

Libros de **Cátedra**

Análisis estructural y funcional de Macromoléculas

Betina Córscico

Lisandro J. Falomir Lockhart

Gisela R. Franchini

Natalia Scaglia

FACULTAD DE
CIENCIAS EXACTAS

e
exactas



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE MACROMOLÉCULAS

Betina Córscico

Lisandro J. Falomir Lockhart

Gisela R. Franchini

Natalia Scaglia



2013

Análisis estructural y funcional de macromoléculas / Betina Córscico ... [et.al.] ; edición literaria a cargo de Betina Córscico; Lisandro J. Falomir Lockhart ; Gisela R. Franchini ; Natalia Scaglia . – 1a ed. - La Plata : Universidad Nacional de La Plata, 2013.

E-Book: ISBN 978-950-34-1057-8

1. Proteínas. 2. Lípidos. 3. Análisis Estructura-Función. I. Córscico, Betina II. Falomir Lockhart, Lisandro J, ed. lit. III. Franchini, Gisela R., ed. lit. IV. Scaglia , Natalia, ed. lit.

CDD 541.372

Fecha de catalogación: 23/12/2013

Diseño de tapa: Dirección de Comunicación Visual de la UNLP

Diseño interior: DCV Mario Raúl Ramos



Universidad Nacional de La Plata – Editorial de la Universidad de La Plata

47 N.º 380 / La Plata B1900AJP / Buenos Aires, Argentina
+54 221 427 3992 / 427 4898
editorial@editorial.unlp.edu.ar
www.editorial.unlp.edu.ar

Edulp integra la Red de Editoriales Universitarias Nacionales (REUN)

Primera edición, 2013
ISBN 978-950-34-1057-8
© 2013 - Edulp

ÍNDICE

Prefacio	7
-----------------------	---

Parte I – Caracterización de proteínas. Técnicas de baja resolución

Capítulo 1. Técnicas bioquímicas para el estudio de proteínas. <i>Gisela R. Franchini y Betina Córscico</i>	10
1.1. Técnicas electroforéticas	10
1.2. Cromatografía de permeación por geles	27
1.3. Ultracentrifugación analítica	29
Capítulo 2. Fluorescencia. <i>Eduardo De Gerónimo y Lisandro Jorge Falomir Lockhart</i>	37
2.1. Fenómenos luminiscentes	37
2.2. Espectrometría de fluorescencia	42
2.3. Anisotropía	52
2.4. Quenching de la fluorescencia	56
2.5. Fenómeno de transferencia de energía de resonancia Förster (FRET)	61
2.6. Sondas fluorescentes	64
Capítulo 3. Espectroscopía infrarroja en el estudio de proteínas y membranas lipídicas. <i>Guillermo G. Montich</i>	76
3.1. Introducción y fundamentos	76
3.2. Instrumentación	79
3.3. FTIR de proteínas. Estructura secundaria y dinámica	81
3.4. FTIR de lípidos	93

Capítulo 4. Dicroísmo circular de péptidos y proteínas.

<i>Lucrecia María Curto, Gabriela Elena Gómez y José María Delfino</i>	98
4.1. La naturaleza de la luz polarizada.....	98
4.2. La relación entre la luz plana y circularmente polarizada	99
4.3. La interacción de la luz polarizada con la materia	101
4.4. Las condiciones físicas para que ocurra el fenómeno de CD	105
4.5. El efecto Cotton, según se manifiesta por ORD o CD	107
4.6. La instrumentación y la práctica para la medición de CD	109
4.7. El valor de CD para investigar la conformación de péptidos y proteínas.....	114
4.8. La región UV lejana y la estructura secundaria	116
4.9. Estimación del contenido de estructura secundaria	118
4.10. La región UV cercana y la estructura terciaria.....	122
4.11. Cambios conformacionales en proteínas	123
4.12. Interacción de proteínas con ligandos.....	125
4.13. Efecto de anfífilos y co-solventes sobre péptidos desestructurados.....	130

Parte II – Métodos de alta resolución para el estudio estructural de proteínas

Capítulo 5. Cálculos computacionales en macromoléculas biológicas.

<i>Marcelo D. Costabel y Fernando Zamarreño</i>	136
5.1. Orígenes.....	136
5.2. Modelo inicial.....	138
5.3. Estudios computacionales de la estructura biomolecular	138
5.4. Modelo y energía	139
5.5. Electroestática de macromoléculas.....	141
5.6. Dinámica de macromoléculas	144

Capítulo 6. Resolución de estructuras de proteínas por la técnica de cristalografía de rayos X.

<i>Marcelo D. Costabel</i>	150
6.1. Un breve (muy breve) repaso de la Historia.....	151
6.2. Por qué rayos X y por qué cristales?	153
6.3. Cristalización de la proteína.....	154
6.4. Colección de datos de difracción	156
6.5. El mapa de densidad electrónica de la proteína.....	157
6.6. Ajuste de la secuencia de aminoácidos al mapa.....	158
6.7. Resolución.....	159
6.8. Refinamiento	159
6.9. Validación	161
6.10. Herramientas computacionales para resolver una estructura cristalográfica ...	162

Capítulo 7. Resonancia magnética nuclear.

<i>Marina Ibáñez Shimabukuro y M. Florencia Rey Burusco</i>	166
7.1. Fundamentos.....	167
7.2. Espectrómetro	169
7.3. Parámetros espectrales	171
7.4. Cómo se obtiene un espectro	180
7.5. Ejemplo práctico: Determinación de estructura	181
7.6. Aplicaciones	187

Parte III – Caracterización biofísica de lípidos y membranas y sus interacciones con proteínas

Capítulo 8. Interacción de lípidos con el agua y formación de estructuras empaquetadas.

<i>Valeria Silva y Jorge L. Pórfido</i>	193
8.1. Interacción hidrofóbica y polimorfismo lipídico	195

8.2. Monocapas	198
8.3. Micelas	203
8.4. Micelas invertidas	205
8.5. Bicapas.....	207
8.6. Membranas modelo	209
Capítulo 9. Interacción lípido-proteína.	
<i>Jorge L. Pórfido y Valeria Silva</i>	220
9.1. Lípidos en la estabilización y regulación de proteínas.....	227
9.2. Estrategias para el estudio de las interacciones lípido-proteína	230
Capítulo 10. Técnicas biofísicas para el estudio de lípidos y membranas.	
<i>Carolina Bagnato</i>	251
10.1. Partición de fases y solubilidad de lípidos.....	251
10.2. Extracción de lípidos totales	253
10.3. Separación y análisis de lípidos	263
Parte IV – Estudio funcional de proteínas	
Capítulo 11. Interacción proteína-proteína.	
<i>Luciana Rodriguez Sawicki y Natalia Bottasso Arias</i>	290
11.1. Estudio <i>in silico</i> de interacciones proteína-proteína	294
11.2. Técnicas de screening	302
11.3. Técnicas de confirmación <i>in vivo</i>	319
Capítulo 12. Calorimetría de titulación isotérmica.	
<i>F. Luis González Flecha</i>	333
12.1. Termodinámica de la asociación entre ligandos y macromoléculas	334
12.2. Aspectos experimentales.....	339

12.3. Características termodinámicas de la interacción entre ligandos y macromoléculas	346
Capítulo 13. Microscopía óptica.	
<i>Lisandro Jorge Falomir Lockhart y Federico Fuentes</i>	354
13.1. Partes del microscopio compuesto de campo amplio.....	355
13.2. Aumento y resolución	362
13.3. Aberraciones	367
13.4. Generación de contraste y variantes de microscopios de luz transmitida.....	368
13.5. Microscopio de fluorescencia de campo amplio	371
13.6. Microscopio de fluorescencia confocal.....	376
13.7. Variantes de microscopios	386
13.8. Rompiendo la barrera de difracción: Nanoscopías de fluorescencia	389
13.9. Aplicaciones: Biofísica en el microscopio.....	395
13.10. Bibliografía sobre microscopía óptica.....	402
Los autores	406

PREFACIO

El objetivo de este libro es incentivar a alumnos y docentes del área de bioquímica y afines a acercarse a un grupo de metodologías modernas que se aplican a la comprensión de los principios moleculares responsables de los procesos biológicos, en particular aquellos referidos a las proteínas. Desde los años '90, el advenimiento de la genómica y proteómica ha permitido identificar un gran número de proteínas para las cuáles sólo se cuenta con su estructura primaria. Para profundizar la caracterización estructural y funcional de dichas proteínas, ha sido necesario contar con diversas herramientas bioquímicas y biofísicas. Hoy en día se han desdibujado los límites entre las distintas disciplinas de las ciencias naturales, siendo necesaria una visión integral, provista por la biofísicoquímica, que abarque las técnicas complementarias disponibles actualmente.

Es nuestra intención presentar al lector un conjunto de técnicas que incluye desde metodologías clásicas hasta otras de reciente desarrollo, complementando y actualizando la información que se encuentra disponible en los textos clásicos. Para tal fin hemos reunido un grupo de docentes-investigadores con experiencia en las distintas técnicas descritas a fin de ayudar a los lectores a comprender y transmitir las nuevas metodologías aplicadas al análisis de las biomacromoléculas.

El libro se encuentra dividido en cuatro partes. En la primera se describen en detalle una serie de métodos utilizados para estudiar la estructura de las proteínas y monitorear sus cambios conformacionales. Estas técnicas revisten gran importancia ya que brindan información en cuanto a la relación estructura-función de forma rápida y sencilla, pero sin lograr una resolución a nivel atómico. En la segunda parte nos enfocamos en técnicas que permiten alcanzar una mayor resolución y brindar un modelo atómico de proteínas, ácidos nucleicos y membranas. La tercera parte del libro está dedicada a técnicas de caracterización y estudio de lípidos. Aunque los mismos no son exactamente macromoléculas, su agregación espontánea genera micelas y

membranas que permiten delimitar distintos compartimentos celulares. Asimismo, en dichas estructuras se localizan proteínas que al interactuar con los lípidos cambian sus conformaciones y, por lo tanto, sus propiedades y funciones. Estos capítulos hacen hincapié en la caracterización de las distintas estructuras lipídicas, la interacción lípido-proteína y el estudio de la composición de los lípidos. En la última parte, se realiza un análisis de métodos que permiten estudiar las funciones de las proteínas a través de su interacción con otros componentes celulares, ya sea *in vitro* (componentes puros) o a nivel de células y tejidos. En particular se presentan técnicas de microscopía en las que se combina la caracterización funcional de las proteínas y lípidos con sus distribuciones espaciales y/o temporales dentro de la célula, brindando información para el estudio de procesos dinámicos en células vivas.

Este libro aborda por primera vez en español el estudio de un conjunto de metodologías modernas de alta complejidad. Los autores de las distintas secciones se han propuesto adaptar estos conceptos a un lenguaje apropiado para el estudiante de grado en sus últimos años de estudio, pero con la suficiente profundidad como para que también sea útil para estudiantes de postgrado que desean incursionar en estas técnicas.

Para concluir, quisiéramos agradecer a los autores y colaboradores que hicieron posible la realización de este trabajo, así como a las instituciones que los apoyan. Extendemos nuestra gratitud a la Universidad Nacional de La Plata por generar el ámbito que enmarca esta obra. Esperamos generar en los lectores interés por los conocimientos presentados y alentarlos a profundizar en el estudio de estas áreas.

La Plata 3 de Septiembre 2013

Dr. Betina Córscico

Dr. Lisandro Jorge Falomir Lockhart

Dr. Gisela Raquel Franchini

Dr. Natalia Scaglia

PARTE I

CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS

TÉCNICAS DE BAJA RESOLUCIÓN

CAPÍTULO 1

TÉCNICAS BIOQUÍMICAS PARA EL ESTUDIO DE PROTEÍNAS

Gisela R. Franchini y Betina Córscico

Introducción

Con la finalidad de realizar estudios estructurales y funcionales de una proteína, uno de los pasos fundamentales es obtenerla en forma pura. Luego del proceso de purificación deben llevarse a cabo una serie de procedimientos que permitan controlar el grado de pureza y también realizar una caracterización inicial de dichas proteínas. Entre las técnicas bioquímicas más comúnmente utilizadas y que aportan información complementaria podemos mencionar las siguientes: electroforesis, cromatografía de exclusión molecular, centrifugación analítica y análisis de entrecruzamiento químico, entre otras.

Este capítulo está destinado a que el alumno tenga una primera aproximación a una serie de técnicas que permiten caracterizar y controlar el grado de pureza de una proteína. Si bien esto no pretende ser un manual técnico, se aportarán los fundamentos, los procedimientos básicos y el análisis de la información obtenida a partir de las técnicas que se describen.

1.1. Técnicas Electroforéticas

Es bien sabido que todo átomo o molécula con carga neta migrará al aplicarse un campo eléctrico. Las técnicas electroforéticas permiten la separación de macromoléculas de acuerdo a su masa, a su carga neta o a la relación entre ambas, forzándolas a atravesar por una matriz porosa mediante la aplicación de dicho campo eléctrico.

La electroforesis de macromoléculas es normalmente llevada a cabo mediante la siembra de una muestra en una matriz porosa embebida en una solución buffer que actúa como un tamiz molecular. Bajo la influencia de un voltaje aplicado, diferentes especies de moléculas en la muestra se moverán a través de la matriz a diferentes velocidades separándose unas de otras.

Las proteínas son macromoléculas que presentarán carga neta siempre y cuando se encuentren a un pH distinto de aquel correspondiente a su punto isoeléctrico (pI), siendo este último el pH específico al cual una proteína no presenta carga neta. Cuanto mayor sea el cociente carga/masa más rápido migrará la proteína en el campo eléctrico.

La electroforesis en geles de poliacrilamida es una herramienta muy útil para una gran cantidad de aplicaciones en lo que respecta a la caracterización estructural y/o funcional de una proteína. Esta técnica es simple, eficiente y se requiere de muy poco equipamiento y reactivos. Además, puede utilizarse en escala analítica o preparativa ampliando las posibilidades de su aplicación.

Por las razones mencionadas anteriormente es una de las primeras opciones para llevar a cabo al momento de caracterizar inicialmente una proteína. Es importante destacar que la electroforesis en geles de acrilamida también es útil para la caracterización, separación e identificación de otras macromoléculas.

Entre las aplicaciones destinadas al estudio de proteínas se destacan:

- Determinación de masa molecular
- Estado de agregación
- Estabilidad frente a desnaturalizantes químicos
- Actividad enzimática
- Interacción con otras macromoléculas

Geles de poliacrilamida unidimensionales

Nociones generales

Los geles pueden armarse con forma cilíndrica o como hojas muy delgadas de dimensiones variables. Los primeros se utilizan para isoelectroenfoco (IEF) o con fines preparativos, y los segundos son los más utilizados en el laboratorio para experimentos de rutina. En este apartado daremos principal importancia al uso y armado de los geles chatos.

En la mayoría de los equipos para electroforesis de proteínas que se utilizan en el laboratorio, el gel es montado entre dos cámaras que contienen soluciones buffer de una manera tal que la única conexión eléctrica entre estas cámaras es a través del gel (Figura 1.1A). En estos equipos denominados *verticales*, los geles se arman entre dos placas de vidrio utilizadas como soporte con ambos laterales y el fondo sellados y una separación de aproximadamente 1 mm. De esta manera, queda una cámara muy delgada pero uniforme donde se vuelca la solución para armar geles (Figura 1.1B).

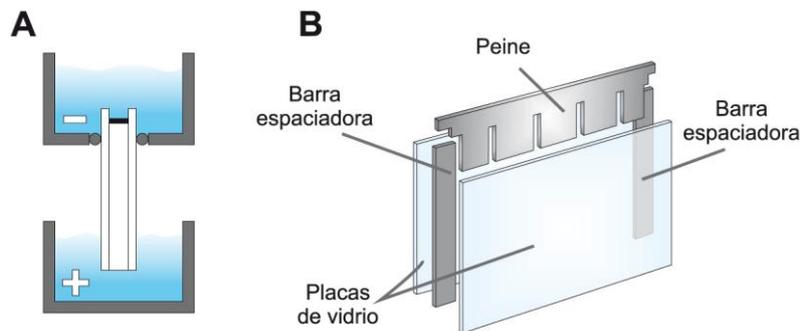


Figura 1.1. A) Corte transversal de un equipo de electroforesis vertical. B) Diagrama del sistema de armado de geles para equipos para electroforesis verticales. Los vidrios deben ser sellados de manera de poder generar una cavidad muy delgada donde volcar la mezcla para geles.

Propiedades de la acrilamida

El material más utilizado para el armado y posterior resolución de mezclas de proteínas es la acrilamida. Su uso en distintas concentraciones forma poros en un rango útil para separar la mayoría de dichas macromoléculas. Dentro de sus propiedades más sobresalientes encontramos que es químicamente inerte, transparente y es estable en un amplio rango de pH, temperatura y fuerza

iónica. Además se consigue comercialmente de manera muy pura y a un relativo bajo costo. Es importante resaltar que el monómero de acrilamida es un potente toxico para el sistema nervioso central y periférico.

Aunque la acrilamida es una substancia muy nociva, se puede utilizar de manera segura. Todo el manejo, mezclado y manipulación del monómero de acrilamida debe llevarse a cabo dentro de una campana de extracción de gases utilizando guantes de látex. Una vez que el monómero ha polimerizado no es más tóxico, no obstante, como el proceso no es 100% eficaz, siempre habrá contaminación con monómero. Por esta razón, los geles deben ser tratados con la misma precaución que la solución del monómero.

Como con cualquier químico que se utilice en el laboratorio siempre hay que consultar la cartilla de bioseguridad (MSDS, de la sigla en inglés *Material Safety Data Sheet*) antes de usarlo. La acrilamida y los materiales contaminados con la misma deben ser descartados como desechos químicos.

Diseño experimental

Los aspectos más importantes a tener en cuenta al momento de realizar una electroforesis en gel de poliacrilamida unidimensional por primera vez son los siguientes:

- tamaño de poro efectivo
- sistemas continuos o discontinuos
- condiciones disociantes o no disociantes
- método de detección a utilizar

- Tamaño de poro efectivo

El tamaño de poro efectivo está determinado por dos factores: a) la concentración de acrilamida y b) la concentración del entrecruzador químico,

que usualmente es bisacrilamida. %T y %C es la manera en que se denota la composición de los geles de poliacrilamida, siendo:

% T: concentración total de monómero utilizada para producir el gel (acrilamida + bisacrilamida) en gramos por ml (% p/v).

% C: el porcentaje en peso que representa el agente entrecruzador sobre el total de monómero que ha sido utilizado.

Cuanto mayor es la concentración de acrilamida, menor será el poro efectivo. En cambio, si consideramos el efecto de la bisacrilamida, observamos que existe una concentración máxima hasta la cual veremos una disminución en el tamaño de poro, este valor ha sido calculado alrededor de $C = 5\%$. Cruzado ese umbral, el tamaño de poro comenzará a crecer (Fawcett, 1966).

La concentración de acrilamida en un gel es un factor determinante que puede afectar mucho el resultado de una corrida electroforética. De esta manera si se quiere obtener una buena resolución entre dos proteínas es factible encontrar una concentración óptima para tal fin. Para el caso de una muestra con una mezcla de proteínas, encontrar una concentración óptima de acrilamida es muy difícil por lo cual uno deberá optar por ensayar distintas condiciones hasta encontrar aquella concentración que permita observar a los distintos miembros de la mezcla de la mejor manera posible.

¿Qué estrategia puede utilizar un investigador que va a analizar una mezcla de proteínas por primera vez mediante electroforesis en geles de poliacrilamida? Una posibilidad es hacer una corrida inicial utilizando un gel 7,5 % de acrilamida y en base a este resultado hacer una segunda elección, por ejemplo entre 5 y 15 % de acrilamida. Una segunda opción sería realizar un gel en gradiente de poliacrilamida donde se prepara el gel utilizando un equipo generador de gradientes y por lo tanto la concentración de acrilamida aumenta a medida que se avanza en el gel, disminuyendo el tamaño de poro efectivo (Figura 1.2).

Los geles en gradiente son ampliamente utilizados para la caracterización de mezclas de proteínas ya que amplía el rango de masas moleculares a ser analizadas en un mismo gel. Los límites usuales son 3-30% T en gradientes de tipo lineal dependiendo del tamaño de las proteínas a ser separadas. Una de

las principales ventajas de estos geles en gradiente es que las proteínas están continuamente atravesando áreas del gel con un tamaño de poro menor teniendo esto un efecto concentrador. Si bien estos geles en gradiente son muy útiles, pueden ser poco reproducibles.

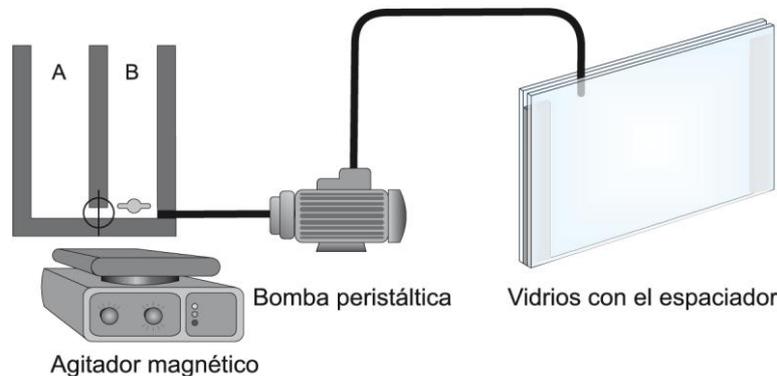


Figura 1.2. Equipo para generar un gradiente en geles de poliacrilamida. A y B se refieren al reservorio y cámara de mezclado donde se encuentra un buzo metálico que gira impulsado por un agitador magnético ubicado por debajo. Las cámaras A y B están conectadas por la parte inferior con una pequeña llave que permite abrir o cerrar. La cámara B está conectada con el equipo para armar geles a través de una bomba peristáltica.

Si, por el contrario, lo que se quiere es encontrar la concentración de acrilamida óptima para la resolución de dos proteínas se deberá tener en cuenta el tamaño y carga de las proteínas en cuestión. Este parámetro se podrá determinar midiendo su movilidad en geles de diferente concentración de acrilamida. Finalmente se construye un diagrama de Ferguson (Ferguson, 1964) donde se grafica el $\log_{10}(R_f)$ en función de la concentración de monómero (% T), siendo R_f el cociente entre la distancia recorrida por la proteína y la distancia recorrida por un colorante o proteína estándar. Construyendo los diagramas de Ferguson el aspecto de la carga de la proteína es eliminado ya que la pendiente K_r (coeficiente de retardo) es una medida únicamente del tamaño molecular (Figura 1.3) (Andrews, 1986).

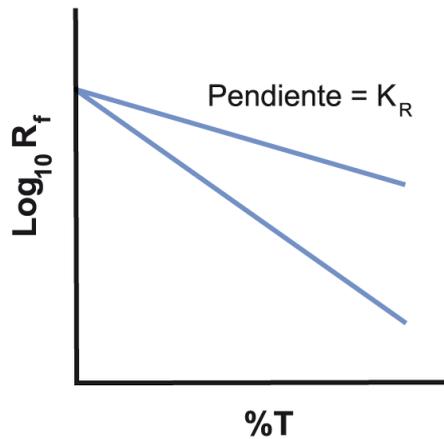


Figura 1.3. Diagrama de Ferguson para dos proteínas hipotéticas distintas. En este caso se puede observar como a mayores % T las proteínas presentan una movilidad distinta y podrían resolverse mejor.

- ¿Geles continuos o discontinuos?

Geles continuos son aquellos en los cuales los iones presentes en los buffers son los mismos a un mismo pH, tanto en la muestra como en el gel y los reservorios que contienen los electrodos. En estos sistemas las proteínas son cargadas o sembradas directamente en el gel en el cual se van a separar o resolver (Figura 1.4A). Este tipo de sistema es más recomendable para proteínas en su estado nativo dado que las mismas necesitan condiciones estables a lo largo de toda la corrida, especialmente si luego se quiere realizar una medida de su actividad. Otro factor a tener en cuenta es que la muestra debe ser lo más concentrada posible dado que no habrá un efecto concentrador determinado por el gel (ver más adelante).

Por el contrario, los *geles discontinuos* son aquellos que utilizan diferentes iones en los buffers presentes en los geles de aquellos presentes en los buffers de los reservorios de los electrodos. La mayoría de los geles discontinuos tienen diferencias no solo en la composición de los buffers sino también en sus pH. Los geles suelen estar divididos en dos regiones: un gel concentrador y uno separador (Figura 1.4B).

La principal ventaja de los geles discontinuos es la posibilidad de sembrar una mezcla de proteínas relativamente diluida y aun así obtener una buena resolución. Esto se logra preparando un gel denominado concentrador que presenta un tamaño de poro más grande y un pH menor al del gel separador, que contiene poro más pequeño. De esta manera la muestra se siembra directamente en el gel concentrador, y por un efecto de retardo en las proteínas más chicas, debido al pH, con respecto a las más grandes, que avanzan por existir un poro más grande, se logra un efecto de apilamiento antes de ingresar al gel separador.

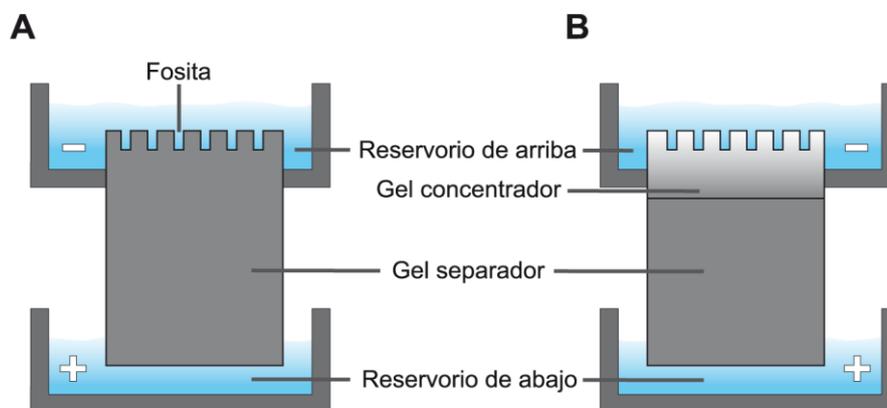


Figura 1.4. A) Gel continuo, las muestras son sembradas en fositas formadas directamente en el gel que va a separar las proteínas; B) Gel discontinuo, las muestras son sembradas en pequeñas fositas formadas en el gel concentrador.

- ¿Geles disociantes o no disociantes?

Dependiendo de cuál es el fin último de las proteínas que serán sometidas a una electroforesis, se deberá decidir sobre las condiciones en las cuales se realizará la corrida. La mayoría de los estudios que se realizan utilizando geles de poliacrilamida se hacen en condiciones disociantes. Esto significa que tanto los buffers como la preparación de la muestra tendrán componentes desnaturizantes que permitirán la disociación de aquellos complejos proteicos en sus correspondientes subunidades polipeptídicas y la pérdida de la estructura tridimensional nativa de las proteínas. Los agentes desnaturizantes

más utilizados son el dodecil sulfato de sodio (SDS) y la urea. El primero es un detergente iónico muy fuerte y la urea es un desestructurante del agua que afectara la capa de solvatación de las proteínas (agente caotrópico).

Entre las electroforesis unidimensionales disociantes la técnica de SDS-PAGE (de sus siglas en inglés: *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), es probablemente la más utilizada de rutina en los laboratorios. Es un gel de tipo discontinuo diseñado por Laemmli en 1970 (Laemmli, 1970). Sus aplicaciones más comunes son la determinación de la masa molecular (ver detalle más adelante) y el estado de pureza de las muestras de proteínas durante los procesos de purificación.

Esta técnica separa a las proteínas exclusivamente de acuerdo a su tamaño. Durante su preparación para ser sembrada en el gel, la muestra debe ser desnaturalizada calentándola a 100°C durante al menos 5 minutos en presencia de SDS. Adicionalmente, dependiendo de la muestra a ser analizada, también se agregan grupos –tiol (β -mercaptoetanol o ditioneitol) que determinarán la reducción de los puentes disulfuro presentes en las proteínas y permitirá observar los posibles oligómeros que conforman una proteína en forma independiente. En estas condiciones, los distintos polipéptidos de la muestra unirán SDS en una proporción de peso constante (1.4 mg de SDS por mg de proteína) y todos adoptarán una forma similar de varilla. Esto hará que las proteínas adopten una carga neta negativa uniforme haciendo que migren siempre hacia el ánodo y solamente de acuerdo a su tamaño. Las proteínas más grandes se retrasaran más y moverán más lentamente, mientras que lo opuesto ocurrirá para las más pequeñas.

Es una buena práctica incluir un marcador de peso molecular en una de las calles del gel que permita la comparación y, eventualmente, el cálculo de la masa molecular de la proteína de interés. Es importante también que dicho marcador contenga proteínas que estén por encima y debajo del peso molecular de nuestra incógnita.

En la electroforesis en condiciones nativas (no disociantes) se preserva la interacción entre subunidades proteicas, su estructura y su actividad biológica. En este tipo de geles es muy importante la correcta selección del pH al cual se

va a realizar la corrida dado que las proteínas migrarán de acuerdo a su relación carga/masa intrínseca.

Los geles no desnaturizantes permiten la resolución de proteínas en su estado nativo, ya sea monomérico o un complejo, que va a retener su estructura terciaria y en muchos casos su función. Es recomendable para este tipo de corridas electroforéticas utilizar sistemas continuos de manera de no enfrentar a la proteína con cambios en el pH o el tamaño de poro durante la corrida. Cambios en el pH del medio generaran cambios en la carga neta de las proteínas y por lo tanto afectará la separación de las mismas. Cuanto mayor sea la diferencia entre el pH del buffer del entorno y el punto isoeléctrico de las proteínas menor será el tiempo de la corrida electroforética y las bandas serán menos difusas. Obviamente se deberá tener en cuenta el rango de pH en el cual las proteínas en cuestión son estables. Si bien hay rangos conocidos de pH para las proteínas se deberían ajustar las condiciones de corrida para cada una de ellas.

- Métodos de detección

La cantidad de proteína a sembrar en cada calle del gel va a depender de dos factores: i) la complejidad de la muestra y ii) el método de detección de las proteínas a ser utilizado. Para el primer caso, cuanto mayor cantidad de proteínas distintas tenga la muestra mayor será, dentro de ciertos límites, la cantidad que deba sembrar por calle en un gel para conseguir observar todas las bandas. Considerando un gel de rutina de dimensiones pequeñas (8 x 7 cm) la cantidad de proteína variará de aproximadamente 1 a 20 μg por calle. Cantidades mayores a 50 μg de proteína por calle afecta el desarrollo de la corrida y puede generar artefactos.

Por otra parte, la elección del método de detección es un factor muy importante al momento de diseñar una corrida electroforética. Para las cantidades de proteína mencionadas en el párrafo anterior, el Coomassie Brilliant Blue es el más comúnmente utilizado.

Para muestras con cantidades 10 veces menores de proteínas (0,1-1 $\mu\text{g}/\text{calle}$) se requerirá de un método más sensible como es la tinción con plata (Hames, 1990). En algunos casos incluso se requiere de un método aún más sensible, como puede ser el inmunoblotting que utiliza anticuerpos asociados a enzimas que amplificarán la señal.

Si se desea detectar una actividad enzimática, en principio podría realizarse luego de la corrida electroforética para lo cual se debería cortar el gel con la banda de interés y realizar una elusión en una solución buffer adecuada de acuerdo a las propiedades de la enzima. Esta práctica puede ser muy laboriosa, con lo cual otra posibilidad más conveniente sería la de determinar la actividad enzimática *in situ*. La principal limitante es que los métodos de detección existentes son adecuados solo para una cantidad relativamente pequeña de enzimas y los resultados son muy difíciles de cuantificar. Es importante mencionar que los geles más convenientes para este tipo de detección son aquellos de tipo nativo.

Por último, mencionaremos los geles en los cuales se incluye el sustrato de la enzima cuya actividad quiere ser medida en la matriz del gel. Un ejemplo es la medida de actividad de la glucógeno fosforilasa (Lerín, 2004), donde se incorpora almidón en la mezcla del gel y se deja polimerizar. Luego se realiza una corrida electroforética en condiciones nativas y se realiza una tinción con iodo. En este caso será una tinción de tipo negativa, ya que donde se encuentre la enzima se habrá degradado el almidón y este no se teñirá con el iodo, pudiéndose observar una región blanquecina.

Aplicaciones de geles de poliacrilamida unidimensionales

- Determinación de la masa molecular utilizando SDS-PAGE

Una de las principales aplicaciones de los geles unidimensionales es la determinación de masa molecular (M) utilizando la técnica SDS-PAGE, es decir, en condiciones disociantes. Cabe destacar que la determinación de masa

molecular también se puede emplear utilizando corridas electroforéticas con proteínas en su estado nativo mediante diagramas de Ferguson. Estos diagramas han sido muy útiles para determinar el tamaño molecular de proteínas en su estado nativo (Hames, 1990).

En estas condiciones, un gráfico de la movilidad relativa (R_f) versus log de la M de polipéptidos conocidos describe una recta, es decir una relación directamente proporcional entre ambos parámetros. Los polipéptidos antes mencionados son de masa molecular conocida y se utiliza la distancia que estos han recorrido para construir la curva estándar (Figura 1.5). Es importante también tener en cuenta que la relación entre el $\log_{10} M$ molecular y la distancia recorrida (r) es lineal solo en un determinado rango de masas moleculares, y este variará con la concentración de los geles y el sistema de buffers utilizado.

- Geles en gradiente de urea corridos transversalmente. Curvas de desnaturalización.

Entre las aplicaciones posibles para los geles unidimensionales encontramos los geles en gradiente de urea corridos transversalmente. En este tipo de geles se realiza un gradiente de urea y luego se realiza la corrida electroforética con el gel rotado 90° (Figura 1.6). De esta manera el gradiente que fue generado de abajo hacia arriba durante su preparación se encuentra de derecha a izquierda durante la corrida. Cabe destacar que el tamaño de poro, es decir la concentración de acrilamida y el agente entrecruzador, es uniforme pero lo que varía es la concentración de urea (0-8M). Se siembra la proteína en su forma nativa en una única calle que tiene prácticamente el mismo largo que el gel permitiendo que la muestra se enfrente con todo el gradiente realizado (0-8 M urea) de manera simultánea.

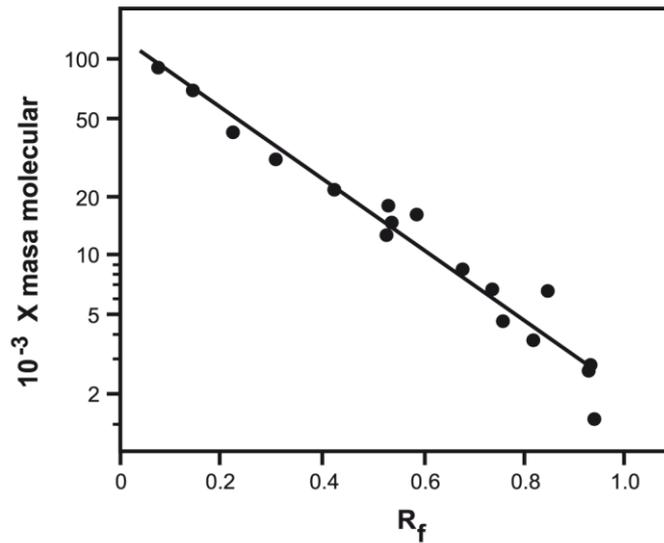


Figura 1.5. Curva de calibración mostrando la movilidad relativa R_f en función del log de la masa molecular de distintos polipéptidos. Las R_f son expresadas de acuerdo al frente de corrida con el colorante azul de bromofenol.

El objetivo principal de este tipo de electroforesis es monitorear la desnaturalización en el equilibrio de proteínas inducida por un agente químico como la urea, así como también estudiar la disociación de proteínas oligoméricas. Es importante notar que el cloruro de guanidinio no es adecuado para usar como agente desnaturalizante, ya que al ser una sal, los iones se verían afectados por la aplicación del campo eléctrico determinando artefactos de corrida.

Luego de utilizar el método de detección adecuado se observara idealmente y dependiendo de la proteína una curva de tipo sigmoidea. En la misma se podrán distinguir: una región denominada pretransición representada principalmente por el estado nativo; una región intermedia denominada transición de características más difusas correspondiente a una población mixta con proteínas tanto en su estado nativo como desplegado y por último una tercera región denominada de postransición que está representada principalmente por el estado desplegado. De esta manera se puede obtener información sobre la termodinámica y cinética del proceso de desnaturalización de una proteína (Figura 1.6).

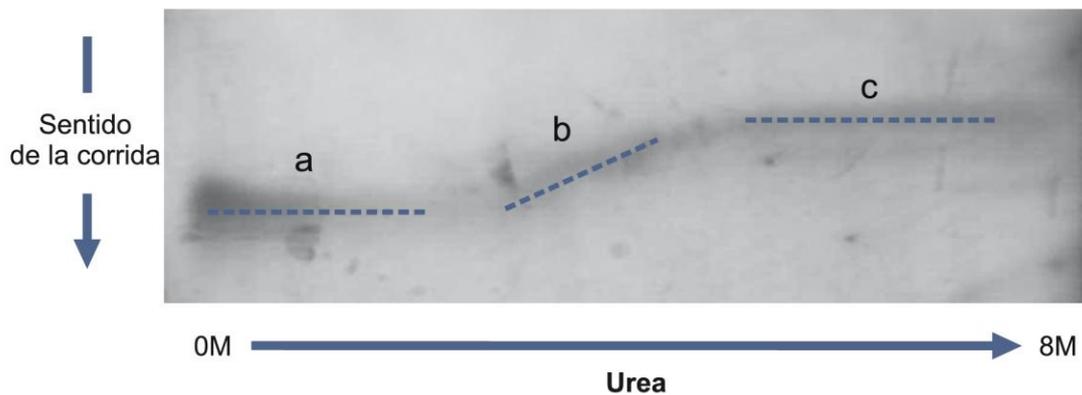


Figura 1.6. Gel en gradiente de urea corrido transversalmente. En la imagen se observa la electroforesis usando un gradiente lineal de urea (0-8M) de una variante abreviada de la proteína que une ácidos grasos de intestino de rata (IFABP). Se destacan las regiones de pretransición (a), transición (b) y postransición (c).

Electroforesis capilar

La electroforesis capilar (EC) es una técnica de alta resolución para la separación de una gran variedad de moléculas de interés biológico como metabolitos, drogas, amino ácidos, proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos. Al igual que con los geles de poliacrilamida descritos anteriormente con EC se realiza una separación en base a la relación carga masa. Una diferencia considerable con respecto a los geles de tipo SDS-PAGE es que se pueden utilizar una gran variedad de matrices y sistemas de buffers. Esto determina una gran flexibilidad en el diseño de protocolos de separación óptimos.

