.38	0.16
1:1530	0.34	0.11
1:1050	0.36	0.10

B) LUV DPPC

s/l	b_m	ϕ_f
1:1300	0.52	0.26
1:973	0.49	0.19
1:507	0.35	0.10
1:351	0.33	0.07

IV.5 CONCLUSIONES

En el capítulo anterior se mostró que mediante MC540 es posible obtener información detallada acerca de propiedades topológicas de membranas lipídicas. Esto fue posible a través de las señales espectroscópicas previamente conocidas para dicha sonda pero también debido a la aparición de dos nuevas señales no caracterizadas aún.

La existencia de diferentes especies en fase acuosa y en membrana y el cambio en el peso relativo de la señal de cada una de ellas permitió obtener información acerca de cambios estructurales superficiales, especialmente a través de la banda de absorción a 450 nm.

La alta sensibilidad mostrada por la sonda a cambios no fácilmente detectables mediante otros métodos abrió un campo de investigación que requería la caracterización de las nuevas señales: absorción a 450 nm y emisión fluorescente a 630 nm.

En este capítulo se planteó la caracterización de la fluorescencia a 630 nm, ya visualizada como fluorescencia del dímero de MC540 en membranas en fase gel. Esta última condición de fase requirió la búsqueda de condiciones adecuadas de concentración de la sonda, tales que se evitase la presencia de la misma en fase acuosa.

La búsqueda de esas condiciones permitió al mismo tiempo confirmar interpretaciones realizadas en los estudios del capítulo anterior. Por ejemplo, de acuerdo a las condiciones de adición de la sonda al liposoma es posible sensar exclusivamente la interfase externa (figuras IV-2 y IV-4); se pudo averiguar que la señal de absorción a 450 nm existe también en el caso de membranas de DPPC en fase gel, aunque oculta por la mayor intensidad de las otras bandas (figura IV-4) y que lo mismo sucede con la emisión a 630 nm en membranas de DPPC cuando la concentración de sonda en fase acuosa es alta (figura IV-1B).

En conjunto, estas tres observaciones destacan la diferencia notable en las características interfaciales que membranas compuestas por DMPC y DPPC demuestran a través de la interacción con la sonda. Este es un resultado que pone en evidencia la diferencia que introducen sólo dos átomos de carbono más en los residuos de ácidos grasos de dichas fosfatidilcolinas.

En condiciones en que existen sólo monómero y dímero asociados a membranas en fase gel se determinaron las constantes de equilibrio de dimerización en MLV y LUV y se confirmó que la emisión a 630 nm corresponde al dímero asociado a la membrana.

Por lo tanto, la fluorescencia del dímero en fase gel demuestra ser sensible a las características interfaciales, tanto a nivel temperatura (ver figura III-7 y IV-3), densidad de carga superficial (figura IV-8) y presencia de colesterol (figura III-9).

Los resultados mostrados en este capítulo abren una nueva línea de trabajo dado el alto carácter diagnóstico de estas nuevas señales espectroscópicas.

CAPITULO V

GRUPOS CROMOFOROS

UNIDOS A FOSFOLIPIDOS:

DERIVADOS DEL GRUPO

DANSILO

V.1 INTRODUCCION

En el capítulo anterior se estudiaron las propiedades de interfases lipídicas en membranas de composición y estado de fase conocido utilizando una sonda que se adsorbe, merocianina 540. En este capítulo se estudiarán sistemas similares empleando sondas en las cuales el grupo cromóforo está covalentemente unido a la cabeza polar del fosfolípido.

El propósito es obtener información sobre la polaridad de la región interfacial e inferir del comportamiento fotofísico de las sondas las modificaciones que se producen a raíz de cambios en el grado de hidratación, movilidad de las cabezas polares, curvatura de la membrana, potencial superficial y densidad de carga. En este caso, el grupo cromóforo actúa como prueba dentro de una zona que se restringe a la región interfacial ya que está unido a la membrana por las cadenas hidrocarbonadas.

Las sondas elegidas son dansilfosfatidiletanolamina (DPE) y dansildihexadecilamina (DA). En la figura V-1 se muestran sus estructuras químicas. Ambas sondas poseen el mismo grupo cromóforo, N,N-dimetil-2-aminonaftaleno-6-sulfonato, denominado generalmente grupo dansilo.

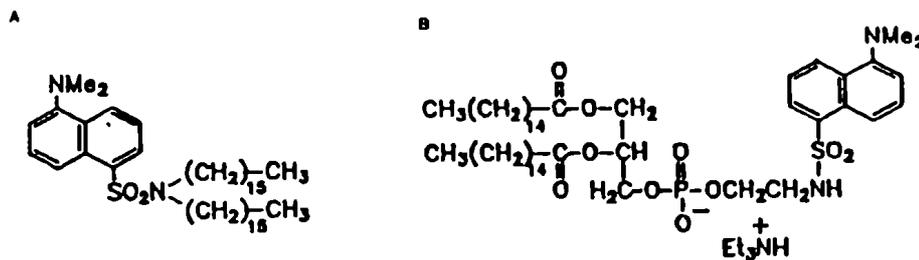


Figura V-1: Estructura química de las sondas DA (dansildihexadecilamina, parte A) y DPE (dansilfosfatidiletanolamina, parte B).

Derivados de aminonaftalenos se han utilizado como sondas en sistemas biológicos, debido a que sus propiedades fluorescentes son fuertemente dependientes del microentorno (Waggoner y Stryer, 1970). Por ejemplo, son muy poco fluorescentes en solventes polares, pero cuando se disuelven en solventes no polares o se adsorben en proteínas la intensidad de la emisión aumenta significativamente y el espectro de emisión se desplaza hacia

longitudes de onda más cortas (Seliskar y Brand, 1970). Esta dependencia con la polaridad del solvente ha sugerido el empleo de aminonaftalenos como sondas de "polaridad" en sistemas heterogéneos.

Uno de los primeros estudios con DPE en vesículas lipídicas es el realizado por Faucon y Lussan (1973). El cromóforo está localizado en la zona del grupo glicerol y se ha observado una disminución gradual del grado de polarización de DPE en SUV a medida que la temperatura se incrementa desde la fase gel hacia la fase líquido-cristalina. El mismo estudio realizado con MLV muestra una pendiente de cambio diferente. Esto indica que el radio de curvatura de la vesícula influye en los valores de anisotropía de la sonda que sensa la interfaz. Los mismos autores (1974) observan que el grado de polarización de DPE en EPC aumenta a temperatura constante con el agregado de iones trivalentes (La^{3+}) y con Ca^{2+} sólo si la membrana contiene cierta proporción de fosfolípidos negativamente cargados (ácido fosfatídico), y atribuyen el cambio a un aumento en la microviscosidad del entorno de la sonda.

Se ha observado (Wells, 1976) que al aumentar el contenido de agua en mezclas agua-éter, la intensidad relativa de fluorescencia en el máximo de DPE decrece más del 50% desde eter puro hasta mezclas con alto contenido de agua (15 mg/mL) y la longitud de onda del máximo del espectro de emisión ($\lambda_{\text{emis}}^{\text{máx}}$) aumenta 40 nm.

Un estudio con una sonda similar en la cual el grupo dansilo está unido a la serina de fosfatidilserina muestra un corrimiento al azul del máximo de emisión, un aumento de anisotropía y un aumento de la intensidad relativa de emisión en vesículas de PS en presencia de iones divalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+}). Los autores sugieren un desplazamiento del cromóforo hacia zonas más internas y menos polares en la bicapa (Harris, 1977). Resultados similares fueron reportados por Gupte et al. (1979). En ambos casos se observa disminución en el valor de anisotropía estacionaria de la sonda como respuesta al agregado de cationes monovalentes.

Los estudios de salto de temperatura realizados por Teissie (1979) muestran que DPE detecta el comienzo de la transición principal 4°C antes del valor reportado para otras sondas localizadas en el interior de la bicapa. Teissie

sugiere que el hecho se debe a que la interfaz es la región desde donde se "dispara" el proceso de transición de fase. Los resultados son consistentes con los obtenidos por Faucon y Lussan (1973).

Un estudio del comportamiento dinámico de DPE en butanol y liposomas multilamelares de EPC es realizado por Ghigginio et al. (1981). Los resultados son analizados considerando la reorientación de las moléculas de solvente alrededor del cromóforo en el estado excitado. Dicho proceso se denomina relajación del solvente y, en el caso del sistema estudiado por dichos autores, ocurre en la escala de tiempo del orden del tiempo de vida del estado excitado del fluoróforo. En un trabajo posterior, Stubbs et al. (1985) estudiaron nuevamente procesos de relajación en distintos derivados del grupo dansilo, en función de la temperatura en MLV de DMPC y DPPC.

Kimura e Ikegami (1985) emplearon DPE para evaluar constantes dieléctricas locales en liposomas. La medición comparativa de anisotropía de DPE y DPH en función de la temperatura muestra la diferente dinámica de las regiones hidrocarbonada e interfacial de la bicapa.

Un estudio realizado por Ohki y Arnold (1990) emplea la sensibilidad de las sondas de dansilo para detectar cambios en la constante dieléctrica a nivel de interfaz y relaciona los resultados con la capacidad fusogénica inducida por distintas moléculas.

En este capítulo se estudian las características espectroscópicas de DPE y DA en en membranas lipídicas en función del tamaño y de la composición empleando sistemas unilamelares (SUV y LUV).

También se analiza el comportamiento de estas sondas en membranas cuyas propiedades interfaciales, por ejemplo potencial superficial, es modificado por la introducción de colesterol y floretina.

Como sistema de referencia se presentan en primer lugar las características espectroscópicas de las sondas en solventes orgánicos.

V.2 METODOS

V.2.a Corrimiento de Stokes y relajación del solvente.

El proceso de relajación del solvente ocurre cuando el valor del momento dipolar del cromóforo en el estado excitado, μ^* , difiere considerablemente del valor del momento dipolar en el estado fundamental, μ . En dicho caso el proceso denominado *relajación del solvente* es un factor importante a considerar para interpretar la dependencia de los parámetros fotofísicos del cromóforo con el medio en que se encuentra.

La absorción de radiación ocurre en alrededor de 10^{-15} segundos, el cual es un tiempo adecuado para la redistribución de electrones, produciéndose un momento dipolar μ^* distinto de μ . La creación de μ^* perturba la caja de solvente alrededor del cromóforo. En un medio polar las moléculas de solvente relajan por interacciones dipolares, a través de la reorientación de sus dipolos, disminuyendo en consecuencia la energía del estado excitado. Por lo tanto el proceso de relajación del solvente contribuye a aumentar la diferencia de energía entre la absorción y la emisión de radiación, que se evalúa en términos del corrimiento de Stokes, S (en unidades de número de onda):

$$S = \nu_a - \nu_f \quad (\text{V-1})$$

donde ν_a es el número de onda correspondiente al máximo del espectro de absorción (o de excitación) y ν_f el número de onda correspondiente al máximo del espectro de fluorescencia ($\nu_f = 1/\lambda_{\text{emis}}^{\text{máx}}$).

Lippert (1957) y Mataga et al. (1956) desarrollaron un modelo matemático sencillo, relacionando S con la constante dieléctrica del medio (ϵ) y el índice de refracción (n) mediante la ecuación:

$$S = \nu_a - \nu_f \cong \frac{2(\mu - \mu^*)^2}{hca^3} \left(\frac{\epsilon - 1}{2\epsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \right) + S_0 \quad (\text{V-2})$$

donde h es la constante de Planck, c la velocidad de la luz en vacío, a es el radio de la cavidad en la cual reside el cromóforo y S_0 es el corrimiento de Stokes en vacío.

El modelo supone que el solvente se relaja completamente alrededor del cromóforo *antes* de que ocurra la emisión. Esta hipótesis es correcta en medios de baja viscosidad, en donde el tiempo de reorganización de los dipolos del solvente, τ_R , es mucho menor que el tiempo de vida del estado excitado, τ (Lakowicz, J.R., Principles of Fluorescence Spectroscopy. Plenum Press, New York, 1983). En caso contrario la emisión ocurre desde un estado no relajado, de mayor energía que el estado completamente relajado, y se obtienen valores menores de S que los predichos por la ecuación de Lippert-Mattaga.

V.2.b Anisotropía estacionaria: definición y cálculo.

La anisotropía estacionaria $\langle r \rangle$ se obtiene mediante la ecuación:

$$\langle r \rangle = (I_{vv} - I_{vh}) / (I_{vv} + 2 G I_{vh}) \quad (V-3)$$

donde I representa la intensidad de fluorescencia, los índices v y h las componentes de la radiación polarizadas en forma vertical y horizontal, respectivamente; el primer subíndice en orden de izquierda a derecha corresponde a luz incidente y el segundo a luz emitida; y $G = I_{hv}/I_{hh}$ es un factor de corrección instrumental, medido en cada una de las determinaciones de $\langle r \rangle$. El valor resultante de $\langle r \rangle$ se obtuvo como el promedio de los valores de anisotropía medidos para aproximadamente 20-30 longitudes de onda diferentes alrededor de la longitud de onda del máximo de emisión, λ_{emis}^{max} .

V.3 PROPIEDADES ESPECTROSCOPICAS EN SOLVENTES ORGANICOS

El conocimiento de las propiedades fotofísicas de un determinado cromóforo es importante para la comprensión del comportamiento que sondas derivadas de dicho cromóforo experimenten en función de diversas variables.