CE emplea una columna capilar fusionada con sílica, que puede o no estar derivatizada con otros grupos funcionales. En contraste con los geles de tipo SDS-PAGE, las bandas de proteínas no pueden ser fijadas o teñidas ya que están en una fase móvil. La separación, es en esencia, análoga a la técnica de HPLC (por sus siglas en inglés *High Performance Liquid Chromatography*). Sin embargo, la separación por CE se basa en parámetros electroforéticos. Esta técnica es particularmente útil para la determinación de la pureza de una muestra y para una rápida, eficiente y cuantitativa evaluación de las técnicas de

purificación. Para más detalles ver Current Protocols in Protein Science, Capítulo 10.

Isoelectroenfoque (IEF)

El isoelectroenfoque (IEF) es una técnica de alta resolución que separa a las proteínas de acuerdo a sus valores de pI. A diferencia de las técnicas de electroforesis descritas en las secciones anteriores donde el pH establece una densidad de carga constante y por lo tanto una movilidad uniforme; la densidad de carga de superficie de un compuesto anfotérico en IEF cambia continuamente, y va decreciendo de acuerdo a su curva de titulación. Un compuesto anfotérico se mueve a lo largo del gradiente de pH hasta que alcanza su posición de equilibrio, donde el pH del medio es el mismo que el de su pI, su movilidad se torna cero y la molécula se detiene.

El gradiente de pH es creado y mantenido por el pasaje de una corriente eléctrica a través de una solución de compuestos anfóteros que tienen pI muy parecidos, determinando un rango de pH. El transporte electroforético causará que los anfóteros (mezclas de poliaminoácidos con diferentes propiedades de carga y por lo tanto diferentes valores de pI) se agrupen en zonas muy estrechas de acuerdo a sus pI y por ende generando un gradiente de pH, que se incrementa desde el ánodo (carga positiva) hasta el cátodo (carga negativa). De esta manera, proteínas que son muy similares estructuralmente y presentan pI que difieren tan poco como 0,01 unidades de pH, pueden ser resueltas. En IEF proteínas que tienen una carga neta positiva migrarán hacia el cátodo y ganará o perderá protones hasta que alcance el valor de pH en el gradiente que iguale a su pI. De la misma manera, proteínas que presenten carga neta negativa migrarán hacia el ánodo y perderá o ganará protones hasta que alcance el valor de pH igual a su pI. Una vez que una proteína ha migrado hasta la posición donde el pH es iguala a su pI, se concentrará y focalizará. Una mezcla de proteínas a la que se aplica IEF se separa de acuerdo a sus puntos isoeléctricos. Utilizando un método correcto de detección, las proteínas

aparecerán como bandas bien definidas a través del gradiente de pH. El IEF se puede realizar tanto en una escala analítica (10 μ g) como preparativa (1-10 mg).

La buena resolución de la técnica requerirá de la optimización tanto del gradiente de pH como de la intensidad el campo eléctrico aplicado a través de dicho gradiente de pH. Típicamente, se usa un amplio gradiente de pH en experimentos preliminares y, de acuerdo al comportamiento de la proteína de interés y el objetivo del ensayo, se selecciona un rango de pH más estrecho para mejorar la resolución.

La preparación de la muestra también requiere de optimización, ya sea para una escala analítica como para una preparativa. Las proteínas en la muestra tienen que estar perfectamente solubilizadas y libres de sales que puedan interferir con el proceso de focalización. A veces, la solubilización de proteínas puede requerir la presencia de urea o detergentes no iónicos para poder mantener el gradiente de pH continuo y poder generar bandas bien focalizadas.

Electroforesis bidimensionales

En una electroforesis bidimensional se realizan dos corridas unidimensionales secuenciales sobre una misma muestra de proteínas, y se considera cada corrida como una dimensión distinta.

La primera dimensión es una IEF, mediante la cual se separan las proteínas de acuerdo a sus pI. De esta manera las distintas proteínas de la muestra quedan focalizadas a lo largo de un gradiente de pH inmovilizado en un gel o en una cinta. Luego, el gel o la cinta se ponen sobre un gel de tipo SDS-PAGE (Figura 1.7). La segunda dimensión es un SDS-PAGE en el cual, como se ha descrito anteriormente, las proteínas serán separadas de acuerdo a su masa molecular (Figura 1.7). La diferencia radica en que las distintas proteínas no serán sembradas en calles separadas sino que partirán desde los distintos puntos focalizados que se generaron durante la corrida de la primera dimensión (IEF). Al final de la corrida de la segunda dimensión el gel es teñido utilizando

una técnica apropiada apareciendo las distintas proteínas como puntos en el gel (Figura 1.8).

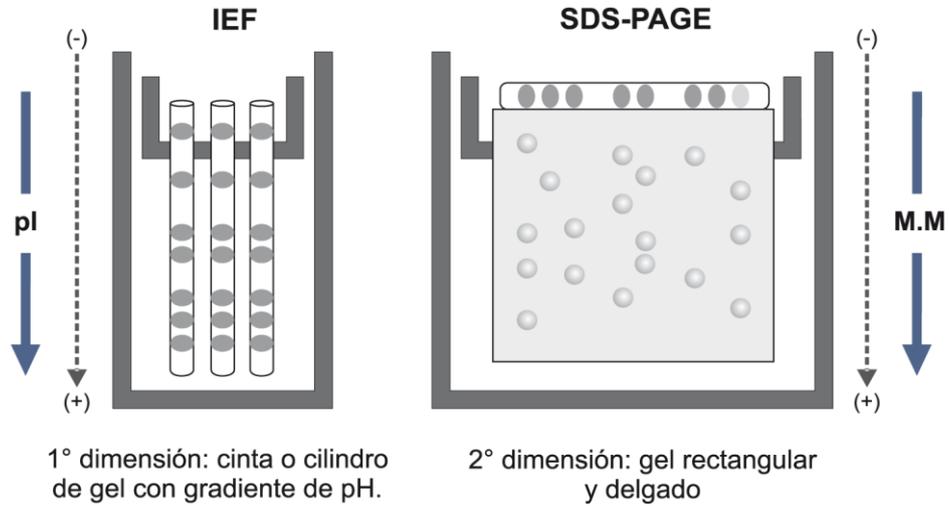


Figura 1.7. Diagrama mostrando cómo se realiza un gel bidimensional. Primero se realiza la primera dimensión donde las proteínas se separan de acuerdo a su *pI*. Luego las cintas de *pH* son sembradas en un SDS-PAGE con una inclinación de 90°. En la segunda dimensión las proteínas se resuelven de acuerdo a su masa molecular (M.M).

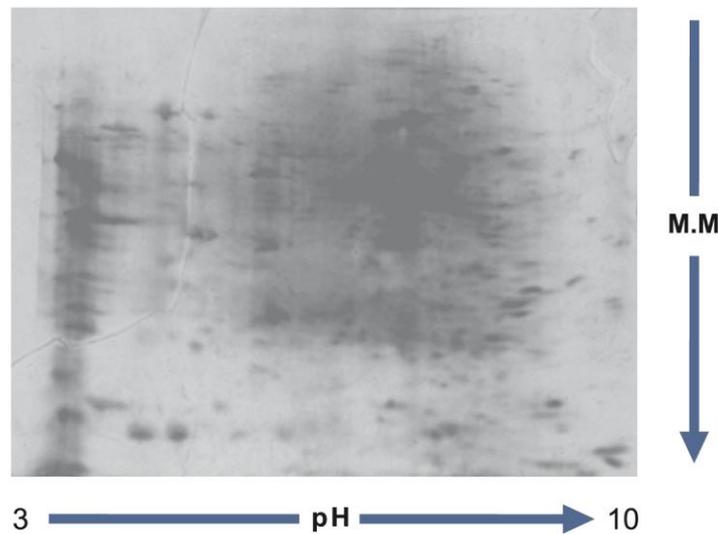


Figura 1.8. Imagen de un gel bidimensional de un lisado de células de la línea Caco-2 de carcinoma de colon humano. Se puede observar como las proteínas han sido resueltas en la primera dimensión de acuerdo a sus *pI* y de acuerdo a sus masas moleculares (M.M) en la segunda dimensión que fue corrida a 90°. El revelado fue realizado utilizando una tinción de plata.

La resolución de los geles bidimensionales es tal que muestras tan complejas como lisados celulares conteniendo varios miles de proteínas diferentes pueden ser analizados.

Si bien se pueden aislar proteínas de interés directamente del gel para luego enviarlo a una determinación por espectrometría de masas, el uso más frecuente que se le da a esta técnica bidimensional es la de observar variaciones en los patrones de expresión de distintos tejidos sometidos a distintos tratamientos.

1.2. Cromatografía de Permeación por Geles

La Cromatografía es una técnica que puede ser usada para el aislamiento de macromoléculas o para analizar sus propiedades estructurales. En particular la cromatografía de permeación o filtración por geles puede ser usada para determinar la masa molecular de macromoléculas. La cromatografía de permeación por geles puede separar proteínas de acuerdo a su tamaño dado que las proteínas más grandes no pueden entrar en la estructura porosa de la matriz y viajan a lo largo de la columna relativamente rápido (Figura 1.9). Las proteínas de menor tamaño entran a través de los poros de la matriz y su movimiento a lo largo de la columna es más lento.

La base de este tipo de cromatografía como herramienta analítica es la relación lineal entre el logaritmo de la masa molecular de la macromolécula y su coeficiente de distribución (K_d):

$$K_d = (V_e - V_o) / (V_i - V_o)$$

Donde V_e es el volumen de elusión de la macromolécula de interés (volumen de eluyente colectado entre la aplicación de la muestra en la columna y la elusión de la molécula de la columna), V_o es el volumen muerto (el volumen de elusión de una molécula que queda excluida) y V_i es el volumen de elusión de una molécula pequeña que penetra los poros de la matriz.

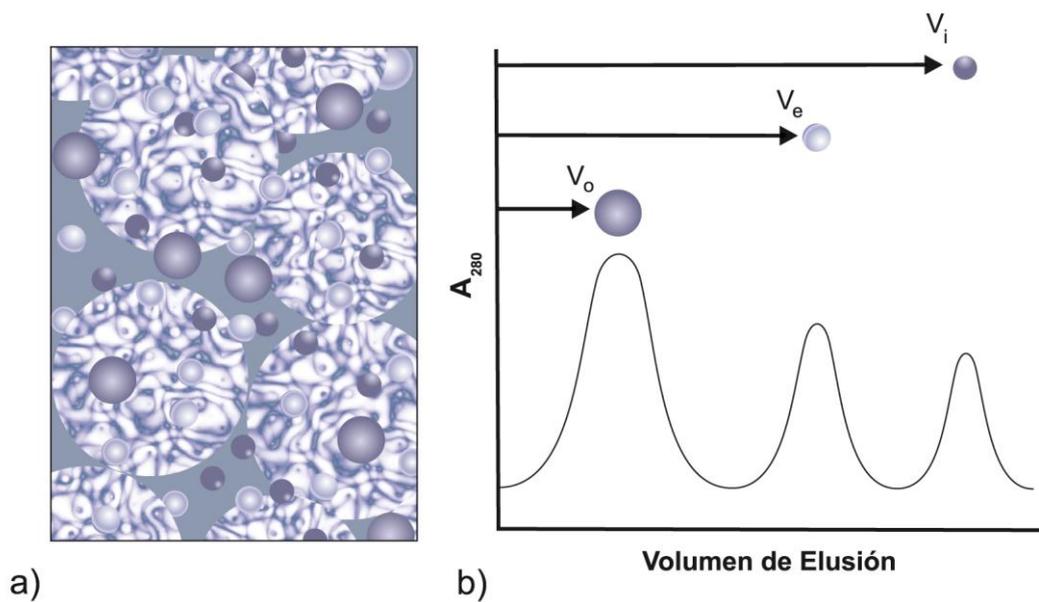


Figura 1.9. Filtración por geles de moléculas. V_i : volumen de elusión de moléculas que penetran a través de los poros de la matriz. V_o : volumen de elusión de moléculas que quedan excluidas de los poros de la matriz. V_e : volumen de elusión de la molécula de interés.

La determinación de la masa molecular mediante filtración por geles requiere de la calibración de la columna a través de la medición de los K_d de una serie de moléculas de masa conocida.

La filtración por geles separa a las moléculas de acuerdo a su radio de Stokes (R_s). El R_s es función de la masa y la forma de la molécula. En el caso de dos moléculas con idéntica masa pero distintas estructuras, una molécula elongada tiene R_s mayor que una esférica.

Las moléculas con R_s grande no penetran los poros de la matriz del gel de filtración y por lo tanto tienen un K_d pequeño. Las moléculas con R_s pequeño, entran a través de los poros de la matriz y como resultado tienen un K_d alto.

La estabilidad de los medios de filtración por geles junto con la amplia variedad de condiciones de elusión, hacen posible el análisis de proteínas en distintas condiciones:

- a) Condiciones Nativas: usando buffers que promueven el estado nativo de la proteína de interés. Esto permite la determinación de la masa molecular de proteínas monoméricas y oligoméricas.
- b) Condiciones Desnaturalizantes: en las que se usan agentes desnaturalizantes (cloruro de guanidinio, urea, etc.) en las que se disrumen

las interacciones inter e intramoleculares. Bajo estas condiciones se determina la masa de subunidades individuales.

Para una determinación adecuada de la masa molecular se requiere:

1. Una columna de filtración con el medio del rango de fraccionamiento adecuado.
2. Moléculas de calibración con masas por encima y por debajo de la de la molécula de interés.
3. Para las condiciones nativas, buffers que promuevan la estabilidad de la molécula, mientras que minimizan las interacciones de la misma con la columna. Condiciones de elusión idénticas para el estándar.
4. En condiciones desnaturizantes, se emplean buffers con el agente desnaturizante tanto para la muestra como para el estándar.

Esta técnica es aplicada rutinariamente en los laboratorios donde se realiza análisis estructural de proteínas. El tipo de equipamiento necesario es mínimo. Existe una gran variedad de matrices de distinto rango de fraccionamiento disponibles comercialmente.

1.3. Ultracentrifugación Analítica

La ultracentrifugación analítica (UCA) es el método más riguroso que permite determinar la masa molecular de proteínas y otras macromoléculas y obtener información acerca de su forma y grado de oligomerización.

El principio es muy simple: Las proteínas y otras macromoléculas en solución, sólo sometidas a la fuerza gravitacional de la tierra, se mantiene uniformemente distribuidas sin sedimentar debido a sus movimientos térmicos aleatorios (Brownianos). Sólo cuando están sometidas a una enorme fuerza de aceleración, sedimentan. Las moléculas más grandes se moverán más rápido hacia abajo en el tubo de la centrífuga. El movimiento de las partículas es detectado realizando mediciones de Absorbancia en el UV/visible o alternativamente, índice de refracción. El método posee dos ventajas

fundamentales: 1) permite estudiar macromoléculas y complejos macromoleculares en solución y 2) es un método absoluto (no requiere estandarización). Los dos experimentos más frecuentes empleando UCA son los de *velocidad de sedimentación* y *equilibrio de sedimentación*. La elevada precisión y exactitud del análisis de sedimentación se debe a que está firmemente basado en la termodinámica y todos los términos de las ecuaciones que describen el comportamiento de sedimentación se pueden determinar experimentalmente.

En la medición de *velocidad de sedimentación*, el rotor gira a velocidades muy altas, de tal forma que la sedimentación sobrepasa a la difusión. La macromolécula se aleja del eje de rotación en forma de un frente delgado. En combinación con otros datos como el coeficiente de difusión (D), se puede usar este experimento para determinar el peso molecular (PM) y obtener información acerca de la forma de la macromolécula.

En las mediciones de *equilibrio de sedimentación*, la velocidad del rotor es baja, de tal forma que hay un balance entre la sedimentación y la difusión. Esto conduce a una distribución estable (en el equilibrio) de la macromolécula en la celda. De esta manera, la posición depende sólo del tamaño y no de la forma. Esta forma de medir es más precisa, pero lleva más tiempo. Esto último puede ser problemático en el caso de muestras inestables. Se puede resolver utilizando celdas más pequeñas.

Instrumentos

Una ultracentrífuga analítica hace girar un rotor en una cámara al vacío (para disminuir el calentamiento friccional y la turbulencia aerodinámica) a una velocidad controlada constante muy alta (hasta 80.000 rpm) y temperatura controlada constante. Además debe permitir el registro de la distribución de concentración de la muestra a tiempos establecidos (Figura 1.10).

- *Rotores*: Los rotores para UCA deben soportar un stress gravitacional enorme. A 60.000 rpm, un rotor de ultracentrífuga típico genera un campo

centrífugo en la celda de alrededor de $250.000 \times g$. Esto quiere decir que una masa de 1 gr experimenta un peso aparente de 250 Kg. Además el rotor debe permitir el pasaje de la luz a través de la muestra que se está centrifugando.

- *Celdas*: las celdas para UCA también deben soportar las altas fuerzas gravitacionales y deben permitir el paso de la luz. Generalmente se trata de una cavidad de aleación de aluminio con los laterales constituidos por dos ventanas gruesas de cuarzo.

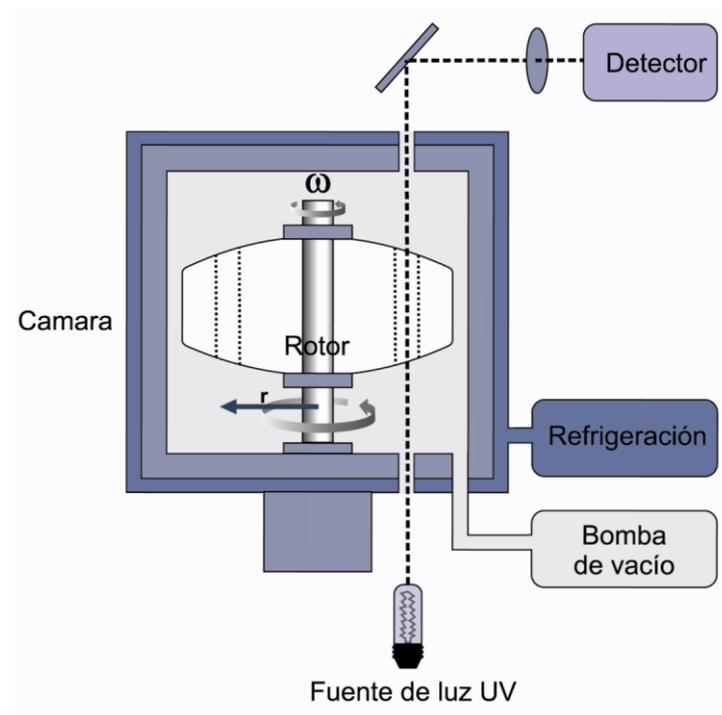


Figura 1.10. Esquema del sistema óptico y las características del rotor de una ultracentrífuga analítica. ω es la velocidad angular de rotación, y r es la distancia de la proteína al eje de rotación.

Aplicaciones de la ultracentrifugación analítica

Determinación de PM

Permite la medición directa del PM del soluto en su estado nativo y tal como existe en solución, sin necesidad de calibración. El método es aplicable a moléculas de un amplio rango de PM, desde varios cientos (sacarosa) hasta varios millones (partículas virales y organelas). El método es aplicable a proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos (cualquier sustancia cuya Absorbancia o índice de refracción sea distinto del solvente).

Análisis de sistemas asociados

El método se puede aplicar al estudio de cambios en el PM cuando las moléculas se asocian para formar estructuras más complejas. La mayoría de las funciones biológicas dependen de las interacciones entre macromoléculas. La UCA permite determinar el PM del complejo tal como existe en solución y en forma independiente de su forma. Los experimentos de *equilibrio de sedimentación* permiten estudiar un amplio rango de interacciones incluyendo la unión de macromoléculas a pequeños ligandos, la autoasociación de macromoléculas y las interacciones macromoleculares heterogéneas. Debido al proceso de sedimentación, dentro de la celda habrá un rango de concentraciones, desde muy baja en el menisco, hasta una mucho mayor en el fondo de la celda. Asimismo, la concentración relativa de las especies asociadas será mayor en el fondo y el análisis del PM promedio como función del radio puede dar información acerca de la estequiometría y la fuerza de la asociación. La UCA es particularmente sensible para el examen de interacciones débiles o transitorias. Este tipo de asociación es de importancia biológica y de difícil estudio por otros métodos.

Velocidad de sedimentación

En este tipo de ultracentrifugación, la proteína está sometida a la acción de tres tipos de fuerzas: centrífuga (centrípeta), flotación y friccional. El efecto de las mismas se expresa en la siguiente ecuación:

$$\frac{M(1-\bar{v}\rho)}{Lf} = \frac{v}{\omega^2 r} \quad \text{Ec. 1.1}$$

Donde M es el PM de la proteína, \bar{v} es el volumen específico parcial de la proteína, ρ es la densidad de la solución, L es el número de Avogadro, f es el coeficiente de fricción de la proteína, v es la velocidad a la que se mueve la proteína, ω es la velocidad angular de rotación, y r es la distancia de la proteína al eje de rotación.

Si el segundo término $\frac{v}{\omega^2 r}$ se reemplaza por S , coeficiente de sedimentación:

$$S = \frac{M(1-\bar{v}\rho)}{Lf} \quad \text{Ec. 1.2}$$

Valores de alrededor de 10^{-13} s son frecuentes para macromoléculas. Este valor es conocido como 1 unidad Svedberg (S).

Un experimento de Velocidad de Sedimentación comienza con la solución de la muestra distribuida uniformemente en la celda de la centrifuga. Bajo la influencia de la fuerza centrípeta, las partículas más densas que el solvente comenzarán a moverse hacia el fondo. En la Figura 1.11 se esquematiza un perfil típico de concentración vs. distancia. Se mide la velocidad de movimiento (v) del frente de la macromolécula a lo largo de la celda (alejándose del eje de rotación).

Para cada tiempo t , la distancia recorrida por el frente de la macromolécula (el punto medio del frente) desde el eje de rotación es r . El coeficiente de sedimentación S se puede obtener del gráfico de $\ln r$ vs t , cuya pendiente es $\omega^2 S$. Conociendo la velocidad a la que gira el rotor se calcula ω .

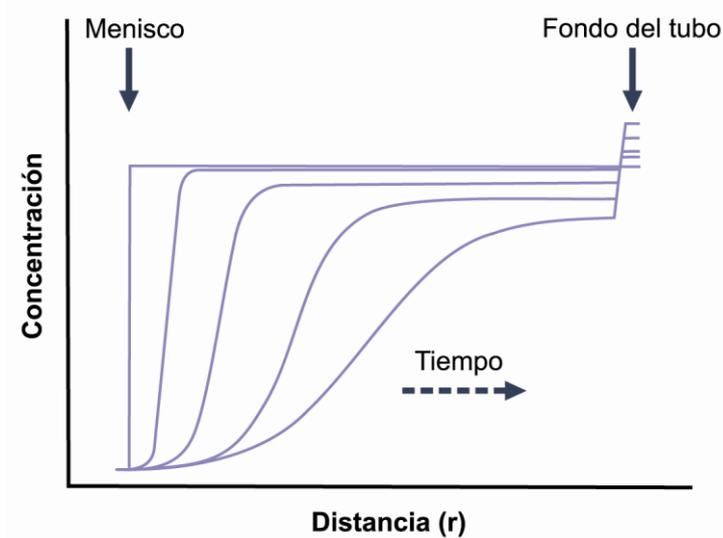


Figura 1.11. Experimento de Velocidad de Sedimentación. La concentración está graficada en función del radio desde el eje de rotación en distintos intervalos de tiempo.

La ecuación 1.2 muestra que podemos calcular el peso molecular (M), conociendo el coeficiente de sedimentación, el volumen parcial específico (se puede estimar a partir de la composición de amino ácidos), la densidad de la solución y el coeficiente de fricción.

Teniendo en cuenta que:

$$f = \frac{RT}{DL} \tag{Ec. 1.3}$$

donde D es el coeficiente de difusión.

Sustituyendo en la ecuación 1.2, se obtiene la ecuación 1.4 conocida como la ecuación de Svedberg (en honor al científico sueco Premio Nobel 1926):

$$M = \frac{RT S}{D(1-\bar{v}\rho)} \tag{Ec. 1.4}$$

Los valores de s para proteínas monoméricas dependen de la concentración, s disminuye levemente con el aumento de la concentración. En aquellas proteínas que forman dímeros, tetrámeros, etc., el valor de s aumentará con el aumento de la concentración hasta un cierto punto. Estos datos se pueden analizar para obtener constantes de asociación entre subunidades (Byron, 1996; van Holde, 1998).

Si conocemos el valor del PM obtenido a partir de otras mediciones, podemos usar los valores de M y s para obtener el valor de f , el coeficiente de fricción. El valor de f informa acerca de la resistencia de la proteína a moverse a través de la solución, y depende de dos factores, la forma y el grado de hidratación. Este último factor es calculable, siendo de alrededor de 0,3 gr de agua unida por gr de proteína. Este tipo de mediciones son usadas para determinar la forma de las proteínas en solución (Bermudez, 2002).

Equilibrio de Sedimentación

En este tipo de experimento, se genera una distribución estable de macromoléculas a lo largo de la celda, ya que hay un balance de las fuerzas de sedimentación y difusión. La distribución depende de la masa molecular y es independiente de la forma de la macromolécula y la viscosidad de la solución. Por lo tanto es posible obtener valores muy exactos de masa molecular y también permite caracterizar sistemas que se asocian (van Holde, 1998).

La ecuación que describe el gradiente de concentración (c) es la siguiente:

$$M = \left(\frac{2RT}{(1-\bar{v}\rho)\omega^2} \right) \frac{d(\ln C)}{dr^2} \quad \text{Ec. 1.5}$$

Haciendo un gráfico de $\ln c$ vs r^2 se obtiene una recta de cuya pendiente se calcula M .

El alejamiento de la idealidad de la solución de macromoléculas (provocado, por ejemplo, por interacciones entre moléculas de soluto) producirá una pequeña disminución en la masa determinada a concentraciones crecientes. Para resolver este error, se hacen determinaciones a diferentes concentraciones y luego se extrapola M a concentración cero.

Si las moléculas forman dímeros, tetrámeros, etc., el gráfico mostrará una curvatura hacia arriba. Ajustando una curva a los datos experimentales se puede encontrar un modelo que explique el comportamiento y determinar las

constantes de equilibrio del proceso y, en consecuencia, las fuerza de la interacción (van Holde, 1998).

Esta es una técnica muy poderosa para determinar la masa molecular de una macromolécula en solución. Una desventaja es el tiempo que puede tomar, lo que puede dificultar el estudio de moléculas inestables. Por otra parte el equipamiento requerido no siempre está al alcance de un laboratorio estándar.

Bibliografía

Andrews AT. Electrophoresis: Theory, Techniques and biochemical and clinical Applications. Oxford University Press, New York (NY), 1986.

Bermudez VP, MacNeill SA, Tappin I y Hurvitz J. J.Biol.Chem, 277: 36853-62, 2002.

Byron O. Analytical Ultracentrifugation, Chapter 16A. En Price NC (Ed.), Proteins Labfax, Bios Scientific Publishers, Oxford, 1996.

Fawcett JS, Morris CJOR. Molecular-sieve chromatography of proteins on granulated polyacrylamide gels. Separation Scy, 1: 9-26, 1966.

Ferguson KA. Starch-Gel electrophoresis. Application to the classification of pituitary proteins and polypeptides. Metabolism, 13: 985-1002, 1964.

Hames BD and Rickwood D. Capítulo 1, Gel Electrophoresis of proteins. A practical approach 2nd Edition, Oxford University Press, Bath, 1990.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680, 1970.

Lerín C, Montell E, Nolasco T, García-Rocha M, Guinovart JJ, Gómez-Foix AM. Regulation of glycogen metabolism in cultured human muscles by the glycogen phosphorylase inhibitor CP-91149. Biochem J. 378: 1073-1077, 2004.

van Holde KE, Johnson WC y Ho PO. Chapter 5 Principles of Physical Biochemistry, Prentice Hall, Englewood Cliffs (NJ). 1998.

CAPÍTULO 2

FLUORESCENCIA

Eduardo De Gerónimo y Lisandro Jorge Falomir Lockhart

Introducción

La fluorescencia es una de las técnicas más ampliamente empleadas dentro de las áreas de las ciencias biológicas y químicas. Su alta sensibilidad se combina con un alto grado de especificidad que permite trabajar en un amplio rango de concentraciones y, en particular, dentro de los valores relevantes para los sistemas vivos, ya sean células, tejidos o animales. En el presente capítulo nos centraremos en analizar los fundamentos de la técnica así como distintas variables y parámetros que pueden asociarse al fenómeno de fluorescencia. Luego describiremos los equipos y las técnicas más comunes para el estudio *in vitro* de reacciones químicas y la caracterización de biomacromoléculas. Por otro lado, las aplicaciones en células y tejidos serán dejadas para el Capítulo 13, en el que se describen las técnicas de Microscopía Óptica. Finalmente, concluiremos el presente capítulo resumiendo las propiedades más sobresalientes de los fluoróforos más frecuentemente empleados.

2.1. Fenómenos Luminiscentes

La luminiscencia es la propiedad que presentan ciertas sustancias de poder emitir luz sin la necesidad de ser sometidas a altas temperaturas. Los fenómenos luminiscentes pueden clasificarse según la fuente de energía que excite la molécula emisora, teniendo así los siguientes procesos luminiscentes:

- Fotoluminiscencia: La energía activadora es radiación electromagnética del espectro visible, ultravioletas o rayos X.
- Quimioluminiscencia: La energía de excitación se libera mediante una reacción química.
- Bioluminiscencia: La energía proviene de reacciones químicas, como en el caso anterior, pero que tienen lugar en los seres vivos.
- Triboluminiscencia: Se produce al liberarse la energía almacenada en ciertas sustancias cristalinas como consecuencia de su ruptura.

La fotoluminiscencia, a su vez, puede subdividirse en fluorescencia y fosforescencia, según el tiempo que transcurre desde la absorción de la radiación hasta la emisión de luz. La Fluorescencia puede considerarse un fenómeno prácticamente instantáneo, transcurre en tiempos del orden de la milmillonésima de segundo ($1 \text{ ns} = 10^{-9} \text{ s}$) y dura únicamente mientras haya un estímulo excitatorio. Por el contrario, en la fosforescencia la energía absorbida se libera lenta y continuamente ya que existe un retraso temporal considerable entre la excitación y la emisión de fotones. Normalmente el proceso transcurre entre millonésimas de segundo ($>1 \mu\text{s} = 10^{-6} \text{ s}$) a varios minutos, y algunas sustancias pueden continuar emitiendo luz hasta incluso durante horas después del corte del estímulo que la provoca.

El mecanismo físico que rige ambos procesos es similar. Las moléculas absorben energía en la forma de fotones y algunos de sus electrones son promovidos a orbitales moleculares de mayor energía. En este estado electrónico excitado, la molécula puede sufrir diferentes mecanismos de conversión interna que disipan parte de la energía absorbida como calor o excitando otras moléculas. Los cambios energéticos están cuantizados y deben cumplir con las leyes físicas. En el caso del fenómeno de fosforescencia en particular, los electrones excitados cambian su estado cuántico de spin, pasando de una configuración de estado *Singlete* a una de estado *Triplete*, lo que clásicamente está “prohibido” o, mejor dicho, tiene una probabilidad muy baja. Del mismo modo, la desexcitación de los electrones desde el estado *Triplete* al basal (*Singlete*) también es un proceso poco probable. Esta es la razón por la cual la fosforescencia puede durar varios minutos. El decaimiento

de los electrones excitados nuevamente al orbital de menor energía (estado basal *Singlete*) se asocia a la emisión de un fotón que arrastra el exceso de energía (equivalente a la diferencia entre los niveles excitados y basal). De este modo, en el caso de la fluorescencia, por ejemplo, la longitud de onda del fotón emitido es más larga que la de aquel absorbido en primera instancia para excitar la molécula. Cabe mencionar también aquí el fenómeno de Quimioluminiscencia, en el cuál la excitación de una molécula está acoplada a una reacción química, y a la cual también se asocia la disipación de parte de la energía puesta en juego como luz.

Las sustancias que tienen la capacidad de emitir luz por fluorescencia al ser excitadas por diferentes tipos de radiación son llamadas *Fluoróforos*. Dichas sustancias suelen ser moléculas orgánicas poliaromáticas o heterociclos con un sistema de enlaces- π conjugado. Sin embargo, más recientemente se han descrito nanopartículas de semiconductores, así como también nanocristales de diamante impurificados con átomos de N, que también presentan esta propiedad. En el presente capítulo describiremos en detalle el fenómeno de fluorescencia y sus distintas variantes y aplicaciones para el estudio de sistemas biológicos. Especial atención prestaremos a los distintos tipos de fluoróforos disponibles hoy en día y a las ventajas de los últimos desarrollos.

Diagrama de Jablonski

El diagrama de Jablonski es una representación simplificada de los niveles electrónicos (orbitales) de una molécula y de las posibles transiciones electrónicas que se pueden dar entre estos niveles (Atkins, 2002). Se agrupan verticalmente los estados electrónicos de acuerdo a su energía y horizontalmente de acuerdo a su multiplicidad de espín (Figura 2.1).

Cuando una molécula absorbe un fotón, un electrón salta desde el nivel vibracional más bajo del estado *Singlete* fundamental (S_0) a uno de los niveles vibracionales del primer estado *Singlete* excitado (S_1) y cuya diferencia de energía sea equivalente a la del fotón absorbido. La energía necesaria para

que ocurra el salto de nivel es igual a $h\nu$, donde h es la constante de Planck y ν es la frecuencia de excitación. El tiempo transcurrido en la absorción de ese fotón es del orden de 10^{-15} segundos. Si las moléculas se encuentran en solución, pierden rápidamente el exceso de energía vibracional por transferencia no radiativa a las moléculas del solvente, quedando entonces en el nivel más bajo posible de energía vibracional del estado excitado S_1 . Este proceso se denomina *relajación vibracional* y ocurre en un tiempo que oscila entre 10^{-11} y 10^{-13} segundos. Si la energía es suficiente, el electrón puede pasar a un estado electrónico superior al primer estado excitado (S_2). Previo a la emisión de luz, es necesario un proceso de conversión interna durante el cual el electrón pasa desde un nivel vibracional inferior del estado S_2 a un nivel vibracional elevado del estado S_1 , y por mecanismos de relajación vibracional retorna al nivel más bajo posible de energía vibracional de éste último. La ganancia de energía vibracional del disolvente puede comprobarse en un ligero incremento de la temperatura del medio.

Aunque teóricamente sería posible que el electrón cayera desde el estado vibracional alto al estado basal S_0 , en la práctica esto no ocurre dado que el mecanismo de reconversión de energía interna ocurre usualmente en tiempos muy cortos, por lo que resulta virtualmente imposible para el electrón ceder nuevamente el total de la energía que recibió, y como consecuencia la luz emitida es siempre de menor energía y, consecuentemente, de mayor longitud de onda que la recibida. El tiempo de vida media o *lifetime* (τ) de una especie excitada es relativamente breve, entre 1 y 10 ns, porque existen diversos mecanismos por los cuales un átomo o una molécula excitada libera el exceso de energía y se relajan a su estado fundamental:

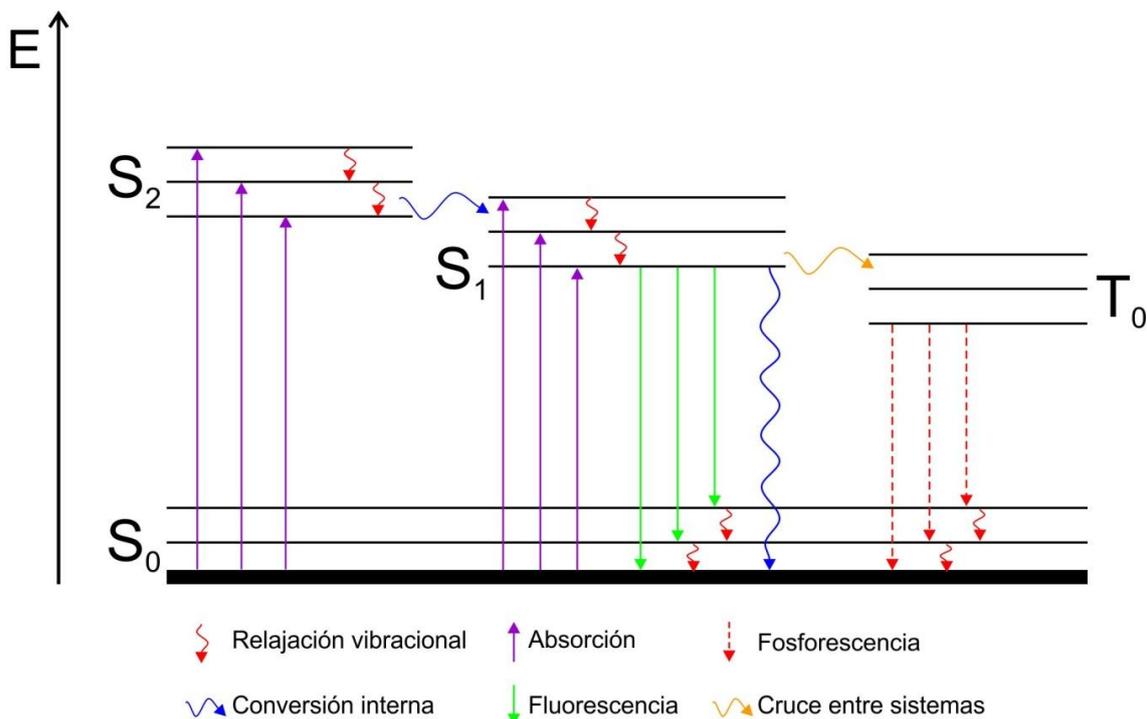


Figura 2.1. Diagrama de Jablonski. Representación esquemática de la distribución de niveles electrónicos de una molécula donde se indican con diferentes colores las transiciones electrónicas posibles entre el estado fundamental S₀ y los distintos estados excitados singlete S₁, singlete S₂ y triplete T₀.

- **Fluorescencia:** La emisión de un fotón arrastra el exceso de energía residual del electrón al caer del estado S₁ al S₀. Debido a la disipación de energía por relajación vibracional, el fotón emitido posee mayor longitud de onda y, por lo tanto, menor energía que el fotón absorbido. Este corrimiento hacia longitudes de onda mayores se conoce como desplazamiento de Stokes. En aquellos casos en los que la radiación absorbida sea emitida sin cambio en la longitud de onda (misma energía), el fenómeno se conoce como radiación de resonancia o resonancia fluorescente.

- **Disipación no radiativa:** Este conjunto de procesos implica, generalmente, una interacción y transferencia de energía entre la molécula excitada y el medio circundante. Este conjunto de procesos suele denominarse conversiones externas.