En relación a los cromóforos dansilo, la variación del rendimiento cuántico de fluorescencia, ϕ_f , y de λ_{emis}^{max} con la polaridad del solvente en soluciones homogéneas fue estudiada por Seliskar y Brand (1970) en una serie de catorce aminonaftalenos con diferentes sustituyentes. Dichos estudios indicaron que una transferencia de carga intramolecular se produce luego de la absorción de radiación en la banda de menor energía (transición singlete-singlete). Este proceso es el que originaría el aumento del momento dipolar en el estado excitado. El grupo cromóforo de DPE y DA, N,N-dimetil-2-aminonaftaleno-6-sulfonato, verifica la relación de Lipert-Mataga en mezclas etanol-agua (Seliskar y Brand). Seliskar y Brand determinaron, mediante (V.2), que la diferencia ($\mu^* - \mu$) es de aproximadamente 19 D.

V.3.a Resultados y discusión.

En la tabla V-1 se tabulan la longitudes de onda del máximo de los espectros de excitación y de emisión de DPE y DA en distintos solventes. En la misma se observa como el corrimiento de Stokes, S, aumenta con la polaridad del solvente.

En la figura V-2 se representa S en función de la variable $F = \frac{\epsilon - 1}{2\epsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1}$. S varía en forma aproximadamente lineal con F, como predice la ecuación de Lippert-Mataga, (V-2).

TABLA V-1: Longitudes de onda correspondientes a los máximos de emisión (λ_{emis}^{max}) para DPE y DA en solventes orgánicos a 22 °C. En cada solvente λ_{emis}^{max} fue independiente de la longitud de onda de excitación. ϵ representa la constante dieléctrica del solvente y n el índice de refracción.

λ_{exc}^{max} DPE = 340 ± 1 nm; λ_{exc}^{max} DA = 342 ± 1 nm en todos los solventes.

SOLVENTE	ϵ	n	DPE: λ_{emis}^{max} (nm)	S (cm^{-1})	DA: λ_{emis}^{max} (nm)	S (cm^{-1})
Parafina	---	----	472	8053	456	7310
Metilciclohexano	2	1.42	480	8752	458	7406
Cloroformo	5	1.44	508	9727	494	9169
Butanol	18	1.40	521	10218	524	10328
Etanol	25	1.36	522	10255	528	10472
1,2-propanodiol	32	1.43	534	10685	534	10513

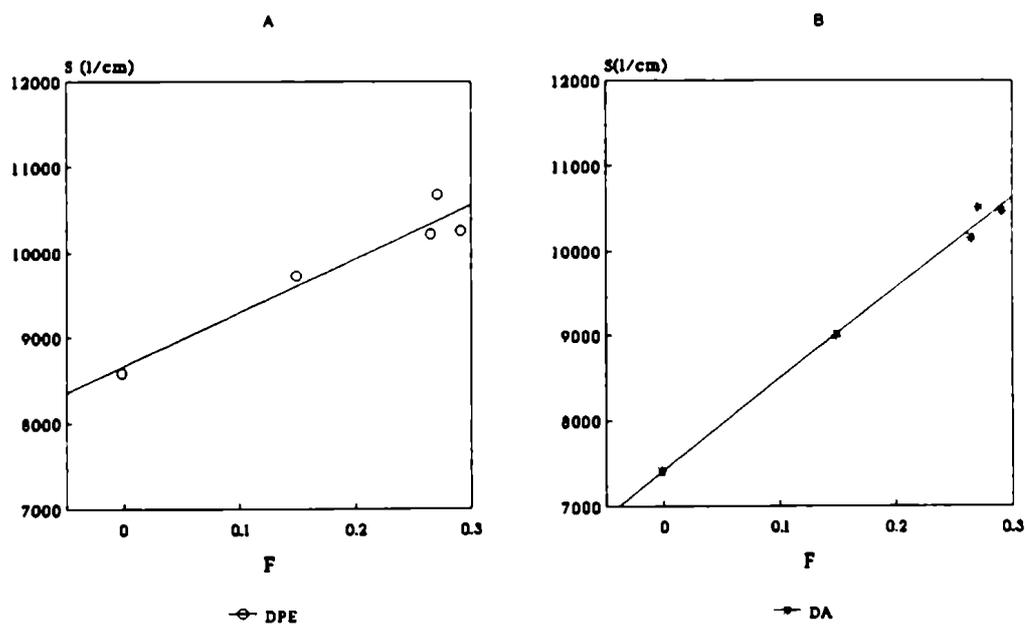


Figura V-2: gráficos de Lippert-Mataga para DPE (A) y DA (B) en medio homogéneo. S = corrimiento de Stokes. $F = \frac{\epsilon - 1}{2\epsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1}$. Los valores de S , ϵ y n corresponden a los de

tabla V-1.

De la pendiente de dichas rectas se obtuvieron valores de $\frac{2(\mu - \mu^*)^2}{hca^3}$ iguales a $(6320 \pm 1023) \text{ cm}^{-1}$ para DPE y $(10445 \pm 718) \text{ cm}^{-1}$ para DA. La ordenada al origen corresponde a S_0 , obteniéndose: $S_0 = (8661 \pm 252) \text{ cm}^{-1}$ para DPE y $S_0 = (7439 \pm 177) \text{ cm}^{-1}$ para DA.

En la tabla V-2 se representan las longitudes de onda de emisión de dichas sondas obtenidas en 1,2-propanodiol a diferentes temperaturas.

TABLA V-2: Longitudes de onda correspondientes a los máximos de los espectros de excitación ($\lambda_{exc}^{m\acute{a}x}$) y de emisión ($\lambda_{emis}^{m\acute{a}x}$) para DPE y DA en 1,2 propanodiol a diferentes temperaturas.

TEMPERATURA ($^{\circ}\text{C}$)	DPE: $\lambda_{emis}^{m\acute{a}x}$ (nm)	DA: $\lambda_{emis}^{m\acute{a}x}$ (nm)
-53	479	485
-43	494	498
-36	504	504
-28	515	515
-18	525	525
8	534	534
22	534	534

1,2-propanodiol es un solvente viscoso que forma soluciones vítreas a bajas temperaturas. Dado que en dicho medio y a $-53 \text{ }^{\circ}\text{C}$ los tiempos de rotación molecular son mucho más largos que el tiempo de vida del estado excitado, el valor de anisotropía estacionaria, $\langle r \rangle$, medido en tales condiciones es igual al valor de anisotropía límite (llamado también anisotropía fundamental), r_0 . Se obtuvo $r_0 = 0.30$ para DPE y $r_0 = 0.29$ para DA.

Por otra parte en la tabla V-2 se observa el efecto de la temperatura sobre $\lambda_{emis}^{m\acute{a}x}$ en un medio de alta viscosidad ($\eta = 40 \text{ cP}$ a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$). Cuando la temperatura disminuye la constante dieléctrica aumenta y por lo tanto la ecuación de Lippert-Mataga predice un aumento de $\lambda_{emis}^{m\acute{a}x}$. Sin embargo $\lambda_{emis}^{m\acute{a}x}$ disminuye al

pasar de 22 °C a -53 °C en 1,2-propanodiol. Este resultado muestra que la emisión ocurre desde un estado no relajado. La elevada viscosidad del medio impide la completa reorientación de las moléculas del solvente alrededor del cromóforo y por lo tanto la emisión ocurre a mayores energías (menor λ_{emis}^{max}) que las correspondientes a un medio de igual constante dieléctrica pero baja viscosidad. Cuando la temperatura disminuye la viscosidad aumenta y λ_{emis}^{max} disminuye aún más, como se observa en la tabla V-2.

V.4 ESTUDIOS EN FUNCION DEL TIPO DE LIPOSOMA

V.4.a Resultados.

Mediante las sondas DA y DPE, se estudiaron las propiedades de la interfaz de bicapas de DMPC en liposomas unilamelares de distinto tamaño: SUV (vesículas unilamelares sonicadas, diámetro 25-50 nm) y LUV (vesículas unilamelares grandes, diámetro 90-100 nm de acuerdo a nuestro método de preparación).

Las figuras V-3 y V-4 muestran los espectros de emisión y excitación de fluorescencia de DPE y DA en función de la temperatura. Los espectros de emisión varían su intensidad y la longitud de onda del máximo de emisión, mientras que en los espectros de excitación sólo se modifica la intensidad del máximo. Los máximos de excitación para la sonda DPE y DA son 341 nm y 346 nm respectivamente, los cuales permanecen invariantes a las distintas temperaturas ensayadas. Estos experimentos fueron realizados partiendo desde 32°C, temperatura en la cual DMPC está en fase líquido-cristalina L_{α} , y descendiendo gradualmente la temperatura hasta 7°C, en la cual DMPC está en fase gel L_{β} .

La figura V-5 y la tabla V-3 permiten hacer un análisis más minucioso de los cambios mencionados. En la figura V-5A para DPE se grafica la variación de la longitud de onda del máximo de emisión de fluorescencia con la temperatura. Si bien en todos los casos a mayor temperatura la longitud de onda es mayor, la pendiente de cambio no es la misma para SUV (Δ) que para LUV (O). Para SUV se observa un aumento monótono de la longitud de onda de emisión en todo el rango de temperaturas. En cambio para LUV la longitud de onda de emisión es la misma entre 16° y 19°C y varía muy poco en el rango 13°-22°C. En la figura las líneas verticales a 14° y 24°C señalan las temperaturas de cambio de fases $L_{\beta}' \rightarrow P_{\beta}'$ y $P_{\beta}' \rightarrow L_{\alpha}$ determinadas en MLV de DMPC (Lipka et al., 1984; Janiak et al., 1979).

La dependencia de la intensidad de fluorescencia del máximo de emisión con la temperatura también muestra un comportamiento diferente para SUV y LUV (fig. V-5B). Para SUV (Δ) la intensidad decrece en forma continua

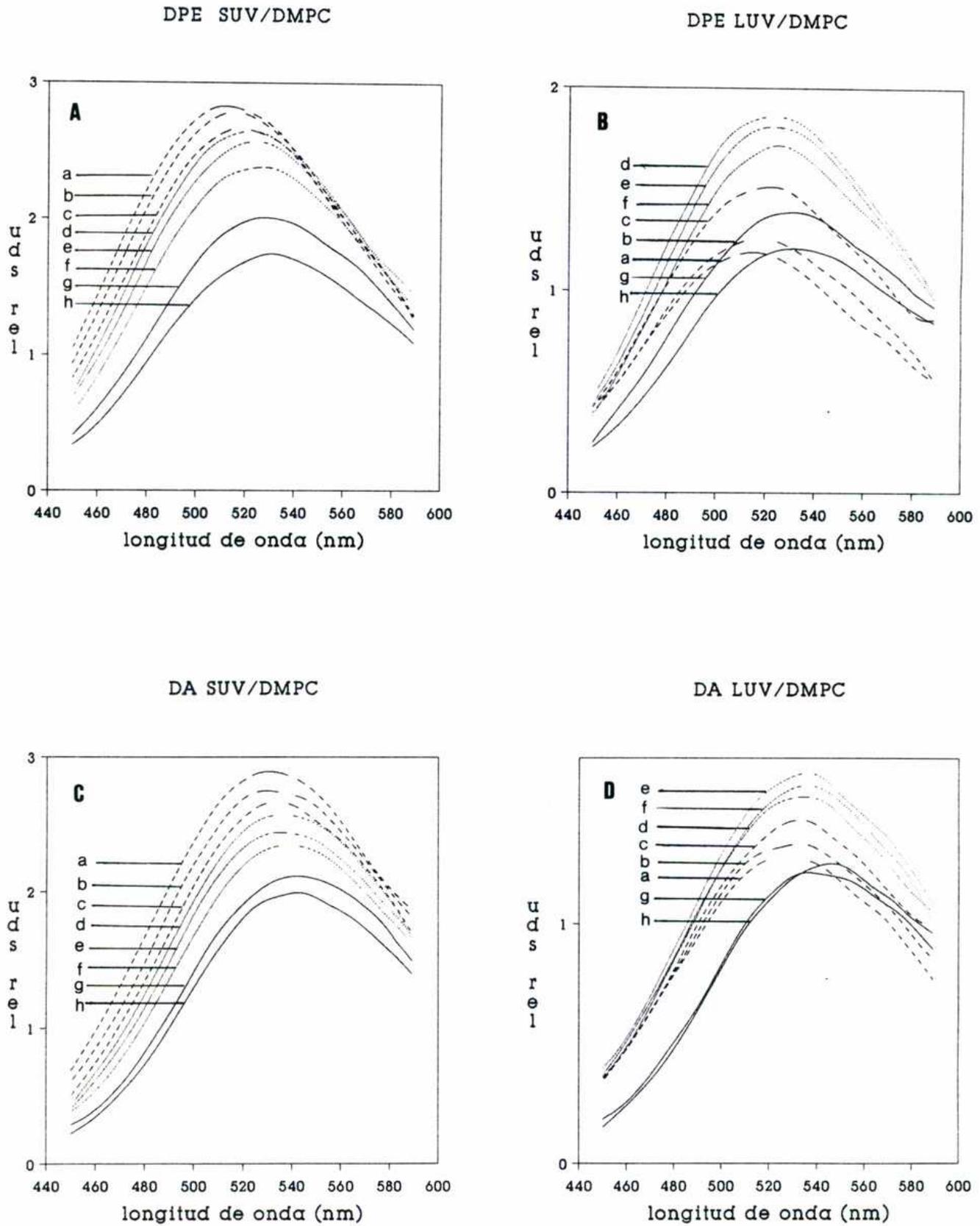


FIGURA V-3: Espectros de emisión de fluorescencia de DPE y DA en función de la temperatura en SUV (A y C) y LUV (B y D) DMPC. a) 7°C; b) 10°C; c) 13°C; d) 16°C; e) 19°C; f) 22°C; g) 27°C; h) 32°C. $\lambda_{excit.} = 320 \text{ nm}$. Las $\lambda_{emis}^{m\acute{a}x}$ se indican en Tabla V-3.

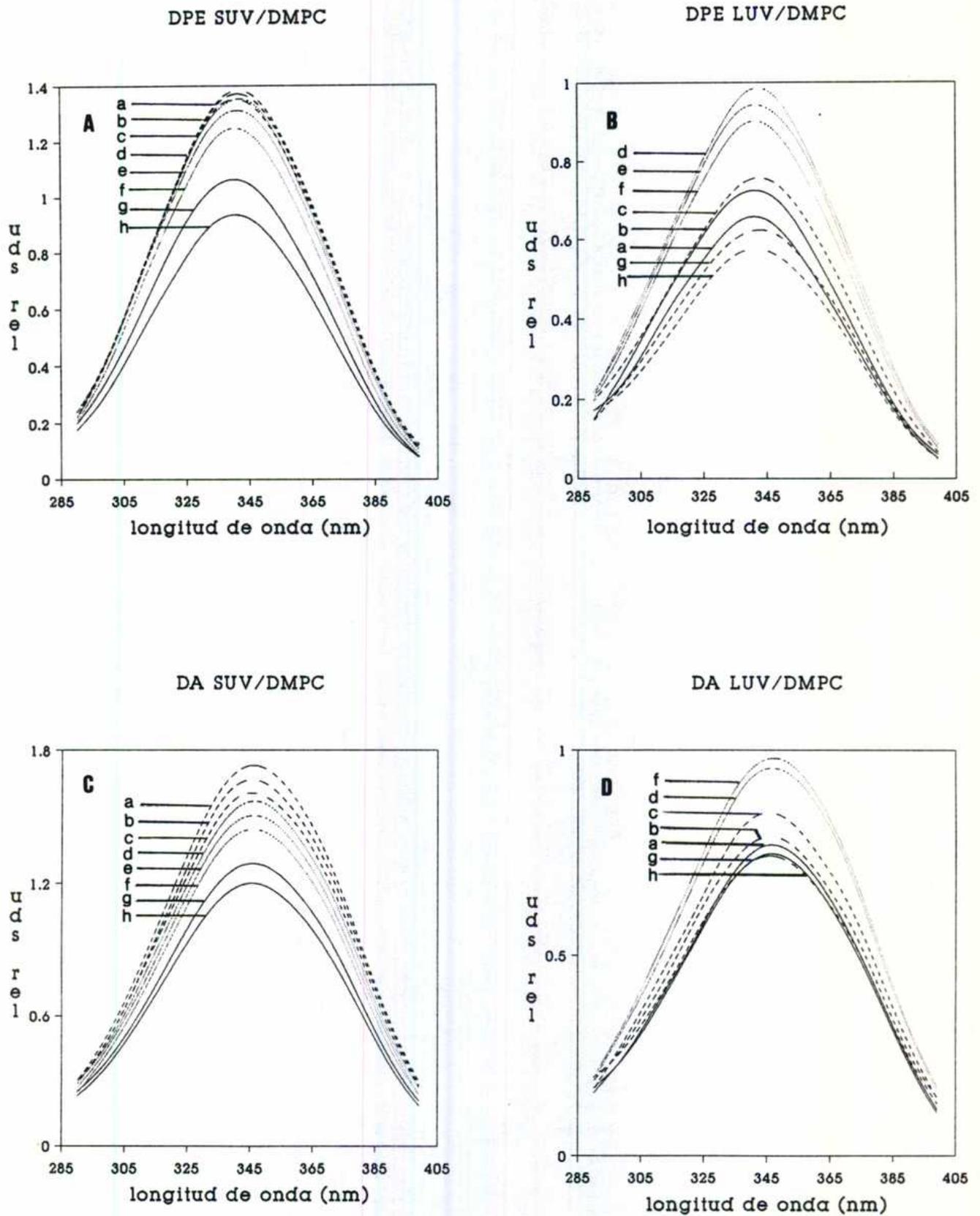


FIGURA V-4: Espectros de excitación de DPE y DA en función de la temperatura en SUV (A y C) y LUV (B y D) DMPC. a) 7°C; b) 10°C; c) 13°C; d) 16°C; e) 19°C; f) 22°C; g) 27°C; h) 32°C. $\lambda_{emis} = 630$ nm.

con el aumento de temperatura, mientras que para LUV (o) la intensidad es máxima a 16°C y decrece hacia ambos extremos (7° y 32°C).

Las figuras V-5 C y D y la tabla V-3 muestran el mismo análisis para la sonda DA. El comportamiento es similar al descrito para DPE, si bien se observa que para SUV entre 16 °C y 19 °C λ_{emis}^{max} no varía, mientras que para LUV el máximo de intensidad de fluorescencia se produce a T = 19°C y la longitud de onda permanece casi invariante ahora en el rango 16°-27°C.

TABLA V-3: Variación de λ_{emis}^{max} y de la intensidad de emisión a dicha longitud de onda en función de la temperatura.

T (°C)	DPE SUV		DPE LUV		DA SUV		DA LUV	
	λ_{emis}	intens	λ_{emis}	intens	λ_{emis}	intens	λ_{emis}	intens
7	511	2.829	515	1.190	530	2.893	527	1.279
10	515	2.784	517	1.257	530	2.753	533	1.337
13	518	2.662	522	1.512	534	2.669	533	1.438
16	522	2.643	523	1.863	536	2.571	535	1.536
19	524	2.565	523	1.809	536	2.439	536	1.636
22	527	2.380	525	1.716	538	2.344	536	1.585
27	528	2.007	531	1.388	542	2.113	537	1.216
32	531	1.741	532	1.208	543	1.992	546	1.254
$\Delta\nu$ (cm ⁻¹)	7371		6205		4517		6603	

$$\Delta\nu = \frac{1}{\lambda_{emis}^{max}(32^\circ\text{C})} - \frac{1}{\lambda_{emis}^{max}(7^\circ\text{C})}$$

La figura V-6 muestra los gráficos de intensidad del máximo de excitación en función de la temperatura para SUV y LUV y para ambas sondas: DPE parte A y DA parte B. Se obtiene el mismo patrón de cambio que mediante el análisis de los espectros de emisión.

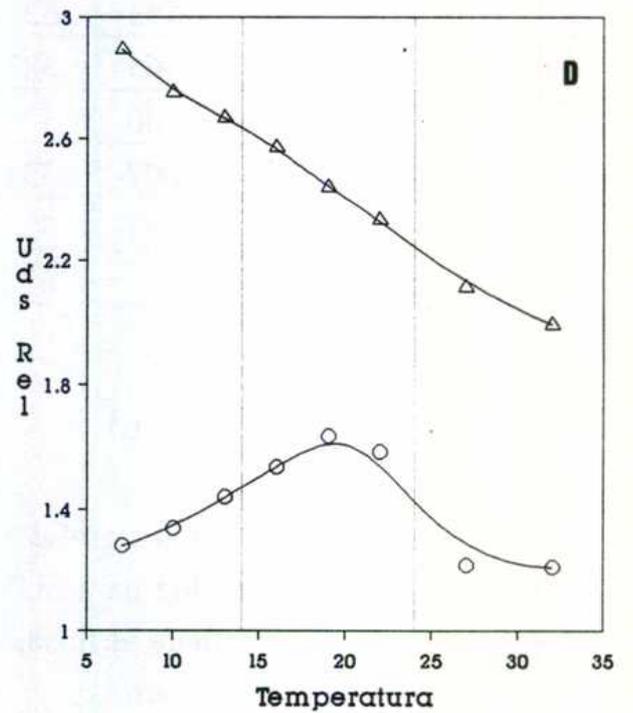
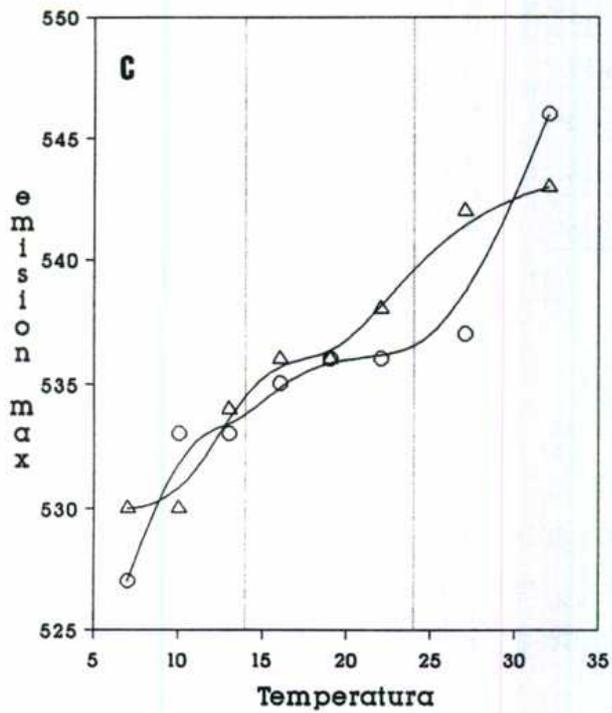
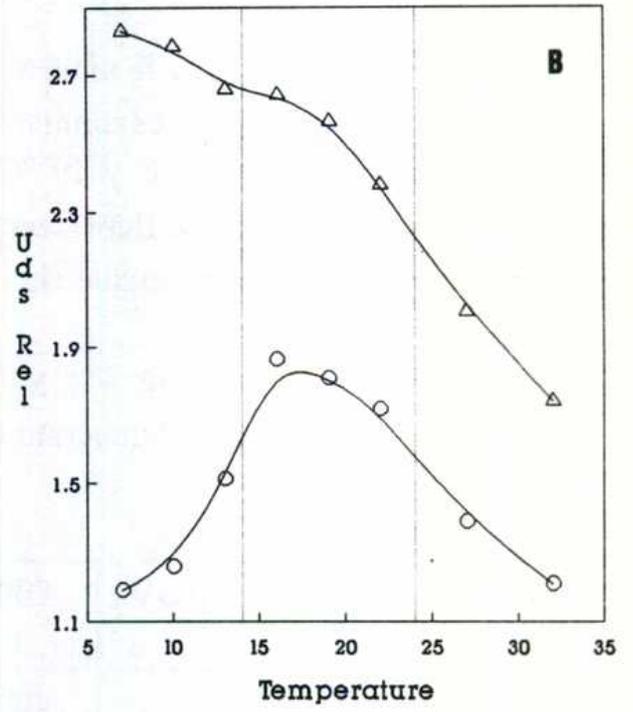
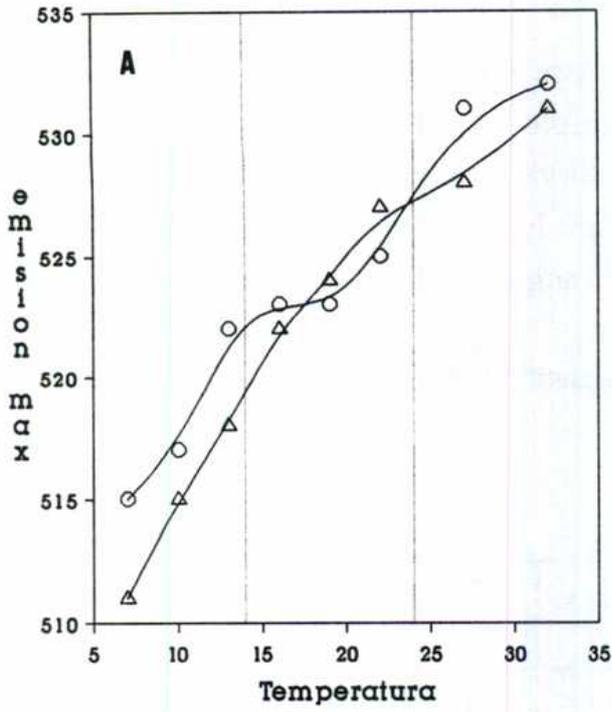


FIGURA V-5: Variación de la longitud de onda de emisión máxima (A y C, $\lambda_{emis}^{máx}$ en nm) y de la intensidad de emisión de fluorescencia (B y D, en unidades relativas) de DPE y DA respectivamente en función de la temperatura. (Δ) SUV DMPC; (O) LUV DMPC.

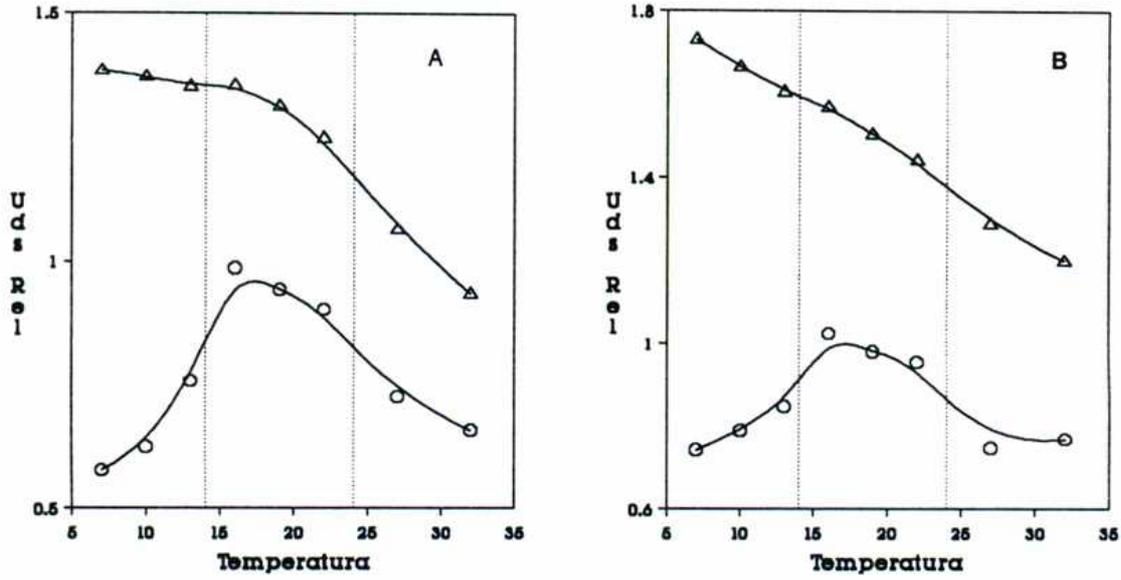


Figura V-6: Variación de la intensidad del máximo de excitación de DPE (A) y DA (B) con la temperatura en SUV (Δ) y LUV (O) DMPC.