- **Fosforescencia:** Ocurre en moléculas que poseen orbitales degenerados con energías muy similares a las de los niveles excitados. Ocasionalmente, un electrón con alta energía puede ceder parte de su energía a un electrón en estado basal y formar dos electrones desapareados en dos orbitales

degenerados (estado triplete excitado T_1^*), lo que conlleva a un cambio de multiplicidad. El estado triplete es metaestable, pero puede existir por tiempos muy largos (hasta horas) debido a que las transiciones entre estados singlete y triplete está “prohibida” (es muy poco probable). Cuando los electrones en estado triplete aparean sus espines ceden esa energía de apareamiento en forma de luz.

- *Quenching*: La extinción de la fluorescencia (o *Quenching*) es un mecanismo de desexcitación por el cual el fluoróforo interacciona con ciertas moléculas denominadas “quenchers” (como cloroformo, acrilamida, TEMPO, etc.) que son capaces de capturar el exceso de energía del estado excitado y de disiparla completamente como calor. Los quenchers pueden localizarse selectivamente en membranas o proteínas al igual que los fluoróforos, pudiendo estos combinarse para obtener información sobre interacción de proteínas o sobre cambios conformacionales.

- *Reacciones químicas*: En muchos casos el estado excitado puede tomar una vía química lo que suele degradar el fluoróforo, con la consecuente pérdida de la intensidad de fluorescencia. De este modo, se pueden interconvertir formas fluorescentemente activas y “oscuras”.

2.2. Espectrometría de Fluorescencia

La espectrometría de fluorescencia (también llamada fluorimetría o espectrofluorimetría) es un método espectroscópico ampliamente utilizado en mediciones analíticas y en investigaciones científicas (Sharma, 1999). Consiste en la caracterización de los espectros de excitación y/o de emisión de fluoróforos, así como la interacción entre más de uno de ellos o con el entorno en el que se encuentran. Se aplica comúnmente para estudiar, entre otras cosas, relaciones estructura-función e interacciones de biomoléculas como proteínas y ácidos nucleicos; secuenciación de ADN y caracterización genómica, así como en métodos de inmunoensayos ampliamente empleados en análisis clínicos.

La espectrofluorimetría es una técnica muy sensible y relativamente sencilla de realizar. Todos los métodos espectrofotométricos se basan en la ley de Lambert y Beer:

$$\log(I_0/I) = \epsilon \times l \times C \quad \text{Ec. 2.1}$$

donde I_0 es la intensidad de la luz incidente, I es la intensidad de la luz transmitida, ϵ es el coeficiente de absortividad molar, l es el camino óptico de la cubeta y C es la concentración del fluoróforo. De esta expresión se deduce que la cantidad de luz absorbida es proporcional al número de moléculas de fluoróforo a través de las cuales pasa la luz. La intensidad de la fluorescencia emitida depende de una serie de factores, no todos propios exclusivamente del fluoróforo estudiado, sino también del solvente y las condiciones en las cuales se realiza la medida. Las más importantes son:

- *Concentración del fluoróforo*: La intensidad de la radiación fluorescente también es proporcional al número de fotones de excitación absorbidos por el sistema y, por lo tanto, es proporcional a la concentración de la sonda fluorescente. Sin embargo, es importante tener en cuenta que a concentraciones elevadas pueden aparecer efectos de filtro interno, es decir, absorción de la fluorescencia dentro de la misma muestra. Este efecto puede ser más relevante en el caso en que se mezclan más de un fluoróforo en el mismo ensayo.
- *Absortividad molar (ϵ)*: La intensidad de fluorescencia también depende de la facilidad con que se excita el fluoróforo, es decir de su sección efectiva de captura de fotones. Este parámetro se resume en el coeficiente de extinción o de absortividad molar (ϵ) de la sonda.
- *Estructura Química del Fluoróforo*: Los compuestos que contienen grupos funcionales aromáticos presentan una fluorescencia más intensa. Estructuras alifáticas y alicíclicas con dobles enlaces conjugados pueden presentar también fluorescencia. La estructura está íntimamente relacionada a la rigidez estructural, que es uno de los factores determinantes de la fluorescencia.
- *Rendimiento cuántico (QY_f)*: El rendimiento cuántico o eficacia cuántica de fluorescencia es la relación entre el número de moléculas que emiten

fluorescencia respecto al número total de moléculas excitadas. Cuanto más procesos de desexcitación coexistan para un fluoróforo, menor será la fracción de moléculas que se desexcitan de forma radiativa, y por lo tanto menor será la intensidad de fluorescencia (Ec. 2.2).

$$QY_f = \frac{k_f}{k_f + k_q + k_{nr}}$$

Ec. 2.2

- *Tiempo de vida media (τ):* El tiempo de vida media (o *lifetime*) representa el tiempo que el fluoróforo se mantiene en los estados excitados (S_1 , S_2 , T_0 , etc.) antes de decaer al estado fundamental (S_0) nuevamente. Cuanto menor sea el τ más fotones puede emitir una sonda por unidad de tiempo y la intensidad será mayor.

- *Temperatura:* el aumento de la temperatura favorece las colisiones moleculares aumentando la probabilidad de fenómenos de desactivación no radiativos (conversión externa) y, por lo tanto, disminuyendo el QY_f .

- *Disolvente:* La naturaleza del disolvente es uno de los factores principales que define la intensidad de fluorescencia de un compuesto en solución, así como sus propiedades espectrales. Parte de la pérdida de energía por interacción con el solvente se debe al reordenamiento del solvente ante el cambio del momento dipolar del estado excitado respecto a estado basal. De este modo, solventes menos polares tienden a inducir menor desfasaje de Stokes y un mayor QY_f . Lo opuesto ocurre con los solventes más polares, que sensan mejor el cambio del momento dipolar del fluoróforo. Por otro lado, una disminución en la viscosidad del disolvente aumenta la probabilidad de conversión externa y produce una disminución de la intensidad de fluorescencia.

- *Efecto del pH:* Cuando los fluoróforos poseen sustituyentes ácidos o básicos en los anillos aromáticos es común que las formas ionizadas y no ionizadas presenten diferente longitud de onda e intensidad de excitación y/o de emisión. Por lo tanto, es necesario tener un estricto control del pH durante los ensayos fluorimétricos en los que se emplean este tipo de sondas fluorescentes.

El τ dependerá de los mecanismos de desexcitación activos para una sonda en un determinado entorno (solvente, presencia de quenchers, temperatura, pH,

etc.). Este parámetro define cuántos fotones de fluorescencia pueden recuperarse por unidad de tiempo. Por otro lado, la intensidad de fluorescencia también depende de la multiplicidad de mecanismos no radiativos que compitan con las desexcitaciones luminiscentes. De este modo, es importante conocer el QY_f de los fluoróforos y el coeficiente de absorptividad molar (ϵ). El brillo aparente (B) de un fluoróforo puede estimarse como el producto entre el ϵ a la longitud de onda del máximo del espectro de excitación y el QY_f .

$$B = QY_f \times \epsilon$$

Ec. 2.3

Instrumentos para la medida de la fluorescencia

Dos tipos generales de instrumentos suelen usarse en la espectrometría de fluorescencia:

- *Fluorómetros de filtro*: Utilizan filtros para seleccionar y separar la luz incidente y la luz fluorescente.
- *Espectrofluorómetros*: Usan monocromadores de red de difracción para seleccionar y diferenciar la luz incidente y la luz fluorescente.

Ambos tipos de instrumentos poseen un diseño similar. La luz de una fuente de excitación pasa a través de un filtro o monocromador, la luz de la longitud de onda seleccionada incide sobre la muestra, donde parte de la luz incidente es absorbida (Lakowicz, 1999). La radiación fluorescente es emitida en todas las direcciones, pero se medirá a 90° o a 180° en relación a la dirección del haz de excitación. La luz emitida atraviesa un segundo filtro o monocromador y se selecciona el haz de luz fluorescente al tiempo que se elimina la luz de excitación que haya sido dispersada en la dirección de lectura de la fluorescencia. Esto último puede lograrse también con ayuda de un espejo dicróico. El haz de fluorescencia llega luego al detector, donde se registra su intensidad (Figura 2.2). La diferencia entre el diseño basado únicamente en filtros y el de monocromadores es que estos últimos permiten registrar los espectros de excitación y/o de emisión. Sin embargo, los monocromadores

poseen el inconveniente de que las redes de difracción no sólo seleccionan una longitud de onda determinada, sino que también la luz de longitudes de onda equivalentes a los múltiplos de la seleccionada, lo que suele crear artefactos, en especial en relación a la luz de excitación dispersada. Esto puede solucionarse de dos formas. Por un lado, puede interponerse un filtro o un espejo dicróico de pasaje largo que bloquee la luz de excitación. De lo contrario se pueden emplear monocromadores que funcionen con dos redes de difracción diferentes de forma tal que los múltiplos de longitudes de onda seleccionados en la primera sean eliminados en la segunda red. Esta última opción suele ser significativamente más costosa.

Los componentes generales que forman parte de los fluorómetros y espectrofluorímetros son:

- Fuentes de radiación: lámparas o láseres
- Filtros y/o monocromadores
- Cubetas portamuestra
- Detectores
- Sistema electrónico y registrador

Describiremos a continuación más en detalle las características y funciones de cada componente:

- *Fuentes de luz*: Los factores a considerar en una fuente de radiación son la intensidad de la lámpara, la distribución de longitudes de onda de la radiación que la fuente emite y su estabilidad. Los espectrofluorímetros de barrido requieren fuentes de radiación que emitan continuamente sobre un amplio intervalo espectral. En cambio, los fluorómetros de filtro o espectrofluorímetros que se usan específicamente para mediciones analíticas a longitudes de onda fijas pueden usar fuentes de luz discretas, ya sea de líneas atómicas o, más recientemente, fuentes de luz LED (por sus siglas en inglés, *Light Emitting Diodes*, diodos emisores de luz). Las lámparas usualmente empleadas son:

a) *Lámparas de arco de alta presión de Xenón*: Se usan en casi todo espectrofluorímetro comercial. Emiten una radiación continua, intensa y relativamente estable que se extiende de los 300 a los 1300 nm.

b) *Lámpara de destello de Xenón*: Es una fuente compacta de poco costo. Genera un destello de alta energía producido por la descarga de un capacitor a través de la lámpara llena de Xenón. Tiene un espectro de emisión continuo con intensidad casi constante en el rango de 300-800 nm, y una radiación suficiente para las mediciones por encima de 200 nm.

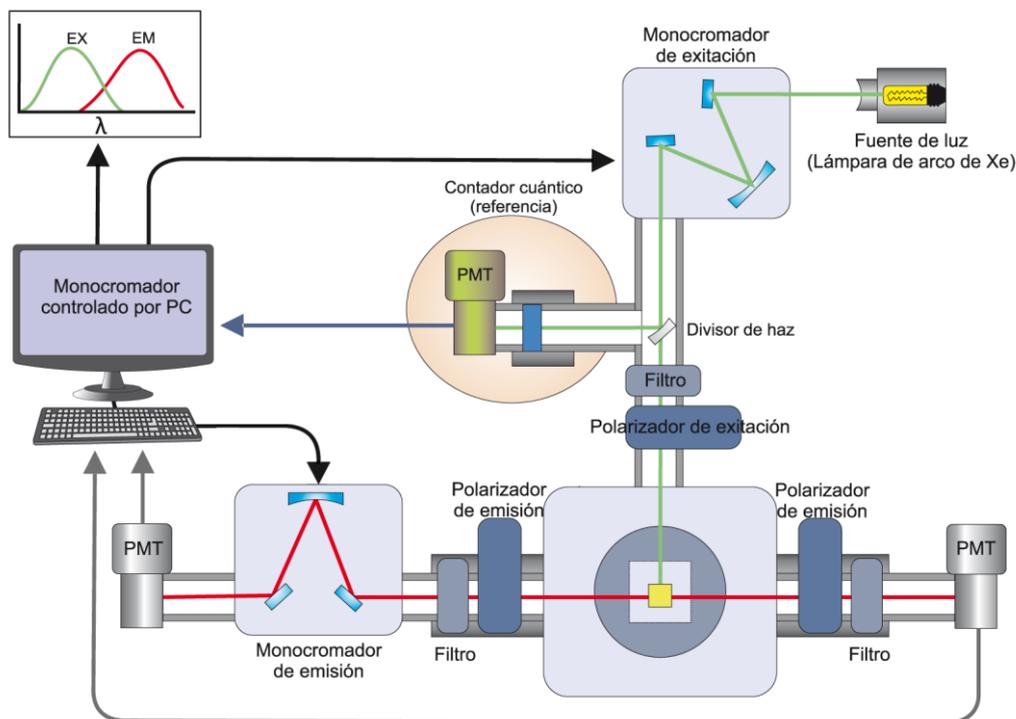


Figura 2.2. Esquema general de un espectrofluorímetro. Los haces de excitación (verde) y de emisión (rojo) atraviesan los distintos componentes del espectrofluorímetro. En el esquema se representa un equipo híbrido con características de un espectrofluorímetro de monocromadores (excitación y emisión hacia la izquierda) y de un fluorómetro de filtros (emisión hacia la derecha). También se observa un espejo divisor de haces que dirige una pequeña fracción de la luz de excitación hacia el contador cuántico para medir una referencia de la intensidad de excitación. La señal registrada por los distintos detectores (PMT) es registrada, digitalizada e integrada en una computadora, que a su vez controla la posición y la abertura de las rendijas de los monocromadores, así como la posición de los polarizadores.

c) *Lámparas de vapor de mercurio de baja presión*: Son utilizadas frecuentemente en los fluorómetros de filtro. Estas lámparas pueden recubrirse con fósforo para obtener un espectro de emisión más cercano al continuo, o pueden tener un bulbo claro de material que transmite el UV para permitir el uso de líneas individuales del mercurio. Las líneas de emisión discontinuas que irradian de la lámpara de mercurio muestran una sensibilidad considerable para un material cuyo espectro de excitación coincide con una línea de emisión de mercurio, por lo que se usan con frecuencia en microscopía (ver Capítulo 13).

d) *Láseres*: Un láser emite luz de alta intensidad en uno o unos pocos intervalos muy estrechos de longitudes de onda, por lo general de 0.01 nm. En el caso de láseres con una única longitud de onda, se hace innecesario el monocromador o el filtro de excitación. La desventaja de este tipo de fuentes es que la longitud de onda de un láser no se puede variar. Las fuentes de láser suelen emplearse cuando se requiere una radiación de excitación altamente monocromática para minimizar los efectos de las interferencias fluorescentes, como por ejemplo en microscopía (ver Capítulo 13).

- *Filtros y Monocromadores*: Un monocromador transmite luz de una longitud de onda y tolerancia ajustables. Los monocromadores más utilizados son las redes de difracción, en las cuales la luz sale con un ángulo diferente dependiendo de la longitud de onda y se puede, entonces, seleccionar qué longitudes de onda transmite con una rendija de ancho variable. El monocromador de excitación se localiza entre la fuente de radiación y la muestra, mientras que el monocromador de emisión se halla entre la muestra y el detector (Figura 2.2). Para tener una buena selectividad espectral y poder resolver la estructura fina de los espectros, el monocromador de emisión debe ser capaz de resolver dos líneas con diferencia de 0.1 nm. En mediciones de anisotropía (ver siguiente sección) se añaden además dos filtros de polarización, uno después del monocromador de excitación, y otro antes del monocromador de emisión. Es importante recordar que los polarizadores tienen un rango de eficiencia, la cual depende también de la longitud de onda seleccionada, y por lo general es difícil fabricar polarizadores que funcionen bien en todo el rango de uso un espectrofluorímetro (UV-Visible-IR).

Los monocromadores no son perfectos y transmiten luz con otras longitudes de onda diferentes a las establecidas. Muchos equipos disponen de un sistema de monocromación doble que comprende dos monocromadores en tándem para dispersar la luz de excitación y otros dos para examinar los espectros de fluorescencia. El monocromador doble reduce drásticamente la interferencia de la radiación dispersada por la muestra y también permite el uso de rendijas más grandes para alcanzar la misma resolución que los monocromadores comunes. Las rendijas más grandes permiten el paso de más radiación a

través del monocromador de excitación, lo que permite trabajar con muestras a concentraciones bajas sin sacrificar resolución.

- *Cubetas Portamuestras:* Las cubetas utilizadas en fluorescencia pueden ser rectangulares o cilíndricas, aunque las primeras son más frecuentemente empleadas. Se utilizan cubetas de sílice (cuarzo) cuando se trabaja con luz UV, ya que el vidrio absorbe significativamente a esas longitudes de onda (<300 nm). En caso de emplear luz visible, se pueden emplear también cubetas de vidrio o incluso de algunos tipos de plásticos. Se debe tener cuidado en el diseño del compartimento de la cubeta para reducir la cantidad de radiación dispersada que alcanza el detector. Con este propósito, suelen introducirse deflectores en el compartimento. Durante los ensayos, es muy importante evitar dejar las huellas dactilares en las cubetas, ya que la grasa de la piel con frecuencia fluoresce y produce dispersión de luz.

- *Detectores:* La señal de fluorescencia es de baja intensidad, por lo cual se requieren dispositivos amplificadores. Los tubos fotomultiplicadores (PMT, *Photo-Multiplier Tube*) son los detectores más utilizados en instrumentos de fluorescencia. Estos detectores suelen trabajarse en la modalidad de recuento de fotones para mejorar la relación señal/ruido. También son empleados los detectores de diodos en serie y de transferencia de carga. Este tipo de detectores permite el registro rápido de los espectros de excitación y de emisión.

El detector puede ser de un solo canal, detecta la intensidad de una longitud de onda en cada momento, o de múltiples canales, detecta la intensidad en todas las longitudes de onda simultáneamente (detector espectral). Este tipo de detectores consiste en un arreglo de detectores puntuales que se disponen luego de un componente que discrimina las distintas longitudes de onda. En el caso de algunas aplicaciones particulares, los detectores también clasifican la intensidad en función del tiempo de arribo de los fotones dividiéndolos en canales temporales. Este es el caso de las medidas de tiempo de vida media en el dominio de tiempo (ver más adelante).

Cabe destacar que, en los equipos más actuales, una pequeña fracción de la radiación de excitación es dirigida hacia un detector de referencia, o detector cuántico, que registra las variaciones de intensidad de la fuente de luz.

- *Espectrofluorómetros*: La fluorescencia suele medirse en un ángulo de 90° en relación a la luz de excitación con el fin de evitar la interferencia de la luz de excitación transmitida. Esto se traduce en una mejor relación señal-ruido y reduce el límite de detección si se compara con una geometría de 180°.

Casi todos los espectrofluorómetros utilizan ópticas de doble haz, para compensar las fluctuaciones en la potencia de la fuente. Las señales procedentes de los detectores de la muestra y de referencia se dirigen a un amplificador diferencial. La técnica de doble haz suministra una mayor precisión analítica, conveniencia y velocidad que las técnicas de un solo haz comparables, ya que discrimina mejor la fluorescencia de la muestra de la dispersión interferente.

Espectros de excitación y emisión

El espectro de excitación es una representación del número de fotones absorbidos, en función de su longitud de onda, por una molécula y que se traducen en la emisión de fluorescencia. El espectro de excitación presenta cierta correspondencia, en general, con el espectro de Absorbancia. Para registrar el espectro de excitación se fija el monocromador de emisión a una longitud de onda cercana al máximo de fluorescencia y se hace un barrido exploratorio de longitudes de onda con el monocromador de excitación.

El espectro de emisión representa el número de fotones emitidos, según su longitud de onda. Se obtiene fijando el monocromador de excitación a una longitud de onda cercana al máximo del espectro de excitación y haciendo un barrido espectral con el monocromador de emisión (Figura 2.3). Una propiedad de la fluorescencia es que, debido a la disipación parcial de la energía de excitación que ocurre durante la vida del estado excitado, el espectro de emisión normalizado es independiente de la longitud de onda de excitación (λ_{exc}) empleada. Esto se conoce como la Regla Kasha.

La naturaleza generalmente simétrica de ambos espectros es el resultado de la misma transición, involucrada tanto en la absorción como en la emisión y las similitudes de los niveles vibracionales de S_0 y S_1 . Esta propiedad se conoce como la regla de la imagen espejo. Existen muchas excepciones a esta regla, como cuando los fluoróforos forman complejos o cuando existen grupos ionizables.

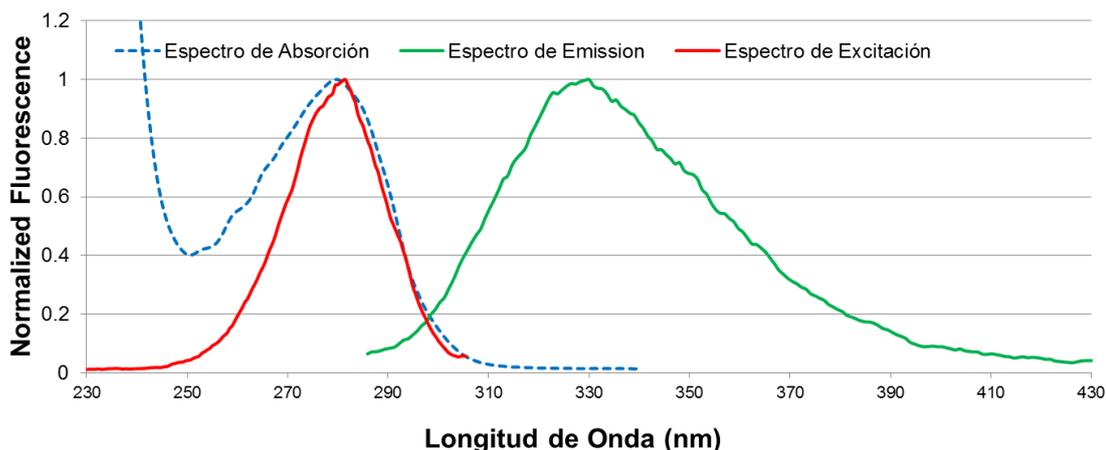


Figura 2.3. Espectros de absorción, excitación y emisión. En el gráfico se muestra, a modo de ejemplo, los espectros de fluorescencia de excitación (rojo) y de emisión (verde) del triptófano Trp^{82} de la proteína IFABP-W6F. Además se muestra el espectro de absorción de la proteína (azul) con fines comparativos.

Los espectros de fluorescencia se encuentran a menudo acompañados por cuatro bandas indeseables: la dispersión Rayleigh, la dispersión Raman, la posible fluorescencia del solvente y los máximos de segundo orden (cuando se emplean redes de difracción). Sin embargo, en la práctica resulta sencillo distinguir estas cinco emisiones contaminantes que deforman el espectro real del fluoróforo analizado realizando el registro de espectros de muestras blanco en ausencia de dicho fluoróforo.

El espectro de emisión de los compuestos fluorescentes es especialmente sensible al entorno molecular. Por ello, el estudio de los factores ambientales que pueden afectar al proceso de fluorescencia es muy importante y se desarrollará en detalle en la última sección del presente capítulo.

2.3. Anisotropía

Se define como anisotropía al grado de polarización de la emisión que presentan los fluoróforos al ser excitados con luz linealmente polarizada. La luz polarizada es aquella radiación electromagnética cuya onda presenta un solo plano de oscilación. Al excitar una molécula pequeña fluorescente con luz polarizada, la luz emitida deja de estar polarizada debido a la movilidad aleatoria que presentan las moléculas en solución durante su tiempo de vida en el estado excitado. Sin embargo, si se trata de una molécula de mayor volumen, o si una molécula pequeña se une a otra de mayor tamaño, la movilidad va a ser menor y la luz emitida va a estar más polarizada en el mismo plano que la luz de excitación. Esto depende del tiempo de vida media del fluoróforo, siendo los fluoróforos de menor τ los que presentan mayor polarización, debido a que tienen menos tiempo para rotar entre la excitación y la emisión. Del mismo modo, aquellos fluoróforos con τ más largos son aquellos que presentan menos polarización de su emisión.

Suponiendo el hipotético caso en que se pudieran tener moléculas inmóviles, con sus dipolos de excitación paralelos al plano vertical, y fuesen excitadas con luz polarizada en el mismo plano, la luz emitida también estaría totalmente polarizada en el plano vertical. En la situación de que las moléculas inmóviles estuvieran orientadas al azar (de forma que la orientación de sus dipolos de excitación podría ser cualquiera) y fuesen excitadas con luz polarizada en el plano vertical, sucederían varios eventos a la vez. Las moléculas con sus dipolos en el plano vertical actuarían según lo descrito anteriormente. Las moléculas con sus dipolos perpendiculares al plano de la luz polarizada no absorberían luz y, por tanto, no emitirían radiación. Las moléculas con cualquier otra orientación absorberían luz en distintos grados, dependiendo de lo cerca o lejos que estuvieran de su orientación óptima. Por lo tanto, la luz emitida no estaría totalmente polarizada en el plano vertical sino que incluiría componentes en otras direcciones. En una situación real, las moléculas rotan, lo cual introduce una nueva variable en la que las moléculas absorben luz

cuando su dipolo tiene una determinada dirección y, al emitirla, dicha orientación ha variado (Weber, 1966).

Para medir el grado de polarización, se excita la muestra problema con luz verticalmente polarizada (Figura 2.4) y se mide la intensidad de la luz emitida que pasa a través de dos polarizadores, uno orientado paralelamente a la dirección de la luz polarizada de excitación (intensidad que se denomina $I_{||}$) y otro orientado perpendicularmente a dicha dirección (valor llamado I_{\perp}).

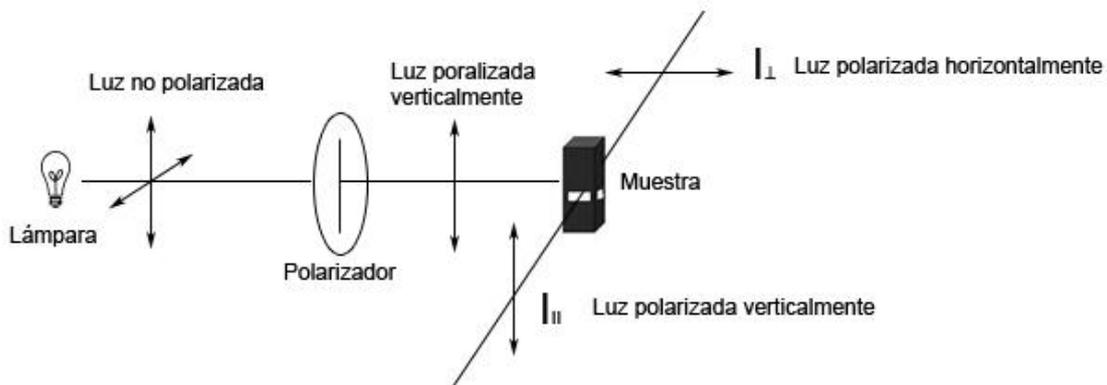


Figura 2.4. Medición de la Anisotropía de un Fluoróforo. El esquema de un espectrofluorímetro en forma T es una de las opciones para medir la polarización de la fluorescencia. La emisión de la fluorescencia pasa por dos polarizadores de análisis en cada canal de emisión, pero orientados en forma perpendicular uno respecto del otro.

A partir de estos dos valores, la anisotropía (r), que es una magnitud adimensional y es independiente de la intensidad total de la muestra, se calcula como:

$$r = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + 2I_{\perp}} \quad \text{Ec. 2.4}$$

Otro parámetro empleado con frecuencia es el de Polarización (P), que se define como:

$$P = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + I_{\perp}} \quad \text{Ec. 2.5}$$

Tanto r como P contienen la misma información, pero la anisotropía es empleada preferentemente porque es normalizada por el total de la intensidad ($I_{\tau} = I_{||} + 2 \times I_{\perp}$). Si la luz emitida está totalmente despolarizada, por lo que los

valores de $I_{||}$ y de I_{\perp} son iguales, el valor de la anisotropía es 0. En cambio, si la luz emitida está totalmente polarizada (valor de I_{\perp} igual a 0), la anisotropía tiene un valor de 1. Es necesario notar que los valores de P también varían entre 0 y 1, pero no es exactamente equivalente.

El valor de la anisotropía disminuye, generalmente, al aumentar la movilidad de las moléculas. La diferente orientación de los dipolos de excitación y de emisión debido a la libre rotación de las moléculas en solución es uno de los principales mecanismos de la despolarización que experimentan los fluoróforos. Por este motivo, los compuestos orgánicos fluorescentes en estado libre (soluble) prácticamente no tienen polarización. Pero si estas moléculas pequeñas se unen a otras estructuras de mayor tamaño, como proteínas o membranas) su movimiento se ve reducido y su anisotropía aumenta. La despolarización de las sustancias se debe también a otros procesos importantes como el movimiento browniano de las partículas fluorescentes, la reabsorción de la luz emitida por una segunda molécula, la luz dispersada, fenómenos de transferencia de energía y el aumento del tiempo de vida media del estado excitado.

Equipos para medida anisotropía

Los equipos para medir la Anisotropía de fluorescencia son muy similares a los espectrofluorímetros o los fluorímetros clásicos y comparten varios de los componentes básicos. El diseño incluye una fuente de luz, un selector de longitud de onda de excitación (monocromador o filtro), polarizador de excitación, portacubeta, polarizador de emisión, selector de longitud de onda de emisión (monocromador o filtro) y detector. Los polarizadores deben poder ser rotados para cambiar la orientación del plano de polarización y/o de emisión.

Los polarizadores lineales son elementos ópticos que transmiten la luz cuyo vector eléctrico está alineado con el eje de polarización y bloquean aquella cuyo vector forme un ángulo de 90° con dicho eje. Están fabricados con materiales formados por partículas alargadas, varillas o placas alineadas

paralelamente unas a otras, debido a lo que transmiten sólo un plano de luz polarizada y absorben el perpendicular. Para una adecuada medida de la anisotropía se requiere que los polarizadores estén correctamente calibrados y colocados en las posiciones horizontal y vertical ya que, de lo contrario, la relación de intensidades que se calcula no sería real.

Modos de medida de la anisotropía

Existen dos formatos posibles para las medidas de Anisotropía, el L y el T. El formato L consta de un canal de excitación y un canal de emisión. Debido a ello, es necesario poder ubicar en el canal de emisión el polarizador en distintas orientaciones. De este modo se mide el componente paralelo y perpendicular en forma sucesiva para obtener τ y P . Además, es necesario el uso de un factor de corrección para tener en cuenta la polarización parcial que ocurre en el monocromador de emisión y la dependencia de su eficiencia de transmisión con el ángulo del polarizador. En el formato T hay un canal de excitación y dos canales de emisión, uno para el componente vertical y otro para el horizontal, lo que permite medir ambos simultáneamente (Figura 2.4). Las distintas sensibilidades que suelen tener los polarizadores de los dos canales de emisión, así como los dos detectores empleados, se corrigen también con un factor de corrección calculado experimentalmente. Este factor de corrección (G) se calcula a partir del cociente entre las mediciones de las intensidades de fluorescencia registradas al mantener el polarizador de excitación en posiciones horizontal (90° respecto a la posición de medida normal) y el polarizador de emisión en posiciones vertical (0°) y horizontal (90°). Los ensayos de anisotropía, como permiten obtener medidas de la libertad de movimiento del fluoróforo, por ejemplo libre y unido, se aplican principalmente al estudio de las interacciones moleculares. Algunos ejemplos serían ensayos con receptores y ligandos, interacciones proteína-péptido, proteína-ADN, inmunoensayos competitivos, etc. También se usan para obtener información sobre el tamaño, la forma y la orientación de moléculas (principalmente

proteínas), la rigidez de los medios moleculares. Concretamente, esta técnica es muy importante en el estudio de la movilidad de los lípidos de la membrana y la desnaturalización de proteínas.

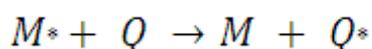
2.4. *Quenching* de la Fluorescencia

El fenómeno de *Quenching* de la fluorescencia se refiere a los procesos que provocan una disminución en la intensidad de emisión fluorescente de una sustancia dada. Puede ser el resultado de varios mecanismos como, por ejemplo, reacciones de los estados excitados, transferencia de energía, formación de complejos y por colisiones (Eftink, 2000). Los fenómenos de *Quenching* pueden clasificarse en dos grandes grupos: los llamados “colisionales o dinámicos”, debido a los choques entre las moléculas (fluoróforo y *quencher*) y los “estáticos”, resultado de la formación de complejos. Dado que ambos tipos de *Quenching* requieren del contacto molecular entre el fluoróforo y el *quencher*, este fenómeno es especialmente importante en soluciones acuosas donde las colisiones son frecuentes.

Una gran variedad de sustancias son capaces de actuar como *quenchers* de fluorescencia, entre ellas, el oxígeno molecular en estado *singlete*, las aminas alifáticas y aromáticas, xenón, peróxido de hidrógeno, acrilamida, bromuros y yoduros, así como la mayoría de los radicales como el TEMPO.

***Quenching* dinámico.**

El *Quenching* dinámico puede representarse, esquemáticamente, como una transferencia de energía entre una especie excitada (M^*) y una especie *quencher* (Q):



Este proceso se describe por la ecuación de Stern-Volmer:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv} \times [Q] \quad \text{Ec. 2.6}$$

donde F_0 y F son las intensidades de emisión fluorescente en ausencia y presencia del quencher, respectivamente, a una concentración del quencher $[Q]$, y K_{sv} es la constante de Stern-Volmer.

A su vez, la constante de Stern-Volmer está relacionada con el tiempo de vida media de la fluorescencia de la especie emisora:

$$K_{sv} = k_q \times \tau_0 \quad \text{Ec. 2.7}$$

k_q es la constante bimolecular de *Quenching* y τ_0 es el tiempo de vida de fluorescencia de la especie emisora.

Un ejemplo de *Quenching* colisional es el que experimentan los residuos de triptófano por la acrilamida. Dado que la acrilamida es soluble en medio acuoso, la efectividad del *Quenching* es muy utilizada para analizar el grado de exposición que presentan estos aminoácidos al solvente en las proteínas. Por ende, aquellos triptófanos ubicados en entornos hidrofóbicas serán menos accesibles a las moléculas de acrilamida y, por consiguiente, afectados con una menor eficiencia que aquellos triptófanos expuestos al medio acuoso. En la Figura 2.5 se muestra un ejemplo del método de Stern-Volmer aplicado a una serie de mutantes puntuales de triptófano de la proteína que une ácidos grasos de intestino (IFABP). La relación de la fluorescencia de los triptófanos en ausencia y presencia de acrilamida (F_0/F) se grafica en función de la concentración de acrilamida creciente. De la pendiente se obtiene la constante de Stern-Volmer (K_{sv}). A mayor K_{sv} observada, más expuesto al solvente, y por ende a la acrilamida, se encuentra el triptófano analizado.

Los resultados demuestran que los triptófanos naturales Trp⁸² (mutante W6F) y Trp⁶ (mutante W82F) se encuentran poco accesibles al entorno. El Trp⁸², al estar localizado profundamente en el sitio de unión de ligandos, difícilmente sufre el *Quenching* de la acrilamida, confirmando la alta hidrofobicidad presente en su entorno. El Trp⁶, si bien se ubica más cercano a la superficie externa de la proteína, no es accesible al solvente ya que se encuentra rodeado también por grupos hidrofóbicos (Figura 2.6). Los mutantes puntuales L30W, F55W e

I114W, cuyos triptófanos se localizan en la interfase de la proteína, son más fácilmente afectados por la acrilamida al estar más expuestos al solvente. El Trp¹⁷ (mutante F17W) presenta una accesibilidad intermedia a la acrilamida, lo que puede corresponderse a que este residuo se orienta hacia el interior de la proteína, y forma la parte superior del sitio de unión de ligandos, por lo que resulta estar menos expuesto que los otros mutantes, pero más que los triptófanos naturales.

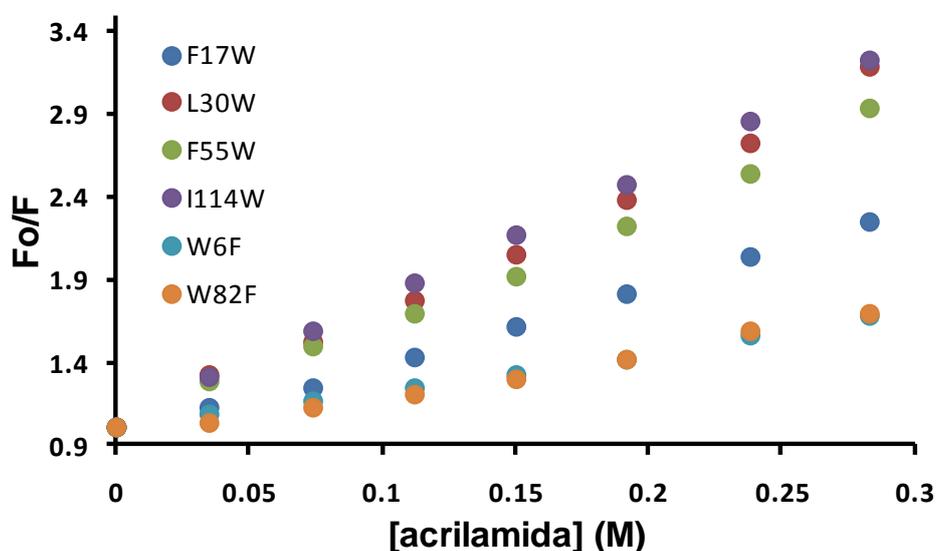


Figura 2.5. Quenching Triptófanos con Acrilamida. El gráfico muestra un ensayo tipo de Quenching con acrilamida de una serie de mutantes de triptófanos en la proteína IFABP. A una solución de cada uno de los mutantes se le agregó concentración creciente de acrilamida (0 – 0.3 M). F_0/F es la relación entre la intensidad de fluorescencia de la proteína en ausencia (F_0) y presencia de acrilamida (F). Del ajuste de la ecuación de Stern-Volmer a los datos experimentales puede obtenerse la constante de Stern-Volmer (K_{sv}).

Una gráfica de Stern-Volmer lineal generalmente indica la presencia de un solo fluoróforo o especie emisora. Por el contrario, una gráfica de Stern-Volmer no lineal puede suponer la presencia de dos poblaciones distintas de fluoróforos. A su vez, una gráfica de Stern-Volmer lineal no asegura que el proceso de Quenching estudiado sea de tipo dinámico, un proceso de Quenching de tipo estático también genera un comportamiento lineal en las gráficas de Stern-Volmer.