Conjuntamente con el registro de los espectros de excitación y emisión se midió y calculó el valor de anisotropía estacionaria en cada caso de acuerdo a la ecuación V-3. En la figura V-7 puede observarse la evolución de la anisotropía estacionaria para ambas sondas en función de la temperatura.

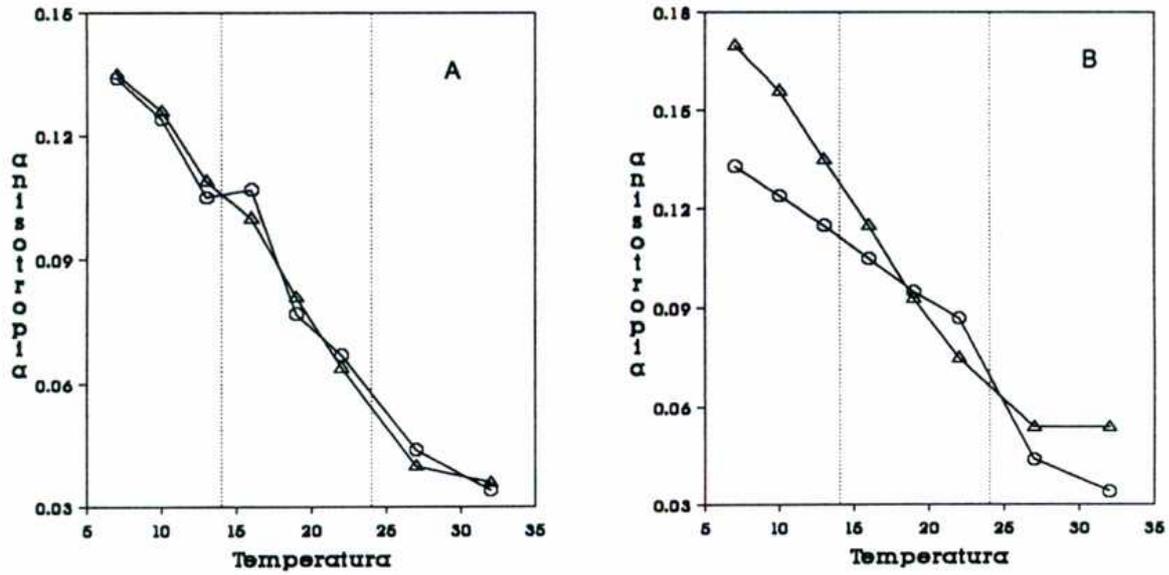


Figura V-7: Variación de la anisotropía estacionaria $\langle r \rangle$ de DPE (A) y DA (B) en función de la temperatura en SUV (Δ) y LUV (O) DMPC.

V.4.b Discusión.

Los datos de la tabla V-3 y de las figuras V-5 B y D y V-6 para LUV muestran un aumento en la intensidad de emisión fluorescente cuando la temperatura desciende desde 32°C, un máximo aproximadamente entre 16° y 19° C (según la sonda), y luego vuelve a descender a temperaturas menores. El coeficiente de absorción molar, ϵ , de DPE y DA no varía con la temperatura (Faucon y Lussan, 1973). Por lo tanto la causa de estos cambios debe ser que el rendimiento cuántico de fluorescencia, ϕ_f , varía con la temperatura. ϕ_f es función de la relación k_{nr}/k_f , donde k_{nr} es la constante de desactivación no radiativa y k_f es la constante de emisión. Cuanto menor es k_{nr}/k_f mayor es ϕ_f y por lo tanto mayor es la intensidad de la emisión, I , de acuerdo con la relación (V-4):

$$I = \text{cte.} \cdot \phi_f = \text{cte.} \cdot \frac{1}{\left(1 + \frac{k_{nr}}{k_f}\right)} \quad (\text{V-4})$$

Por una parte, en solventes orgánicos puros la disminución de temperatura induce una disminución de la velocidad de los procesos de emisión no radiativa (Lakowicz, 1983) y k_{nr}/k_f disminuye. En general, un aumento de la rigidez del medio produce un aumento monótono de la intensidad de fluorescencia. Sin embargo, este aumento de intensidad no se verifica cuando la temperatura desciende más allá de 19° (DA) o 16°C (DPE) en LUV DMPC, como se observa en las figuras V-5B y D. Esto indica que en dichas membranas existe otro proceso que influye sobre k_{nr}/k_f , diferente a los que se observan en solventes puros.

k_{nr}/k_f puede variar con la temperatura debido a la presencia de moléculas que produzcan un efecto de quenching de la emisión. Para estas sondas en membranas lipídicas el quenching por presencia de agua es el mecanismo más probable dada la composición del sistema en estudio (ver estudios previos en introducción).

El hecho de que la intensidad de fluorescencia aumente al descender la temperatura en un cierto rango y luego disminuya nuevamente podría explicarse en términos de un menor o mayor acceso de moléculas de agua a la

región donde se encuentra el cromóforo, o a un cambio de la ubicación relativa de la sonda en la interfaz inducido por la temperatura.

Un comportamiento análogo ha sido ya previamente observado mediante otras sondas (Sonnenschein y Weiss, 1990; Lissi et al., 1992). El aumento del tiempo de vida de fluorescencia de las sondas empleadas por dichos autores en LUV y en fase tubular registrado a temperaturas previas a la transición de fase principal, ha sido explicado considerando que las moléculas de fosfolípidos vecinas al cromóforo tienen diferente capacidad en función de la temperatura para proteger al mismo de las moléculas de agua.

El aumento inicial de intensidad al pasar a fase gel podría implicar que existe menor número de moléculas de agua alrededor del cromóforo. La disminución posterior de intensidad podría deberse a un nuevo acceso de las moléculas de agua a la región del cromóforo. Esto implicaría que la micropolaridad sensada por el cromóforo debería primero disminuir, y luego aumentar. Esto, a su vez implicaría un inicial corrimiento al azul de $\lambda_{\text{emis}}^{\text{máx}}$, y un posterior corrimiento al rojo. Sin embargo los datos experimentales sólo muestran una permanente disminución de $\lambda_{\text{emis}}^{\text{máx}}$ con el descenso de temperatura. Luego, este corrimiento al azul del espectro sólo puede explicarse si la emisión radiativa se produce desde un estado no relajado respecto al inmediato anterior, debido a la disminución de la temperatura. Esta suposición es apoyada por determinaciones de los tiempos de relajación de las cabezas polares, que muestran una disminución del movimiento de las mismas al disminuir la temperatura (en particular al pasar de fase $P\beta'$ a $L\beta'$ (Dufourc et al., 1992; MacDonald et al., 1991). Este factor explicaría el continuo corrimiento al azul de la $\lambda_{\text{emis}}^{\text{máx}}$ en LUV detectado con ambas sondas. El análisis de los cambios de intensidad de fluorescencia registrados con LUV de DMPC para ambas sondas sugiere que existe relajación de solvente en dichos sistemas.

Es interesante observar que el aumento de intensidad de fluorescencia observado con DPE y DA se produce en un rango de temperaturas que corresponde aproximadamente a la región de fase gel $P\beta'$ en MLV DMPC. La existencia de las subfases $L\beta'$ y $P\beta'$ se ha verificado en liposomas multilamelares, pero no se ha informado aún en liposomas unilamelares grandes. En vesículas sonicadas DPE y DA no muestran dicho aumento de

intensidad de fluorescencia, lo cual coincide con lo observado por Sonneschein y Weiss (1990) mediante sondas derivadas del grupo pireno y con el hecho de que dichas subtransiciones en fase gel no existen en SUV, como ha sido observado previamente (Huang y Mason, 1978).

En este sentido las propiedades de interfaz detectadas por estas sondas se corresponden con las propiedades determinadas mediante calorimetría diferencial.

El corrimiento de λ_{emis}^{max} hacia longitudes de onda mayores a medida que aumenta la temperatura puede deberse a dos causas:

1) Un cambio en la composición molecular del microentorno del cromóforo de tal modo que la constante dieléctrica local aumente. Esto podría deberse a un mayor grado de hidratación de las cabezas polares a mayor temperatura (Kimura e Ikegami, 1985). Este corrimiento se rige por la ecuación de Lippert-Mataga. Como se mencionó en la sección V.2.a, dicha ecuación considera que el sistema ha relajado totalmente, reorientándose las moléculas de solvente antes que se produzca la emisión fluorescente.

2) Sin embargo, en caso de que la región de interfaz en donde se encuentra la sonda ofrezca un medio viscoso a la misma, un aumento de temperatura también producirá un corrimiento al rojo del espectro de emisión, debido a una más completa relajación antes de de la emisión.

El caso de las sondas derivadas del grupo dansilo es un caso particular en el cual el momento dipolar del estado excitado es muy diferente del correspondiente al estado fundamental. Se ha verificado que en solventes viscosos como butanol la emisión se produce desde un estado no totalmente relajado (Ghiggino et al., 1981).

La inserción de la sonda en una membrana lipídica coloca a la misma en una región donde las moléculas están orientadas en un arreglo definido, en el cual los movimientos moleculares y la polaridad dependen fuertemente de la temperatura (ver capítulo I). Luego, en la evolución de los espectros hacia longitudes de onda mayores con el aumento de temperatura puede existir

contribución de ambos factores: polaridad y relajación. Ambos se discuten separadamente a continuación.

Como se mostró en las figuras V-II A y B, DA y DPE verifican con buena aproximación la relación de Lippert-Mataga para los solventes considerados en tabla V-1. En dicha tabla se observa que el cambio de S con la constante dieléctrica (ϵ) es mayor para valores de $\epsilon \leq 18$. Para solventes con $\epsilon > 18$, un cambio del 100 % en ϵ solamente produce un cambio del 4 % en S . Este comportamiento se estudió simulando la dependencia de S en función de ϵ dada por la ecuación de Lippert-Mataga, (V-2). En dicha simulación se emplearon los valores de $\frac{2(\mu - \mu^*)^2}{hca^3}$ y S_0 obtenidos para DA. El índice de refracción se supuso constante, simulándose curvas con $n = 1.33$ (índice de refracción del agua), $n = 1.40$ y $n = 1.50$. Los valores simulados de S vs. ϵ se muestran en la figura V-8.

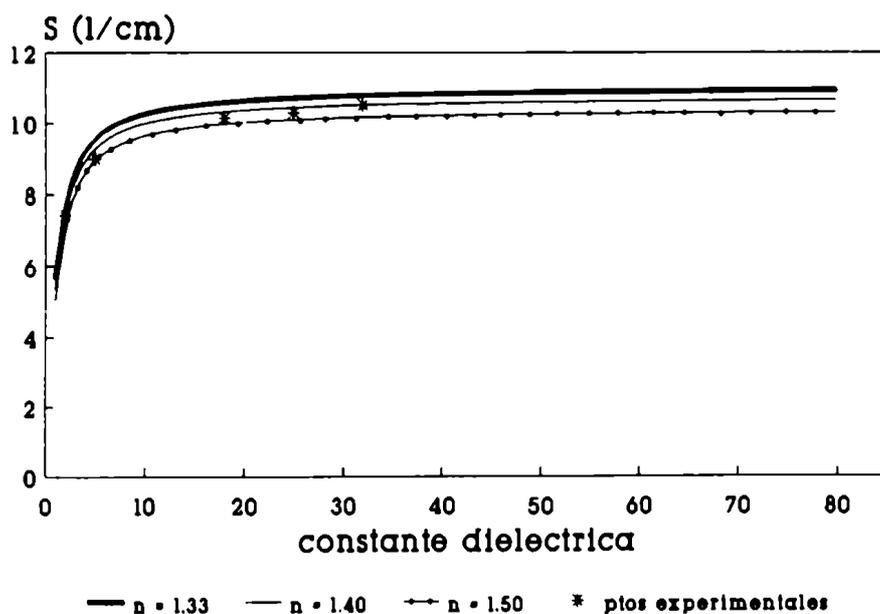


Figura V-8: Valores simulados de S ($\times 10^{-3}$) en función de ϵ . Para cada curva se supuso que el índice de refracción, n , es constante. Los puntos experimentales correspondientes a DA en los solventes de tabla V-1 se representan para comparación.

En la figura V-8 se observa que para $\epsilon > 20$, S tiende asintóticamente a un valor máximo. En dicho rango el término $\frac{\epsilon-1}{2\epsilon+1}$ tiende a un valor límite igual a 0.5.

En consecuencia, la determinación de constantes dieléctricas para $\epsilon > 20$ presenta la dificultad de que S toma valores cercanos al máximo y por lo tanto solventes de muy distinta polaridad, (como agua y etanol: $\epsilon = 78$ y 25 respectivamente) darán valores similares de S. Además se predice que en dicho intervalo los valores experimentales de S estarán influidos por el término $\frac{n^2-1}{2n^2+1}$. La dispersión de S con F que se observa en las figuras V-II A y B en el intervalo de mayores polaridades ($F \cong 0.3$) se debe por lo tanto a las diferencias de índice de refracción entre distintos solventes.