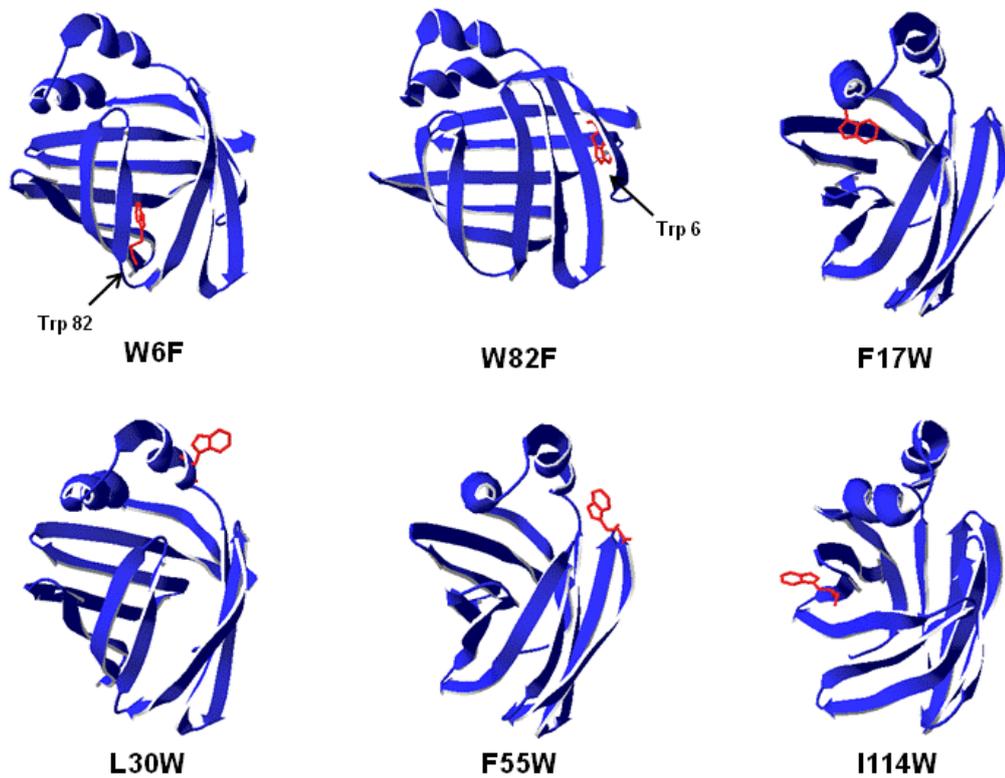
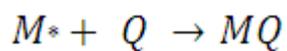


Figura 2.6. Modelos moleculares de los mutantes de IFABP. Las figuras fueron obtenidas por minimización de energía empleando el programa Swiss-PdbViewer a partir de la estructura cristalográfica de la proteína nativa. El esqueleto peptídico se muestra en el formato de cintas (azul) y los residuos de Trp analizados en los ensayos de Quenching están resaltados en rojo.

Quenching estático

El *Quenching* estático se produce, generalmente, como consecuencia de la formación de un complejo no fluorescente entre la molécula emisora y la molécula quencher.



La constante de formación del complejo (K_s) es definida como:

$$K_s = \frac{[MQ]}{[M][Q]}$$

Ec. 2.8

donde [MQ] es la concentración del complejo, [M] es la concentración del fluoróforo libre, y [Q] es la concentración del quencher. Si el complejo MQ no emite, la relación de intensidades F_0/F es igual a la relación de concentraciones $[M]_0/[M]$, donde $[M]_0$ es la concentración total del fluoróforo:

$$[M]_0 = [M] + [MQ]$$

Reemplazando esta expresión en la constante de formación del complejo, se puede despejar la siguiente ecuación:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_S \times [Q] \quad \text{Ec. 2.9}$$

El *Quenching* estático también conduce a una relación lineal entre F_0/F y [Q], excepto que la constante de *Quenching* es la constante de formación del complejo.

Para diferenciar entre ambos tipos de *Quenching* el método más conveniente es el análisis de la dependencia de los tiempos de vida de fluorescencia con la concentración del quencher. Si el *Quenching* es dinámico, el cociente de los tiempos de vida de fluorescencia en ausencia y presencia de quencher (τ_0 / τ) es igual al cociente de las intensidades de fluorescencia (F_0/F). Si, por el contrario, existe un *Quenching* estático, una fracción del compuesto emisor se encuentra secuestrada formando parte del complejo no emisor y la fluorescencia observada proviene solamente del fluoróforo libre. Esta fracción no ha sido alterada, por lo que el tiempo de vida de fluorescencia que se mide es igual al tiempo de vida en ausencia del quencher (τ_0). En definitiva, el cociente τ_0 / τ no demostrará dependencia con la concentración del quencher. De este modo, la medida del tiempo de vida de la fluorescencia (τ_0) a distintas concentraciones del quencher y de la gráfica de τ_0 / τ versus [Q] puede diferenciar claramente entre un proceso de *Quenching* de tipo dinámico y otro estático.

2.5. Fenómeno de Transferencia de Energía de Resonancia Förster (FRET)

La transferencia resonante de energía tipo Förster (o FRET) es un mecanismo de transferencia no radiativa de energía entre dos fluoróforos que poseen una superposición espectral significativa y una orientación relativa apropiada. Este fenómeno ocurre sin la emisión fluorescente por parte del fluoróforo dador y se produce debido a un acoplamiento entre los momentos dipolares entre las transiciones de desactivación del estado excitado de la molécula dadora y la excitación de una molécula aceptora, originalmente en su estado fundamental. Ocurre a través del espacio sin necesidad de contacto dador-aceptor. Este proceso compite con los demás procesos de desactivación del estado excitado de la molécula dadora y por ello determina la disminución del rendimiento cuántico de fluorescencia y la disminución del tiempo de vida.

Para que ocurra FRET entre dos fluoróforos, el dador debe emitir (en ausencia del aceptor) a longitudes de onda más cortas que las del aceptor y el espectro de emisión del dador debe superponerse, al menos parcialmente, con el espectro de absorción de aceptor (Figura 2.7).

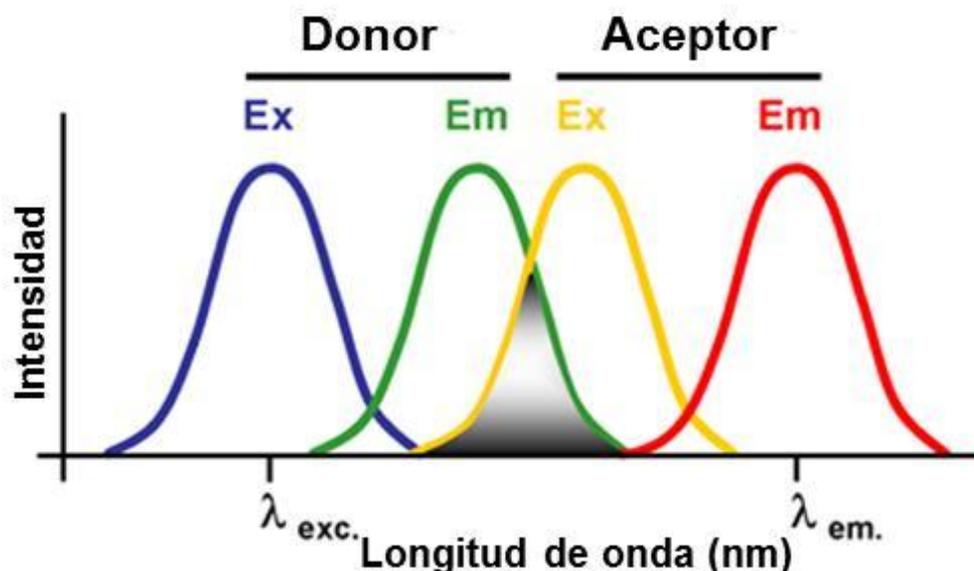


Figura 2.7. Superposición entre el espectro de emisión del dador y el espectro de excitación del aceptor.

De acuerdo con la teoría desarrollada por Theodor Förster, que considera una aproximación dipolar para la interacción coulombica, la velocidad de transferencia de energía se expresa como:

$$K_T(r) = \left(\frac{1}{T_d}\right)\left(\frac{R_0}{r}\right)^6 \quad \text{Ec. 2.10}$$

donde K_T es la velocidad de decaimiento del estado excitado del dador (en ausencia de aceptor), T_d es la vida media del dador, R_0 es el radio crítico de Förster, donde la transferencia de energía y el decaimiento espontáneo del estado excitado del dador son igualmente probables, y r es la distancia entre el dador y el aceptor. De esta ecuación se deduce que la eficiencia de FRET disminuye con la inversa de la sexta potencia de la separación entre los fluoróforos. La distancia a la que la energía de transferencia disminuye un 50% (conocida como radio de Förster) es alrededor de 3-6 nm para los pares más comunes dador-aceptor.

Las condiciones necesarias para que el fenómeno de FRET ocurra son las siguientes:

- Las moléculas de aceptor y dador deben estar muy próximas (10-100 Å), pero no necesariamente en contacto, y deben tener una orientación definida.
- El espectro de absorción del aceptor debe superponerse, al menos parcialmente, con el espectro de emisión del dador.

Si se desactiva la fluorescencia del fluoróforo aceptor (*photobleaching*), aumenta la intensidad de emisión del fluoróforo dador, ya que el dador no es más desexcitado por el fenómeno de FRET al interactuar con el aceptor.

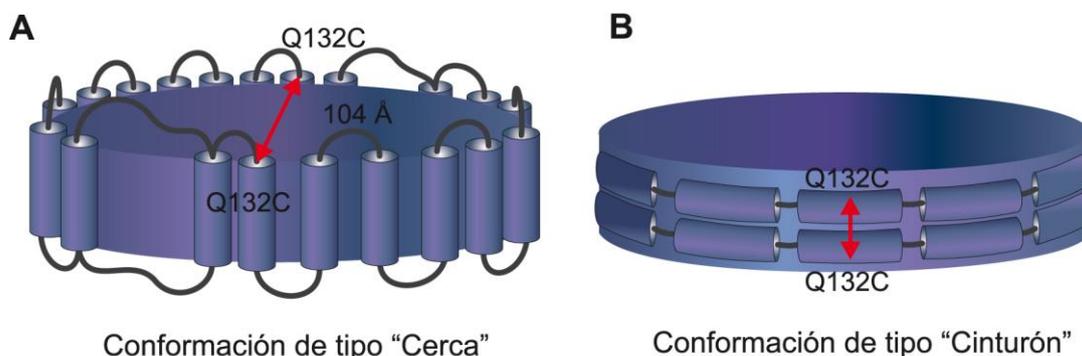


Figura 2.8. Conformaciones posibles para la apolipoproteína A1 cuando está unida a lípidos.

Los procesos FRET contienen información estructural acerca del par dador-aceptor. Un ejemplo de este tipo de estudios es la determinación de la conformación de una apolipoproteína (ApoA-I) cuando se une a lípidos (Li, 2000). ApoA-I es una proteína anfipática con un alto contenido alfa hélices que une fosfolípidos con alta afinidad y los organiza en bicapas solubles o *discos* que toman colesterol de los tejidos. Numerosos estudios revelaron que cada *disco* contenía dos moléculas de ApoA-I pero no la manera en que interaccionaban. De esta manera, surgieron dos hipótesis para describir su interacción con los fosfolípidos: a) el modelo de “cerca”, donde las distintas alfa hélices se disponen alrededor del disco de manera antiparalela, y b) el modelo de “cinturón”, donde las hélices se disponen con sus ejes de manera perpendicular a las cadenas aciladas de los fosfolípidos (Figura 2.8). Para dilucidar la conformación de las moléculas de apoproteína cuando forman parte de los discos se construyeron mutantes puntuales donde se reemplazó la glutamina 132 por una cisteína (ApoA-I Q132C) de manera de incluir grupos -SH con reactividad selectiva para marcar a la proteína en forma específica. Los ensayos de FRET se realizaron empleando moléculas de ApoA-I marcadas con 5-iodoacetamidofluoresceína (5-IAF), como dador, y con tetrametilrodamina iodoacetamida (TMRIA), como acepto. Dado que el diámetro de los discos es de 104 Å, si las hélices se encuentran en la conformación de tipo “cerca” el fenómeno de FRET no ocurriría debido a la distancia que separaría ambos fluoróforos. Mientras que si las hélices estuvieran en la conformación de tipo cinturón si se observaría dicho fenómeno (Figura 2.8). Los espectros de emisión de la ApoA-I marcada en los discos HDL mostraron un decaimiento en la intensidad de emisión del dador y un incremento en la intensidad de emisión del acepto consistente con una eficiencia FRET del 40%. La presencia de FRET demostró que la ApoA-I adopta la conformación de “cinturón” en vez de la conformación en “cerca”. Otras aplicación muy frecuente de FRET es la medición de distancias entre dos sitios en una macromolécula, como por ejemplo, la determinación de la distancia entre un triptófano (dador) y un acepto extrínseco unido en forma covalente o no covalente. Los estudios FRET también son empleados en la

determinación de constantes de afinidad de distintas interacciones moleculares o complejos macromoleculares en los que más de un par dador-aceptor es posible. Ver ejemplos en el Capítulo 11 sobre interacción proteína-proteína

2.6. Sondas Fluorescentes

Algunas bio(macro)moléculas presentan naturalmente fluorescencia gracias a los grupos aromáticos de las proteínas, cofactores lipídicos o complejos de iones metálicos. Sin embargo, para la mayoría de los estudios de fluorescencia se recurre a fluoróforos externos sintetizados por técnicas químicas a partir de compuestos orgánicos que les brindan sus variadas propiedades fisicoquímicas y espectrales. Sin embargo, en las últimas décadas se ha vuelto cada vez más frecuente el uso de compuestos inorgánicos, complejos metálicos y cristales que también presentan el fenómeno de fluorescencia. Finalmente, no podemos dejar de mencionar el desarrollo de los distintos tipos de proteínas fluorescentes, que promovieron los estudios de procesos biológicos en células vivas gracias a que pueden ser codificadas genéticamente y que actualmente ofrecen una paleta completa de colores. La Figura 2.9 muestra un ejemplo de cada tipo de sonda fluorescente. A fin de comparar y contrastar las ventajas y limitaciones de los distintos fluoróforos disponibles hoy en día, desarrollaremos a continuación una breve guía de selección de sondas fluorescentes.

- 1. *Fluoróforos Naturales*: Prácticamente en cada grupo de biomoléculas existen subunidades con propiedades fluorescentes. En las proteínas, por ejemplo, los residuos de Triptófano (Trp) y Tirosina (Tyr) son los fluoróforos intrínsecos naturales y presentan espectros de fluorescencia en el UV. Los mismos pueden emplearse para estudiar las estructuras de las proteínas y el entorno inmediato que rodea estos residuos. Los residuos de Trp resultan más convenientes que los de Tyr, ya que poseen un rendimiento cuántico superior y a que su espectro de emisión responde a la polaridad de su entorno. Sin embargo, como su distribución dentro de la célula es muy amplia y abundante, su señal no resulta específica para su uso en muestras complejas, como en las

técnicas de microscopía de fluorescencia. Además, en muestras de células y tejidos existe una alta contaminación de la señal por la fluorescencia de otras proteínas y demás componentes celulares, como los cofactores RedOx derivados de nucleótidos, como NAD^+ y FAD. Los ácidos nucleicos no emiten una fluorescencia considerable, pero, sin embargo, si pueden absorber luz UV (filtro interno).

Por otro lado, los tejidos vegetales tienen gran cantidad de pigmentos, moléculas lipídicas coloreadas como clorofilas, xantofilas o carotenoides; y muchas de ellas también son fluorescentes. Los iones de metales de transición complejados con proteínas también presentan propiedades de absorción de luz, a veces absorbiendo la fluorescencia propia de la muestra y otras incluso emitiendo, dependiendo del ion y el complejo. Por estas razones, los grupos fluorescentes naturales sólo suelen ser empleados cuando uno trabaja con sistemas puros (*in vitro*), donde resultan de gran utilidad.

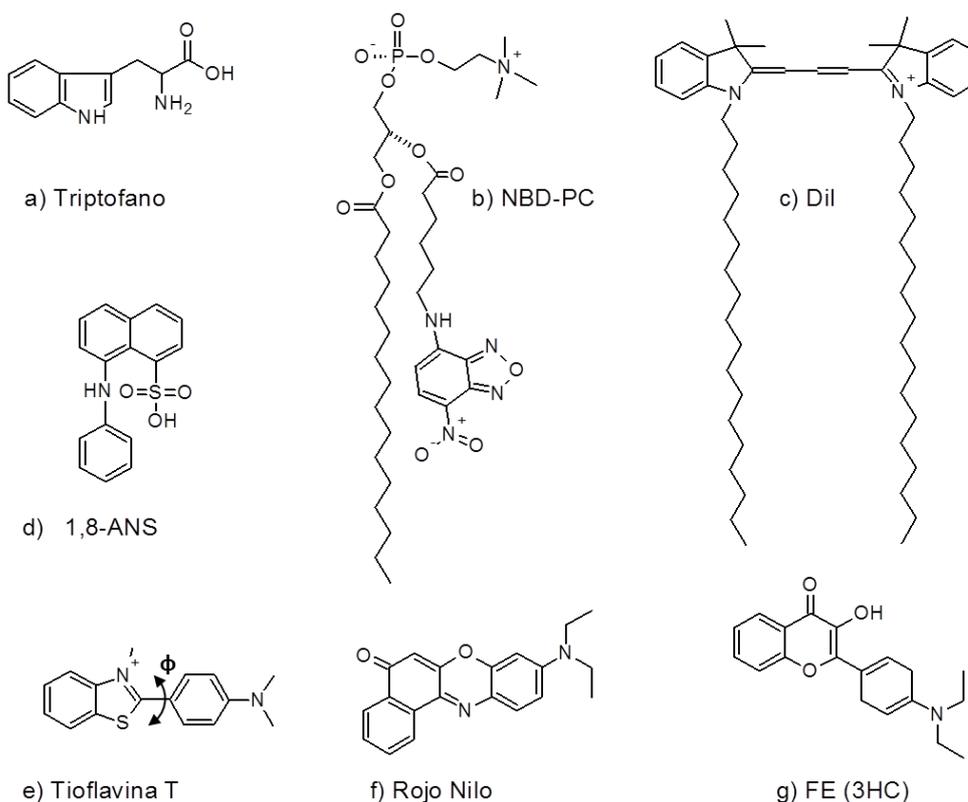


Figura 2.9. Estructura química de ejemplos de distintos tipos de sondas fluorescentes empleadas en sistemas biológicos. (a) Sonda natural: Aminoácido Triptófano; (b) análogos fluorescentes de metabolitos: NBD-PC; (c) fluoróforo anfifílico: Dil; (d) fluoróforo lipofílico: 1,8-ANS; (e) rotor molecular: Tioflavina T; (f) sonda sensible al entorno; Rojo Nilo; (g) sonda multiparamétrica: FE (de la familia de las 3HCs). Ver descripciones detalladas en el texto.

- 2. *Sondas Fluorescentes Orgánicas*: Distintos compuestos orgánicos con sistemas de enlaces- π conjugados presentan fluorescencia en el rango de luz UV-Visible-IR. La ventaja principal de los fluoróforos orgánicos es el alto coeficiente de extinción (ϵ) y el alto rendimiento cuántico de fluorescencia (QY_f) que presentan. Para su uso en el estudio de una biomacromolécula en particular es necesario unirlos en forma específica y estable a la misma. Los lípidos por ejemplo pueden ser sintetizados como análogos fluorescentes en los que una parte de los mismos se reemplaza o modifica para incorporar el grupo responsable de la fluorescencia. En el caso de las proteínas se recurre a las técnicas de química de proteínas para modificar los residuos específicos mediante la unión covalente de la sonda fluorescente. Los grupos que normalmente se modifican para tal fin son los amino, los carboxilo o los sulfhidrilos, correspondientes a Lisinas (Lys), Glutámicos (Glu) y Aspárticos (Asp), y Cisteínas (Cys) respectivamente. De este modo, los fluoróforos deben ser modificados para contener un grupo succinilimido, tetrafluorofenilo o isotiocianato si se desea que se unan a los residuos de Lys. Los mismos reactivos se emplean para marcar los nucleótidos través de sus grupos amino. Los grupos carboxilos se conjugan con fluoróforos carbodiimidas, pero puede ser necesario activar los carboxilos con 3-sulfo-tetrafluorofenilo. En el caso de los residuos de Cys, los fluoróforos se acoplan a iodoacetamida o maleimida. Estos reactivos pueden emplearse para marcar fluorescentemente anticuerpos y sondas de ADN que permitan reconocer proteínas, secuencias de ADN o ARN, así como estructuras subcelulares con alta especificidad y sensibilidad. Esta es la base del fundamento de técnicas como Inmunofluorescencia (IF), Citometría de flujo o Fluorescencia por Hibridización *in situ* (FISH) (para más detalles, ver Capítulo 13).

Existen muchas sondas fluorescentes que, debido a su estructura química, presentan afinidad por distintos componentes subcelulares, como por ejemplo membranas biológicas. Existen tres categorías de sondas fluorescentes que permiten teñir bicapas fosfolipídicas: análogos de fosfolípidos, fluoróforos con un grupo de anclaje y fluoróforos liposolubles. Estas sondas generalmente

presentan una limitada solubilidad y su QY_f aumenta notablemente en entornos lipofílicos respecto a su rendimiento en medio acuoso.

a) *Análogos de Fosfolípidos*: Las cabezas polares y/o sus cadenas aciladas son modificadas químicamente para contener un fluoróforo. De este modo, los análogos fluorescentes se comportan como los fosfolípidos naturales y pueden ser incorporados en las membranas biológicas. Algunos ejemplos son el NBD-PE, el NBD-PC o el BODIPY-PC (Cairo, 2010).

b) *Fluoróforos Anfifílicos*: La estructura química de estos compuestos fluorescentes, que normalmente incluyen largas cadenas hidrofóbicas, favorece la localización de estas sondas en las bicapas fosfolipídicas y lipoproteínas. Podemos incluir en este grupo a las sondas de la familia de las Dialquilcarbocianinas y de las Dialquilaminoestirilos. Entre los ejemplos sobresalientes debemos mencionar DiI, DiO, DiD y DiR (Johnson, 2010). Más recientemente se han desarrollado fluoróforos anfifílicos cargados, pero en los que las cargas positivas y negativas se invierten respecto a su configuración en los fosfolípidos naturales. Esto les brinda una muy alta afinidad por membranas biológicas, como en el caso del NR12S (Kucherak, 2010; Demchenko, 2009).

c) *Fluoróforos Lipofílicos*: Este grupo de sondas fluorescentes se caracteriza por tener gran afinidad por estructuras hidrofóbicas y particionan preferentemente en membranas. En este grupo se incluyen las sondas de fluidez de membranas DPH y TMA-DPH, además de las sondas de superficie de membranas ANS y Laurdan (Johnson, 2010).

Una limitación importante de este tipo de sondas fluorescentes es la promiscuidad que muestran por diversas estructuras dentro de la célula. Por tal motivo, dependiendo de la sonda, su uso puede restringirse casi exclusivamente a ensayos *in vitro*.

- 3. *Proteínas Fluorescentes*: Las proteínas fluorescentes (PFs) disponibles hoy en día han sido el resultado de más de 30 años de investigación y desarrollo que les terminó valiendo el premio Nobel de Química de 2008 a tres investigadores. Originalmente, Osamu Shimomura describió la purificación de la GFP (proteína Fluorescente Verde) de *Aequorea victoria* en la década del '60 (Shimomura, 1962). A mediados de los años '90 fue Martin Chalfie quien

propuso por primera vez su uso como marcador en células vivas (Chalfie, 1994). Finalmente fue Roger Y. Tsien junto a su grupo de trabajo quien por más de 15 años estudió y modificó la secuencia de esta proteína para comprender cómo se formaba el fluoróforo y cómo poderlo modificar para lograr distintas propiedades fotofísicas y espectrales (Heim, 1994). Posteriormente a la descripción de la avGFP, le han sucedido otras PFs de otras especies, algunas de las cuales han sido más fáciles de extender su espectro más allá del rojo. Actualmente se cuenta con una variedad muy amplia de colores que abarcan desde los 430 nm hasta más allá de los 700 nm, permitiendo múltiples marcaciones en paralelo (Giepmans, 2006). Los diferentes colores de las PFs se fueron obteniendo progresivamente sumando mutaciones a la secuencia original de la aqGFP, especialmente una vez que se resolvió su estructura cristalográfica, pudiendo diseñar racionalmente los mutantes puntuales para obtener efectos específicos. Las PFs empleadas actualmente acumulan una serie de mutaciones que optimizan o limitan el plegado, la maduración, la dimerización de las proteínas, además de sus propiedades espectroscópicas (Shaner, 2007).

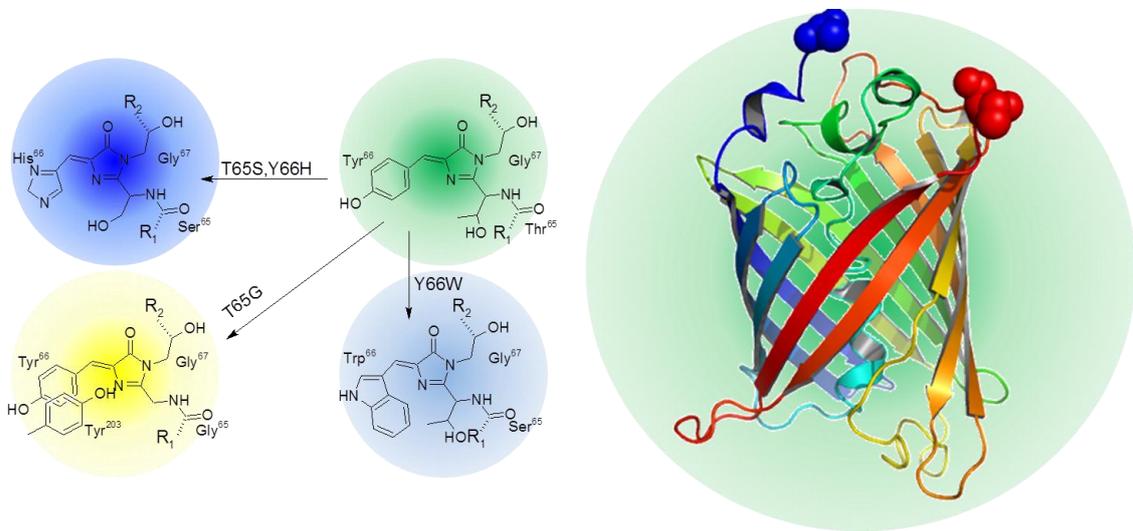


Figura 2.10. Proteínas fluorescentes. El esquema muestra los cromóforos ubicados en el centro de las estructuras para una serie de mutantes de proteínas fluorescentes basadas en aqGFP que muestran diferentes propiedades espectroscópicas: GFP, BFP, CFP e YFP. Notar que sólo se indican las mutaciones del cromóforo propiamente dicho, pero que otras mutaciones son introducidas también para compensar estas mutaciones y lograr mejor estabilidad.

- 4. Puntos Cuánticos (Qdots): Se conoce como Puntos Cuánticos (Qdots o *Quantum Dots*) a los nanocristales de semiconductores recubiertos de una capa protectora, descritos originalmente a inicios de los '80, lo suficientemente pequeños como para mostrar propiedades de mecánica cuántica, en particular *excitones* definidos. Los Qdots presentan propiedades intermedias entre las de las moléculas individuales y las de los semiconductores macroscópicos, las que dependen fuertemente del tamaño y la forma de los mismos. Como fluoróforos, los Qdots tienen las ventajas de ser mucho más estables que las PFs o los fluoróforos orgánicos, y presentan un espectro de excitación inusualmente ancho, pudiendo separar perfectamente la luz de excitación de la luz de emisión así como excitar Qdots de varios colores al mismo tiempo con luz de una única longitud de onda. Esto los convierte en muy buenos dadores, pero en pésimos aceptores FRET. Además el color puede ser sintonizado controlando el tamaño y la forma del núcleo del Qdot, lo que también afecta el prendido y apagado (*blinking* o pestañeo). Así, por ejemplo, los Qdots de Cd:Te presentan emisión desde los 450 nm hasta los 850 nm dependiendo de su tamaño, el que varía entre 2 y 50 nm respectivamente.

Sondas sensibles al entorno

Entre los fluoróforos orgánicos clásicos se incluyen a la fluoresceína, la rodamina, la cumarina, las cianinas y todos sus derivados. Algunos de estos compuestos presentan una solubilidad bastante alta y además son fluorescentes aun cuando están libres en solución. La fluoresceína por ejemplo, presenta los espectros que casi no se modifican en condiciones bastante extremas. Este es uno de los factores más importantes si se desea poder monitorear o detectar un fluoróforo en forma independiente de su localización subcelular. Sin embargo, en el caso de estudiar fenómenos en los que el objeto de estudio se particiona entre dos o más estados o fases (por ejemplo, soluble y unido a membranas), se revaloriza el uso de sondas capaces de reconocer y

reportar cambios en su entorno y de traducir estos cambios como alteraciones medibles en su espectro y/o en las propiedades del mismo (tiempo de vida o anisotropía). Del mismo modo, los biosensores basados en fluorescencia emplean cambios de intensidad o forma de su espectro para reportar sobre la presencia de su ligando específico (metabolitos, iones, etc.). Las sondas sensibles al entorno son herramientas muy útiles para monitorear y analizar por fluorescencia diferentes procesos biológicos así como las propiedades de los componentes en estudio. Este tipo de sondas puede clasificarse en intensiométricas, de corrimiento de banda o multiparamétricas de acuerdo a la naturaleza del origen de su capacidad de censo de su entorno (Demchenko, 2009).

1. - *Sondas Intensiométricas*: Esta familia de fluoróforos está representada mayormente por los llamados “rotores moleculares”. Consisten en dos grupos aromáticos planares conectados por un enlace simple de libre rotación. Esas sondas muestra una dependencia muy fuerte de su intensidad de fluorescencia emitida (aumento del QY_f) dependiendo de las restricciones impuestas a su libertad de rotación por el microentorno en el que se encuentra. Por lo tanto, su unión a estructuras de mayor tamaño o su partición en un medio de mayor viscosidad aumentan su intensidad de emisión al disminuir la rotación de sus grupos funcionales. Compuestos como la Tioflavina T (ThT), por ejemplo, son comúnmente empleados para monitorear la agregación amiloide de proteínas gracias a que su unión específica a las estructuras amiloideas viene acompañada de un significativo aumento de la intensidad de fluorescencia emitida. La ThT tiene una estructura de dos anillos prácticamente planar en su estado basal ($\phi = 30^\circ$) (Figure 2.9). Al ser excitada, la molécula comienza a rotar explorando diversas conformaciones y pierde su planaridad, desacoplando el sistema de enlaces- π conjugados y disminuyendo su QY_f . La unión a las estructuras amiloideas previene esta diversificación estructural y mantiene al fluoróforo en su conformación planar, maximizando la emisión de fluorescencia, que puede ser hasta 500 veces mayor que la de la sonda libre en agua (Biancalana, 2009). En algunas aplicaciones, las sondas intensiométricas presentan algunos problemas para el análisis cuantitativo

debido a que la respuesta registrada (cambio de intensidad observado respecto a la fluorescencia basal del fluoróforo libre, o F_0) muestra una dependencia con la concentración local, parámetro que puede ser muy difícil de controlar en los entornos biológicos.

2. - *Sondas con Corrimiento de Banda*: Los fluoróforos que muestran corrimiento de su banda de emisión también se conocen como sondas solvatocrómicas, ya que dicho corrimiento depende de su interacción con el solvente. Estas sondas presentan un fuerte cambio en su polaridad intramolecular al pasar del estado basal al excitado por la transferencia intramolecular de carga (ICT, *Intramolecular Charge Transfer*). Esta es la razón por la cual la interacción con el solvente relaja el estado excitado de forma más eficiente cuando el entorno es más polar e induciendo en consecuencia una emisión con un corrimiento de Stokes más importante. Los factores que afectan el QY_f de las sondas solvatocrómicas son la polaridad del entorno y el grado de hidratación de la misma, ya que el estado excitado puede relajarse por interacciones dipolo-dipolo o por la formación de puentes de hidrógeno, respectivamente. En algunas sondas puede observarse también un corrimiento del espectro de absorción/excitación, pero el efecto suele ser mucho más notorio sobre el espectro de emisión. Debido a estas características, este tipo de sondas tiene gran utilidad en el estudio de estructuras de membranas e interacciones lípido-proteína, pero también pueden emplearse para analizar cambios conformacionales de polipéptidos o interacciones entre proteínas. Algunos ejemplos de sondas solvatocrómicas son el Prodan, el NBD o el Rojo Nilo.

3. - *Sondas Fluorescentes Multiparamétricas*: Esta tercera clase de fluoróforos sensibles al entorno muestra más de una banda de emisión, correspondientes a la coexistencia de más de un estado excitado. Así, estas sondas presentan espectros con dos o más bandas. Existen distintos tipos de sondas multiparamétricas, dependiendo del origen de la multiplicidad de estados. Una de las familias de compuestos más prolífera de esta clase de sondas pertenece a los derivados de la 3-hidroxicromona (3HCs) (Yushchenko, 2006; Yushchenko, 2007a). Las 3HCs presentan un equilibrio tautomérico por la

Transferencia Intramolecular de Protones en el Estado Excitado (ESIPT, *Excited State Intramolecular Proton Transfer*) entre las formas N^* y T^* . La forma tautomérica T^* se relaja como parte de los procesos de conversión interna y se relaja nuevamente por interacciones con el solvente, por lo que la emisión correspondiente al decaimiento de este estado presenta un máximo de emisión de mayor longitud de onda (menor energía) respecto a la banda correspondiente a la emisión de la forma normal excitada (N^*). La Figura 2.11 muestra el equilibrio tautomérico para la sonda multiparamétrica Maleimida-FC (o MFC) de la familia de las 3HCs y su relación con la emisión de dos bandas de fluorescencia (Yushchenko, 2010).

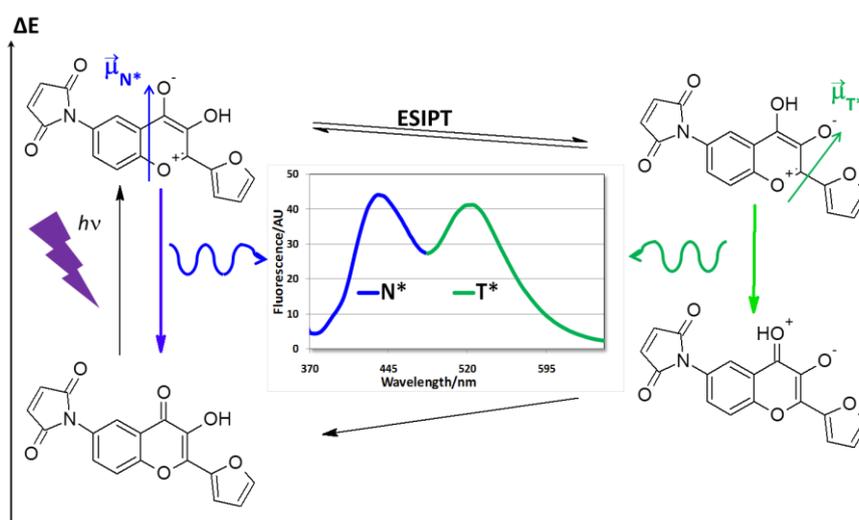


Figura 2.11. Sondas multiparamétricas ESIPT. El esquema muestra el equilibrio tautomérico en el estado excitado por la transferencia intramolecular de protones (ESIPT). Estas sondas están basadas en el núcleo básico de la 3-hidroxicromona, que muestra una emisión de múltiples bandas de acuerdo al entorno en el que se encuentre. En este caso, la sonda MFC muestra dos bandas de emisión correspondientes a la forma normal N^* (azul) y una banda de mayor longitud de onda (menor energía) correspondiente a la emisión desde la forma tautomérica T^* (verde).

Las intensidades absoluta y relativa de ambas bandas de emisión son muy sensibles a la polaridad y/o a la hidratación del entorno de la sonda. El cociente de las intensidades de ambas bandas (T^*/N^*) es particularmente conveniente un indicador apto para monitorear estas propiedades, por lo que a estas sondas también se las conoce como sondas de “proporción métrica” (*ratiometric*) (Klymchenko, 2004). Sin embargo, es necesario contemplar que, dependiendo de la sonda empleada, las bandas de emisión también pueden

sufrir corrimientos del máximo por mecanismo similares a los fluoróforos con corrimiento de banda. Por otro lado, algunas de las 3HC pueden presentar una alta sensibilidad a la hidratación de la sonda mediante la formación de un puente de hidrógeno entre el carbonilo en posición 4 del heterociclo y una molécula de agua. En entornos acuosos la sonda con el puente de hidrógeno presenta espectros de excitación y emisión que difiere de los de la sonda “no hidratada”. La forma hidratada presenta una única banda de emisión (H-N*), especialmente en solventes próticos.

La proporción de las intensidades de cada banda brinda información sobre la presencia de agua y la polaridad del entorno. Esta capacidad de censar más de una propiedad a la vez es la que les da el nombre de sondas multiparamétricas. La respuesta relativa de cada banda puede optimizarse modificando los sustituyentes en las posiciones 2 y 7 del heterociclo de las 3HCs. A mayor capacidad donante de electrones en el sustituyente 2, menor es la relación T*/N*; mientras que el agregado de un grupo donante de electrones en posición 7 resulta en un aumento de dicha relación (M'Baye, 2007; Klymchenko, 2007). De este modo se pueden calibrar las propiedades de la sonda a distintos rangos de sensibilidad a las propiedades de su microentorno (distintas proporciones métricas) como para detectar cambios conformacionales de proteínas, interacciones con proteínas o ácidos nucleicos (Yushchenko, 2007b), cambios de fase membranas fosfolipídicas modelo o naturales (Avilov, 2005).

Además de las sondas ESIPT, existe otro tipo de sondas multiparamétricas. Un ejemplo son los sensores de iones, capaces de reconocer con muy alta afinidad y especificidad un catión metálico, como Fura-2 que puede reconocer al Ca^{+2} . En estos casos la formación de un complejo quelante entre el fluoróforo y el ión cambia las propiedades espectrales del primero. En el caso de Fura-2 se altera el espectro de excitación, por lo que comparando la fluorescencia emitida (505-530 nm) cuando se excita con longitud de onda de 340-350 nm con la registrada al excitar la sonda con luz de 375-390 nm se puede calcular la concentración de Ca^{+2} libre calibrando el sistema con una curva patrón.

Un tercer grupo de sondas fluorescentes multiparamétricas está representado por aquellos fluoróforos sensibles a potenciales transmembrana. Así, por ejemplo, sondas como el JC-1, que pertenece a la familia de las carbocianinas catiónicas, es concentrado en las mitocondrias por la presencia de un potencial transmembrana. El JC-1 soluble y monomérico presenta una fluorescencia verde (510-540 nm). Pero su acumulación en la mitocondria induce la formación de agregados-*J* que presentan una fluorescencia roja (570-620 nm). El cociente entre ambas señales permite reconocer mitocondrias activas de las no funcionales.

Bibliografía

- Atkins P, De Paula J. Atkins' Physical chemistry. Oxford University Press, Bath, 2002.
- Avilov SV, Bode C, Tolgyesi FG, Klymchenko AS, Fidy J, Demchenko AP. Heat perturbation of bovine eye lens α -crystallin probed by covalently attached ratiometric fluorescent dye 4'-diethylamino-3-hydroxyflavone. *Biopolymers* **78**: 340-348, 2005.
- Biancalana M, Makabe K, Koide A, Koide S. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to the surface of β -rich peptide self-assemblies. *Journal of Molecular Biology* **385**: 1052-1063, 2009.
- Cairo CW, Key JA, Sadek CM. Fluorescent small-molecule probes of biochemistry at the plasma membrane. *Current Opinion in Chemical Biology* **14**: 57-63, 2010.
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**: 802-805, 1994.
- Demchenko AP, Mely Y, Duportail G, Klymchenko AS. Monitoring biophysical properties of lipid membranes by environment-sensitive fluorescent probes. *Biophysical Journal* **96**: 3461-3470, 2009.
- Eftink MR. Fluorescence quenching: theory and applications. En Lakowicz JR (Ed.), Topics in fluorescence spectroscopy, Vol. 2: Principles (pp. 53–126). Plenum Press, New York. 2000.
- Giepmans BN, Adams SR, Ellisman MH, Tsien RY. The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science* **312**:217-24, 2006.
- Heim R, Prasher DC, Tsien RY. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci* **91**:12501-12504, 1994.
- Johnson ID, Spence M. (Eds.), Probes for Lipids and Membranes, Chapter 13, en The Molecular Probes® Handbook—A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies 11th Ed, Life Technologies, 2010. <https://www.lifetechnologies.com/ar/es/home/references/molecular-probes-the-handbook/probes-for-lipids-and-membranes.html> (Visitada el 30 de Agosto 2013).

Klymchenko AS, Demchenko AP. 3-Hydroxychromone dyes exhibiting excited-state intramolecular proton transfer in water with efficient two-band fluorescence. *New Journal of Chemistry* **28**: 687-692, 2004.

Klymchenko AS, Yushchenko DA, Mely Y. Tuning excited state intramolecular proton transfer in 3-hydroxyflavone derivative by reaction of its isothiocyanate group with an amine *Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry* **192**: 93-97, 2007.

Kucherak OA, Oncul S, Darwich Z, Yushchenko DA, Arntz Y, Didier P, Mely Y, Klymchenko AS. Switchable Nile Red-based probe for cholesterol and lipid order at the outer leaflet of biomembranes. *Journal of the American Chemical Society* **132**: 4907-4916, 2010.

Lakowicz JR. Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2nd Ed., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York /NY), 1999.

Li HH, Lyles DS, Thomas MJ, Pan W, Scorci-Thomas MG. Structural determination of lipid-bound ApoA-I using fluorescence resonance energy transfer. *J. Biol. Chem.* **275**:37048–37054, 2000.

M'Baye G, Klymchenko AS, Yushchenko DA, Shvadchak VV, Ozturk T, Mely Y, Duportail G. Fluorescent dyes undergoing intramolecular proton transfer with improved sensitivity to surface charge in lipid bilayers. *Photochemical and Photobiological Sciences* **6**: 71-76, 2007.

Shaner NC, Patterson GH, Davidson MW. Advances in fluorescent protein technology. *J Cell Sci* **120**: 4247-4260, 2007.

Sharma A, Schulman SG. Introduction to Fluorescence Spectroscopy. Wiley-Interscience, Hoboken (NJ), 1999.

Shimomura O, Johnson F, Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* **59**: 223–39, 1962.

Weber G. Polarization of the fluorescence of solutions. En Hercules DM (Ed.), Fluorescence and phosphorescence analysis (pp. 217–240). John Wiley and Sons, New York (NY), 1966.

Yushchenko DA, Shvadchak VV, Bilokin MD, Klymchenko AS, Duportail G, Mely Y, Pivovarenko VG. Modulation of dual fluorescence in a 3-hydroxyquinolone dye by perturbation of its intramolecular proton transfer with solvent polarity and basicity. *Photochemical and Photobiological Sciences* **5**: 1038-1044, 2006.

Yushchenko DA, Shvadchak VV, Klymchenko AS, Duportail G, Pivovarenko VG, Mely Y. Steric control of the excited-state intramolecular proton transfer in 3-hydroxyquinolones: Steady-state and time-resolved fluorescence study. *Journal of Physical Chemistry A* **111**: 8986-8992, 2007a.

Yushchenko DA, Vadzyuk OB, Kosterin SO, Duportail G, Mely Y, Pivovarenko VG. Sensing of adenosine-5'-triphosphate anion in aqueous solutions and mitochondria by a fluorescent 3-hydroxyflavone dye. *Analytical Biochemistry* **369**: 218-225, 2007b.

Yushchenko DA, Fauerbach JA, Thirunavukkuarasu S, Jares-Erijman EA, Jovin TM. Fluorescent ratiometric MFC probe sensitive to early stages of α -synuclein aggregation. *Journal of the American Chemical Society* **132**: 7860-7861, 2010.

CAPÍTULO 3

ESPECTROSCOPIA INFRARROJA EN EL ESTUDIO DE PROTEÍNAS Y

MEMBRANAS LIPÍDICAS

Guillermo G. Montich

3.1. Introducción y Fundamentos.

La comprensión del funcionamiento de la célula viva es una de las construcciones intelectuales más destacadas que hemos elaborado. Desde el punto de vista termodinámico el concepto es relativamente simple: la célula es un sistema abierto que genera orden local a partir de la disipación, o aumento de la entropía del universo. La descripción de los procesos individuales que sustentan ese intercambio de energía y generación de orden es un poco más compleja, involucra la descripción de múltiples vías metabólicas simultáneas, y la identificación de sustratos, catalizadores y productos en una complicada organización temporal y espacial. Esta descripción se sustenta en la capacidad analítica de identificar compuestos químicos relativamente simples y macromoléculas complejas, sus conformaciones y la relación entre estas conformaciones y sus actividades químicas. Dentro de las herramientas analíticas, la espectroscopia tiene un papel central. También aquí el fundamento es simple: la comparación entre la radiación electromagnética incidente y la emitida o transmitida por la muestra brinda información sobre las moléculas que interactuaron con la radiación.

Absorción en la zona del infrarrojo.

La absorción de fotones con energía entre 50 y 500 kJ.mol⁻¹, correspondientes a longitudes de onda entre 25 y 2.5 μm (400 a 4000 cm⁻¹), es debida a

transiciones vibracionales. Esta es la banda que utiliza un espectrómetro infrarrojo (IR) convencional. En espectroscopia infrarroja las longitudes de onda se expresan como su inversa, el número de onda, en unidades de cm^{-1} , (número de ciclos que entran en un centímetro). Para mantener la convención de que en un espectro de Absorbancia o emisión las energías mayores se encuentran a la izquierda de la representación gráfica, los espectros IR se grafican con números de onda mayores hacia la izquierda.

Consideremos una molécula diatómica con átomos de masas M_1 y M_2 unidos por un resorte de constante de fuerza k . Utilizando mecánica clásica podemos describir este sistema como un oscilador armónico. La fuerza entre las masas depende del valor de k y de la distancia entre ambas según la ley de Hooke: $\mathbf{F} = -k\mathbf{x}$. Resolviendo las ecuaciones clásicas $\mathbf{F} = m\mathbf{a}$ y $d^2\mathbf{x}/dt^2 = -\mathbf{a}$ podemos demostrar que el sistema oscila con una frecuencia $\nu = 1/2\pi(k/M)^{(1/2)}$. M es la masa reducida del sistema $1/M = 1/M_1 + 1/M_2$. Si entre ambos átomos hay separación de cargas (carga en M_1 $+q$ y carga en M_2 $-q$), el sistema constituye un dipolo descrito por el vector momento dipolar $\boldsymbol{\mu} = q\mathbf{x}$. La oscilación de \mathbf{x} con frecuencia ν determina una oscilación en el valor de $\boldsymbol{\mu}$. Un campo eléctrico oscilando con la misma frecuencia que la molécula puede acoplarse, actuando sobre las cargas, e inducir un aumento en la amplitud de la oscilación. Este campo eléctrico oscilante es el correspondiente a la luz incidente, y el aumento en la amplitud se corresponde con absorción de luz.

La naturaleza cuántica del sistema determina que no todas las amplitudes, por lo tanto no todos los valores de energía, sean accesibles. Los niveles de energía permitidos están igualmente espaciados de acuerdo a $E_l = (l + \frac{1}{2})h\nu$, l es un número cuántico con valores $l = 0, 1, 2, \dots$. Las transiciones están permitidas solamente entre estados contiguos, $\Delta l = 1$. Las transiciones ocurren entonces con $\Delta E = E_l - E_{l-1} = h\nu$.

Conclusiones importantes:

- Para observar absorción de energía en la zona del infrarrojo la oscilación debe estar acompañada de oscilaciones en el valor del momento dipolar. Esto

ocurre solamente si los átomos involucrados tienen cargas eléctricas parciales y constituyen un dipolo.

- La longitud de onda de la luz absorbida, (la energía involucrada en la transición) depende de la masa de los átomos involucrados, o la masa reducida del conjunto, y de la fuerza del resorte (la fuerza del enlace covalente).

Esta dependencia con la masa y la calidad del enlace determinan la poderosa capacidad analítica de esta espectroscopia. Un grupo carbonilo -C=O , por ejemplo tiene una frecuencia de absorción característica en el vacío. Cualquier interacción del C o del O con otros átomos que cambien la densidad electrónica sobre los átomos y sobre el enlace, alterando su fuerza, inducirá cambios en la energía de la transición vibracional y en la posición espectral de la banda de absorción. Gracias al extenso y laborioso trabajo de químicos y espectroscopistas, tenemos herramientas para inferir cuál es la relación entre esas interacciones y los cambios espectrales observados experimentalmente.

Modos vibracionales.

Si pudiéramos observar la filmación del movimiento vibracional de una molécula poliatómica (de hecho es lo que observamos en una simulación de Dinámica Molecular), aparecería como un movimiento caótico. Sin embargo, puede ser descrito rigurosamente en términos de modos vibracionales. Para describir todos los movimientos de una molécula compuesta de N átomos necesitamos tres coordenadas espaciales por cada átomo, $3N$. Como todos se trasladan y rotan simultáneamente, $3 + 3 = 6$ coordenadas son utilizadas para describir la rotación y traslación de toda la molécula. El resto de las coordenadas, $3N-6$, sirve para describir los movimientos vibracionales. El problema sigue siendo complejo y no parece haber mejorado por habernos deshecho de 6 coordenadas. La simplificación ocurre cuando podemos reconocer que existen conjuntos de movimientos vibracionales independientes. En una molécula de agua, por ejemplo (Figura 3.1), podemos reconocer que el “aleteo” de los átomos H (variando el ángulo H-O-H) ocurre

independientemente del estiramiento/acortamiento de los enlaces H-O. Este aleteo es un modo vibracional. Con respecto a las distancias de enlace, podemos considerar un movimiento en el que un enlace H-O se estira simultáneamente con el acortamiento del otro enlace H-O. Este es un modo vibracional llamado “estiramiento antisimétrico”.

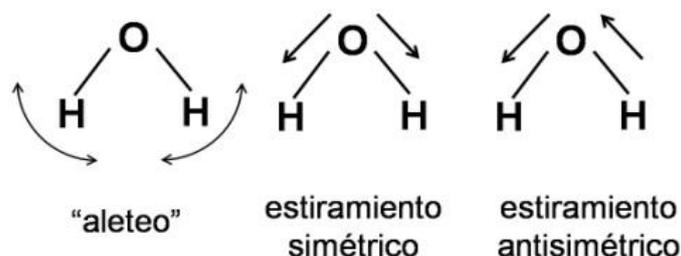


Figura 3.1. Modos vibracionales de H₂O. Las flechas indican el desplazamiento relativo de los átomos.

Ocurre también otra vibración en la que los dos enlaces H-O se estiran y contraen simultáneamente, este modo vibracional es el “estiramiento simétrico”. El estiramiento simétrico, el estiramiento antisimétrico y el “aleteo” son movimientos independientes. Esto significa que podemos excitar a cada modo vibracional de manera independiente. Por ejemplo, con radiación de 1654 cm⁻¹ podemos inducir transiciones de aleteo sin alterar el estiramiento simétrico o antisimétrico.

3.2. Instrumentación.

La adquisición de espectros de absorción IR se realiza con un interferómetro. El funcionamiento de estos equipos está descrito en libros de Química Analítica Instrumental [(Skoog, 2001), en esta referencia encontrará también una muy buena explicación sobre principios de espectroscopia vibracional]. Resumidamente, la muestra es atravesada por dos haces que contienen todo

el espectro IR. Uno recorre un camino óptico fijo y el otro uno variable. La variación del camino óptico es de pocos centímetros y generada por el desplazamiento de un espejo. Debido a la interferencia constructiva y destructiva de ambos haces, la señal que llega al detector es la transformada de Fourier del espectro de absorción de la muestra. Si algunas longitudes de onda son absorbidas por la muestra, esa información queda registrada en la forma del interferograma. La intensidad de esta señal es función de la distancia recorrida por el espejo. El equipo nos entrega la transformada de Fourier de esa señal, que es el espectro de absorción o de transmitancia. Esta es ahora una señal de intensidad de luz en el dominio de longitudes de onda. La relación señal:ruido que se obtiene con estos interferómetros es del orden de 10.000:1.

Preparación de las muestras.

Para muestras biológicas disponemos de dos modalidades: transmitancia y reflexión total atenuada (ATR). La Figura 3.2A muestra el esquema de una celda de transmitancia para muestras líquidas. Debido a la alta Absorbancia del agua, solvente habitual de las muestras biológicas, necesitamos un paso óptico muy pequeño comparado con el que utilizamos en espectroscopia convencional en el visible o ultravioleta. El espaciador esquematizado en la figura (que es quien determina el paso óptico) tiene un espesor de 5 a 100 μm . La muestra que depositamos sobre la ventana es de entre 20 y 50 μL . Usualmente, puede contener entre 50 y 200 μg de proteína y 1 mg de lípido.

La Figura 3.2B presenta el esquema del muestreo con un cristal de ATR. El cristal es de diferentes materiales, generalmente de germanio o sulfuro de Zn. Su tamaño es de aproximadamente 5 cm de largo y 0,5 cm de ancho y espesor. El haz IR ingresa al cristal en la dirección indicada en la figura. Utilizando un ángulo apropiado, cuyo valor depende de la geometría del cristal y de su índice de refracción, el haz se refracta completamente en ambas caras. En la pequeñísima fracción de luz que penetra en el medio acuoso se produce la absorción por parte de la muestra. Nuestra "celda" en este caso está

constituida por los puntos donde el haz es refractado. La ventaja de este sistema es que tenemos acceso inmediato a la muestra y un paso óptico mucho más pequeño que el conseguido con un espaciador. Podemos conseguir que nuestras muestras se adsorban al cristal, y estudiar el efecto de cambios de composición de la solución acuosa (pH, concentración de sales, o ligandos) sin necesidad de desarmar y armar nuevamente una celda de transmisión. En ambas modalidades, es habitual tomar el espectro de absorción o transmitancia de la muestra de interés y descontar la señal producida por una muestra que contiene solamente al solvente, sin la molécula cuyo espectro nos interesa conocer.

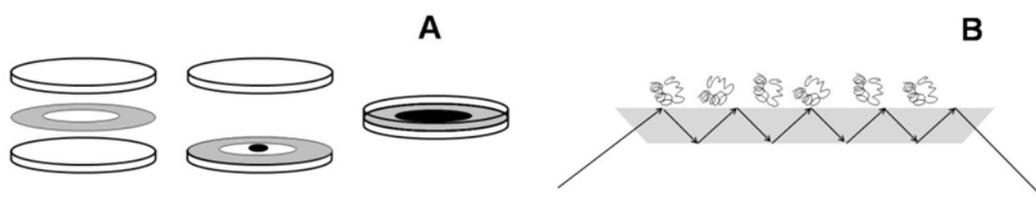


Figura 3.2. Esquema de los muestreos por transmisión y reflexión total atenuada (ATR). A, transmisión. Los círculos blancos representan ventanas de CaF₂ o BaF₂, el círculo gris un espaciador de nylon, teflon o mylar, el punto negro representa la muestra. B, ATR. El prisma gris representa al cristal de ATR, en la parte superior se representa la solución acuosa que contiene a la muestra. Las flechas representan la trayectoria del haz IR.

3.3. FTIR de Proteínas. Estructura Secundaria y Dinámica.

La mayor parte de la información que obtenemos sobre proteínas proviene de bandas que ocurren entre 1800 y 1400 cm⁻¹, y particularmente a 1650 cm⁻¹. Justamente allí, el solvente ¹H₂O tiene una fuerte banda de absorción. En la Figura 3.3 se observa que la línea de base a 1650 cm⁻¹, el espectro del solvente puro, es más bien un pico. Esto dificulta su substracción. La estabilidad y la relación señal/ruido del espectrómetro permite realizar esta substracción de manera aceptable, pero si utilizamos como solvente ²H₂O, todas las bandas del solvente se desplazan a menores número de onda y

queda libre una ventana que permite una mejor substracción de la línea de base (ver Figura 3.3).

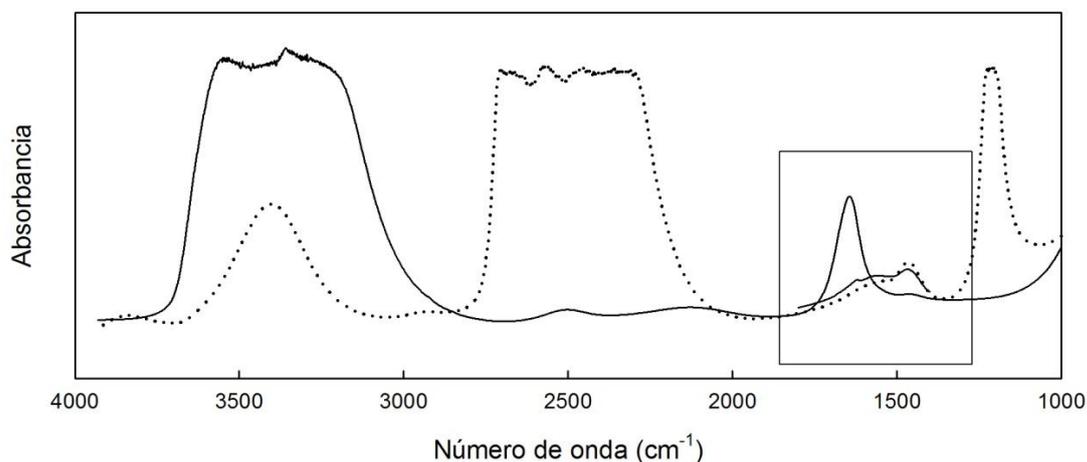


Figura 3.3. Espectros de absorción IR de $^1\text{H}_2\text{O}$ y $^2\text{H}_2\text{O}$. La línea continua corresponde a agua, la línea de puntos a agua pesada. En el recuadro se incluye, en línea continua, el espectro de una muestra que contiene $100\ \mu\text{g}$ de proteína en $^2\text{H}_2\text{O}$. La diferencia entre ese espectro y la línea punteada genera los espectros de proteína como los mostrados en la Figura 3.5.

Bandas amida I y amida II.

El grupo de seis átomos que conforman la unión peptídica ($\text{C}_\alpha\text{CO-NHC}_\alpha$) genera $3 \times 6 - 6 = 12$ modos vibracionales. Dos de ellos, llamados amida I y amida II, generan la mayor parte de la información que buscamos. La banda amida I está centrada en $1650\ \text{cm}^{-1}$ y es debida a la vibración (estiramiento) del enlace $-\text{C}=\text{O}$ acoplado al aleteo del H. Si utilizamos como solvente $^2\text{H}_2\text{O}$, el H de la unión peptídica es reemplazado por el $^2\text{H}_2$ proveniente del solvente. La banda amida I sufre un pequeño desplazamiento debido al cambio en la masa reducida del sistema. Cuando el espectro es obtenido en $^2\text{H}_2\text{O}$ se denomina amida I'. La banda amida II es debida a la vibración angular del enlace N-H (aleteo) y estiramiento del enlace N-C. En este caso el efecto de sustitución isotópica tiene mayor influencia en la posición espectral: para el grupo $\text{CO-N}^1\text{H}$ ocurre a $1546\ \text{cm}^{-1}$ y para $\text{CO-N}^2\text{H}$ a $1450\ \text{cm}^{-1}$. La banda amida II también

contiene información estructural pero más difícil de extraer e interpretar que la amida I. Su gran desplazamiento por efecto isotópico en cambio, es particularmente útil para estudiar la dinámica de fluctuaciones como veremos a continuación.

Estudio de Estructura Secundaria.

La posición espectral de la banda amida I depende de la estructura secundaria en que está involucrado el grupo CO-NH. Los diferentes tipos de estructura secundaria, α -hélice, cadenas y hojas β , giros y estructuras sin orden periódico, generan bandas amida I localizadas en números de onda característicos. Los factores que determinan la posición exacta de la banda son i) la fuerza de las uniones por puente hidrógeno (HB) que involucran al O y al H del grupo amida y ii) la orientación relativa de los osciladores C=O. *Influencia del HB:* cuando el átomo de O participa en una unión HB, se debilita el enlace C=O. La constante de este resorte es menor y la transición vibracional ocurre a menor energía. Para el H involucrado en un HB su vibración angular está restringida y ocurre a mayores energías. La combinación de ambas contribuciones determina, dependiendo de la fuerza de las uniones HB, la energía, y posición espectral de la banda amida I. *Influencia de la orientación relativa de dipolos:* los dipolos oscilantes en un conjunto pueden interactuar eléctricamente por resonancia. Cuando un fotón incide sobre un dipolo, la energía es transferida por resonancia a los demás y la absorción se produce en el conjunto de dipolos. El número de onda apropiado para la absorción del conjunto depende de la distancia y orientación relativa de los grupos. Dipolos cercanos y orientados paralelamente se acoplarán con más eficiencia que dipolos más lejanos orientados mutuamente perpendiculares. Podemos esperar entonces que un conjunto de dipolos (los grupos -C=O) arreglados en una α -hélice absorban a un número de onda particular y diferente de un conjunto arreglado como hojas y cadenas β o desordenadas. La Tabla 1 muestra la posición de las bandas correspondientes a diferentes elementos de estructura secundaria. La

asignación de bandas a diferentes elementos de estructura secundaria es el resultado de cálculos (Krimm, 1986) y de observaciones experimentales (Byler, 1986).

Tabla 3.1. Posición de la banda amida I de diferentes elementos de estructura secundaria.

Conformación	Posición de la banda amida I (cm ⁻¹)	
	En ¹ H ₂ O	En ² H ₂ O
α-hélice	1653	1650
Cadenas β antiparalelas	1632	1632
	1690	1675
Cadenas β paralelas	1630	1632
Orden no periódico	1656	1643
(desordenadas)		
Bordes de hojas β	-	1627
Agregados inespecíficos	-	1616

En la Figura 3.4, en línea continua, se muestra los espectros IR para dos proteínas con estructura secundaria mayoritariamente α-hélice y hoja plegada β. Podemos observar que las bandas principales coinciden aproximadamente con los valores asignados en la Tabla 3.1. Estos espectros son complejos y están constituidos por la suma de bandas subyacentes. Estas bandas están muy próximas y son mucho más anchas que la resolución espectral de nuestros espectrómetros. Generan envolventes que dificultan su reconocimiento inmediato. Disponemos de herramientas para identificar la posición e intensidad de bandas subyacentes: autodeconvolución de Fourier (FSD), segunda derivada del espectro y ajuste de curvas.

Autodeconvolución de Fourier.

Consideremos que el espectro obtenido experimentalmente $E(\nu)$, es el resultado de un espectro de alta resolución, $M(\nu)$, distorsionado por una función $G(\nu)$:

$$E(\nu) = \int_{-\infty}^{\infty} G(\nu')M(\nu - \nu')d\nu'$$

Ec. 3.1

Esta operación es la convolución entre la función $M(\nu)$ y la función de distorsión $G(\nu)$. El subíndice $(\nu-\nu')$ significa que para cada valor de ν realizamos la integral sobre todos los demás valores de ν . Si conocemos, o suponemos la forma de $G(\nu)$, podemos realizar la operación de autodeconvolución de Fourier (FSD) y obtener el espectro $M(\nu)$. Este procedimiento genera un espectro con resolución aumentada “artificialmente” que nos revela la posición de las bandas subyacentes (Kauppinen, 1981). En la Figura 3.4, en línea de puntos, se muestra el resultado de aplicar FSD a los espectros experimentales. En la literatura se informa normalmente el factor de incremento de resolución, k , y el ancho de banda utilizado para la función $G(\nu)$.

- *Segunda derivada*: Otro procedimiento utilizado frecuentemente para encontrar bandas componentes es simplemente tomar la segunda derivada del espectro. Los mínimos en la segunda derivada evidencian bandas subyacentes.

- *Ajuste de curvas*: Una vez encontradas las posiciones de las bandas que componen el espectro, buscamos sus contribuciones relativas. Con un proceso de sumas iterativas y ajuste por cuadrados mínimos podemos encontrar la combinación de intensidades y anchos de banda para los componentes, de manera que sumados reproduzcan el espectro observado experimentalmente. La proporción de estructuras α -hélice, hojas β , o desordenadas corresponde aproximadamente a la proporción relativa del área de las correspondientes bandas. No es el método de elección para conocer la cantidad absoluta y exacta de elementos de estructura secundaria, pero nos permite estudiar cambios, aún muy sutiles, de estructura secundaria en diferentes condiciones experimentales. En nuestro laboratorio hemos utilizado este protocolo para estudiar los cambios estructurales de proteínas solubles cuando interactúan con membranas lipídicas (Paolorossi, 2011; Nolan, 2003). En el laboratorio de la Dra. Rosana Chehín, en la Universidad Nacional de Tucumán-INSIBIO, se ha utilizado extensamente esta metodología para resolver la estructura y cambios conformacionales de varias proteínas (Torres-Bugeau, 2012; Cortez 2010).

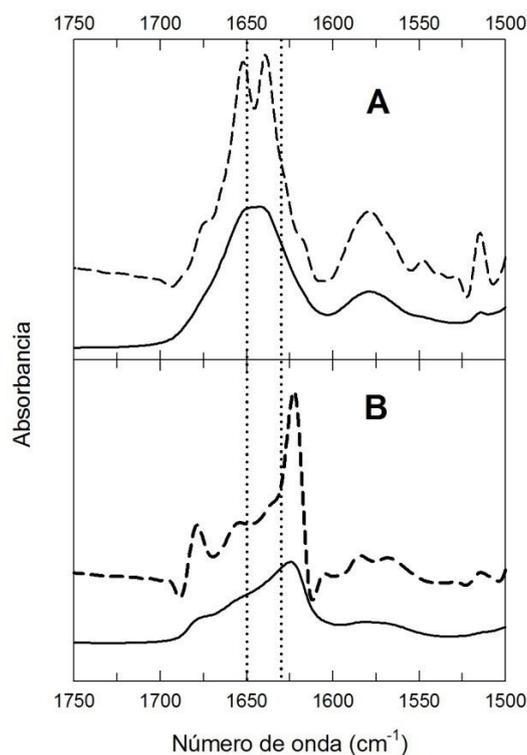
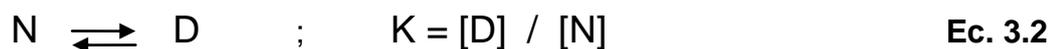


Figura 3.4. Espectros de absorción IR de proteínas. Líneas continuas: espectros experimentales sin tratamiento. Líneas de trazos: los correspondientes espectros autodeconvolucionados. Las líneas verticales de puntos marcan números de onda característicos a 1650 y 1630 cm^{-1} correspondientes a α -hélice y hoja β , respectivamente. Las bandas entre 1700 y 1600 cm^{-1} corresponden a amida I'. Las bandas a 1575 cm^{-1} corresponden a cadenas laterales (glutámicos y aspárticos). A: α -lactalbúmina, proteína mayoritariamente α -hélice. B: L-BABP, proteína mayoritariamente hoja β .

Dinámica de Proteínas.

- Intercambio ^1H - ^2D : Una proteína globular soluble y pequeña transita un estado nativo N y uno desplegado D de acuerdo a una simple ley de equilibrio:



Esto no deja de ser sorprendente: el equilibrio entre un ácido protonado y desprotonado, reacción que nos resulta familiar y cotidiana y que describimos con una única constante, involucra solamente la unión de un protón; en cambio, el equilibrio entre N y D en la reacción de la Ec. 3.2 involucra el establecimiento

de centenares de contactos intramoleculares definidos en el estado nativo a partir de una estructura básicamente fluctuante y sin contactos intramoleculares estables. Podemos concluir que la estructura nativa, compacta, con contactos definidos, se desensambla y vuelve a ensamblar permanentemente en solución. Obviamente, este equilibrio en condiciones nativas se encuentra fuertemente desplazado hacia la izquierda.

Un simple y elegante experimento en un espectrómetro FTIR pone de manifiesto la existencia de este proceso. El átomo de H del grupo amida en solución es lábil y se intercambia con H del solvente. Sin embargo, en una proteína nativa, se encuentra invariablemente involucrado en una unión por HB y no intercambia libremente con H del solvente. Salvo que la unión HB se desarme temporalmente. Se puede proponer tres regímenes de intercambio: una rotura local, que involucra solamente a un HB y no altera a otros, un desplegamiento zonal que involucra a un elemento de estructura secundaria (un grupo de aminoácidos que forman un segmento de α -hélice, por ejemplo), y un desplegamiento global que involucra el desplegamiento de toda la proteína (Ec. 3.2).

Tomemos una proteína nativa en solución acuosa y cambiemos rápidamente el solvente por agua pesada. Si los ^1H de las uniones peptídicas son accesibles, serán intercambiados por ^2H de la solución (provenientes de la disociación de $^2\text{H}_2\text{O}$, $^2\text{H}_2\text{O} = ^2\text{HO}^- + ^2\text{H}^+$). Como el ión $^2\text{H}^+$ es mayoritario, el intercambio es prácticamente irreversible y todos los grupos quedarán eventualmente como $-\text{CO}-\text{N}^2\text{H}-$. Si los grupos $-\text{CO}-\text{N}^2\text{H}-$ y $-\text{CO}-\text{N}^1\text{H}-$ generan señales espectrales diferentes, podemos seguir el intercambio en función del tiempo. Utilizando espectroscopia de resonancia magnética nuclear (NMR), Englander y colaboradores demostraron que el intercambio se produce efectivamente en los tres niveles de desplegamiento propuestos, incluyendo el desplegamiento global correspondiente a la reacción de la Ec. 3.2 (Englander, 1997). El fundamento de la metodología es que ^2H no tiene señal de resonancia, y la desaparición de las señales de ^1H de grupos amida indica que existe este intercambio.

Con mucha menor resolución (con NMR podemos identificar a qué aminoácido pertenece cada H intercambiado), pero también de manera experimentalmente más sencilla, podemos observar este intercambio, reflejo del proceso de desplegamiento-replegamiento: la banda amida I' ($-N^2H-$), está desplazada a menores frecuencias con respecto a la banda amida I ($-N^1H-$). El cambio es mucho más dramático para la banda amida II que se desplaza 100 cm^{-1} .

La Figura 3.5 muestra el intercambio $^1H-^2H$ en hemoglobina. En ese experimento, hemos tomado una alícuota de hemoglobina muy concentrada, la hemos diluido en 2H_2O y colocado en la celda de transmitancia. Tomamos espectros a intervalos regulares de tiempo y graficamos la desaparición de la banda amida II. El desplazamiento de las bandas amida en función del tiempo, mostrado en la Figura 3.5, es una observación directa del tránsito de la proteína por un estado desplegado. Debe notarse que el equilibrio se mantiene desplazado hacia el estado nativo ya que siempre obtenemos espectros correspondientes al estado nativo.

Diferentes condiciones funcionales, como ligandos unidos a la proteína o grupos prostéticos pueden estabilizar estados con diferentes grados de fluctuaciones. Estas diferencias pueden ser detectadas midiendo la velocidad del intercambio $^1H-^2H$ (Celej, 2003; Celej 2004).

- *Protonación de residuos laterales y detección del pH local y efectivo:* El estado de protonación de cadenas laterales de aminoácidos puede ser estudiado con espectroscopia IR. La banda de absorción IR del carboxilo ionizado se localiza en 1575 cm^{-1} . Cuando está protonado, se desplaza a 1710 cm^{-1} . El siguiente es un ejemplo de lo valiosa que es esta información.

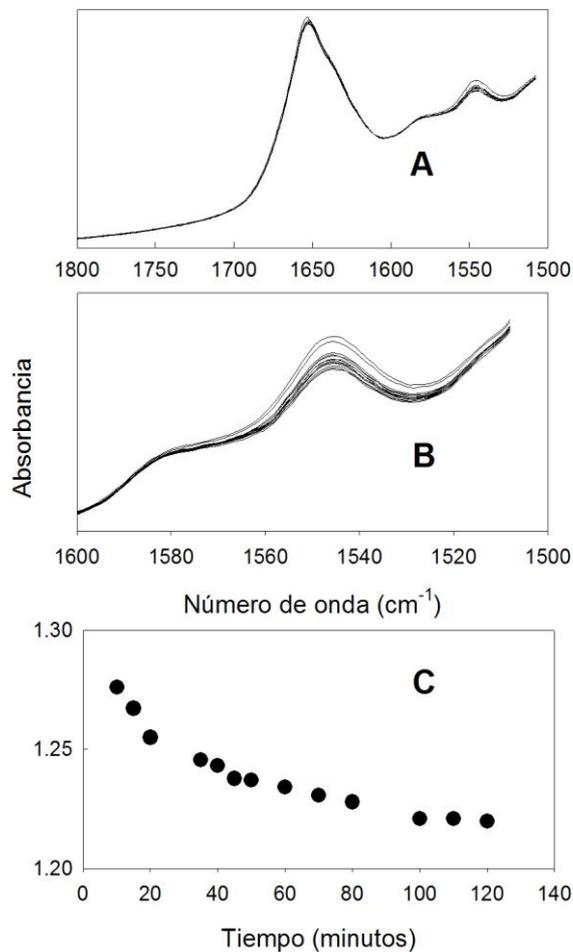


Figura 3.5. Intercambio $^1\text{H}^2\text{D}$ en hemoglobina. A, bandas amida I y amida II de hemoglobina a diferentes tiempos de intercambio. B, ampliación de escala de A. C, Absorbancia a 1546 cm^{-1} en función del tiempo de intercambio.

La utilización de sistemas artificiales de membrana lipídica ha permitido estudiar y entender aspectos fundamentales de procesos celulares (Gennis, 1988; Heimburg, 2007). Un aspecto particular son los potenciales electrostáticos en las inmediaciones de la membrana lipídica. Estos son el *potencial de transmembrana*, debido a la distribución asimétrica de iones permeables, *el potencial interno*, debido a la diferencia de constante dieléctrica entre la membrana y el medio acuoso, *el potencial dipolar*, debido a la organización de los dipolos de los componentes de la membrana y el *potencial de superficie*, debido a la presencia de cargas netas en la interfase membrana/agua. Todos tienen activa participación en procesos claves de la fisiología celular (Gennis, 1988). Prestaremos atención al potencial de

superficie, no porque sea más importante que los otros sino porque podemos evidenciar su presencia y relevancia en sistemas artificiales de membrana utilizando espectroscopia IR de proteínas.

La presencia de cargas eléctricas netas y fijas en una superficie en contacto con una solución de electrolito genera un potencial eléctrico con su máximo valor en el plano de la superficie que decae exponencialmente con la distancia. La concentración de iones sigue una distribución de potencial de Boltzmann. Si la superficie tiene cargas netas negativas, en sus inmediaciones encontraremos cationes con concentración local mayor que en el seno de la solución y los aniones estarán más diluidos. Cualquier electrolito presente en la solución debería seguir esta distribución, incluso el ión H^+ . El pH en la proximidad de una interfase cargada negativamente es menor que en el seno de la solución. Las “distancias a la interfase” o las “inmediaciones de la interfase” a que hacemos referencia están en el orden de los pocos nanómetros. En una membrana celular el potencial de superficie es del orden de 50-200 mV y la diferencia de pH es de alrededor de una unidad con respecto a la solución. Esto tiene consecuencias importantes: grupos ácidos que al pH de la solución, lejos de la interfase, están ionizados, pueden protonarse en inmediaciones de la interfase porque allí el pH es más bajo.

La Figura 3.6 muestra la titulación de la proteína α -lactalbúmina, donde medimos la intensidad de la banda debida a cadenas laterales protonadas en función del pH de la solución. Alfa-lactoalbúmina es una proteína soluble a pH = 7. Sabemos que a pH = 3.5 sufre un cambio conformacional que la hace competente para unirse a membranas lipídicas. Las curvas de titulación en solución y en presencia de membranas zwitteriónicas (sin carga eléctrica neta) se superponen. En presencia de membranas aniónicas, con una superficie de carga neta negativa, generando un potencial de superficie negativo y concentrando protones en la interfase, la curva de titulación está desplazada hacia pH más altos. Se observó además, que la unión a membranas aniónicas se produce cuando el pH de la solución es 4.5. La interpretación de estas observaciones es que cuando el pH de la solución (eje x) es 4.5, en la interfase

es 3.5. A este pH, las moléculas de α -LA cercanas a la interfase se unen irreversiblemente a la membrana y se depleta la fracción en solución.

Lo destacable de este experimento, es que hemos medido de manera directa el pH efectivo en las inmediaciones microscópicas de la proteína y la membrana, medida que es inaccesible al electrodo de vidrio.

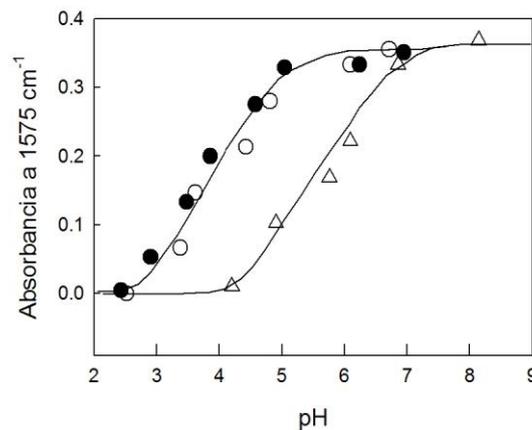


Figura 3.6. Titulación de α -lactoalbúmina. Se grafica la intensidad de la banda IR de carbonilo ionizado para la proteína en solución (●), en presencia de membranas de lípido zwitteriónico POPC (○), y del lípido aniónico POPG (Δ) en función del pH de la solución.