Si bien los valores de S de la figura V-8 fueron simulados usando los valores de $\frac{2(\mu-\mu^*)^2}{hca^3}$ y S_0 correspondientes a DA, la dependencia de S con ϵ puede ser generalizada para otras sondas fluorescentes. Tocanne y Teissié (1991) han recopilado valores de ϵ obtenidos con diferentes sondas espectroscópicas localizadas en distintas zonas de la interfaz lípido-solución. En ningún caso los valores reportados superan $\epsilon = 40$, lo cual es llamativo considerando que la constante dieléctrica del agua es 78. El análisis aquí descripto indica que para cada sonda existe un corrimiento de Stokes máximo tal que a partir de un dado valor de polaridad del microentorno un aumento mayor de dicha polaridad no producirá cambios apreciables en la longitud de onda de emisión. Esta dependencia de S con ϵ puede dar lugar a errores importantes en la determinación de constantes dieléctricas para $\epsilon > 20-40$, cuando estas se interpolan de la ecuación de Lippert-Mataga.

Con los valores de S medidos en SUV y LUV de DMPC a diferentes temperaturas (tabla V-3), se interpolaron valores de constantes dieléctricas. Para ello se supuso $n = 1.35$, independiente de la temperatura (Chang y Colbow, 1976). Los valores obtenidos para ϵ se representan en función de la temperatura en la figura V-9.

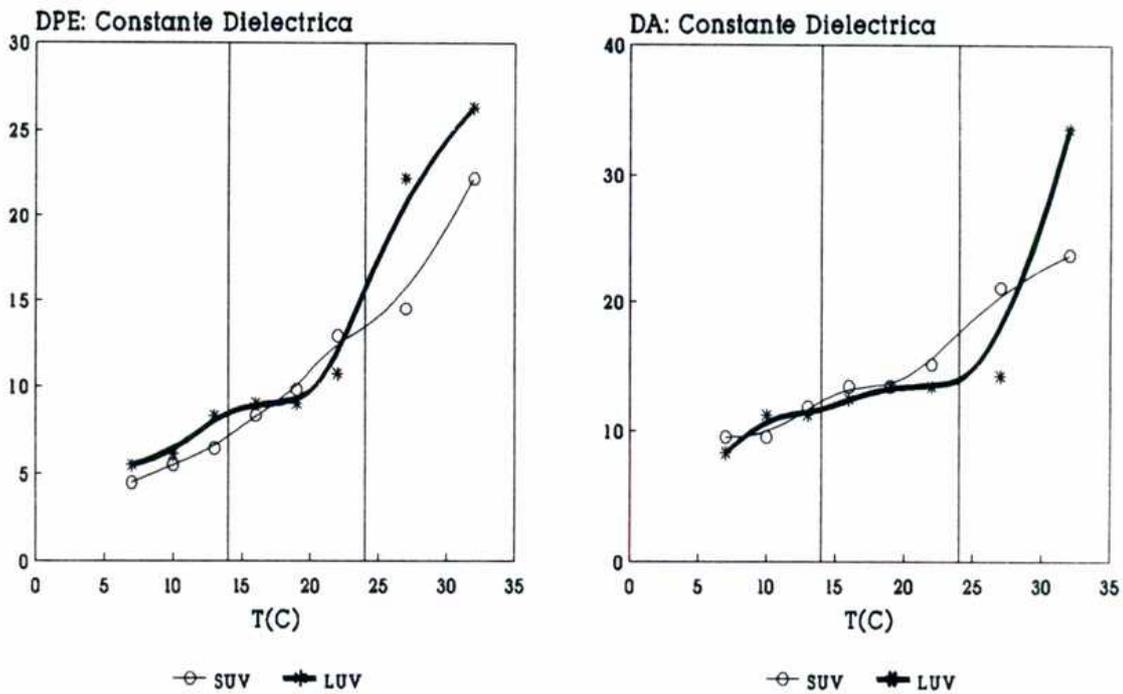


Figura V-9: Constantes dieléctricas calculadas en SUV y LUV de DMPC, correspondientes a los microentornos de DPE y DA.

Los valores calculados de ϵ varían entre 5 y 13 para ambas sondas en fase gel, y aumentan notoriamente cuando la temperatura se acerca a la de transición de fase principal.

Nuevamente, se observa que el aumento de ϵ en SUV es gradual, mientras que en LUV las curvas presentan inflexiones más pronunciadas en las regiones de transiciones de fase determinadas en MLV (rectas a 14 y 24°C en figura V-9) como se discutió anteriormente. El aumento de la constante dieléctrica entre 7 y 18°C indica que debe existir un aumento en el grado de hidratación de la región interfacial aún en fase gel, tal como ha sido propuesto por otros autores (Cevc, 1991).

Para los casos aquí estudiados no hemos observado longitudes de emisión mayores de 540 nm ($S \cong 10.800 \text{ cm}^{-1}$) en ningún solvente, ni en membranas. Respecto de la constante dieléctrica hallada en fase líquido cristalina, la simulación graficada en la figura V-8 indica que valores de ϵ mayores de 20 darán muy poca variación en el valor de S . Por lo tanto los valores obtenidos en fase líquido cristalina podrían estar afectados por un error de hasta 100%. Considerando que las sondas se ubican en una región de interfaz con un medio acuoso, los valores de ϵ obtenidos en dicha fase parecerían ser una cota inferior del valor verdadero.

También es necesario destacar que las constantes dieléctricas de la figura V-9 fueron calculadas usando la ecuación (V-2), la cual supone que los dipolos que rodean al cromóforo se reorientaron completamente antes de la emisión (ver sección V.2.a). Esta hipótesis es válida cuando $\tau_R \ll \tau$, donde τ_R es el tiempo de relajación de los dipolos y τ es el tiempo de vida del estado singlete excitado del cromóforo. La validez de la misma puede ser objetada en el caso de cromóforos en bicapas lipídicas y principalmente en fase gel, donde el movimiento de los dipolos de las cabezas polares de los fosfolípidos es más lento que en fase líquida, y por lo tanto τ_R es mayor. (Lakowicz, 1983). Empleando las ecuaciones mencionadas por Lakowicz en relación con procesos generales de relajación, se deduce que los valores de S obtenidos experimentalmente deberían ser corregidos por el factor multiplicativo $\left(1 + \frac{\tau_R}{\tau}\right)$ para poder utilizar entonces la ecuación (V-2), en el caso en que haya relajación durante el tiempo de vida del estado excitado.

En el caso de DPE y DA, se han hallado valores de τ_R entre 1 y 2 ns y τ entre 15 y 18 ns dependiendo del estado de fase de la membrana (Gighino et al., 1981; y resultados no incluidos en esta tesis). Por lo tanto el factor de corrección mencionado variaría entre 1.06 y 1.13, lo cual aumentaría el corrimiento de Stokes entre un 6 y un 13%. Este cambio puede no ser importante en fase líquida por las razones antes mencionadas. En fase gel un aumento de 13% en S cambiaría un valor de ϵ de 5 a 6 aproximadamente, lo cual tampoco afecta significativamente las interpretaciones sobre como varía la polaridad de una región en función de la temperatura. No obstante, dependiendo de los valores de τ_R y τ , la corrección debida al factor de relajación puede ser significativa para otras situaciones o sondas fluorescentes.

V.5 ESTUDIOS EN FUNCION DE LA COMPOSICION LIPIDICA

V.5.a Resultados.

En esta parte se estudian las propiedades de las interfases de liposomas unilamelares sonicados de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG) y mezclas equimolares de ambos lípidos, a distintas temperaturas en fase gel y líquido cristalina, y en liposomas multilamelares de DPPC en fase gel dopados con distintas proporciones de colesterol y floretina.

En la tabla V-4 A y B se indican los parámetros medidos para DPE y DA respectivamente mediante fluorescencia estacionaria en membranas con diferente densidad de carga superficial negativa aportada por el fosfolípido DPPG.

V.5.a.1 Influencia de la temperatura a composición lipídica fija:

Para membranas de DPPC 100%, se produce un corrimiento al rojo del espectro de emisión de fluorescencia tanto para DPE como para DA, si bien dicho corrimiento es más pronunciado para DPE ($\Delta\nu = 6962 \text{ cm}^{-1}$) que para DA ($\Delta\nu = 4193 \text{ cm}^{-1}$).

Para membranas mixtas de DPPC 50%/ DPPG 50%, el comportamiento de ambas sondas con el aumento de temperatura es similar, produciéndose un corrimiento al rojo, en este caso más pronunciado para DA que para DPE (ver valores de $\Delta\nu$ en tabla V-4 A y B).

En el caso de membranas de DPPG pura, el efecto de la temperatura en el espectro de emisión de DA es análogo al descrito anteriormente. Si bien los valores de $\lambda_{\text{emis}}^{\text{máx}}$ a 13°C no son iguales para las tres composiciones, $\Delta\nu$ entre 13° y 48°C varía entre 4000 y 6000 cm^{-1} .

Contrariamente, DPE presenta la particularidad de que su espectro de emisión no se desplaza a longitudes de onda mayores con la temperatura, manteniéndose la $\lambda_{\text{emis}}^{\text{máx}} = 540 \text{ nm}$ invariante en fase gel y líquido cristalina.

Por otra parte, los valores de anisotropía estacionaria para ambas sondas y para todas las composiciones lipídicas descritas disminuyen con el aumento de temperatura. Si bien el valor final obtenido a 48°C es 0.03-0.04 en todos los casos, la proporción de cada cambio es distinta dado que los valores iniciales hallados a 13°C para cada sonda y composición presentan diferencias notables.

TABLA V-4

A) DPE

COMPOSICION							
	13°C		32°C		48°		$\Delta\nu\#$
	$\lambda_{emis}^{máx}$	$\langle r \rangle$	$\lambda_{emis}^{máx}$	$\langle r \rangle$	$\lambda_{emis}^{máx}$	$\langle r \rangle$	
DPPC	513	0.15	523	0.09	532	0.03	-6962
DPPC/DPPG	524	0.13	534	0.07	537	0.02	-4620
DPPG	540	0.10	541	0.06	540	0.03	0
$\Delta\nu^*$	-9747		-6362		-2785		

B) DA:

COMPOSICION							
	13°C		32°C		48°		$\Delta\nu\#$
	$\lambda_{emis}^{máx}$	$\langle r \rangle$	$\lambda_{emis}^{máx}$	$\langle r \rangle$	$\lambda_{emis}^{máx}$	$\langle r \rangle$	
DPPC	529	0.19	536	0.12	541	0.04	-4193
DPPC/DPPG	516	0.18	528	0.11	534	0.04	-6532
DPPG	490	0.09	493	0.07	504	0.03	-5669
$\Delta\nu^*$	15046		16273		13570		

* $\Delta\nu$ representa la diferencia entre $\nu(\text{DPPC } 100\%) - \nu(\text{DPPG } 100\%)$ en cm^{-1} donde $\nu = 1/\lambda_{emis}^{máx}$

$\Delta\nu$ representa la diferencia entre $\nu(48^\circ\text{C}) - \nu(13^\circ\text{C})$ en cm^{-1} donde $\nu = 1/\lambda_{emis}^{máx}$. $\lambda_{exc}^{máx}$ de DPE y DA es 341 nm y 346 nm respectivamente, para todas las temperaturas y composiciones de membrana indicadas.

V.5.a.2 Influencia de la composición lipídica a temperatura constante:

La evolución de los espectros de DPE con el cambio de composición de DPPC pura a DPPG pura es inversa a la de DA: los espectros de DPE se corren al rojo mientras que los de DA se corren al azul.

La magnitud del corrimiento al azul es similar para las tres temperaturas en el caso de DA; mientras que para DPE el corrimiento al rojo en fase líquido cristalina (48°C) es mucho menos pronunciado que en fase gel a 32°C, y este a la vez menor que a 13°C.

Excepto en fase líquida, en donde los valores de anisotropía son prácticamente iguales para ambas sondas en todas las composiciones y temperaturas, el análisis a temperatura constante muestra una disminución de $\langle r \rangle$ con el aumento en la proporción de DPPG.

V.5.b Discusión.

DPE y DA tienen el mismo grupo cromofórico unido covalentemente a dos grupos hidrocarbonados diferentes: un fosfolípido y un dialquilamino respectivamente (ver figura V-1). Adicionalmente, DPE tiene una carga negativa en el grupo fosfato de su cabeza polar, mientras que DA es una sonda neutra. La estructura química del DPE es la de un N-acil derivado de la fosfatidiletanolamina y en consecuencia la cabeza polar que contiene el cromóforo puede experimentar los cambios conformacionales característicos de los fosfolípidos. No es factible en cambio, que la estructura química de DA sufra cambios conformacionales que afecten su ubicación en la interfaz de modo significativo. Por lo tanto, la exacta ubicación de ambas sondas en la interfaz y su comportamiento frente a cambios estructurales inducidos por temperatura, densidad de carga superficial, composición lipídica, etc. puede ser diferente. El análisis de los resultados descritos anteriormente debe tener en cuenta estos factores diferenciales entre ambas sondas.

V.5.b.1 Análisis de los cambios observados a composición lipídica constante:

El corrimiento de los espectros de emisión a longitudes de onda mayores al pasar de 13° a 48°C es, como se discutió en la sección anterior, probablemente debido en parte a cambios en la polaridad del microentorno del cromóforo y en parte a una más rápida relajación del solvente a mayor temperatura. El aumento de temperatura produce un aumento en la movilidad de los grupos a nivel de interfaz y por lo tanto una más rápida relajación. A su vez; una consiguiente entrada de agua a mayor profundidad y aumento del grado de hidratación (Simon y McIntosh, 1986b) generan un aumento en la polaridad de la región interfacial.

En el caso de DPE también podría existir un cambio conformacional de la cabeza polar de la fosfatidiletanolamina a la cual está unida la sonda. La estructura química de DPE es similar a la de un N-acilderivado de la fosfatidiletanolamina. La conformación del grupo polar de dichos derivados fosfolipídicos ha sido estudiada por Lafrance et al. (1990) mediante espectroscopía infrarroja y Raman. Los autores hallaron que si la longitud del grupo acilo es menor de la equivalente a 10 átomos de carbono (como sería en el caso del cromóforo dansilo) dicho grupo se localiza en la región del grupo sn-1 carbonilo en fase gel, desplazándose hacia la zona más externa del grupo glicerol en fase líquido-cristalina. Este cambio de ubicación podría contribuir al corrimiento de Stokes observado.

DPE presenta además la particularidad de que en membranas de DPPG 100% el espectro de fluorescencia no experimenta cambio en λ_{emis}^{max} cuando aumenta la temperatura, y el valor inicial medido en fase gel a 13°C está de por sí fuertemente desplazado al rojo (siendo este el mayor valor obtenido para esta sonda en membranas y solventes orgánicos).

Este hecho podría deberse a una fuerte repulsión electrostática entre el grupo polar de DPE y el de DPPG, ambos cargados negativamente en el grupo fosfato, lo cual llevaría a la sonda al extremo más alejado posible hacia la fase acuosa. En dicha posición el grado de hidratación sería máximo (máxima polaridad y corrimiento al rojo del espectro). El cromóforo estaría a todas las

temperaturas ubicado prácticamente en la fase acuosa, constituyendo ésta el medio más altamente polar posible para la sonda. Los espectros de fluorescencia no son sensibles a los cambios en la membrana producidos por la transición de fase. No obstante, el cambio de fase resulta evidente a través del cambio del valor de anisotropía estacionaria, el cual disminuye notablemente con la temperatura.

En todos los casos, la disminución de anisotropía muestra el aumento en la movilidad de las cabezas polares a nivel de interfaz. Aún en fase gel (13°-32°C) el aumento de temperatura incrementa la movilidad (Dufourc et al., 1992).

V.5.b.2 Análisis de los cambios observados a temperatura constante en función de la composición lipídica:

Es importante recalcar que este análisis es posible debido a que fosfatidilcolina y fosfatidilglicerol de la misma longitud de cadena de ácidos grasos saturados son completamente miscibles y tienen iguales temperaturas de transición de fase gel/líquido-cristalina (Sixl y Watts, 1982; Blunie, 1983).

Existen dos importantes diferencias a nivel del grupo polar entre DPPC y DPPG. DPPG lleva una carga negativa en el grupo fosfato mientras que DPPC es switeriónica. El valor hallado para el momento dipolar del grupo fosfoglicerol es $\mu = 11$ D, mientras que el del grupo switeriónico fosfocolina es $\mu = 19$ D (Shepherd y Buldt, 1978; Marassi y Macdonald, 1991).

El espectro de emisión de fluorescencia de DPE se desplaza fuertemente al rojo en presencia de DPPG (tabla V-4A). Este hecho puede explicarse (al igual que en el análisis hecho anteriormente para DPPG 100% con la temperatura) considerando el desplazamiento del cromóforo hacia la fase acuosa debido a repulsión electrostática.

Para la sonda DA, como puede verse en la tabla V-4B, al aumentar la composición porcentual de DPPG a temperatura constante se produce un fuerte corrimiento de los espectros hacia longitudes de onda menores.

Como se discutió al estudiar liposomas de distinto tamaño, el corrimiento al azul de λ_{emis}^{max} puede deberse a una disminución de la polaridad alrededor del cromóforo o a una relajación del solvente más lenta (ver figura V-7). Respecto a primer punto, el momento dipolar del grupo polar de DPPG ($\mu = 11$ D) es mucho menor que el de DPPC ($\mu = 19$ D). Con respecto a la posible contribución de una relajación del solvente incompleta, no hemos encontrado datos disponibles en la literatura que permitan clarificar ese punto. Aún suponiendo que no hubiese diferencias significativas entre ambos fosfolípidos a este respecto, la menor polaridad del grupo fosfatidilglicerol justifica que su incorporación en la membrana produzca el corrimiento al azul de los espectros de emisión de DA.

El cambio de composición de DPPC pura a DPPG pura muestra en ambos casos una disminución en el valor de anisotropía estacionaria de las sondas. Dicha disminución es menos significativa a mayores temperaturas y desaparece en fase líquida.

En el caso de DPE, la disminución de anisotropía del fluoróforo podría deberse a que la sonda al desplazarse hacia la fase acuosa accede a regiones con mayor libertad de movimiento.

En el caso de DA, la disminución de $\langle r \rangle$ podría deberse a diferencias en el grado de empaquetamiento de ambos fosfolípidos. Sin embargo Pascher et al. (1987) indican que el patrón de empaquetamiento de fosfatidilglicerol es muy similar al de fosfatidilcolina. Por el momento, es difícil dar una interpretación al respecto, debido a la falta de información adicional (estudios comparativos con otras sondas) que permitan proponer un modelo sencillo.

V.6 EFECTO DE LA INTRODUCCION DE MOLECULAS CON DISTINTO MOMENTO DIPOLAR: COLESTEROL Y FLORETINA

V.6.a Resultados.

Se incorporó colesterol y floretina a membranas multilamelares de DPPC a temperatura ambiente (22°C), y se estudió su efecto en los espectros de fluorescencia de DA y DPE. Estas moléculas poseen momentos dipolares mucho menores que el del grupo fosfocolina y los estudios están dirigidos a obtener mayor información acerca de la influencia de la introducción en la membrana de moléculas con menor momento dipolar.

En la figura V-10 se muestra la estructura molecular de la floretina; la correspondiente a colesterol está representada en la figura 10 del capítulo III.

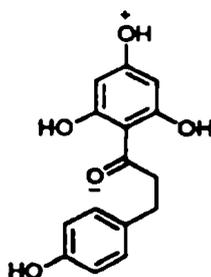


Figura V-10: Estructura molecular de floretina.

Las tablas V-5 A y B muestran los valores de $\lambda_{emis}^{m\acute{a}x}$ y $\lambda_{exc}^{m\acute{a}x}$ para DPE y DA respectivamente, del corrimiento de Stokes (S) y de la anisotropía estacionaria ($\langle r \rangle$) para vesículas multilamelares de DPPC dopadas con distintas proporciones de colesterol y floretina. Como puede observarse, las sondas DPE y DA experimentan un patrón de comportamiento similar como respuesta a la introducción de estas moléculas.

TABLA V-5: Parámetros espectroscópicos para las sondas DPE y DA en membranas de DPPC y mezclas con colesterol y floretina a T = 25°C.

A) DPE

COMPOSICION	λ_{emis}^{max} (nm)	λ_{exc}^{max} (nm)	S (cm ⁻¹)	$\langle r \rangle$
DPPC	522	341	1020	0.11
Colest 10%	488	339	9000	0.07
Colest 30%	482	337	8900	0.08
Floretina 5%	518	355	8900	0.095
Floretina 20%	534	367	8500	0.135

B) DA

COMPOSICION	λ_{emis}^{max} (nm)	λ_{exc}^{max} (nm)	S (cm ⁻¹)	$\langle r \rangle$
DPPC	528	347	9880	0.14
Colest 10%	528	347	9880	0.08
Colest 30%	466	343	7695	0.06
Floretina 5%	526	359	8800	0.14
Floretina 20%	536	371	8300	0.175

Los espectros de excitación se obtuvieron con detección a 520 nm. Los espectros de emisión se obtuvieron con excitación a 320 nm excepto para el caso de floretina 20% (excitación a 350 nm).

Para ambas sondas la introducción de colesterol y floretina producen una disminución considerable del corrimiento de Stokes. La anisotropía estacionaria desciende con la introducción de colesterol en ambas proporciones del 10 y 30%; en cambio no es afectada significativamente por un 5% de floretina pero aumenta cuando se introduce dicha molécula en proporción del 20%.

V.6.b Discusión.

En primer lugar se discute el corrimiento de Stokes observado al agregar colesterol. λ_{exc}^{max} permanece prácticamente invariante con respecto a la característica para membranas de DPPC pura, pero λ_{emis}^{max} disminuye notablemente.

Se conoce que el colesterol disminuye el grado de hidratación de la membrana (Simon y McIntosh, 1986; McIntosh et al., 1989; Saito et al., 1991), lo cual justificaría el corrimiento al azul observado. Se ha determinado que el colesterol disminuye el potencial dipolar de las bicapas lipídicas de DPPC en fase gel (E.A.Disalvo, comunicación personal). Según Adamson (1976), el potencial dipolar de membrana, ψ_{dip} , se puede aproximar por (Adamson, 1976) :

$$\psi_{dip} = \frac{\rho \langle \mu \rangle}{\epsilon} \quad (V-5)$$

donde ϵ es una constante dieléctrica efectiva que tiene en cuenta la presencia de moléculas de agua, $\langle \mu \rangle$ es el momento dipolar resultante en la región de las cabezas polares, y ρ es la densidad superficial de los dipolos contribuyentes.

Aparentemente la disminución del grado de hidratación, y consecuentemente de ϵ , indicaría que debe producirse un aumento en el potencial dipolar, contrariamente a lo determinado experimentalmente. Por lo tanto el efecto sobre ψ_{dip} debido a la disminución de ϵ debe ser compensado por una disminución del producto $\rho \langle \mu \rangle$. En efecto, al incorporarse colesterol se están reemplazando dipolos del grupo fosfocolina (de alto momento dipolar: $\mu_{PC} = 19$ D) por dipolos de colesterol de bajo momento dipolar ($\mu_{COL} = 1.6$ D), lo cual contribuye a una importante disminución del momento dipolar resultante $\langle \mu \rangle$. Además el colesterol actúa como espaciador disminuyendo la densidad superficial de dipolos, ρ , lo cual también contribuye a disminuir ψ_{dip} (refe). La disminución de ψ_{dip} y el efecto de espaciamiento llevan a la conclusión de que tanto $\langle \mu \rangle$ como η disminuyen al incorporar colesterol, lo cual debe contribuir a disminuir la polaridad de la región superficial.

En conclusión, el corrimiento hacia el azul de los espectros de emisión de DPE y DA debido a la introducción de colesterol se debe a una disminución de la polaridad de la interfaz.

El efecto en las propiedades fluorescentes producido por la introducción de floretina en la bicapa puede explicarse en forma análoga. Si bien no se observa corrimiento de λ_{emis}^{max} hacia el azul, sino hacia el rojo, λ_{exc}^{max} también se desplaza hacia longitudes de onda mayores. El resultado global es una disminución del corrimiento de Stokes, lo cual indica que la polaridad de la región sensada por el fluoróforo disminuye.

La disminución de la anisotropía estacionaria de DA y DPE con la introducción de colesterol es consistente con el aumento de la movilidad a nivel de cabezas polares determinado mediante diferentes técnicas (Saito et al., 1991; Needham et al., 1988 y referencias allí citadas).

La introducción de floretina en proporción del 20% resulta en un aumento de $\langle r \rangle$ para ambas sondas. Ha sido reportado que la floretina no modifica el empaquetamiento de las cabezas polares. En base a los resultados disponibles no es posible aún dar una interpretación a este efecto. Se sugiere que el aumento de $\langle r \rangle$ podría deberse a una interacción específica de floretina con el grupo cromóforo.

Finalmente, el hecho de que las sondas DPE y DA experimentan un patrón de comportamiento similar como respuesta a la introducción de colesterol y floretina puede deberse a que las mismas no tienen carga neta, de modo que en este caso DA y DPE están sensando efectos similares y posiblemente regiones similares en la interfaz.

V.7 CONCLUSIONES GENERALES

El empleo de sondas fluorescentes sensibles a la polaridad brinda abundante información acerca de las propiedades dieléctricas de la región en donde se localiza el cromóforo. Para una correcta interpretación de la misma es necesario tener en cuenta las aproximaciones y limitaciones del método, tal como se describe en la sección V.4.b.

Los cambios de las propiedades fluorescentes de DA y DPE con la temperatura se pueden correlacionar con las distintas transiciones de fase de la bicapa. La comparación de los resultados obtenidos en vesículas LUV y SUV parece indicar que la penetración y/o adsorción de moléculas de agua presenta características significativamente diferentes en ambos sistemas.

Los estudios de la sección V-6 indican que DA y DPE permiten detectar cambios en la polaridad de la interfaz inducidos no sólo por la temperatura, sino también por la introducción de moléculas de diferente momento dipolar.

CAPITULO VI

**DISCUSION GENERAL
Y CONCLUSIONES**

VI DISCUSION GENERAL Y CONCLUSIONES

En el capítulo III se observó que la sonda MC540 adsorbida a bicapas lipídicas en estado gel da un pico de absorción a 450 nm y una banda de fluorescencia a 630 nm, los cuales son función de la temperatura, la longitud y ramificación de las cadenas de ácidos grasos y la presencia de colesterol. Los cambios producidos por estos factores a nivel de interfase lípido-agua se correlacionan con las características topológicas de cada una de las fases estudiadas.

Los experimentos con MC540 demuestran que la adición de una ramificación en el extremo C terminal de los residuos de ácidos grasos afecta notablemente la región interfacial. Por lo tanto, la configuración de mínima energía de un fosfolípido en una determinada estructura cristalina está determinada por todas las porciones de la molécula. Es decir que si bien se puede llevar fosfatidilcolinas con diferentes ácidos grasos a fase sólida esto no implica que las estructuras sean idénticas en las distintas regiones de la bicapa.

Los experimentos con colesterol permiten extraer las mismas conclusiones. El colesterol se inserta en la bicapa como se muestra en la figura II-10, afectando tanto la región interfacial, como la zona hidrocarbonada. Los resultados obtenidos con MC540 permiten deducir que la fase inducida a todas las temperaturas por la inclusión de colesterol en proporciones mayores a un 30% es diferente a la fase L_{α} de un lípido puro.

MC540 es capaz de detectar los cambios que se producen a dos niveles: interfacial, como se observa por la desaparición de la emisión fluorescente a 630 nm; y en la región acilglicerol, como se observa por los cambios de partición al desaparecer la absorción a 570 nm.