- *Espectroscopia diferencial.* Un truco simple nos permite acceder a lo (casi) invisible: Los cambios espectrales que hemos presentado son relativamente grandes y fáciles de detectar. La sensibilidad y reproducibilidad de un espectrómetro FTIR corriente permite, en principio, detectar cambios mucho menores. Nuestro enemigo, para mediciones sutiles, es la reproducibilidad de la línea de base, que es severamente afectada con solo desarmar y armar la celda. Existen varios sistemas donde los cambios en la proteína pueden ser generados sin manipular la celda y permiten obtener excelente información sobre mecanismos de reacción. Las reacciones enzimáticas donde los cofactores o sustratos son ADP o ATP, corren con gran ventaja. Disponemos de compuestos donde ATP o ADP están unidos covalentemente a grupos que inhiben su reactividad normal, pero pueden ser liberados por una reacción fotoquímica: un destello de luz, generalmente en la zona del visible, libera a ADP o ATP de su “caja” química y lo deja soluble y funcional. Tomemos

entonces una enzima cuyo sustrato es ATP o que requiere de ATP para actuar sobre otro sustrato. Mezclamos todos los componentes de la reacción, incluyendo al ATP “enjaulado”, en la celda del espectrómetro. Tomemos un espectro IR en las condiciones correspondientes a la proteína en el estado inicial A. Luego de iluminar la muestra con un destello de luz visible, comienza la reacción debido a que el sustrato o cofactor se hace presente y lleva a la enzima a una condición B. Restando el espectro de la condición B menos el de la condición A, se observa generalmente que toda la banda permanece constante (espectro diferencia igual a cero) salvo la aparición de algunas bandas negativas o positivas en el espectro diferencia. Estos cambios de Absorbancia se detectan aun cuando son del orden de 0.1% de la Absorbancia de la banda principal. Experimentos complementarios y un cuidadoso análisis por parte del investigador, permitirá asignar esas bandas y comprender si son debidas a cambios en estructura secundaria, protonación de cadenas laterales, rotura o formación de enlaces en sustratos y productos.

Ca²⁺-ATPasa es una enzima integral de membrana. Transporta Ca²⁺ entre el lumen del retículo sarcoplásmico y el citoplasma celular con hidrólisis de ATP. El ciclo enzimático es complejo e involucra varios estados intermediarios con diferentes grados de unión del sustrato hidrolizable y del ión transportado, agregando aún la complejidad de que tanto el ión transportado como el sustrato pueden unirse a sitios reguladores diferentes de los sitios catalíticos. Con FTIR diferencial se ha demostrado la existencia de al menos dos conformaciones para Ca²⁺-ATPasa, que involucra muy pocos residuos, a lo largo del ciclo de reacción, acompañadas por la unión o liberación de Ca²⁺ (Barth, 1994; Barth, 1996).

Bacteriorrodopsina es una proteína integral de membrana. Transforma la energía de la luz que recibe en un gradiente de protones a través de la membrana. Cuando este gradiente es disipado por una ATPasa, se sintetiza ATP. El primer paso de este mecanismo es la absorción de un fotón que genera un cambio conformacional en el cromóforo, un grupo prostético de la proteína. Los primeros estudios de este mecanismo fueron realizados utilizando FTIR diferencial (Rothschild, 1981). En este caso, el desencadenante de la

reacción en la celda del espectrómetro es justamente el flash de luz que excita al cambio conformacional. La metodología ha evolucionado y actualmente es posible detectar cambios conformacionales en función del tiempo en escalas de μs (Clair, 2012).

3.4. FTIR de Lípidos

Resuspendiendo un lípido puro, o mezclas de unos pocos componentes, en una solución acuosa, obtenemos estructuras autoagregadas con las propiedades de un cristal líquido que nos permiten estudiar aspectos esenciales de la bicapa lipídica (ver detalles en Capítulo 8). En la estructura de un fosfolípido encontramos varios grupos funcionales que pueden absorber en el infrarrojo. Lo interesante y útil es que la posición exacta de las diferentes bandas IR es sensible a propiedades globales de la estructura del autoagregado.

Propiedades de la zona hidrocarbonada.

El ejemplo más inmediato es el estado de fase de la bicapa. En estado gel, los enlaces C-C de las cadenas hidrocarbonadas se encuentran todos en conformación *trans*, el sistema está relativamente ordenado, existe poca movilidad lateral de lípidos, y estos ocupan poca área lateral en el plano de la membrana. En la transición a la fase líquido-cristalina las conformaciones predominantes son las *gauche*, aumentan los grados de libertad del sistema, aumenta la fluidez, el área y la movilidad lateral de lípidos. Las vibraciones simétricas y antisimétricas de los grupos HCH absorben en 2853 y 2924 cm^{-1} respectivamente. La posición exacta de estas bandas depende del acople de los osciladores que depende a su vez de la proporción de isómero *trans* y *gauche*. El cambio de fase de gel a líquido cristalino produce un desplazamiento de aproximadamente 2 cm^{-1} (Figura 3.7). En nuestro

laboratorio, hemos aprovechado la posibilidad de medir simultáneamente los espectros de proteína y lípido, y hemos encontrado que la conformación de una proteína unida periféricamente a la membrana cambia simultáneamente con el cambio de fase del lípido (Decca, 2007; Decca 2012).

Propiedades de la zona de grupos polares.

La zona interfásica de una membrana lipídica es un ambiente particularmente convulsionado. En pocos nanómetros pasamos de una solución acuosa homogénea, isotrópica, y de alta constante dieléctrica a una zona enriquecida en grupos $-CH_2-$ de muy baja constante dieléctrica. Todo esto, atravesando grupos carbonilos y fosfatos altamente polarizados, y con organización anisotrópica.

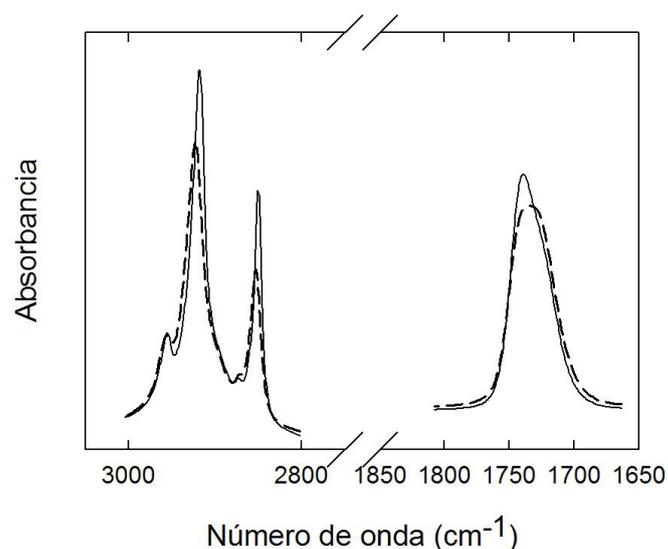


Figura 3.7. Espectros IR del fosfolípido dimiristoil fosfatidil glicerol. Línea continua: lípido en fase gel a 16 °C; Línea de puntos: lípido en fase líquido-cristalina a 34 °C.

Además de los gradientes de potencial electrostático generados en esta zona y mencionados anteriormente, encontramos una organización compleja de agua asociada a grupos polares formando redes de HB entre sí y con la membrana. Las características del agua asociada a la membrana han sido extensamente

estudiadas por el grupo del Dr. Disalvo (Disalvo, 2008), y específicamente con espectroscopia FTIR (Binder, 2007). Los espectros IR de carbonilos y fosfatos son muy sensibles a las propiedades de su entorno y representan una excelente herramienta para estudiar las características de hidratación. Por ejemplo, los espectros IR de fosfolípidos disueltos en un solvente orgánico, conformando una solución homogénea e isotrópica, muestran para el carbonilo, una única banda simétrica a 1750 cm^{-1} . Esto revela un ambiente prácticamente igual para los dos carbonilos de las uniones éster al glicerol (Blume, 1998). En cambio, organizados en bicapas en un medio acuoso, la absorción de -C=O de fosfolípidos está compuesta por dos bandas. Varios estudios han sugerido y demostrado que estas dos bandas corresponden a diferentes estados de hidratación, a diferente tipo de HB y orientación en el plano de la bicapa para los dos grupos éster. Más aún, se ha observado que la intensidad relativa de estas bandas es sensible al ordenamiento a largo alcance de autoagregados lipídicos y depende de si estos se encuentran organizados en forma de micelas o vesículas con diferentes radios de curvatura (Frías, 2009).

Agradecimientos.

El trabajo de nuestro laboratorio se realiza con subsidios de Fundación Alexander von Humboldt, CONICET, ANPCyT, SECyT UNC, y MINCyT Cba. Agradezco especialmente a Belén Decca, Soledad Celej, Verónica Nolan, Maximiliano Del Boca, Mariana Paolorossi y Vanesa Galassi por sus contribuciones a la implementación de espectroscopia FTIR en nuestro laboratorio.

Bibliografía

Byler DM, Susi H. Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. *Biopolymers* 25 469-87, 1986.

Barth A, Kreutz W, Mantele W. Changes of protein structure, nucleotide microenvironment, and Ca^{2+} -binding states in the catalytic cycle of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase: investigation of nucleotide binding, phosphorylation and phosphoenzyme conversion by FTIR difference spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta* 1194: 75-91, 1994.

- Barth, A, von Germar F, Kreutz W, Mantele W. Time-resolved Infrared Spectroscopy of the Ca²⁺-ATPase. *The Enzyme At Work. J. Biol. Chem.* 271: 30637-30646, 1996.
- Binder H. Water near lipid membranes as seen by infrared spectroscopy. *Eur. Biophys. J.* 36: 265–279, 2007.
- Blume A, Hübner W, Messner G. Fourier transform infrared spectroscopy of ¹³C = O-labeled phospholipids hydrogen bonding to carbonyl groups. *Biochemistry* 27: 8239-49, 1988.
- Clair EC, Ogren, JI, Mamaev S, Kralj JM, Rothschild KJ. Conformational changes in the archaerhodopsin-3 proton pump: detection of conserved strongly hydrogen bonded water networks. *J. Biol. Phys.* 38: 153-68, 2012.
- Celej MS, Montich GG, Fidelio GD. Protein stability induced by ligand binding correlates with changes in protein flexibility. *Protein Sci*, 12: 1496-506, 2003.
- Celej MS, Montich GG, Fidelio GD. Conformational flexibility of avidin: the influence of biotin binding. *Biochem Biophys Res Commun.* 325; 922-927, 2004.
- Cortez LM, Avila CL, Bugeau CM, Farías RN, Morero RD, Chehín RN. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase tetramer dissociation and amyloid fibril formation induced by negatively charged membranes. *FEBS Lett.* 584: 625-30, 2010.
- Decca MB, Perduca M, Monaco HL, Montich GG. Conformational changes of chicken liver bile acid-binding protein bound to anionic lipid membrane are coupled to the lipid phase transitions. *Biochim Biophys Acta.* 1768: 1583-1591, 2007.
- Decca MB, Galassi VV, Perduca M, Monaco HL, Montich GG. Influence of the lipid phase state and electrostatic surface potential on the conformations of a peripherally bound membrane protein. *J. Phys. Chem. B* 46: 15141-50, 2010.
- Disalvo EA, Lairion F, Martini F, Tymczyszyn E, Frías M, Almaleck H, Gordillo GJ. Structural and functional properties of hydration and confined water in membrane interfaces. *Biochim. Biophys. Acta* 1778: 2655–2670, 2008.
- Englander SW, Mayne L, Bai Y, Sosnick TR. Hydrogen exchange: the modern legacy of Linderstrøm-Lang. *Protein Sci.* 6: 1101-1109, 1997.
- Frías MA, Disalvo EA. Configuration of Carbonyl Groups at the Lipid Interphases of Different Topological Arrangements of Lipid Dispersions. *Langmuir* 25: 8187–8191, 2009.
- Gennis, RB. Biomembranes. Molecular Structure and Function. Springer. Berlin, 1988.
- Heimburg T. Thermal Biophysics of Membranes. Wiley, Berlin, 2007.
- Kauppinen JK, Moffatt DJ, Mantsch HH, Cameron DG. Fourier self-deconvolution: a method for resolving intrinsically overlapped bands. *App. Spectrosc.* 35: 271-276, 1981.
- Krimm S, Bandekar J. Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins. *Adv. Protein. Chem.* 38: 181-364, 1986.
- Nolan V, Parduca M, Monaco HL, Maggio B, Montich GG. Interactions of chicken liver basic fatty acid binding-protein with lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1611: 98-106, 2003.
- Paolorossi M, Montich GG. Conformational changes of β 2-human glycoprotein I and lipid order in lipid-protein complexes. *Biochim. Biophys. Acta* 1808: 2167-2177, 2011.
- Rothschild KJ, Zagaeski M, Cantore WA. Conformational changes of bacteriorhodopsin detected by Fourier transform infrared difference spectroscopy. *Biochim. Biophys. Res. Comm* 103483-103489, 1981.

Skoog D, Holler FJ, Nieman TA. Principios de Análisis Instrumental. Quinta Edición (Capítulo 17). McGraw Hill, New York, 2001.

Torres-Bugeau CM, Ávila CL, Raisman-Vozari R, Papy-Garcia D, Itri R, Barbosa LR, Cortez LM, Sim VL, Chehín RN. Characterization of heparin-induced glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase early amyloid-like oligomers and their implication in α -synuclein aggregation. *J. Biol. Chem.* 287: 2398-409, 2012.

CAPÍTULO 4

DICROÍSMO CIRCULAR DE PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS

Lucrecia María Curto, Gabriela Elena Gómez y José María Delfino

4.1. La Naturaleza de la Luz Polarizada

La luz presenta una naturaleza dual de onda-partícula. Como onda electromagnética se la describe por la variación sinusoidal en el tiempo y a lo largo de la dirección de propagación de un campo eléctrico (E). Asociada a ésta, se describe la variación del campo magnético (B) en un plano perpendicular. Esta onda puede ser descripta por su amplitud (módulo máximo que alcanza el vector eléctrico) y por su frecuencia ν (número de oscilaciones del campo por unidad de tiempo). El período de una onda es el tiempo mínimo necesario para que el campo y su derivada alcancen los mismos valores en un punto fijo en el espacio (es la inversa de la frecuencia, $1/\nu$). La longitud de onda λ es la distancia lineal entre puntos equivalentes de ondas sucesivas, y equivale al producto entre c y el período, siendo c la velocidad de propagación de la luz en el vacío. Dada la constancia de c , el período y la longitud de onda quedan determinados para una onda de una dada frecuencia ν . Para todo el tratamiento que sigue, basta considerar solamente la evolución del vector eléctrico E .

En la luz natural (no polarizada), el vector E oscila en todos los planos posibles que incluyen la dirección de propagación de la onda (Figura 4.1). Por el contrario, si se selecciona un único plano de oscilación, obtendremos luz linealmente (o planarmente) polarizada (LLP). Intuitivamente, se puede concebir otra clase de luz polarizada en la que el vector E rota a lo largo de la dirección de propagación. Esta última luz se denomina circularmente polarizada (LCP) y existirán dos formas opuestas no superponibles de acuerdo con su

sentido de giro: LCP derecha e izquierda (se indicarán estas dos clases de luz por los subíndices R y L, de sus iniciales en inglés). Nótese que -a diferencia de la LLP- un polarizador lineal interpuesto frente a la onda no podrá distinguir entre luz no polarizada y LCP.

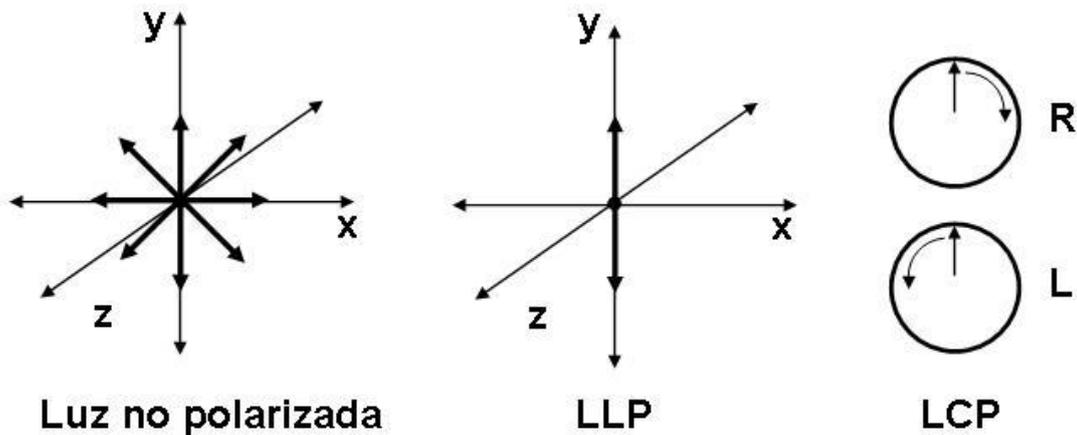


Figura 4.1. Naturaleza de la luz polarizada. Adaptada de Hammes, 2005.

En un experimento clásico de polarimetría, se utiliza LLP monocromática y se mide la desviación angular del plano de oscilación (α) luego de la interacción de la luz con una muestra de una sustancia asimétrica (ver, por ejemplo, Figura 4.2 en Hammes, 2005). Esta magnitud guarda una relación lineal con la concentración de tal sustancia (c) y con el paso de luz (l): $\alpha = [\alpha]_{\lambda T} cl$. La constante $[\alpha]_{\lambda T}$ es propia de tal sustancia para luz de la longitud de onda λ utilizada y a la temperatura T de la medición.

4.2. La Relación entre la Luz Plana y Circularmente Polarizada

Para entender intuitivamente la relación entre LLP y LCP analizaremos las dos afirmaciones siguientes. Para ello, nos valdremos de dos modos de representación (oblicuo o en perspectiva y frontal, Figura 4.2).

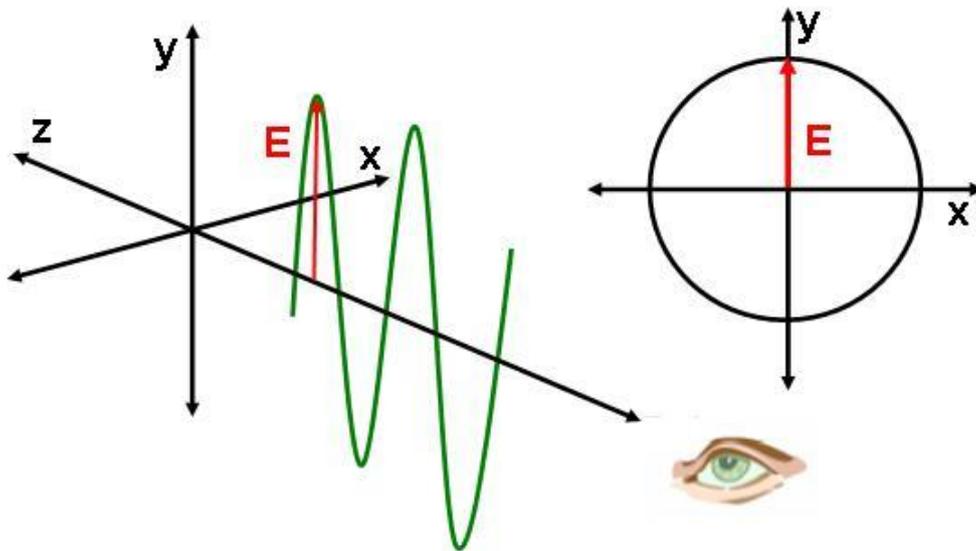


Figura 4.2. Representación en perspectiva (izquierda) y frontal (derecha) de un haz de luz linealmente polarizado.

1. Un haz de luz linealmente polarizado (LLP) resulta de la suma de dos haces circularmente polarizados (LCP) de signo opuesto (R y L) oscilando en fase (esto es, inicialmente ambos vectores coinciden en su posición). Este enunciado puede comprenderse fácilmente utilizando el modo de representación frontal si se considera que en un instante arbitrario, el vector E_R habrá avanzado un ángulo ϕ y el vector E_L , un ángulo $-\phi$. Luego de sumar ambos vectores por la regla del paralelogramo resultará LLP, y se verificará que el vector resultante siempre oscilará en el plano vertical yz . ¿Cuál sería el resultado en cambio, si dichos haces no estuvieran en fase? En este caso, el desfase inicial $\Delta\phi$ causará que en el mismo instante arbitrario uno de los vectores, por ejemplo E_R , se encuentre en la posición angular $\phi + \Delta\phi$, mientras que el otro, en $-\phi$. De este modo, la suma resultará también en LLP, pero puede demostrarse a partir de consideraciones geométricas que el plano de oscilación se habrá inclinado respecto del plano vertical un ángulo $\alpha = \Delta\phi/2$. Veremos más adelante que tal desfase es precisamente lo que ocurre a causa de la interacción de la LLP con la materia asimétrica.

2. La luz circularmente polarizada (LCP) resulta de la suma de dos haces de LLP perpendiculares entre sí y desfasados un cuarto de onda $+\frac{1}{4} \lambda (= +\pi/2)$. Este enunciado puede comprenderse si se emplea el modo de representación

oblicuo. Se dibujan sendos haces de LLP en los planos xz e yz , tal que se encuentren desfasados $+\frac{1}{4}\lambda$ en el origen. Así, el módulo de E de un haz de LLP alcanzará el valor de la amplitud en el punto en que el otro se anule. Como tal, será sencillo representar la suma de ambos vectores en esos puntos, luego de lo cual resultará obvio que el vector resultante describa el movimiento circular característico de la LCP. ¿Qué pasaría si el desfasaje fuese $-\frac{1}{4}\lambda$ ($= -\pi/2$)? Nótese aquí que dependiendo de cual haya sido el signo del desfasaje inicial ($\pm\frac{1}{4}\lambda$) obtendremos LCP de sentido derecho (R) o izquierdo (L). Así, el vector E de la luz resultante procederá hacia el observador rotando como una hélice en sentido horario (R) o antihorario (L). En cualquier caso, al cabo de avanzar una distancia igual a λ , el vector E adopta nuevamente la posición inicial. Por último, ¿cómo sería el haz resultante si ambos haces estuviesen en fase o desfasados media onda $1/2\lambda$ ($= \pi$)? En estos casos, ambas componentes de LLP alcanzarán valores máximos y nodos en los mismos puntos, de modo que la onda resultante será plana y oscilará en los planos sz o tz , donde s o t representan rectas contenidas en el plano xy que pasan por el origen a $+45^\circ$ o -45° respecto del eje y .

Como conclusión general de ambos ejercicios surge que *la LLP puede entenderse a partir de la suma de componentes de LCP, y viceversa*. Este punto resulta de particular importancia para comprender la función de la *celda de Pockels*, componente fundamental de un espectropolarímetro (ver Figura 4.6). Se encuentran animaciones didácticas de estos y otros ejercicios en el sitio www.enzim.hu/~szia/cddemo/ (consultado el 6 de agosto de 2013) del físico húngaro András Szilágyi.

4.3. La Interacción de la Luz Polarizada con la Materia

Al interaccionar con la materia, la luz puede dar origen a los fenómenos de dispersión, absorción, difracción, reflexión o polarización. Consideremos en primer lugar el caso de un haz incidente de LLP (en el plano arbitrario yz) sobre un *material asimétrico*. Aquí, cada uno de los componentes de LCP podría

sufrir *un diferente cambio de velocidad* en ese medio a consecuencia de la interacción. La medida física de tal cambio de velocidad está dada por el índice de refracción n (definido como el cociente de la velocidad de la luz en el vacío c y aquella en el medio c' : c/c' , donde $c' < c$). Así, se podrán definir índices para cada haz de LCP, que se denominarán n_L y n_R , y se cumplirá que $n_L \neq n_R$. ¿Cuál será el resultado observable de cumplirse tal condición? Naturalmente surge que el desfasaje $\Delta\phi$ -que describe el cambio de posición angular del vector- es consecuencia de tal cambio de velocidad, de modo que la luz resultante seguirá siendo LLP, pero su plano de oscilación se habrá inclinado un cierto ángulo $\alpha (= \Delta\phi/2)$ respecto del plano yz. Este ángulo α es aquél que se mide en un experimento de polarimetría (ver antes). Nótese que -por el contrario- el módulo del vector E no se altera, esto es, *no existe cambio en la intensidad* del haz al cabo de atravesar la muestra. En otras palabras, *no se experimenta absorción* del haz de luz. En forma general, la medida del ángulo α (o mejor dicho, la magnitud normalizada $[\alpha]_T$) a cada longitud de onda λ se denomina espectro de dispersión óptica rotatoria (ORD: Optical Rotatory Dispersion).

Consideremos ahora una situación diferente, en la que el sistema asimétrico sea capaz de *absorber diferencialmente cada componente de LCP*. Esto puede enunciarse como sigue.

3. *Un haz de luz linealmente polarizado (LLP) en que uno de los componentes de LCP (R o L) es absorbido diferencialmente por la muestra resultará en un haz de luz elípticamente polarizado.* Por razones de simplicidad, supongamos provisoriamente aquí que sólo ocurre absorción diferencial y no cambio de velocidad (aunque en realidad ambos fenómenos puedan darse simultáneamente, ver más adelante). Esta situación puede formalizarse con la condición $\varepsilon_R \neq \varepsilon_L$, donde ε_R y ε_L son los coeficientes de extinción para cada componente de LCP. ¿Cuál será la consecuencia sobre el módulo del vector E de tal fenómeno de absorción diferencial? Puede deducirse que si se cumple tal condición, entonces a partir de la ley de Lambert y Beer $A = \varepsilon cl$, la definición de Absorbancia $A = -\log(I/I_0)$ y la relación de la intensidad de luz I con la

amplitud de la onda $I \propto |E|^2$, surge que se *modificará diferencialmente la magnitud del módulo del vector eléctrico E*. Sumando nuevamente ambas componentes de LCP resulta *luz elípticamente polarizada* (LEP) (Figura 4.3). Aquí, el vector eléctrico evoluciona en el tiempo (o en el espacio) variando su módulo y posición tal que se describa una elipse.

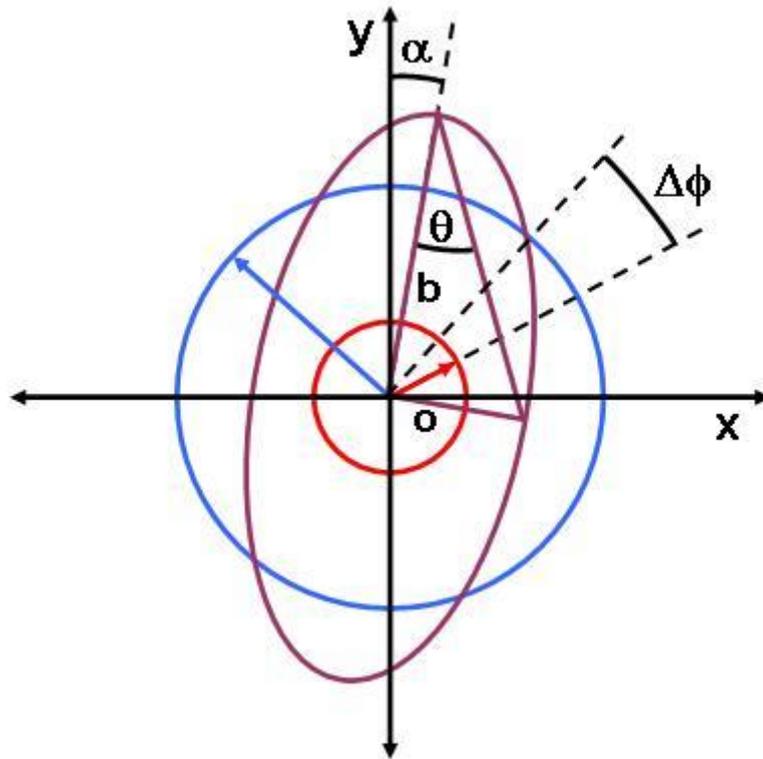


Figura 4.3. Representación frontal de luz elípticamente polarizada.

¿Cuál será la orientación del eje mayor de la elipse? Se advierte que el eje mayor de la elipse está incluido en el plano-*yz* de la LLP incidente. ¿Cuál sería el resultado si además ocurriese desfase entre los componentes de LCP (tal como está representado en la Figura 4.3)? Baste para ello cambiar la orientación angular de uno de los vectores componentes de modo que la resultante será una elipse cuyo eje mayor se encontrará inclinado respecto de la vertical. Esta última es la situación más general que resultará de la interacción de la LLP con la muestra de material asimétrico. Nuevamente, este fenómeno se describe mediante animaciones en el sitio www.enzim.hu/~szia/cddemo/ (consultado el 6 de agosto de 2013).

El fenómeno de *absorción diferencial* de LCP se define como *dicroísmo circular* (CD por *Circular Dichroism*). La magnitud del fenómeno puede cuantificarse de dos modos equivalentes. Uno es a partir de la medida del ángulo theta (θ) llamado *elipticidad*, representado como el ángulo (habitualmente medido en miligrados) definido entre el cateto mayor (semieje mayor b) y la hipotenusa del triángulo rectángulo interior a la elipse (por definición: $\theta = \arctg(o/b)$, donde o es la medida del cateto o semieje menor). Alternativamente, la medida de CD puede definirse como la magnitud $\Delta\varepsilon (= \varepsilon_R - \varepsilon_L)$ denominado *coeficiente de extinción diferencial*, derivado precisamente de la versión diferencial de la ley de Lambert y Beer: $\Delta A = \Delta\varepsilon cl$, donde $\Delta A = A_R - A_L$ y -como antes- la concentración de la sustancia es c y el paso de luz es l . Esta ley encuentra su correlato en la siguiente expresión: $\theta = [\theta]cl$, de uso generalizado en el ambiente bioquímico (ver más adelante). Valga destacar que puede considerarse la LCP como la forma más general de luz polarizada, pues en los extremos incluye como casos especiales la LCP (si $\theta = 45^\circ$, de modo que $o = b$) y la LLP (si $\theta = 0^\circ$, esto es, $o = 0$).

La medida del ángulo θ (o mejor dicho, la magnitud normalizada $[\theta]_\tau$) a cada longitud de onda λ se denomina espectro de dicroísmo circular (CD). A partir de consideraciones geométricas que incluyen las definiciones de elipticidad θ y Absorbancia A , y la relación $I \propto |E|^2$ ya vista entre la intensidad de luz y la amplitud de la onda, puede demostrarse que se cumple la relación $[\theta] = 3300\Delta\varepsilon$ a valores bajos de ángulo θ , donde resulta válida la aproximación de Taylor (Campbell, 1984). Las unidades de $\Delta\varepsilon$ y $[\theta]$ son $\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$ y $^\circ\text{cm}^2\text{dmol}^{-1}$, respectivamente. Más adelante trataremos con mayor detalle estas últimas unidades para el caso de péptidos y proteínas.

Desde un punto de vista conceptual es importante anticipar que -a pesar de que no resulte obvio a partir de una representación geométrica como la de la Figura 4.3 - existe sin embargo una relación biunívoca entre los espectros de ORD y de CD, esto es, entre las magnitudes angulares α (que mide la inclinación del eje mayor de la elipse) y θ (que mide la forma de la elipse). Tal

como se verá más adelante, ambos son *manifestaciones diferentes de un mismo fenómeno físico*, que es el de *la interacción de la luz polarizada con la materia asimétrica* (habitualmente constituida por *moléculas quirales*). En ORD, esta interacción se evalúa (de modo *dispersivo*) a partir del *cambio de velocidad* (índice de refracción) de los haces de LCP, mientras que en CD, la detección (en modo de *absorción*) consiste en evaluar el *cambio de amplitud* (coeficiente de extinción) de estos haces.

4.4. Las Condiciones Físicas para que Ocurra el Fenómeno de CD

Se puede definir un momento dipolar para cada transición electrónica. El dipolo que caracteriza la transición absorberá radiación oscilando en simpatía con la radiación aplicada. Esta oscilación presentará una cierta dirección asociada con ella, de modo que sólo aquellos componentes de la radiación que se encuentren *en la misma dirección del momento dipolar* causarán la transición. Efectivamente, la probabilidad de que ocurra este fenómeno será proporcional al coseno cuadrado del ángulo entre la dirección de la onda aplicada y la dirección del momento de la transición (Campbell, 1984).

Para que pueda observarse el fenómeno de CD, es preciso que se cumplan necesariamente dos condiciones: la molécula en cuestión (i) debe *absorber luz*, de modo que se define un *momento eléctrico μ* asociado a la transición electrónica y (ii) debe *ser asimétrica*, de modo que exista además un *momento magnético m* asociado a la transición. Esto último implica que se verifique en la transición *un desplazamiento neto circular de cargas* (Figura 4.4). De este modo podría visualizarse *una transición ópticamente activa* como un movimiento de cargas conforme a *un camino helicoidal*, resultante de un desplazamiento lineal (traslación) compuesto con un movimiento circular neto (rotación) de cargas entre los orbitales fundamental y excitado. Dado que toda hélice presenta un sentido único de giro (derecho o izquierdo), aquí reside la base que permite detectar transiciones ópticamente activas (Campbell, 1984).

A nivel molecular, el fenómeno podría representarse visualmente a partir de la asimetría de forma del orbital excitado respecto del orbital fundamental.

Así entonces, no toda transición electrónica será ópticamente activa, pues si la molécula no presentare asimetría, el momento magnético será nulo ($m=0$). En otras palabras, que una molécula absorba energía electromagnética no implica necesariamente que presente CD. Contrariamente, aunque la molécula sea asimétrica, si ésta no absorbiere luz, el momento eléctrico será nulo ($\mu=0$) y por esta obvia razón, tampoco presentará CD. En términos formales, el *producto escalar* de ambos momentos debe resultar en un valor distinto de cero (Cantor, 1980). Un tratamiento más detallado de los aspectos teóricos se encuentra en Rodger & Nordén (Rodger, 1997).

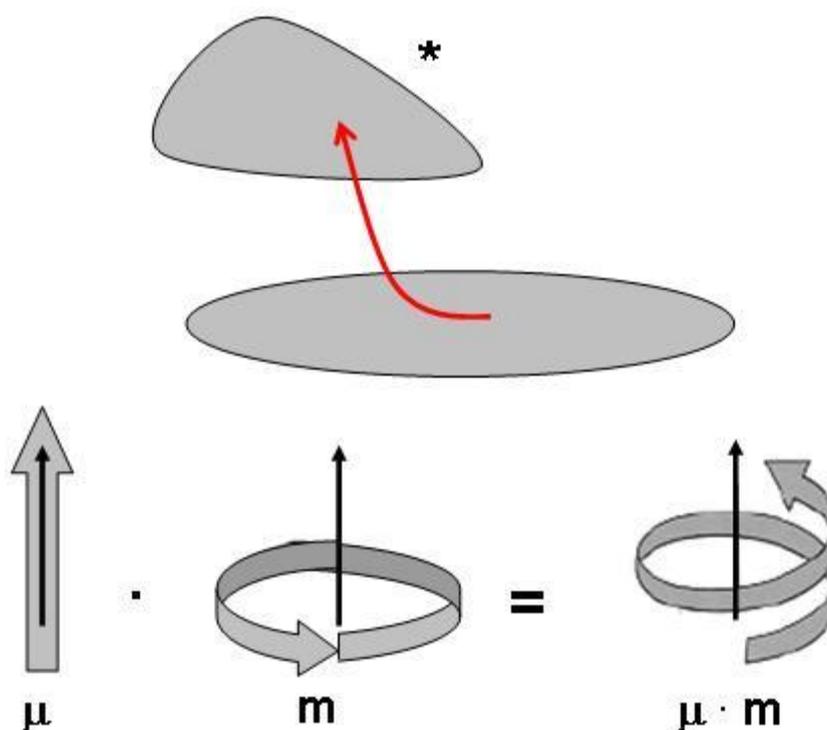


Figura 4.4. Condiciones necesarias para que se pueda observar el fenómeno de CD. Adaptada de Cantor & Schimmel, 1980.

En la práctica, ¿en qué caso se darán las condiciones para que ocurra CD? Cada vez que la molécula cumpla con la presencia de cromóforos quirales (aquellos que no puede superponerse con su imagen especular) en su estructura. Nótese, sin embargo, que esta asimetría puede provenir (i) de la propia estructura del cromóforo, o (ii) de su cercanía a un centro quiral, ya sea

por unión covalente, o (iii) por ubicación del cromóforo en un ambiente asimétrico, aunque pueda tratarse aún de una unión no covalente. En estas consideraciones reside el valor y la utilidad de la técnica de CD en química orgánica y bioquímica. Trataremos más adelante con ejemplos emblemáticos en el campo de la ciencia de péptidos y proteínas que ilustran estos conceptos.

4.5. El Efecto Cotton, Según se Manifiesta por ORD o CD

El efecto Cotton es la manifestación del fenómeno de interacción de la luz polarizada con una molécula quiral. Ya vimos que este fenómeno puede ser medido por ORD o por CD en un rango de longitudes de onda alrededor de la banda de absorción de la sustancia.

Debe destacarse que existe una relación matemática derivada de consideraciones cuánticas que relaciona ambas medidas. Esta conversión de un espectro de ORD en uno de CD y viceversa se formaliza en las transformadas de Kronig-Kramers:

$$[\alpha(\lambda)] = \frac{2}{\pi} \int_0^{\infty} \frac{[\theta(\lambda')]\lambda'}{\lambda^2 - \lambda'^2} d\lambda' \quad \text{Ec. 4.1}$$

$$[\theta(\lambda)] = -\frac{2}{\pi\lambda} \int_0^{\infty} \frac{[\alpha(\lambda')]\lambda'^2}{\lambda^2 - \lambda'^2} d\lambda' \quad \text{Ec. 4.2}$$

De la primera ecuación surge que pueda conocerse un valor de ángulo de rotación α a una dada λ , si se integra convenientemente según la primera transformada el espectro de CD, esto es, los valores de θ en todo el rango de longitudes de onda λ . Inversamente, de la segunda relación surge que pueda calcularse el valor particular de elipticidad θ a una dada λ , si se integra según la segunda transformada el espectro correspondiente de ORD, esto es, los valores de α en todo el rango de longitudes de onda λ . De esta precisa relación surge que la información derivada de cada una de estas técnicas sea redundante, de modo que baste medir uno de los espectros para así conocer al

otro por cálculo. Gráficamente, para una transición dada estas relaciones se ilustran en la Figura 4.5.