Dado que el colesterol afecta las regiones que determinan la permeabilidad de una bicapa es posible entender entonces que promueva un drástico descenso en la permeabilidad de las membranas a solutos de diferente naturaleza.

Las conclusiones del capítulo III se obtuvieron comparando los resultados de las medidas espectroscópicas con medidas estructurales independientes.

En las condiciones de medición utilizadas en el capítulo IV es posible obtener resultados directos acerca de las propiedades interfaciales. Eliminando la contribución de las especies en fase acuosa, los estudios espectroscópicos

demuestran la existencia de sólo monómero y dímero asociados a la membrana. En dichas condiciones es posible asignar la banda de fluorescencia centrada a 630 nm con la especie dímero adsorbida a la superficie de la membrana.

Por lo tanto las variables que se observó modifican la emisión a 630 nm en la primer parte de este estudio (capítulo III), reflejan cambios en la zona de membrana en donde dicha especie interactúa.

La existencia de un equilibrio de dimerización de esta sonda en membranas fue determinada en fase líquido-cristalina por Waggoner y Grinvald (1977), Verkman y Frosch (1985) y Sikurova et al.(1988) aunque dichos autores no observaron emisión fluorescente del dímero. Los presentes resultados en fase gel muestran las mismas bandas de absorción de monómero y dímero asociados a la membrana. Por lo tanto, el hecho de que en estas condiciones se observe fluorescencia del dímero tiene que estar relacionado con el estado de la región en donde éste se adsorbe.

Barni y Savarino (1983), Dixit y Mackay (1983), Aramendía et al. (1988), demuestran que la interacción de colorantes orgánicos con sistemas organizados anfipáticos (micelas, vesículas lipídicas) afecta la agregación y las propiedades fotofísicas de dichas moléculas.

Las propiedades que se modifican en la membrana a nivel interfacial al pasar de fase líquida a fase gel son, el área por molécula, la movilidad y orientación de los grupos polares y el grado de hidratación. Dado que algunos casos reportados de dímeros fluorescentes corresponden a especies adsorbidas sobre sustratos rígidos como por ejemplo cuarzo (Kemnitz et al., 1986), es razonable relacionar preferentemente la emisión del dímero de MC540 con un cambio en la movilidad de los grupos polares. La adsorción puede alterar drásticamente la geometría de un dímero y por lo tanto sus propiedades espectrales (Kemnitz et al., 1986).

El aumento del rendimiento cuántico de fluorescencia en fase gel puede deberse a que la disminución de las reorientaciones intramoleculares y colisiones con las moléculas del entorno disminuiría las transiciones no radiativas.

Paralelamente, el valor de la constante de dimerización hallado en fase gel es dos órdenes mayor que en fase líquido-cristalina. Si bien no es factible en primera instancia relacionar directamente el cambio en la fluorescencia con el cambio en el grado de dimerización, ambos sugieren que en fase gel se produce

un aumento en el orden de la región interfacial. Este ordenamiento se refleja a través de un aumento de potencial dipolar dado por un mayor alineamiento de los grupos fosfocolinas y una consecuente polarización del agua (Simon y McIntosh, 1989).

Los estudios con colesterol también indican que el factor movilidad afecta la emisión del dímero. El colesterol actúa como espaciador a nivel interfacial aumentando la movilidad de los grupos polares de los fosfolípidos (Saito et al., 1991). Es entonces evidente que la emisión fluorescente está condicionada por las propiedades locales en la interfase.

En resumen, los resultados descritos en los capítulos III y IV muestran que cambios en el estado de fase y composición de las membranas lipídicas produce cambios notables en las propiedades espectroscópicas y de agregación de MC540, tales como la transformación de dímeros no fluorescentes en fluorescentes, la aparición de agregados de tipo H no fluorescentes (absorción a 450 nm) y un aumento de la constante de dimerización de las especies asociadas a la membrana. Estos hechos son correlacionables con variaciones en las propiedades interfaciales.

La profundización del estudio de esta región es por lo tanto relevante, y la elección de sondas de estructura análoga a un fosfolípido permite inferir con mayor detalle la naturaleza de las interacciones lípido-lípido a nivel interfacial.

Las sondas derivadas del grupo dansilo cumplen con dichas condiciones. En el capítulo V el estudio en función del tamaño de vesícula demuestra que la temperatura afecta en forma diferente una vesícula sonicada de 25-50 nm de diámetro (SUV) de una cuyo diámetro promedio 80-100 nm (LUV). Los resultados obtenidos indican que las LUV presentan, en la zona interfacial sensada por DPE y DA, características que se han determinado en MLV mediante calorimetría diferencial. Se observa en LUV una región de temperaturas previas a la transición de fase principal análoga a la región de pretransición (fase $P\beta'$) observada para MLV de igual composición lipídica, aproximadamente en el mismo rango de temperatura que para estas últimas. Este hecho no ha sido reportado previamente.

La desaparición de la subtransición de fase en SUV observada por calorimetría de barrido diferencial se ha adjudicado a una disminución de la cooperatividad debido al número restringido de moléculas de lípido en cada vesícula y a una mayor tensión mecánica de la membrana (Huang y Mason, 1978). Los resultados aquí informados indican que el proceso es cualitativamente semejante a nivel de interfaz, lo cual sugiere que al menos parte de dicha cooperatividad esta dada por la reorganización de los grupos en la interfase.

DPE es sensible a la densidad de carga superficial negativa introducida por fosfatidilglicerol dada su propia carga negativa en la cabeza polar, y simula movimientos conformacionales que mimetizan los experimentados por los fosfolípidos en iguales condiciones. DA en iguales circunstancias permite verificar que el potencial dipolar (y en consecuencia la polaridad) es dependiente de los momentos dipolares constituyentes a nivel de interfase sin importar la carga neta de la misma.

Los resultados obtenidos para DPE y DA al introducir en la membrana moléculas como colesterol y floretina (moléculas de bajo momento dipolar sin carga neta) demuestran que el empleo de ambas sondas conjuntamente puede brindar una información detallada acerca del efecto producido a nivel interfacial por cambios en las variables mencionadas.

La información obtenida por una sonda o técnica determinada en el estudio de membranas lipídicas conlleva a menudo el problema de interpretar observaciones locales como propiedades "globales" de la membrana. Estas generalizaciones se evidencian en afirmaciones como la realizada por Pastor et al. (1991) quienes mencionan que la fase líquido-cristalina L_{α} caracteriza a las membranas biológicamente activas. Dicha afirmación sólo puede ser interpretada como propiedad macroscópica, ya que a la luz de los resultados de esta tesis el estado de una fase implica detalles estructurales diferentes en distintas regiones. En muchos casos procesos de diferente naturaleza se explican por la presencia de microdominios. Por ejemplo, diversos estudios demuestran que algunas enzimas aumentan su actividad en varios órdenes de magnitud en regiones de coexistencia de fases: fosfolipasa pancreática (Op den Kamp et al., 1975), fosfolipasa C (Kimura, 1987); fosfolipasa A2 ejerce su

máxima acción lipolítica en la transición de fase, hidrolizando preferentemente los dominios de lípidos en fase gel (Grainger et al., 1989). A estos microdominios se los denomina defectos estructurales que bien pueden ser consecuencia de la organización de la bicapa en una determinada condición.

Es importante señalar que existen numerosas razones por las cuales en membranas biológicas no es posible extrapolar propiedades locales (entorno de primeros vecinos) a propiedades globales:

- La composición lipídica de una membrana biológica puede contener entre 10 y 100 lípidos diferentes;
- Las biomembranas contiene diversas proteínas que pueden presentar fuerte acoplamiento con determinados lípidos u otras proteínas constituyentes;
- Las membranas biológicas no se encuentran en equilibrio termodinámico. Heterogeneidades laterales o transversales en la distribución de lípidos acompañan diversos procesos metabólicos y generan dominios momentáneos que no pueden mimetizarse en una membrana modelo (Devaux y Seigneuret, 1985).

La existencia de dominios de composición o estado de fase diferentes no es incompatible con la actividad biológica. Más aún, uno de los procesos dinámicos más ubicuos y permanentes en membranas biológicas es la fusión de membranas, como parte de los procesos de exo/endocitosis. En la última década se han realizado numerosos estudios al respecto, y uno de los mecanismos más recientemente propuestos es la interacción hidrofóbica-hidrofílica en regiones de coexistencia de fases como la mayor fuerza directora del proceso (Leckband, 1993; Ohki y Arnold, 1990; Helm et al., 1989).

Con la síntesis de sondas de localización específica y el aumento de resolución y/o sensibilidad de las técnicas resueltas en el tiempo, se conoce actualmente que el cambio de fase líquido cristalina a fase gel implica una disminución en los movimientos moleculares pero en diferentes proporciones a distintos niveles de la bicapa lipídica.

Levine et al. (1972) observan en DPPC MLV mediante C^{13} -RMN que la señal correspondiente a la región hidrocarbonada pierde intensidad y

resolución al pasar a fase gel $P\beta'$, en contraste con la señal correspondiente al grupo colina, que sólo modifica ligeramente su intensidad.

Mantsch y Madec (1985) obtienen que la movilidad de las cabezas polares de isoacilfosfatidilcolinas es muy restringida en fase $L\beta'$, pero que aumenta notablemente en fase $P\beta'$, acercándose a los valores obtenidos en fase $L\alpha$.

Cevc (1991) reporta que el cambio de fase $L\beta'$ a fase $P\beta'$ aumenta la movilidad de las cabezas polares y el área por molécula a nivel interfacial, no a nivel de las cadenas hidrocarbonadas. Dicho autor sugiere asimismo que estos cambios conllevan un aumento en el grado de hidratación de la membrana a nivel interfacial al pasar de fase $L\beta'$ a $P\beta'$, previamente reportado por Janiak et al. (1976). Una prueba de la interrelación de dichas variables es la muy alta sensibilidad del valor de la temperatura de pretransición al grado de hidratación de la membrana.

Macdonald et al. (1991) indican que mediante la técnica de H^2 -RMN los movimientos a nivel de cabeza polar en DMPC son detectables en fase gel hasta temperaturas correspondientes al pasaje de fase $P\beta'$ a fase $L\beta'$ (15°C), indicando un desacoplamiento entre el movimiento en la región no polar, altamente restringido en fase gel, aún en fase $P\beta'$, del movimiento a nivel de cabezas polares.

Saito et al. (1991) observan estos cambios empleando una sonda fluorescente de estructura y zona de detección similar a la de DPE o DA, y estudiando los cambios de anisotropía resueltos en el tiempo. Dichos autores hablan del "desacoplamiento" en la dinámica de la interfase respecto de la región no polar, indicando que la movilidad de los grupos polares se incrementa notablemente al pasar de fase $L\beta'$ a $P\beta'$ y es similar en fases $P\beta'$ y $L\alpha$; contrariamente a la de la región hidrocarbonada, que no cambia entre fases $L\beta'$ y $P\beta'$, pero si lo hace a pasar a fase líquida.

Los estudios realizados en esta tesis, empleando dos distintos tipos de sondas (MC540 y derivados del grupo dansilo) y realizando estudios en función de la temperatura y composición lipídica, muestran los siguientes resultados:

- MC540 dimeriza en membranas en fase gel y los valores de las constantes de dimerización obtenidas para MLV y LUV de DPPC en fase $L_{\beta'}$ son dos órdenes de magnitud mayores que en fase líquida.
- El dímero adsorbido a la superficie de la membrana fluoresce en fase gel $L_{\beta'}$ y el aumento de temperatura llevando la membrana a fase $P_{\beta'}$ y luego L_{α} suprime gradualmente la fluorescencia del dímero.
- MC540 comienza a ingresar al interior de la bicapa (ver señal de fluorescencia del monómero en figura IV-3B) a temperaturas previas a la transición principal, en fase $P_{\beta'}$.
- Las sondas DPE y DA muestran en fase gel una disminución gradual del valor de anisotropía estacionaria con el aumento de temperatura.
- El agregado de colesterol en fase gel $L_{\beta'}$ elimina la fluorescencia del dímero de MC540 y disminuye el valor de anisotropía estacionaria de las sondas dansilo. El modelo de interacción del colesterol con los fosfolípidos de membrana descrito en la figura III-10 indica que la introducción de colesterol separa las cabezas polares permitiendo una mayor libertad de movimiento a dicho nivel (Saito et al, 1991; Needham et al., 1988 y referencias allí mencionadas).

Este conjunto de resultados y la comparación de los mismos con los datos de literatura indican que el empleo de sondas fluorescentes permite obtener información sobre las propiedades de la interfaz bicapa-solución en membranas lipídicas.

CAPITULO VII

REFERENCIAS

- Aramendía P.F., Krieg M., Nitsch C., Bittersmann E. y Braslavsky S.E. (1988) *Photochem.Photobiol.* 48, 187.
- Arbeloa F.L., Ojeda P.R., Arbeloa I.R. (1988) *Chem. Phys. Lett.* 148, 253.
- Bangham A.D., Hill M.W. y Miller N.G.A. (1974) en: *Methods in Membrane Biology* (E. Korn,ed.) Vol 1, pp 1-63, Plenum Press, New York.
- Barabino G., Gavotti C. y Marchesi M. (1984) *Chem.Phys. Lett.* 104, 478.
- Barni E., Savarino P., Viscardi G. y Pelizzetti E. (1983) *J.Heterocycl.Chem.* 20, 23.
- Bechinger B. y Seelig J. (1991) *Biochemistry* 30, 3923.
- Biondi A.C. y Disalvo E.A. (1990) *Biochim.Biophys.Acta* 1028, 43.
- Biondi A.C., Féliz M.R. y Disalvo E.A. (1991) *Biochim.Biophys.Acta* 1069, 5.
- Bloom M. y Mouritsen O.G. (1988) *Can.J.Chem.* 66, 706.
- Blume A. (1983) *Biochemistry* 22, 5436.
- Buldt G. y Wohlgemuth R. (1981) *J.Memb.Biol.* 58, 81.
- Cabrini G. y Verkman A.S. (1986) *Biochim.Biophys.Acta* 862, 285.
- Cametti C., De Luca F., Maraviglia B. y Sorio P. (1985) *Chem.Phys.Lett.* 118, 626.
- Casal H. y Mantsch H. (1984) *Biochim.Biophys.Acta* 779, 381.
- Cevc G. (1991) *Biochim.Biophys.Acta* 1062, 59.
- Cevc G. (1987) *Biochemistry* 26, 6305.
- Copely B.R. y McConnell H.M. (1980) *Biochim.Biophys. Acta* 599, 95.
- Cruzeiro-Hansson L. y Mouritsen O.G. (1988) *Biochim. Biophys.Acta* 044, 63.