Ante todo debe destacarse que compuestos enantioméricos presentarán espectros (ORD y CD) que serán imágenes especulares uno del otro. En cuanto a su forma, adviértase que el espectro de ORD se extiende a lo largo de un rango mayor de λ y presenta dos “alas” antisimétricas (de signo opuesto) que se unen en un punto central (λ_0) donde se anula el valor de α . Contrariamente, el espectro de CD para una dada transición presenta un único signo (positivo o negativo) y alcanza un valor máximo (o mínimo) a λ_0 . A ambos lados, el espectro de CD se extingue en un rango estrecho de λ . A $\lambda = \lambda_0$, el valor de elipticidad θ alcanza su valor absoluto máximo, esto es, la luz elíptica resultante presentará la máxima magnitud posible del semieje menor a , manteniendo alineado su semieje mayor b con el plano de la LLP incidente. Por otro lado, nótese que a $\lambda > \lambda_2$ y $\lambda < \lambda_1$ no existirá CD, esto es, la luz transmitida será plana, pero ese plano estará desviado hacia uno u otro lado respecto del plano de propagación yz de la LLP incidente, tal como muestra el espectro de ORD. Esta característica permite que se puedan efectuar mediciones de sustancias quirales (por ejemplo carbohidratos) por polarimetría a longitudes de onda más altas, esto es, alejadas de la zona donde ocurre el efecto Cotton. Así es posible lograr medidas confiables por polarimetría aún en regiones situadas por fuera del rango de absorción del compuesto, donde por ende no podrán observarse bandas de CD.

Hoy en día, CD se usa más frecuentemente que ORD debido a la disponibilidad de equipamiento superior y más sofisticado para su determinación (por la naturaleza alternada del modo de detección de la señal, ver más abajo), así como también por las características propias de las señales: se observan bandas más agudas y de un solo signo en el caso de CD. Esta característica redundante en un menor “spread”, lográndose de este modo un aumento de la resolución de los espectros y facilitándose así la tarea de asignación de bandas.

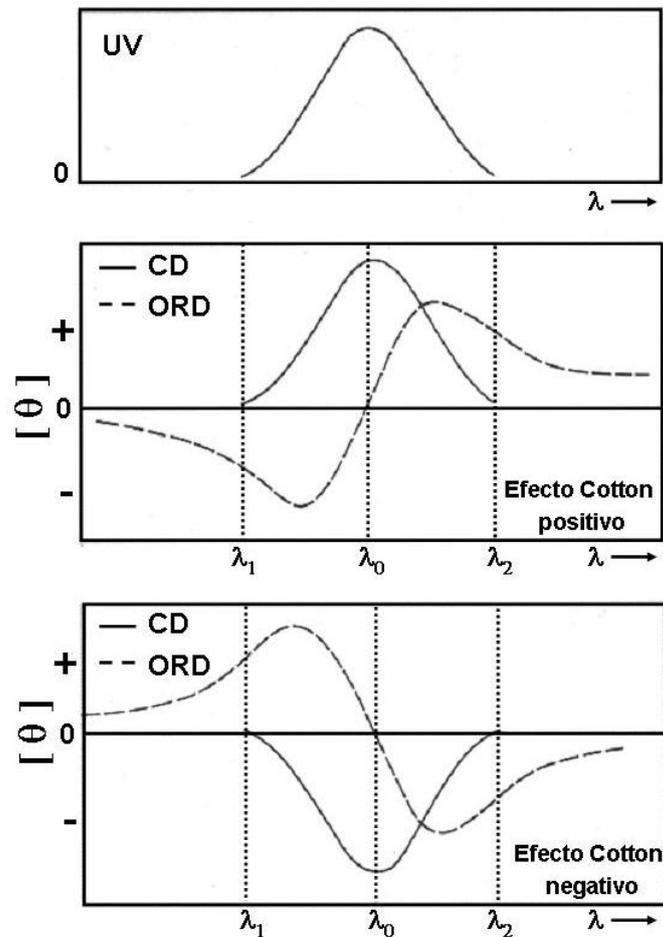


Figura 4.5. Efecto Cotton. Adaptada de Cantor & Schimmel, 1980.

4.6. La Instrumentación y la Práctica para la Medición de CD

El instrumento destinado a la medición de CD se denomina espectropolarímetro. Algunos fabricantes reconocidos de esta clase de instrumentos son Jasco (Japón), AVIV (Estados Unidos) y Applied Photophysics (Reino Unido).

El procedimiento descrito a continuación es el método de modulación, más comúnmente utilizado en aparatos comerciales, aunque existen otros como el de sustracción directa y el elipsométrico (Johnson, 1996).

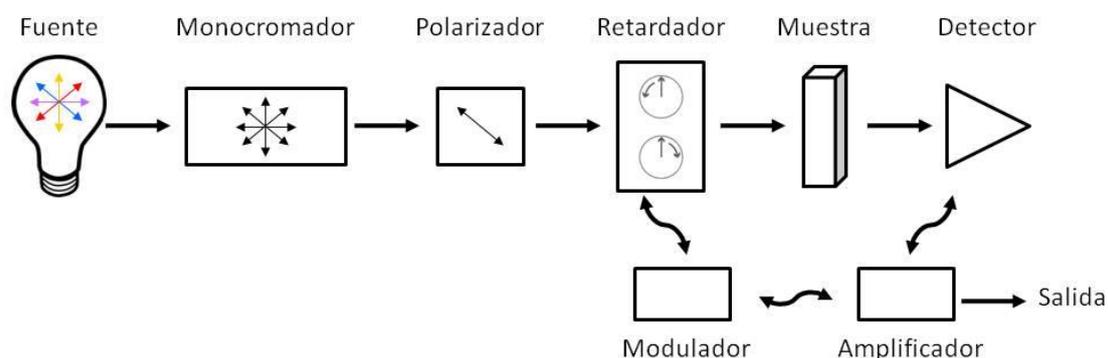


Figura 4.6. Componentes de un espectropolarímetro.

En el diagrama en bloques del instrumento (Figura 4.6) se representa en primer lugar la *fente de luz*, generalmente una lámpara de Xe, que emite luz intensa en un rango amplio 200-900 nm (opcionalmente extendido a la zona infrarroja cercana). Desarrollos más recientes hacen uso de la muy intensa radiación disponible en los sincrotrones para medidas de CD (Wallace, 2009), posibilidad que permite lograr medidas confiables en el rango ultravioleta denominado VUV (*vacuum UV*, $\lambda < 200nm$). Luego, se selecciona luz de cada longitud de onda por pasaje a través de un *monocromador* (prisma o red de difracción). A continuación, la luz atraviesa un *polarizador lineal* (que entrega LLP), antes de incidir sobre el *retardador oscilante de $\frac{1}{4} \lambda$* (modulador fotoelástico o celda de Pockels). Éste es un dispositivo electro-óptico que produce birrefringencia como consecuencia de la aplicación de un campo eléctrico oscilante generado por el *modulador*. Más precisamente, el campo eléctrico aplicado es de naturaleza alternante (CA) a una frecuencia aprox. 50 kHz de modo que -en función del signo del voltaje aplicado- un material piezoeléctrico producirá una vibración mecánica sobre el elemento óptico (usualmente cuarzo) que cambiará alternadamente su índice de refracción. La magnitud del voltaje CA determina la longitud de onda para la cual el dispositivo opera como retardador de $\frac{1}{4} \lambda$ (Johnson, 1996). Recuérdese en este punto la afirmación 2 discutida anteriormente que establece el modo por el cual la LLP se convierte en LCP. Así entonces, la luz que emerge de este dispositivo resulta en LCP de sentido izquierdo o derecho (dependiendo del voltaje aplicado a la celda de Pockels)

que incide sobre la *muestra*, pudiendo ser absorbidas de manera diferencial. Un *fotodetector* eficiente y muy sensible (tubo fotomultiplicador PMT) registra como una señal eléctrica la luz que le llega en función del tiempo. Esta señal incluirá un componente de CA (usualmente muy pequeño en magnitud) que será procesado por el *amplificador (lock-in amplifier)*. Para reducir el ruido, el amplificador utilizará la misma frecuencia que la modulación aplicada al retardador para procesar la señal proveniente del PMT. Así la magnitud de la señal CA será función de la diferencia entre las intensidades transmitidas de los haces derecho e izquierdo ($\propto I_R - I_L$) y la fase será sensible al signo de la señal de CD (positivo o negativo). Finalmente, la salida será la medida de la elipticidad θ (en miligrados, o su equivalente ΔA).

Si luego del pasaje a través de la muestra, cada componente de LCP no es absorbido o es absorbido en la misma medida, la combinación resultante regenerará LLP en el plano original. En cambio, si uno de los componentes de LCP se absorbe en mayor medida que el otro, la radiación resultante será elípticamente polarizada (LEP). Sin embargo, adviértase que la naturaleza de la detección en CD es muy diferente de la de un polarímetro (ORD) y que el método de modulación no evalúa directamente la naturaleza elíptica de la luz transmitida.

En general, los valores de θ medidos en la práctica son muy pequeños. En este sentido, en la mayoría de los trabajos biológicos es usual observar valores que alcanzan sólo ~ 10 miligrados. Utilizando la relación $\Delta A = \theta/33$ (similar a la vista antes), una simple cuenta nos revela que la *diferencia de Absorbancia de cada haz* está en el orden de 0.0003, una medición imposible para cualquier espectrofotómetro estándar. De aquí surge inmediatamente la necesidad de (i) amplificar la señal, acción que conduce inevitablemente a aumentar el ruido, y (ii) contar con procedimientos de detección de naturaleza alternante como el descrito más arriba. Además, para aumentar la relación señal/ruido (S/N) se recurre al promediado temporal en la colecta de datos por elección de una adecuada combinación entre la *constante de tiempo* de respuesta del equipo y la *velocidad de barrido*, dos parámetros de medición inversamente relacionados. Esto es, si se decide aumentar la primera para lograr mayor

relación S/N, se deberá obligatoriamente reducir (hacer más lenta) la segunda. Por otro lado, usualmente se promedian barridos y se aplican *a posteriori* métodos de suavizado digital (por ejemplo, filtros de Savitzky-Golay o de Fourier). Resulta ahora claro que se deba prestar atención especial a las condiciones experimentales de colecta de datos y al post-procesamiento de los mismos tal que se asegure la validez de las mediciones.

Por otro lado, es crucial que el espectropolarímetro sea calibrado regularmente. Particularmente, esto es definitorio para evaluar si ha ocurrido daño a la óptica, hecho que se traduce en errores en la intensidad y posición de los picos. Para este fin se utiliza habitualmente una solución acuosa de ácido (+)-10-canforsulfónico (CSA) o su sal de amonio por ser menos higroscópica (Takakuwa, 1985). Este compuesto permite una calibración en dos puntos ubicados en zonas críticas para la medición habitual con péptidos o proteínas. Específicamente, la sal de amonio de CSA muestra una banda positiva a 290,5 nm ($[\theta]_{290,5} = +7910 \text{ }^\circ\text{cm}^2\text{dmol}^{-1}$) y una banda negativa a 192 nm ($[\theta]_{192}/[\theta]_{290,5} = -2.03$).

Tal como se indicara en la sección anterior, dado que CD es una medida de una diferencia de absorción de luz, sólo se puede observar el fenómeno en la zona donde ocurren la(s) banda(s) de absorción. En cambio ORD, por tratarse de un fenómeno relacionado con el índice de refracción, como tal puede ser mensurable a longitudes de onda alejadas del máximo de absorción (Bloemendal, 1995). Esto puede resultar ventajoso en casos (por ejemplo, si el compuesto absorbe luz en zonas de difícil medida), pero no en general, pues obliga a evaluar la suma pesada del efecto de *todas las bandas de CD* para lograr una correcta interpretación. Además, tal como se vio antes, la detección por CD es técnicamente superior -y por ende, más sensible- que la de ORD. Así las cosas, ORD se usa sólo ya en raras ocasiones para el estudio de la estructura proteica. Antiguamente, el espectropolarímetro (por ejemplo, el modelo J-20 de Jasco) permitía la medida independiente -en canales ópticos separados- de los espectros de ORD o de CD. Hoy día, un espectropolarímetro moderno (por ejemplo, el modelo J-810 de Jasco) mide sólo CD y -si fuere

necesario- el *software* calcula el espectro de ORD mediante la transformación de Kronig-Kramers (ver sección anterior).

Desde el punto de vista operativo es muy importante asegurar un flujo alto y continuo de gas nitrógeno a través de la óptica del aparato y aún en la cámara de medición (especialmente para medidas por debajo de 200 nm). De otro modo, la generación de ozono a partir del oxígeno del aire puede dañar irreversiblemente los espejos del instrumento. Por otro lado, debe procurarse transparencia para todo aquel componente en la muestra que no sea la molécula a medir, esto es, los *buffers* y aditivos no deben absorber luz en el rango de medida (boratos o fosfatos son de elección, Tris es tolerable), o si lo hacen, deben mantenerse a la menor concentración posible (DTT o β -mercaptoetanol <1 mM, EDTA <0,1 mM). De este modo, la Absorbancia total de la muestra es un parámetro crítico a tener en cuenta para la calidad de los datos. Sólo se debe coleccionar el espectro en el rango de λ donde el detector (PMT) sea capaz de medir confiablemente la señal, eliminando toda región (típicamente hacia las menores λ) en que el voltaje aplicado al PMT supere el valor máximo permitido por causa de la excesiva absorción de la muestra. Esto significa que un número insuficiente de fotones lleguen al PMT, de modo que se comprometa la exactitud de la señal de CD medida.

Resulta fundamentalmente crítico determinar con precisión la concentración de la molécula de interés en la muestra. De otro modo, toda comparación entre muestras será inútil. En el caso de proteínas, deben extremarse los cuidados para lograr una medida confiable de la concentración a partir de la Absorbancia verdadera, libre de la influencia de material disperso que interfiera significativamente en la medida. Dada la conocida tendencia de muchos péptidos y proteínas a agregarse, causando que una solución verdadera se convierta en una suspensión coloidal que disperse luz, ésta es quizás una de las principales causas de error en las mediciones. No obstante lo anterior, si se logra saber con exactitud la concentración de la molécula, es posible efectuar medidas de CD aún en muestras que dispersen significativamente la luz, por ejemplo proteínas de membrana incluidas en micelas o liposomas. En este sentido, resulta aceptable la presencia de detergentes como MOPS, Lubrol,

SDS u otros. La relación S/N alcanza un valor óptimo en el rango de Absorbancia 0,6-1,2, pero para la muestra de interés resulta a menudo suficiente un valor de 0,3. Finalmente, para evaluar cualquier deriva (*drift*) instrumental es buena práctica intercalar blancos de solvente y repetir muestras de referencia entre las muestras incógnita.

4.7. El Valor de CD para Investigar la Conformación de Péptidos y Proteínas

La técnica de CD ha sido ampliamente utilizada para investigar aspectos de la conformación de péptidos y proteínas (Fasman, 1996). La preparación de la muestra y la medida misma no es mucho más compleja que la de una determinación espectrofotométrica convencional. El material utilizado no se transforma ni se destruye, de modo que es posible recuperarlo intacto al cabo de la medición. Habitualmente la medida de CD puede realizarse en condiciones “más fisiológicas” que aquellas utilizadas en cristalografía o NMR. Tal como se enfatizara antes, es preciso lograr una medida exacta de la concentración de la muestra proteica a partir de un valor confiable del coeficiente de extinción, o bien, en su defecto, a partir de métodos de referencia, tal como es el análisis de aminoácidos cuantitativo.

Fundamentalmente, CD se utiliza para (i) estimar el contenido global de estructura secundaria, (ii) detectar cambios conformacionales, y (iii) medir interacciones de ligandos (pequeñas moléculas o aún macromoléculas) o fases organizadas (por ejemplo, micelas o bicapas lipídicas) con los polipéptidos. Debe aclararse aquí que también CD ha sido muy empleado para evaluar la conformación y medir fenómenos de interacción en ácidos nucleicos y otras biomoléculas (ver ejemplos en Campbell, 1984; Fasman, 1996; Hammes, 2005), pero la discusión que sigue se limitará exclusivamente al caso de los péptidos y las proteínas.

Para proteínas se ha investigado extensamente la transición $N \leftrightarrow U$ entre el estado nativo (N) y el desplegado (U), incluyendo -en muchos casos- estados

intermediarios. La importancia fundamental de estudiar esta reacción radica en el hecho de que, en general, sólo el estado N está asociado a la función. Aquí reside la gran utilidad de CD para controlar el estado nativo de las proteínas, mediante un análisis simple y confiable que informa sobre el estado conformacional de un producto proteico para uso biomédico o industrial. Por otro lado, la funcionalidad de una proteína se manifiesta generalmente en su capacidad para unir ligandos específicos. Aquí nuevamente CD resulta de gran provecho, pues se puede evaluar cuantitativamente la unión: $N + L \leftrightarrow NL$. Ejemplos de esto último son la unión de sustratos y análogos a las enzimas, o la unión de agonistas, antagonistas y drogas a receptores, canales y bombas. Ante todo, para la medida de CD resulta importante distinguir dos regiones espectrales. La zona del *ultravioleta lejano*, que llamaremos operativamente UV_L (aprox. 180-250 nm), contenida en las regiones FUV (*far UV*) y MUV (*middle UV*). Para esta zona habitualmente se utilizan cubas de 1 mm de paso y aún menor (0,5 o 0,1 y hasta 0,05 o 0,01 mm) si fuere preciso extender la medida a la zona UV de muy bajas longitudes de onda (VUV o *vacuum UV*). La zona del *ultravioleta cercano*, que llamaremos UV_C (aprox. 250-340 nm), contenida en las regiones NUV (*near UV*) y MUV, y que no deberá confundirse con la región denominada UVC. Aquí típicamente se usan cubas de 1 cm de paso óptico, y mayores (de hasta 5 y 10 cm) en caso de ser necesario detectar señales muy débiles. Dado que el contenido de información en un espectro crece significativamente a menores longitudes de onda, si fuere posible, debe procurarse coleccionar datos hasta regiones cercanas o aún menores a 190 nm. En equipos modernos de laboratorio puede alcanzarse el límite de 184 nm, y actualmente se logran mediciones a λ aún menores si se utiliza radiación sincrotrón (Wallace, 2009).

Tal como se señalara anteriormente, para que un compuesto presente señal dicroica éste debe ser (o contener) un cromóforo quiral, o bien, si no fuere así, por interacción con grupos vecinos el cromóforo aquiral deberá adoptar una disposición o ubicarse en un ambiente químico que induzca asimetría. Sobre la base de que las proteínas son polímeros de L-aminoácidos que contienen cromóforos (amidas del enlace peptídico, grupos aromáticos y puentes

disulfuro) (Figura 4.7), naturalmente se originarán estructuras asimétricas que darán origen a señales dicroicas. De este modo, del análisis del espectro de CD en la región UV podrá obtenerse rica información estructural sobre la conformación de la molécula proteica.

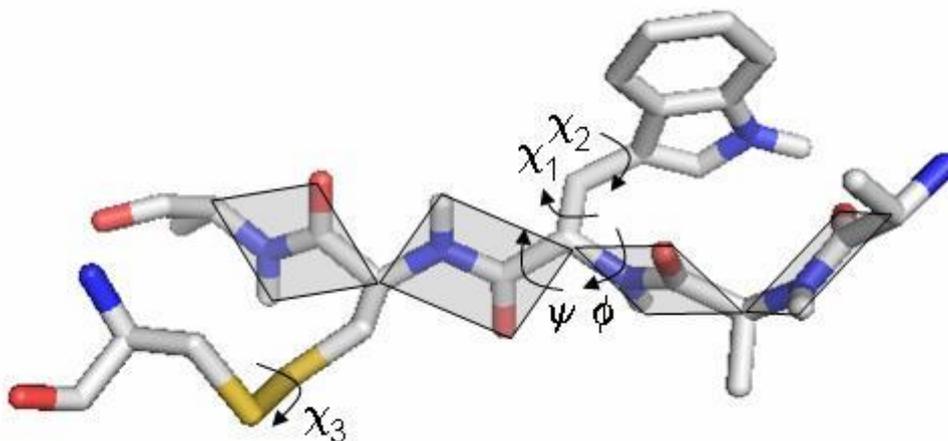


Figura 4.7. Detalle de las posibles conformaciones de los enlaces peptídicos.

4.8. La Región UV Lejana y la Estructura Secundaria

El espectro de CD en la región UV_L informa sobre el *contenido global de estructura secundaria*. El principal cromóforo que contribuye señal en esta región es el enlace peptídico. Este grupo funcional presenta dos transiciones: $n\pi^*$, débil, ancha y centrada en aproximadamente 210 nm y otra $\pi\pi^*$, que es intensa, aguda y está centrada en aproximadamente 190 nm. La interacción entre los planos representados por los enlaces peptídicos dependerá de su disposición relativa, que será diferente (y quiral) de acuerdo con el tipo de estructura secundaria que adopte la cadena, por ejemplo el sentido derecho de la hélice α o la casi completa inversión de los planos en una hebra β . Este hecho da origen a espectros diferentes de CD (Figura 4.8). Aquí se muestran las diferencias entre los dos tipos más frecuentes de estructura secundaria (α y

β), y entre éstos y el de una cadena desordenada (*r. random coil* u ovillo al azar).

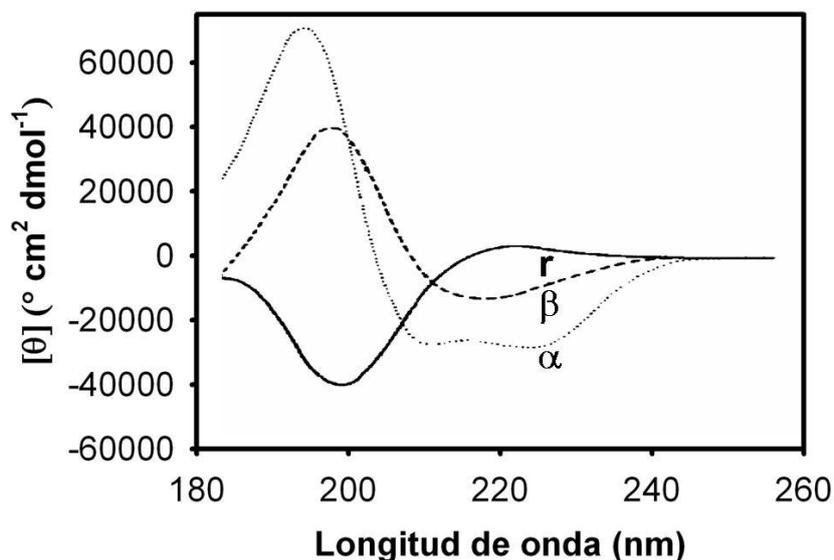


Figura 4.8. Espectros típicos para las estructuras secundarias α y β . También se muestra una cadena desordenada. Adaptada de Brahms & Brahms, 1980.

En forma característica, la presencia de dos mínimos a 208 y 222 nm y de un máximo a ~190 nm da cuenta de la existencia de estructura α helicoidal. En cambio, un único mínimo a ~215 nm y un máximo cercano a ~195 nm dan indicio de contenido preponderante de hoja β . En este caso, la diversidad de estructuras β -paralela, antiparalela y mixta, que definen superficies de variada curvatura- da origen a espectros que difieren considerablemente. Muy distinto a los anteriores es el caso de la estructura desordenada, que presenta una banda débilmente positiva por encima de 210 nm y es fuertemente negativa a λ menores.

Como ejemplos de lo antedicho, en la Figura 4.9 se muestran los espectros de CD en la zona UV_L de la hormona de crecimiento humana (hGH), una proteína *todo α* de la clase *manejo de cuatro hélices* (*four helix bundle*, panel A); la proteína que une ácidos grasos de intestino de rata (IFABP), un dominio predominantemente β (panel B); y un péptido desestructurado en solución acuosa derivado de la lisozima humana (panel C) (Iannucci, 2013).

Si bien en dicha figura resulta fácil advertir por simple inspección visual la contribución al espectro experimental de los distintos tipos de estructura secundaria mencionados, en casos en que la estructura comprenda distintos motivos (por ejemplo, proteínas de la clase α/β ó $\alpha+\beta$) puede resultar más difícil la asignación inequívoca del contenido de cada tipo de estructura secundaria. Por otro lado, nótese que por ser CD una medida *global y poblacional*, no es posible asignar estructura secundaria a regiones específicas de la molécula. Para facilitar la comparación entre espectros de proteínas o péptidos de diferente peso molecular (*MW*), se utiliza la magnitud *MRW* (*mean residue weight*): $MRW = MW/(\#res - 1)$, para expresar la masa de la muestra, donde el denominador representa el número de enlaces peptídicos de la cadena. Finalmente, se han adoptado por razones históricas las siguientes unidades de elipticidad $[\theta]$: $^{\circ}\text{cm}^2\text{dmol}^{-1}$, donde la concentración proteica se expresa en dmoles de residuo de aminoácido promedio por cm^3 .

4.9. Estimación del Contenido de Estructura Secundaria

Para este propósito se han desarrollado numerosos métodos empíricos de deconvolución. La premisa básica consiste en que -así como puede definirse una estructura proteica en términos de los componentes de estructura secundaria que la constituyen- también puede pensarse en un espectro de CD como la resultante de la combinación lineal (se supone aditividad) de las contribuciones (independientes) de cada uno de los tipos de estructura secundaria presentes. Así, para cada λ vale la expresión:

$$[\theta(\lambda)]_{MRW} = \sum_{k=1}^N f_k [\theta(\lambda)]_k \quad \text{Ec. 3.1}$$

donde $[\theta(\lambda)]_{MRW}$ es la elipticidad θ media por residuo de aminoácido, $[\theta(\lambda)]_k$ es el espectro de base para cada tipo k de estructura secundaria (por ejemplo, α , β , t . *turn*, o: "otra", que incluye el ovillo al azar) y f_k es la fracción o proporción

de residuos en la proteína que adoptan el tipo k de estructura secundaria. Para el cálculo, se imponen además las restricciones $\sum_{k=1}^N f_k = 1$ y $f_k \geq 0$. En la aproximación más simple, se trata entonces de ajustar las expresiones anteriores al espectro experimentalmente observado mediante regresión no-lineal. Como resultado se obtendrán las fracciones f_k de estructura secundaria (Venyaminov, 1996; Greenfield, 2006c). Entre los métodos utilizados para este fin se cuentan PG (Provencher/Glückner), HJ (Hennessey/Johnson), SSE, CONTIN, BELOK, VARSLC 1, SC (*self-consistent*), LINCOMB/CCA (*convex constraint analysis*), BPNN (que usa redes neuronales), SOM-BPN y PROT CD. Un sitio de referencia es DICHROWEB (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>, consultado el 6 de agosto de 2013), lugar en que pueden ingresarse datos espectrales para su tratamiento. También se ha establecido el banco de datos espectrales PCDDB (<http://pcddb.cryst.bbk.ac.uk/home.php>, consultado el 6 de agosto de 2013). Un punto crucial aquí consiste en cómo establecer los espectros característicos para cada tipo de estructura secundaria. A grandes rasgos, para este propósito se han utilizado dos clases de métodos: (i) aquellos basados en espectros de referencia obtenidos a partir de polipéptidos modelo, y (ii) otros basados en proteínas de estructura conocida. Los primeros (Greenfield & Fasman, citado por Venyaminov, 1996) utilizan polímeros tales como poli-Lys o poli-Glu, que experimentan transiciones hélice-ovillo (*helix-coil*) dependientes del pH. El problema aquí es la incertidumbre en la elección de aquellos polipéptidos que sirvan como modelo y la conocida dependencia con el largo de las hélices, hebras u ovillos, que habitualmente son más cortas en las proteínas.

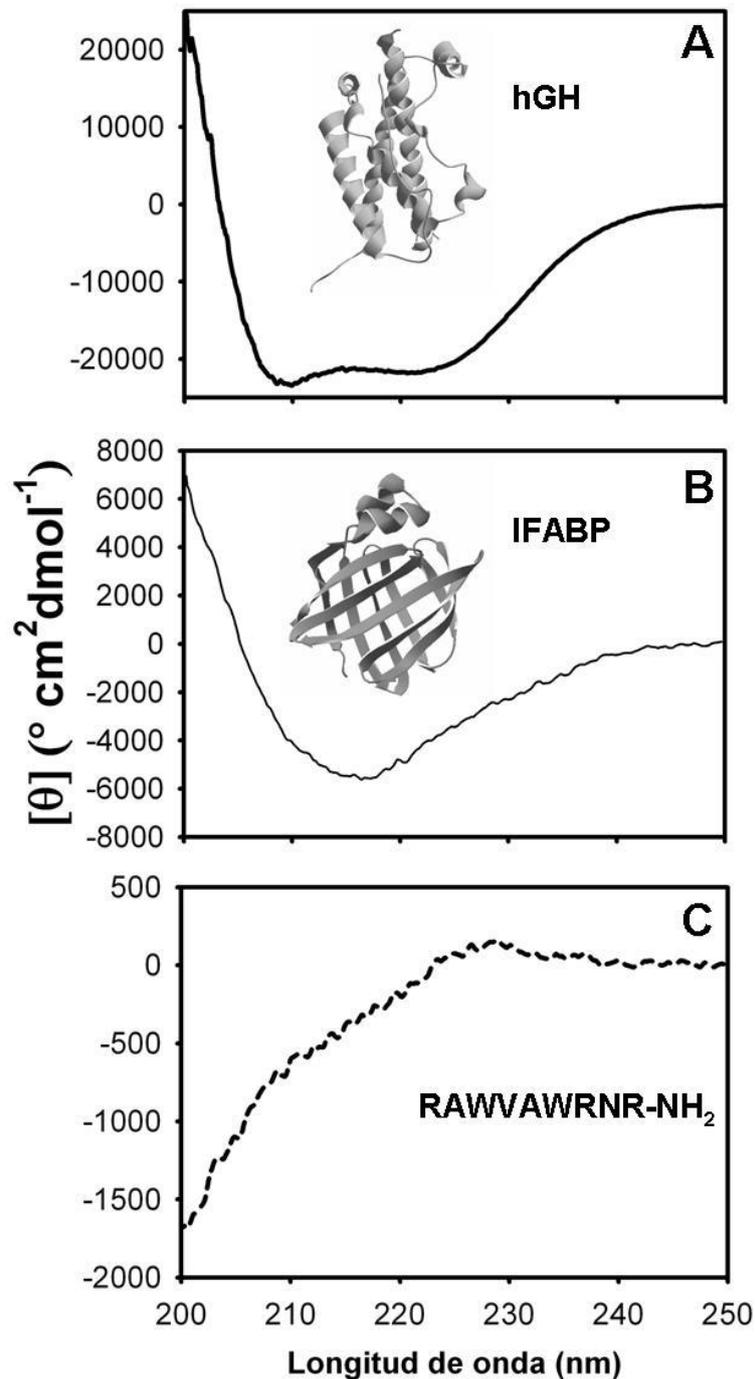


Figura 4.9. Espectros en el UV_L de: A) hormona de crecimiento humana (hGH); B) la proteína que une ácidos grasos de intestino de rata (IFABP) y C) un péptido desestructurado en solución acuosa derivado de la lisozima humana.

Los métodos de la segunda clase (Saxena & Wetlaufer; Chen y col., citados por Venyaminov, 1996) utilizan espectros de proteínas cuya estructura tridimensional sea bien conocida (estructuras depositadas en el banco pdb:

<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>, consultado el 06 de agosto de 2013) para definir el conjunto de base (*basis set*) de espectros correspondientes a hélice α , hoja β y el “resto”. Con esta estrategia se sortea el problema mencionado antes de la dependencia con el largo, pues el análisis está sustentado sobre proteínas reales. No obstante, existen problemas derivados del reducido tamaño del conjunto de proteínas utilizadas como referencia, la falta de distinción entre hélice α y otras hélices (por ejemplo, 3_{10}) y -más importante aún- la hoja β resulta un promedio estadístico entre contribuciones de hoja paralela y antiparalela de variada distorsión, y constituidas por un número variable de hebras de distinto largo. Así, existen factores estructurales propios de las moléculas peptídicas y proteicas que contribuyen a disminuir la exactitud del resultado. De este modo, la confiabilidad de los métodos de deconvolución es mayor si se trata de proteínas ricas en estructura α que si predomina la estructura β . En general, la confianza en la asignación cuantitativa de los distintos tipos de estructura secundaria dista de ser uniforme (conforme al orden $\alpha > r \gg \beta \gg \text{t}$) y el contenido de información del espectro depende fuertemente de cuán lejos en la región UV_L haya podido lograrse la colección de datos (idealmente hasta 184 nm). Las estimaciones del contenido de estructura secundaria son sólo aproximadas, prueba de ello es que la aplicación de varios métodos sobre el mismo espectro experimental puede conducir a resultados significativamente diferentes. Además, aunque la absorción en la zona UV_L está ciertamente dominada por el enlace peptídico, se ha demostrado que aportan contribuciones significativas y variables los puentes disulfuro (en el rango 240-290 nm) y las cadenas laterales aromáticas, fundamentalmente de los residuos de Trp y Tyr ubicados en ambientes estructurados (Chakrabarty, 1993). A menudo, los métodos adolecen del problema de ignorar estas contribuciones. Particularmente, por su utilización generalizada como parámetro de estructura, debe ejercerse especial precaución cada vez que se evalúen las contribuciones a $[\theta]_{222}$ (ver luego).

4.10. La Región UV Cercana y la Estructura Terciaria

El espectro de CD en la región UV_c es único y característico de cada proteína (huella digital o *fingerprint*) y refleja mayoritariamente las contribuciones de las cadenas laterales aromáticas (y puentes disulfuro) ubicadas en ambientes estructurados. Así, las características espectrales aquí reflejarán aspectos de la *estructura terciaria* de la proteína. Esta última característica es sumamente útil para la comparación de la estructura terciaria entre proteínas relacionadas, por ejemplo entre una variante *wild type* y mutantes puntuales, o entre muestras de la misma proteína obtenidas de la fuente natural o en forma recombinante. La Figura 4.10 ilustra espectros de proteínas (hGH e IFABP) en esta región. El péptido desestructurado (ver Figura 4.9, panel C) no presenta señal alguna en esta zona espectral.

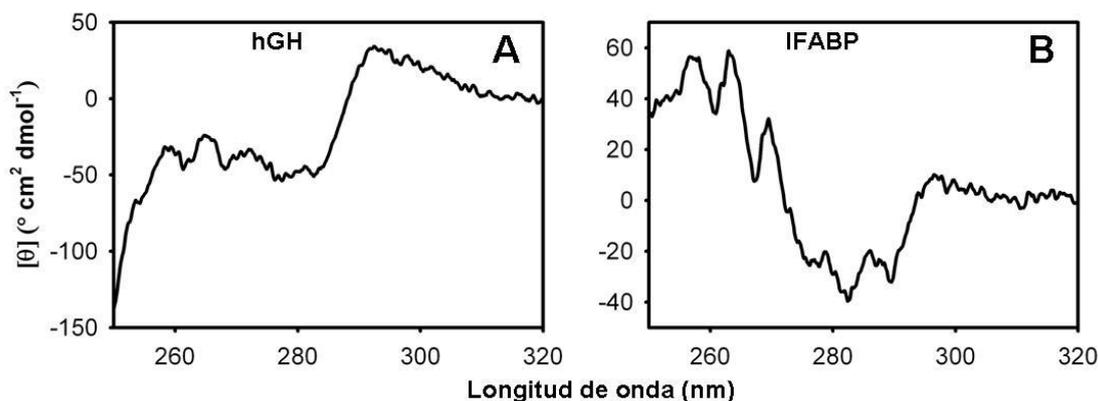


Figura 4.10. Espectros de proteínas en el UV_c: A) hGH y B) IFABP

Las cadenas laterales de los residuos aromáticos (Trp, Tyr, Phe, His) incluyen cromóforos planos (ópticamente inactivos *per se*), que son causantes de bandas de CD en el rango 250-290 nm por su ubicación en el ambiente químico asimétrico dado por la estructura terciaria compacta, característica del estado nativo de la proteína (Woody, 1996). Sumado a estas contribuciones se encuentra el residuo de cistina (el dímero de cisteína) que aporta bandas débiles centradas a ~280 nm cuyo signo depende de la quiralidad del puente disulfuro (la torsión χ_3 está generalmente restringida a ángulos de aproximadamente +90° o -90°) (Srinivasan, 1990). Varios factores influyen

sobre la intensidad de las bandas asignadas a los residuos aromáticos: (i) la rigidez de la proteína, siendo menor la intensidad cuanto mayor es la movilidad; (ii) las interacciones entre los grupos aromáticos, que se torna muy importante a distancias menores que 1 nm; y (iii) el número de grupos aromáticos. Téngase en cuenta que aún proteínas con un número elevado de aminoácidos aromáticos pueden presentar baja señal por efecto de cancelación entre señales positivas y negativas.

Adicionalmente, componentes no proteicos, esto es, grupos prostéticos o cofactores (por ejemplo, hemo, flavinas, etc.), o quelatos de metales de transición (por ejemplo, Cu o Co) en metaloproteínas pueden dar lugar a señales de CD características. Estas pueden proveer información valiosa acerca del entorno proteico asimétrico de estos cromóforos. Como ejemplos, proteínas coloreadas -tales como mioglobina o bacteriorrodopsina- también absorben luz visible -y por quiralidad propia o del ambiente químico- pueden originar señales de CD en esta región espectral.

4.11. Cambios Conformacionales en Proteínas

Entre las técnicas experimentales más utilizadas en biofísica para evaluar la reacción de plegado $N \leftrightarrow U$ -esto es, el equilibrio entre el estado nativo N y la colección (*ensemble*) de formas desplegadas U - la medida del cambio en el espectro de CD ocupa un lugar central por su extrema sensibilidad al cambio conformacional. Cada una de las técnicas (por ejemplo, CD, fluorescencia, exclusión molecular por tamaño, etc.) provee una señal característica (Y) que contiene información sobre la *naturaleza* y la *abundancia relativa* de las especies involucradas en la reacción. A través de la medida de Y en cada muestra donde el equilibrio $N \leftrightarrow U$ se haya perturbado -ya sea por la presencia de agentes caotrópicos como la urea o el cloruro de guanidinio, o por la variación de la temperatura o la presión hidrostática (Greenfield, 2006a; Greenfield, 2006b) - se puede inferir la presencia y cuantificar las especies en equilibrio. En el caso más simple de un equilibrio en dos estados (*two state*)

perturbado por un agente químico D , esto es, donde sólo coexistan las especies N y U , la señal Y podrá expresarse como $Y = f_N Y_N + f_U Y_U$ y de aquí inferirse la fracción desplegada $f_U (= 1 - f_N)$ de proteína como la relación $f_U = (Y - Y_N)/(Y_U - Y_N)$. Con los datos obtenidos es posible hallar el valor de las constantes termodinámicas de la reacción ($K_{eq} = f_U/f_N$, $\Delta G^0 = -RT \ln K_{eq}$ y $\Delta G^0 = \Delta G_{H_2O}^0 + m[D]$) y además el parámetro m que refleja la cooperatividad de la transición. En experimentos en función de la temperatura, se pueden derivar además las magnitudes ΔH^0 y ΔS^0 . Más allá de su valor propio, estos parámetros termodinámicos permiten definir la *estabilidad relativa* de la conformación proteica, una propiedad de fundamental importancia práctica en biotecnología a la hora de evaluar un producto proteico.