- Chen S.C., Sturtevant J.M. y Gaffney B.J. (1980) Proc. Natl.Acad.Sci.USA 77, 5060.
- Chong C.S. y Colbow K. (1976) Biochim.Biophys.Acta 436, 260.
- Daraio M.E., Aramendía P.F. y San Román E.A. (1993) Chem.Phys.Lett. 204, 415.
Ver también Daraio M.E., Aramendía P.F., San Román E.A. y Braslavsky, S.E. (1991) Photochem.Photobiol. 54, 367.
- Davis J.H. (1983) Biochim.Biophys.Acta 737, 117.
- Devaux P.F. y Seigneuret M. (1985) Biochim.Biophys.Acta 822, 63.
- Dixit N.S. y Mackay R.A. (1983) J.Am.Chem.Soc. 105, 2928.
- Dragsten P.R. y Webb W.W. (1978) Biochemistry 17, 5228.
- Dufourc E.J., Mayer C., Stohrer J., Althoff G. y Kothe G. (1992) Biophys. J. 61, 42.
- Eaton D.F. (1988) Pure y Appl.Chem. 60, 1107.
- Ehrenberg B. y Pevzner E. (1993) Photochem.Photobiol. 57, 228.
- Eibl H. y Wooley P. (1979) Biophys.Chem. 10, 261.
- Faucon J.F. y Lussan C. (1973) Biochim.Biophys.Acta 307, 459.
- Feix J.B., Kalyaranaman B., Chignell C.F. y Hall R.D. (1988) J.Biol. Chem. 32, 17247.
- Flewelling R.F. y Hubbell W.L. (1986) Biophys.J. 49, 541.
- Gebhardt C., Gruler H. y Sackman E. (1977) Z. Naturforsch. 32c, 581.
- Ghiggino K.P., Lee A.G., Meech S.R., O'Connor D.V. y Phillips D. (1981) Biochemistry 20, 5381.

- Grainger D.W., Reichert A., Ringsdorf H. y Salesse C. (1989) FEBS Lett. 252, 73.
- Gruen D.W.R. y Marcelja S. (1983) J.Chem.Soc.Farad. Trans. 2, 79, 225.
- Gupte S.S., Lane L.K., Johnson J.D., Wallick E.T. y Schwartz A. (1979) J.Biol.Chem. 254, 5099.
- Harris W.E. (1977) Chem.Phys.Lipids 19, 243.
- Hauser H., Pascher I., Pearson R.H. y Sundell S. (1981) Biochim. Biophys. Acta 650, 21.
- Helm C.A., Laxhuber M., Losche M. y Mohwald H. (1986) Colloid Polym.Sci. 264, 46.
- Hoebeke M., Piette J. y van de Vorst A. (1991) J.Photochem.Photobiol. B: Biol. 9, 281.
- Huang C. y Mason J.Y. (1978) Proc.Natl.Acad.Sci. 75, 308.
- Hui S.W., Boni L.T., Stewart T. y Isaac T. (1983) Biochemistry 22, 3511.
- Humphries G.M.K. y Lovejoy J.P. (1983) Biochem.Biophys.Res.Comm. 111, 768.
- Ipsen H.J., Karlström G., Mouritsen O.G., Wennerstrom H. y Zuckermann M.J. (1987) Biochim.Biophys.Acta 905, 162.
- Israelachvili J.N. (1992) Intermolecular y Surface Forces. Academic Press (Harcourt Brace Jovanovich, Publishers).
- Janiak M.J., Small D.M. y Shipley G.G. (1979) J.Biol. Chem. 254, 6068.
- Janiak M.J., Small D.M. y Shipley G.G. (1976) Biochemistry 15, 4575.
- Jahnig K. (1976) Biophys.Chem. 4, 309.

- Kajikawa K., Takezoe H. y Fukuda A. (1993) Chem.Phys. Lett. 205, 225.
- Kalenak A., McKenzie R.J. y Conover T.E. (1991) J.Membrane Biol. 123, 23.
- Kasha M., Rawls H.R. y El-Bayoumi M.A. (1965) Pure Appl. Chem. 11, 371.
- Kemnitz K., Tamai N., Yamazaki I., Nakashima N. y Yoshihara K. (1986) J.Phys.Chem. 90, 5094.
- Kemnitz K. y Yoshihara K. (1991) J.phys.Chem. 95, 6095.
- Kimura Y. y Ikegami A. (1985) J. Membrane Biol. 85, 225.
- Kimura Y. (1987) J.Membrane Biol. 96, 187.
- Kintanar A., Kunwar A.C. y Oldfield E. (1986) Biochemistry 25, 6517.
- Knoll W., Schmidt G., Ibel K. y Sackmann E. (1985) Biochemistry 24, 5240.
- Krieg M. (1993) Biochem.Biophys.Acta.
- Lafrance D., Marion D. y Pézolet M. (1990) Biochemistry 29, 4952.
- Leckby D.E., Helm C.A. y Israelachvili J. (1993) Biochemistry 32, 1127.
- Lelkes P.I. (1979) Biochem.Biophys.Res.Comm. 90, 656.
- Lelkes P.I. y Miller I.R. (1980) J.Memb.Biol. 52, 1.
- Levine Y.K, Birdsall N.J.M., Lee A.G. y Metcalfe J.C. (1972) Biochemistry 11, 1417.
- Lipka G., Chowdhry B.Z. y Sturtevant J.M. (1984) J.Phys. Chem. 88, 5401.
- Lippert E. (1957) Z.Elektrochem. 61, 962.
- Luna E.J. y McConnell (1977) Biochim.Biophys.Acta 466, 381.

- Lussan C. y Faucon J.F. (1974) *Biochim.Biophys.Acta* 345, 83.
- Luzar A., Svetina S. y Zeks B. (1985) *J.Chem.Phys.* 82, 5146.
- Mabrey S. y Sturtevant J.M. (1976) *Proc.Natl.Acad.Scie.* 73, 3862.
- MacDonald R.C., MacDonald R.I., Menco B., Taleshita K., Subbarao N.K. y Hu L. (1991) *Biochim.Biophys.Acta* 1061, 297.
- Macdonald P.M., Leisen J. y Marassi F.M. (1991) *Biochemistry* 30, 3558.
- Mantsch H.H. y Madec C. (1985) *Biochemistry* 24, 2440.
- Mataga N., Kaifu Y. y Koizumi M. (1956) *Bull.Chem.Soc.Jpn.* 29, 465.
- McDaniel R.V., McIntosh T.J. y Simon S.A. (1983) *Biochim.Biophys.Acta* 731, 97.
- McIntosh T.J., Magid A.D. y Simon S.A. (1989) *Biochemistry* 28, 7904.
- McRae E.G. y Kasha M. (1958) *J.Chem.Phys.* 28, 721.
- Mellier A. y Diaf A. (1988) *Chem.Phys.Lipids* 46, 51.
- Mendelsohn R., Davies M.A., Brauner J.W., Schuster H.F. y Dluhy R.A. (1989) *Biochemistry* 28, 8934.
- Mischel M., Seelig J., Braganza L.F. y Buldt G. (1987) *Chem.Phys.Lipids* 43, 237.
- Miyata A., Heard D., Unuma Y. y Higashigaki Y. (1993) *Bull.Chem.Soc. Jpn.* 66, 999.
- Mortensen K, Pfeiffer W., Sackmann E. y Knoll W. (1988) *Biochim. Biophys.Acta* 945, 221.
- Muto J. (1976) *J.Phys.Chem.* 80, 1342.

- Myassoedova T., Gry D. y Hauteclouque S. (1992) *J.Photochem. Photobiol. A:Chem.* 64, 159.
- Needham T., McIntosh T.J. y Evans E. (1988) *Biochemistry* 27, 4668.
- Negri R.M. (1991) Tesis Doctoral. DQIAQF, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.
- Ohki S. y Arnold K. (1990) *J.Membrane Biol.* 114, 195.
- Ojeda P.R., Amashta I.A.K., Ochoa J.R. y Arbeloa I.L. (1988) *J.Chem. Soc., Faraday Trans. 2*, 84, 1.
- Op den Kamp J.A.F., Kauertz M.T. y Van Deenen L.L.M. (1975) *Biochim. Biophys.Acta* 406, 169.
- Papahadjopoulos D., Jacobsen K., Nir S. y Isac T. (1973) *Biochim. Biophys.Acta* 311, 330.
- Parker C.A. (1968) "Photoluminescence of Solutions", Elsevier, Amsterdam.
- Pascher I., Sundell S., Harlos K. y Eibl H. (1987) *Biochim.Biophys.Acta* 896, 77.
- Pascher I. Lunmark M. Nyholm P. y Sundell S. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1113, 339.
- Pastor R.W., Venable R.M. y Karplus M. (1991) *ProcNatl.Acad.Sci.USA* 88, 892.
- Pink D.A. y MacDonald A.L. (1988) *Biochim.Biophys.Acta* 937, 417.
- Raudino A. y Mauzerall D. (1986) *Biophys.J.* 50, 441.
- Ross W.N., Salzberg B.M., Cohen L.B. y Davila H.V. (1974) *Biophys.J.* 14, 983.
- Ross W.N., Salzberg B.M., Cohen L.B., Grinvald A., Davila H.V., Waggoner A.S. y Wang C.H. (1977) *J.Membrane Biol.* 33, 141.
- Ruthven N.A., Lewis H. y McElhaney R.N. (1990) *Biochemistry* 29, 7946.

- Sackmann E., Ruppel D. y Gebhardt C. (1980) Springer Series in Chem. Phys. 2, 309.
- Saito H., Araiso T., Shirahama H. y Koyama T. (1991) J.Biochem. 109, 559.
- Selwyn J.E. y Steinfeld J.I. (1972) J.Phys.Chem. 76, 762
- Shimshick E.J. y McConnell H.M. (1973) Biochemistry 12, 2351.
- Sikurová L., Haban I. y Franková R. (1988) Studia Biophysica 128, 163.
- Sikurová L., Franková R. y Chorvát D. (1989) Studia Biophysica 133, 67.
- Sikurová L. y Frankova R. (1990) Studia Biophysica 139, 103.
- Sikurová L. y Frankova R. (1991) Studia Biophysica 140, 21.
- Silver B.L. (1985) en "The Physical Chemistry of Membranes; Allen & Unwin y The Solomon Press Eds.
- Simon S.A. y McIntosh T.J. (1986a) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 86, 9263.
- Simon S.A. y McIntosh T.J. (1986b) Methods in Enzymol. 127, 511.
- Simon S.A. y McIntosh T.J. (1989) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86, 9263.
- Sixl F. y Watts A. (1982) Biochemistry 21, 6446.
- Stillwell W., Wassall S.R., Dumaul A.C., Ehringer W.D., Browning C.W. y Janski L.J. (1993) Biochim.Biophys.Acta 1146, 136.
- Stubbs C.D., Meech S.R., Lee A.G. y Phillips D. (1985) Biochim. Biophys. Acta 815, 351.
- Szoka F. y Papahadjopoulos D. (1980) Ann.Rev.Biophys.Bioeng. 9, 467.
- Tasaki I., Sisco K. y Warashina A. (1974) Biophys.Chem. 2, 316.

- Tasaki I. y Warashina A. (1976) *PPhotochem.Photobiol.* 24, 191.
- Teissie J. (1979) *Biochim.Biophys.Acta* 555, 553.
- Tocanne J.F. y Teissié J. (1990) *Biochim.Biophys.Acta* 1031, 111.
- Tokutomi S., Ohki K. y Ohnishi S.I. (1980) *Biochim.Biophys.Acta* 596, 192.
- Trauble H., Teubner M., Woolley P. y Eibl H. (1976) *Biophys.Chem* 4, 319.
- Van Dijck P.W., Kaper A.J., Oomk M.A.J. y de Gier J. (1977) *Biochim. Biophys.Acta* 470, 58.
- Verkman A.S. y Frosch M.P. (1985) *Biochemistry* 24, 7117.
- Verkman A.S. (1987) *Biochemistry* 26, 4050.
- Waggoner A.S. y Grinvald A. (1977) *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 303, 217.
- Waggoner A.S. y Stryer L. (1970) *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 67, 579.
- Waggoner A.S. (1979) *Ann.Rev.Biophys.Bioeng.* 8, 47.
- West W. y Pearce S. (1965) *J.Phys.Chem.* 69, 1894.
- Yamada T., Kajikawa K., Ishikawa K., Takezoe H. y Fukuda A. (1993) *Thin Solid Films* 226, 173.
- Yoshida T., Taga K., Okabayashi H., Kamaya H. y Ueda I. (1989) *Biochim.Biophys.Acta* 984,253.
- Yu H. y Hui S.W. (1992) *Biochim.Biophys.Acta* 1107, 245.

16/5/94