Medir la evolución de los espectros de CD en las regiones UV_L y UV_C en función de la perturbación física o química impuesta permite distinguir la existencia de especies intermediarias en el equilibrio. Recuérdese aquí que la señal de CD en la región UV_L (por ejemplo, $[\theta]_{220}$) informará sobre cambios en la estructura secundaria, mientras que la señal en la región UV_C ($[\theta]_{270}$) lo hará sobre cambios en la estructura terciaria. Habitualmente, y con el fin de explorar este equilibrio desde otra perspectiva, las mismas muestras pueden ser analizadas también por sus propiedades de fluorescencia intrínseca (por ejemplo, por la intensidad y/o máximo de emisión).

La Figura 4.11 ilustra el caso de dos proteínas muy relacionadas por su conformación (aunque disímiles en secuencia) -lisozima de clara de huevo de gallina (HEWL) y α -lactalbúmina bovina (α -LA)- que exhiben mecanismos de plegado muy diferentes (Uversky, 1993).

Mientras que la primera muestra una típica transición simple en dos estados, caracterizada por *la coincidencia de las señales en las zonas UV_L y UV_C , la disociación entre estas señales* en el caso de la segunda evidencia la presencia de especies intermediarias en el equilibrio. Un típico caso de especie intermediaria es el así llamado glóbulo fundido (*molten globule, MG*), una forma emparentada con el estado nativo N , pero levemente expandida, que muestra movimiento interno incrementado de las cadenas laterales de los aminoácidos

hidrofóbicos del *core* proteico. Como tal, en este estado *MG* persiste la señal de CD en la región UV_L , pero se pierde la señal en la región UV_C .

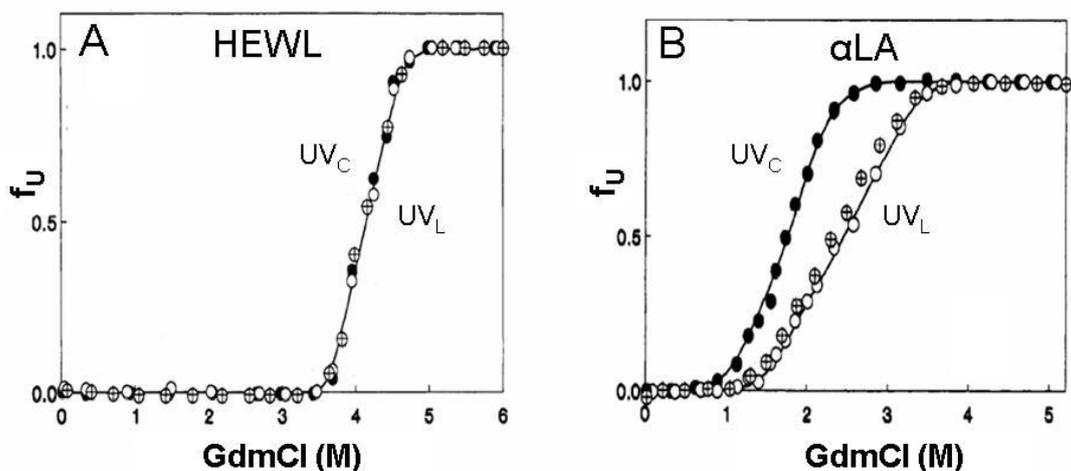


Figura 4.11. Transiciones en el equilibrio para dos proteínas: A) HEWL y B) α LA

Un tratamiento general y detallado de los datos espectrales para extraer valores de los parámetros termodinámicos está fuera del foco de este capítulo. Para aquellos interesados, se recomienda la lectura de las referencias de Schmid (Schmid, 1989), Pace & Shaw (Pace, 2000) y Greenfield (Greenfield, 2006a; Greenfield, 2006b).

Finalmente, valga señalar que también es posible efectuar otro tipo de experimentos en que se perturba el sistema y se mide la *evolución temporal* (*cinética*) de la señal. Para estos últimos, se monta sobre el espectropolarímetro un aparato para *mezclado rápido de flujo interrumpido* (*stopped flow*), que permite preparar muestras y tomar mediciones en el orden de milisegundos (Greenfield, 2006d). Así, se ha estudiado la cinética del plegado de citocromo c, HEWL y α -LA, por mencionar sólo algunos ejemplos pioneros (Kuwajima, 1996).

4.12. Interacción de Proteínas con Ligandos

La exquisita sensibilidad de la señal de CD al ambiente químico puede utilizarse con provecho para la medición de fenómenos de interacción de ligandos con proteínas. En la unión de una proteína P con un ligando L para rendir un complejo PL : $P + L \leftrightarrow PL$, gobernada por la constante de unión $K_{asoc} = [PL]/[P][L]$, es posible en muchos casos evaluar cuantitativamente la forma unida del ligando (PL) en la mezcla en equilibrio, cuando se trate de un ligando cromóforo aquiral, dado que sólo aparecerá señal dicroica inducida si éste se ubica en el ambiente asimétrico provisto por la cavidad de unión en la proteína. Complementariamente, mediante una simple medida espectrofotométrica sobre la misma muestra podrá evaluarse la *concentración total* del ligando ($[L]_{total} = [L] + [PL]$). De este modo, surge inmediatamente que será posible estimar la afinidad K_{asoc} mediante medidas a cada $[L]_{total}$ y $[P]_{total}$ ($= [P] + [PL]$) ensayadas, *sin necesidad de separar la fracción de ligando unida de la libre*.

Sirvan los ejemplos siguientes para ilustrar los conceptos anteriores.

Ejemplo 1: La unión de la sonda anilino naftalén sulfonato (ANS) a IFABP induce una banda positiva centrada a 335 nm, que se incrementa con la concentración del ligando (Figura 4.12) (Arighi, 2003). Nótese que hay otros cambios de forma e intensidad en bandas ubicadas en el rango 250-300 nm, pero éstas probablemente representan la contribución mixta de transiciones aromáticas de la proteína y bandas inducidas por la sonda. El inserto muestra la evolución de la elipticidad a 335 nm en función de la concentración total del ligando presente, en una zona donde sólo absorbe este último. Así se determinó una constante de unión de $12,5 \pm 1,2 \mu\text{M}$, que coincide con aquella estimada por fluorescencia.

Ejemplo 2: A menudo sucede que el fenómeno de unión conlleva una alteración en la conformación de la proteína. Esta situación puede también utilizarse con provecho para medir la afinidad por el ligando. Consideremos el caso de la unión de Ca^{2+} a calmodulina (Figura 4.13) (Gómez y col., resultados no publicados).

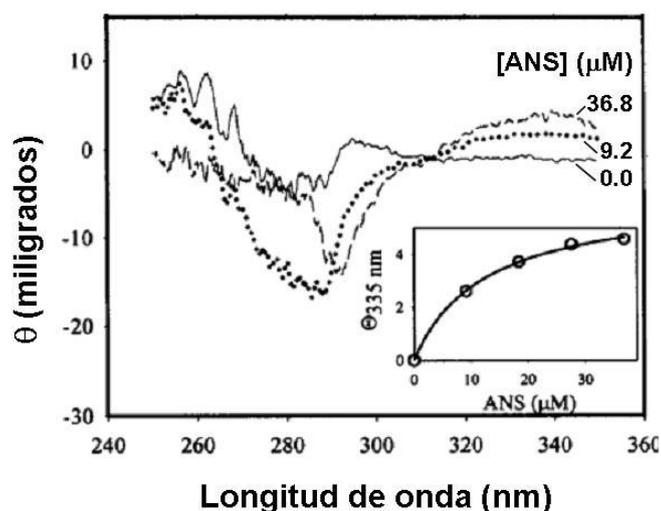


Figura 4.12. Inducción de bandas en el UV_C por unión de ligandos a IFABP

El ión calcio es un ligando “invisible” al CD, pues no presenta absorción UV. Sin embargo, a través de su efecto pronunciado sobre la proteína -en particular sobre los cromóforos aromáticos de Tyr (bandas a 279 y 286 nm) y Phe (bandas a 261 y 268 nm)- es posible evaluar la variación de la señal dicroica de la proteína en el rango UV_C. Los cambios espectrales atribuibles a Tyr y Phe ocurren en forma paralela, reflejando la presencia de estos residuos en cada uno de los sitios ubicados en el dominio C-terminal que unen Ca²⁺ con alta afinidad. Estos cambios se estabilizan una vez que el ión alcanza a saturar estos sitios (Crouch & Klee, citado por Woody, 1996). Notablemente, el efecto de agregar Cd²⁺ en lugar de Ca²⁺ mimetiza estos efectos, implicando así un cambio conformacional idéntico en la proteína (resultados no mostrados).

Ejemplo 3: El fenómeno de unión del ligando oleato con IFABP y una forma abreviada de esta proteína, Δ98Δ (Curto, 2009) se ilustra en la Figura 4.14. Pueden encontrarse semejanzas con el ejemplo anterior en tanto oleato no absorbe luz en el rango medible. Aquí se muestra el efecto moderadamente estabilizante sobre la proteína de la adición del ligando, medida por la evolución de la señal dicroica a 216 nm en función de la concentración del caótropro cloruro de guanidinio (GdmCl). Una vez transformados los datos espectrales en la fracción nativa f_N (ver antes), se evidencia que: (i) la forma Δ98Δ se despliega cooperativamente, (ii) es menos estable que IFABP, pero

(iii) resulta estabilizada en mayor medida por el ligando ácido graso. En $\Delta 98\Delta$, el evento de unión resultaría crítico para estabilizar contactos de cadenas laterales que conducen al reajuste de la estructura terciaria.

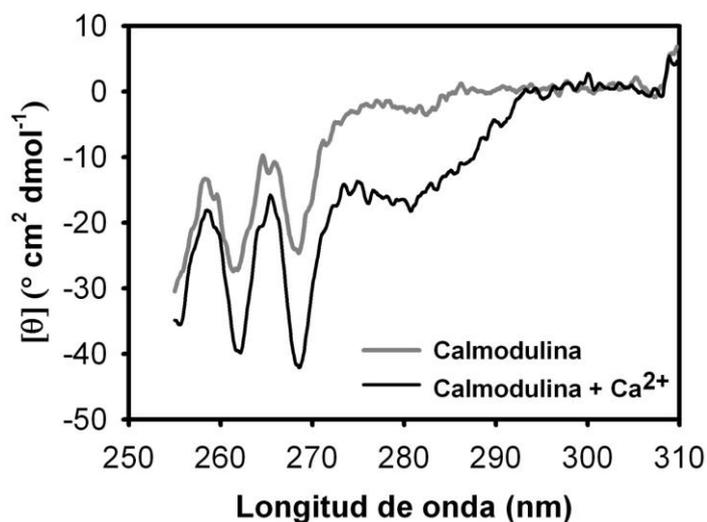


Figura 4.13. Inducción de bandas en el UV_C por unión de calcio a Calmodulina

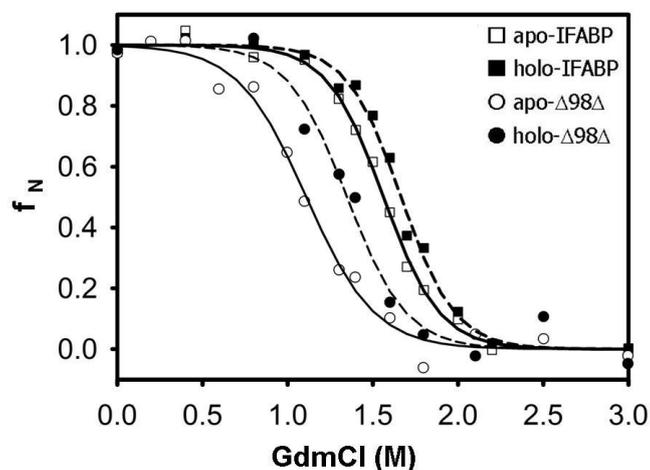


Figura 4.14. Efecto de la unión del ligando ácido oleico sobre la estabilidad de IFABP y $\Delta 98\Delta$

Ejemplo 4: La consolidación de la estructura terciaria de una proteína puede ocurrir a partir del evento de reconocimiento mutuo entre fragmentos de la misma. Éste es el caso del péptido 94-108 de la tiorredoxina de *E. coli* (TRX), que al enfrentarse al fragmento mayor 1-93 es capaz de constituir un complejo no covalente semejante al estado nativo intacto de la proteína, recuperándose

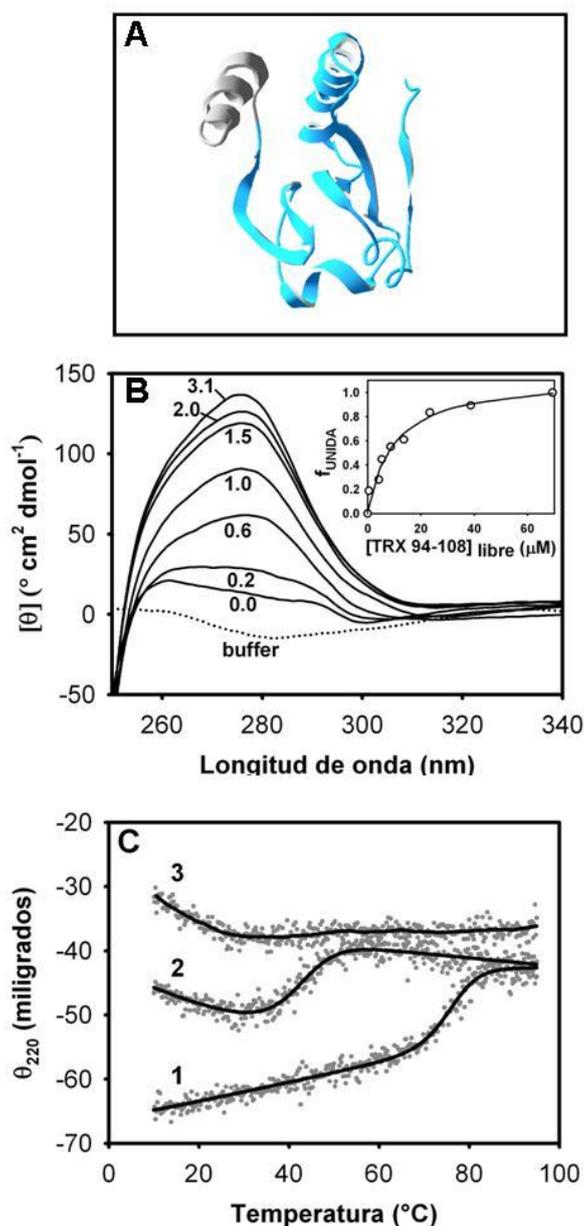


Figura 4.15. (A) Estructura cristalográfica de TRX de *E. coli* (código pdb: 2TRX), donde se muestra el fragmento TRX1-93 en azul y el péptido TRX94-108 en gris. (B) Unión del péptido TRX94-108 al fragmento TRX1-93 seguido por CD en la región UV_C. Los números (0.0 al 3.1) indican la relación molar péptido:fragmento. El inserto muestra la fracción unida (extraída de la evolución de la señal dicróica a 280 nm) en función de la concentración de péptido libre. (C) Desnaturalización térmica seguida por CD en la región UV_L del fragmento TRX1-93 (3), del complejo TRX1-93/TRX94-108 (2), o de TRX de largo completo (1).

inclusive en parte la actividad enzimática (Santos, 2007). Notablemente, en forma aislada el péptido TRX94-108 no presenta estructura, pero se ordena, tal como es el caso en la estructura intacta. Por otro lado, el fragmento TRX1-93 no alcanza a compactarse por sí mismo y da lugar a una estructura del tipo glóbulo fundido (MG). Este caso representa un evento molecular de selección

estructural recíproca, donde ambos componentes ganan orden. La evolución de la señal de CD en la región UV_c a medida que se titula el fragmento TRX1-93 con el péptido TRX94-108 se muestra en la Figura 4.15A.

Al máximo exceso molar ensayado, se advierte la recuperación mayoritaria del espectro nativo. Del gráfico en el inserto puede derivarse la afinidad de esta interacción ($K_D = 1/K_{asoc} \sim 12 \mu\text{M}$). Por otro lado, la estabilidad termodinámica del complejo se evaluó a partir de la transición térmica seguida por la medida de θ_{220} , que estima el contenido de estructura secundaria de la proteína. A diferencia del fragmento TRX1-93, el complejo recupera una transición cooperativa, aunque ésta esté centrada a una temperatura mucho menor (40 °C) que la que experimenta la proteína intacta (76 °C) (Figura 4.15B).

4.13. Efecto de Anfifilos y Co-Solventes sobre Péptidos

Desestructurados

Ejemplo 5: El mismo péptido anfipático TRX94-108 del ejemplo anterior experimenta inducción de estructura α helicoidal -a partir de una forma desestructurada en solución acuosa- por interacción con el detergente dodecil sulfato de sodio (SDS) (Figura 4.16A) (Román, 2010). Este efecto demuestra que la naturaleza hidrofóbica de la unión restringe el espacio conformacional accesible al péptido, favoreciendo aquella estructura secundaria (α -hélice en este caso) que optimice la interacción. Este experimento demuestra que no siempre es necesaria la presencia de un núcleo (*core*) proteico preformado para que un elemento de estructura secundaria como el representado por este péptido adquiera su forma final plegada.

Ejemplo 6: Otro ejemplo de inducción de estructura secundaria está dado por el péptido anti-estafilocócico KW (RKWVWRNR-NH₂), originalmente derivado del fragmento 107-115 de la lisozima humana y normalmente desordenado en solución acuosa (Figura 4.16B) (Iannucci, 2013). Tanto por efecto del co-solvente trifluoroetanol (TFE) como por exposición a una fase micelar constituida por dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC), se advierte que KW se

ordena, a juzgar por la reducción de la magnitud de la banda negativa a ~ 200 nm y la tendencia a exacerbar la banda negativa a 222 nm. Estos resultados subrayan el papel de la estructura secundaria y la distribución de residuos polares y no polares para la efectiva interacción del péptido con la membrana plasmática de la bacteria, un paso crítico para desencadenar su acción letal.

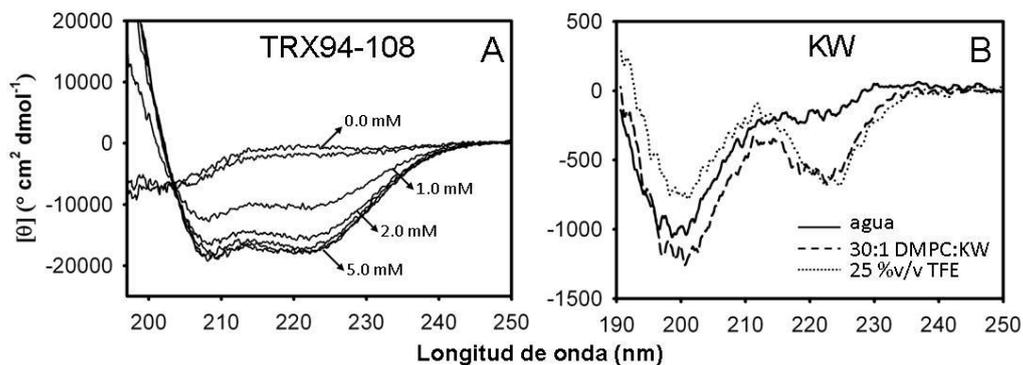


Figura 4.16. Inducción de estructura secundaria por distintos agentes sobre A) TRX94-108 y B) KW.

Ejemplo 7 Cuando IFABP y formas abreviadas de la misma ($\Delta 98\Delta$ y $\Delta 78\Delta$) son desafiadas con el co-solvente TFE (25 % v/v) se dispara un proceso de agregación de tipo amiloide (Curto, 2012). Este proceso implicaría un reordenamiento estructural hacia una forma polimérica del tipo *cross- β* . Sugestivamente, a concentraciones menores del co-solvente (2,5-10 % v/v) -situación en que las proteínas permanecen solubles- la proteína intacta y las formas abreviadas coalescen en una estructura común de carácter predominantemente β (Figura 4.17), que comparte una estabilidad similar frente al caótrofo químico GdmCl (Curto, 2013).

Esta evolución es más marcada para el caso de las formas abreviadas, en concordancia con la mayor plasticidad estructural característica de estas formas respecto de la proteína madre (IFABP). Estas observaciones iluminan aspectos del mecanismo que conduce a la agregación, posiblemente señalando eventos tempranos de este proceso.

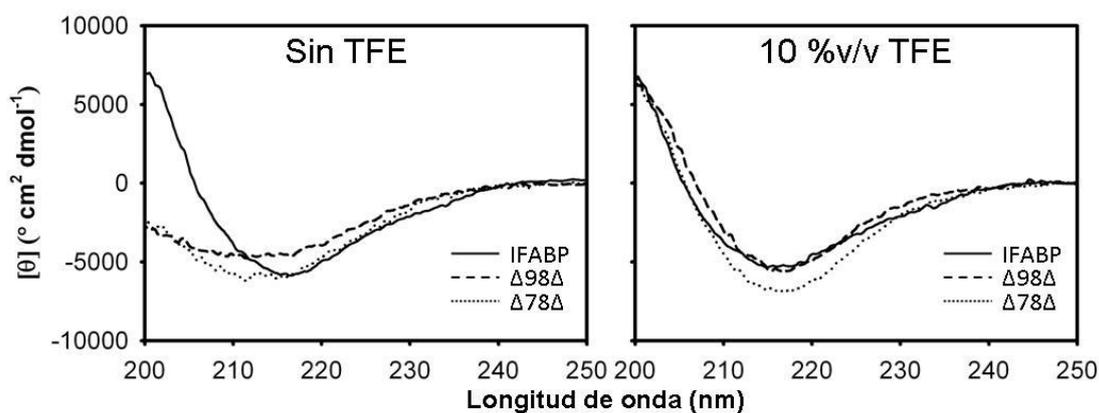


Figura 4.17. Inducción de estructura secundaria por el agregado de TFE sobre IFABP, $\Delta 98\Delta$ y $\Delta 78\Delta$.

Bibliografía

Arighi CN, Rossi JPFC, Delfino JM. Temperature-induced conformational switch in intestinal fatty acid binding protein (IFABP) revealing an alternative mode for ligand binding. *Biochemistry* 42: 7539-7551, 2003.

Bloemendal M, Johnson Jr. WC. Structural information on proteins from circular dichroism spectroscopy: possibilities and limitations. En Herron JN, Jiskoot W, Crommelin DJA (Eds.), *Physical Methods to Characterize Pharmaceutical Proteins* (pp. 65-100). Plenum Press, New York (NY), 1995.

Brahms S, Brahms J. Determination of Protein Secondary Structure in Solution by Vacuum Ultraviolet Circular Dichroism. *J Mol Biol* 138: 149-178, 1980.

Campbell ID, Dwek RA. *Biological Spectroscopy*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., Menlo Park (CA), 1984.

Cantor CR, Schimmel PR. (Eds.), *Biophysical Chemistry, Part II: Techniques for the Study of Biological Structure and Function*. Freeman, New York, 1980.

Chakrabartty A, Kortemme T, Padmanabhan S, Baldwin RL. Aromatic side-chain contribution to far-ultraviolet circular dichroism of helical peptides and its effect on measurement of helix propensities. *Biochemistry* 32: 5560–5565, 1993.

Curto LM, Caramelo JJ, Franchini GR, Delfino JM. $\Delta 98\Delta$, a minimalist model of antiparallel β -sheet proteins based on intestinal fatty acid binding protein. *Protein Sci* 18: 735-746, 2009.

Curto LM, Angelani CR, Caramelo JJ, Delfino JM. Truncation of a β -barrel scaffold dissociates intrinsic stability from its propensity to aggregation. *Biophysical Journal* 103: 1929-1939, 2012.

Curto LM, Angelani CR, Cabanas IS, Caramelo JJ, Delfino JM. On how stable β -barrels become propense to filamentous growth. En Mechanobiology of Proteins and Cells Meeting. Salisbury Cove, Maine, 2013.

Fasman GD. (Ed.), Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules. Plenum Publishing Corp, New York, 1996.

Greenfield NJ. Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. *Nat Protoc* 1: 2527-2535, 2006a.

Greenfield NJ. Determination of the folding of proteins as a function of denaturants, osmolytes or ligands using circular dichroism. *Nat Protoc* 1: 2733-2741, 2006b.

Greenfield NJ. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat Protoc* 1: 2876-2890, 2006c.

Greenfield NJ. Analysis of the kinetics of folding of proteins and peptides using circular dichroism. *Nat Protoc* 1: 2891-2899, 2006d.

Hammes GG. Spectroscopy for the Biological Sciences. Wiley-Interscience, Hoboken (NJ), 2005.

Iannucci N, Curto L, Albericio F, Cascone O, Delfino JM. Structural glance into a novel designed anti-staphylococcal peptide. *Pept Sci*, 2013 (en prensa).

Johnson Jr. WC. Circular dichroism instrumentation. En Fasman GD (Ed.), Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules (pp. 635-652). Plenum Publishing Corp., New York (NY), 1996.

Kuwajima K, Hiraoka Y, Ikeguchi M, Sugai S. Comparison of the transient folding intermediates in lysozyme and alpha-lactalbumin. *Biochemistry* 24: 874-881, 1985.

Kuwajima K. Stopped-flow circular dichroism. En Fasman GD (Ed.), Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules (pp. 159-182). Plenum Publishing Corp., New York (NY), 1996.

Pace CN, Shaw KL. Linear extrapolation method of analyzing solvent denaturation curves. *Proteins (suppl 4)*:1-7, 2000.

Rodger A, Nordén B. Circular Dichroism and Linear Dichroism. Oxford University Press, Bath, 1997.

Roman EA, Rosi P, González Lebrero MC, Wuilloud R, González Flecha FL, Delfino JM, Santos J. Gain of local structure in an amphipathic peptide does not require a specific tertiary framework. *Proteins* 78: 2757-2768, 2010.

Santos J, Marino-Buslje C, Kleinman C, Ermácora MR, Delfino JM. Consolidation of the thioredoxin fold by peptide recognition: interaction between *E. coli* thioredoxin fragments 1-93 and 94-108. *Biochemistry* 46: 5148-5159, 2007.

Schmid FX. Spectral methods of characterizing protein conformation and conformational changes. En Creighton TE (Ed.), Protein Structure: a practical approach (pp. 251-285). IRL Press, New York (NY), 1989.

Srinivasan N, Sowdhamini R, Ramakrishnan C, Balaram P. Conformations of disulfide bridges in proteins. *Int J Peptide Protein Res* 36: 147-155, 1990.

Takakuwa T, Konno T, Meguro H. A New Standard Substance for Calibration of Circular Dichroism: Ammonium d-10-Camphorsulfonate. *Analytical Sciences* 1: 215-218, 1985.

Uversky VN. Use of Fast Protein Size-Exclusion Liquid Chromatography To Study the Unfolding of Proteins Which Denature through the Molten Globule. *Biochemistry* 32: 13288-13298, 1993.

Venyaminov SYu, Yang JT. Determination of protein secondary structure. En Fasman GD (Ed.); Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules (pp. 69-107). Plenum Publishing Corp., New York (NY), 1996.

Wallace BA, Janes RW. (Eds.), Modern Techniques for Circular Dichroism and Synchrotron Radiation Circular Dichroism Spectroscopy. IOS Press, Amsterdam, 2009.

Woody RW, Dunker AK. Aromatic and cystine side-chain circular dichroism in proteins. En Fasman GD (Ed.), Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules (pp. 109-157). Plenum Publishing Corp., New York (NY), 1996.

PARTE II

MÉTODOS DE ALTA RESOLUCIÓN PARA EL ESTUDIO ESTRUCTURAL DE PROTEÍNAS

CAPÍTULO 5

CÁLCULOS COMPUTACIONALES EN MACROMOLÉCULAS BIOLÓGICAS

Marcelo D. Costabel y Fernando Zamarreño

Introducción

Las macromoléculas biológicas constituyen sistemas complejos que pueden adoptar diferentes estados y funciones, sosteniendo un comportamiento dinámico irregular. Para establecer modelos computacionales que respondan a estos requerimientos, debe plantearse la utilización de programas basados en leyes y teorías con fundamentos matemáticos, físicos y químicos, lo que representa un ejemplo de problema multidisciplinario por excelencia.

Al mismo tiempo, el modelado molecular contiene una dosis interesante de arte; donde podemos encontrarnos con un boceto inicial de líneas simples o una figura detallada de pintura real, todo dependiendo del conocimiento previo que tengamos sobre el sistema bajo estudio; y como dijo Pablo Picasso: “el Arte es una mentira que nos ayuda a comprender la realidad”.

5.1. Orígenes

Desde siempre, el hombre se interesó en la descripción de los fenómenos naturales y el consiguiente entendimiento de las estructuras subyacentes que son partícipes de los mismos. No obstante, los comienzos del modelado molecular como hoy lo conocemos, se remontan a comienzos del siglo XX, donde la cristalografía de Rayos X emergente en esos días, resultó una herramienta crucial para desentrañar la estructura molecular de los sistemas biológicos.

Sin embargo la descripción inicial no resultaba sencilla y como el trazado en papel sólo permitía una figura bidimensional, el único camino posible para el armado 3D provino del diseño de mapas de densidad electrónica con materiales como plastilina y madera balsa y la utilización de kits para el armado de modelos de esferas y palos que permitieron una figura más realista de las estructuras en estudio (Figura 5.1.).



© A. Barrington Brown/Photo Researchers, Inc.

Figura 5.1. *Watson y Crick mostrando el modelo estructural de la doble hélice de DNA, armado con alambre.*

Seguramente el trabajo de Watson, Crick y Franklin en la resolución de la estructura del DNA por técnicas cristalográficas (Watson, 1953) es un hito en la historia del modelado molecular de macromoléculas. A partir de allí, la cristalografía y el modelado molecular crecieron en simultáneo.

El aporte siguiente, sin duda, lo brindó la computación. El advenimiento de la informática y el continuo desarrollo de las computadoras, permitió el planteo de modelos cada vez más precisos y la posibilidad de una visualización de los mismos en graficas de tres dimensiones. Pero la computación no sólo permitió el armado de un modelo y la figura correspondiente, también aportó el entorno de trabajo para aplicar el cálculo a sistemas con decenas, centenares o miles de átomos y de esa forma considerar que tipo de interacciones involucran esos

sistemas, dando lugar a descripciones estáticas y dinámicas que dieron origen a lo que hoy conocemos como simulación computacional de macromoléculas y nos permiten inferir o describir el complejo entramado en la relación estructura-función de moléculas biológicas.

5.2. Modelo Inicial

El punto de inicio para el estudio de una macromolécula biológica por técnicas computacionales, es generar ese modelo que permita definir las posiciones de los átomos en el espacio respecto a un sistema de coordenadas cartesianas. Este modelo se obtiene a partir de técnicas experimentales como son la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) o la cristalografía de Rayos X. De todas formas, cabe aclarar que, en aquellos casos donde la posibilidad del experimento se ve frustrada, es factible la realización de un modelo que permita, a partir de una estructura conocida, armar el conjunto de coordenadas de una nueva molécula por medio de un trabajo basado en la homología de las secuencias de aminoácidos que las componen.

Dada la importancia de contar con estas estructuras fue necesario almacenarlas en un sitio de fácil acceso. Por esto, las estructuras resueltas experimentalmente se encuentran depositadas en una base de datos denominada Protein Data Bank (PDB) (Berman, 2000). PDB fue creado en 1971 y contó en sus inicios con 7 estructuras de moléculas depositadas y ha crecido hasta contar con más de 70000 estructuras en la actualidad; lo cual la constituye en el punto de referencia por excelencia dentro de la biología molecular estructural.

5.3. Estudios Computacionales de la Estructura Biomolecular

Conocida la estructura, el paso siguiente es desentrañar el funcionamiento de la misma dentro del ámbito fisiológico en que se instala. La descripción de

estos sistemas biológicos a nivel molecular ha sido durante mucho tiempo ámbito exclusivo de diferentes técnicas experimentales, que permitieron dilucidar los mecanismos involucrados. El inconveniente suele ser que estos experimentos requieren, en muchos casos, mucho tiempo de implementación y un análisis previo minucioso para garantizar la optimización de los recursos que se aplican para su realización.

En ese contexto, el surgimiento de la informática durante el siglo XX, dio lugar, entre una innumerable variedad de utilidades, a la aplicación de la misma en el análisis de complejos biomoleculares.

Durante las primeras décadas este análisis estuvo orientado a la verificación de lo observado de forma experimental; pero en estos momentos se ha convertido en una herramienta predictiva, orientadora del trabajo *in vitro* y ha trasladado el paradigma a una nueva biología *in silico*.

Dado que la posibilidad del cálculo computacional crece día a día gracias al progreso continuo en el hardware, los programas aplicados al análisis de sistemas biológicos, en los cuales se considera un número elevado de átomos, es cada vez más variado. En este capítulo presentamos algunos de los estudios computacionales involucrados en el modelado molecular y que pueden aportar información en la relación estructura-función de biomoléculas.

5.4. Modelo y Energía

Contar con la estructura tridimensional de una molécula es el paso inicial necesario para un estudio computacional. A partir de allí, conocer la Energía del sistema nos da la posibilidad de evaluar el funcionamiento bajo distintas condiciones. En este sentido, la formulación adecuada de la función Energía potencial resulta fundamental para que el modelo planteado sea efectivo. A su vez, la combinación entre el modelo planteado y los algoritmos empleados es fundamental para solucionar los problemas de sistemas a gran escala.

Cuando se plantea entonces la Energía, una serie de cuestiones deben ser tenidas en cuenta. En primer lugar, debe considerarse el espacio de

configuraciones. Este espacio de configuraciones para un sistema molecular es de $3N-6$ grados de libertad, (donde el valor $3N$ corresponde a los desplazamientos espaciales posibles para cada uno de los N átomos que componen la molécula, y las 6 restricciones se deben a los movimientos de traslación y rotación conjunta que no implican movimientos relativos de los átomos) lo cual, para una proteína es del rango de 10^4 , y mayor aún al considerar hidratación explícita dentro del modelo. Es por esto que, dentro del modelo, se aplican restricciones específicas que dan lugar a la reducción de variables que permiten plantear la forma funcional de la Energía en un espacio cartesiano.

La Energía potencial dentro de un modelo molecular es la combinación de varios términos:

$$E = E_{dist} + E_{ang} + E_{tor} + E_{LJ} + E_{coul} \quad \text{Ec. 5.1.}$$

$$E_{dist} = \sum_{ij} S_{ij} \left(r_{ij} - \bar{r}_{ij} \right)^2 \quad \text{Ec. 5.2.}$$

$$E_{ang} = \sum_{ijk} K_{ijk} \left(\cos \theta_{ijk} - \cos \bar{\theta}_{ijk} \right)^2 \quad \text{Ec. 5.3.}$$

$$E_{LJ} = \sum_{ij} \left(\frac{-A_{ij}}{r_{ij}^6} + \frac{B_{ij}}{r_{ij}^{12}} \right) \quad \text{Ec. 5.4.}$$

$$E_{coul} = \sum_{ij} \frac{q_i q_j}{\epsilon(r_{ij}) r_{ij}} \quad \text{Ec. 5.5.}$$

Los dos primeros términos corresponden a la Energía de enlace interatómica (longitud y ángulo), el tercero es un potencial torsional, luego tenemos un potencial de Lennard –Jones que modela la repulsión a distancias cortas y la

atracción a distancias grandes y un potencial Coulombiano entre las partículas cargadas del sistema.

Si bien estas relaciones representan aproximaciones, las mismas son razonables en el caso de las macromoléculas.

5.5. Electroestática de Macromoléculas

En los últimos años ha habido un interés renovado por la Electroestática en la biología, debido a tres factores básicamente:

1. El rol muy importante que juegan dichas interacciones en la caracterización de las propiedades estructurales y funcionales de las macromoléculas,
2. Los avances en la resolución numérica de las ecuaciones básicas que gobiernan estos fenómenos, y
3. El incremento del poder de cálculo que hizo factible crear herramientas computacionales que implementen los algoritmos numéricos en tiempos de cálculo razonables.

La electrostática clásica está regida por la Ecuación de Poisson:

$$-\nabla[\varepsilon(r)\nabla\phi(r)]=\rho(r) \quad \text{Ec. 5.6.}$$

Donde $\varepsilon(r)$ es la permitividad del medio, $\phi(r)$ es el potencial electrostático y $\rho(r)$ es la densidad de carga.

En los casos particulares en los cuales podemos suponer que la permitividad es constante e igual a 1, la solución de la ecuación para este potencial es:

$$\phi(r) = \int \rho(r') \frac{1}{|r - r'|} dr' \quad \text{Ec. 5.7.}$$

Que es la Ley de Coulomb y donde

$$\rho(r) = \sum q\delta(r - r'), \quad \text{Ec. 5.8.}$$

es la densidad de carga correspondiente a un conjunto de N cargas puntuales ubicadas en los sitios atómicos.

La solución del sistema para macromoléculas con forma arbitraria, implica la utilización de métodos numéricos complejos. En estos métodos el espacio continuo se transforma en una matriz discreta compuesta de puntos equiespaciados. El dominio del problema entonces se divide en dos regiones. El volumen asignado al solvente se define como la unión de los volúmenes accesibles a esferas del tamaño de una molécula de agua de radio 0,14 nm que no ingresan al espacio reservado a los átomos de las macromoléculas. Al volumen correspondiente al solvente se le asigna una constante dieléctrica de 78,54 y al volumen correspondiente a las moléculas se les asigna una constante igual a 2.

Cuando las macromoléculas se encuentran en solución, debemos considerar no sólo la presencia de agua, sino también los iones inmersos en la misma y su distribución en la solución. La descripción de un sistema de estas características corresponde a la Ecuación de Poisson-Boltzmann

$$-\nabla[\varepsilon(r)\nabla\phi(r)] = \rho_m(r) + \rho_s(r) \quad \text{Ec. 5.9.}$$

Suponiendo que tenemos una solución salina con cationes y aniones, la densidad de carga en la solución la escribimos como

$$\rho_s(r) = -2ex \sinh\left[\frac{e\phi(r)}{kT}\right] \quad \text{Ec. 5.10.}$$

Con lo cual obtenemos la Ecuación de Poisson – Boltzmann no linealizada:

$$-\nabla[\varepsilon(r)\nabla\phi(r)] = \rho_m(r) - 2ex \sinh\left[\frac{e\phi(r)}{kT}\right] \quad \text{Ec. 5.11.}$$

La cual, con alguna aproximación la podemos escribir como

$$-\nabla[\varepsilon(r)\nabla\phi(r)] = \rho_m(r) - \varepsilon(r)\kappa^2\phi(r), \text{ donde} \quad \text{Ec. 5.12.}$$

$$\kappa^2 = \frac{2Ie^2}{\varepsilon(r)kT} \quad , \quad \text{con una Fuerza Iónica } I = \frac{1}{2} \sum n \left(\frac{q}{e} \right)^2 .$$

A partir de este modelo y especificados los parámetros adecuados se resuelve el sistema discreto y se asignan los valores de potencial a cada uno de los puntos del reticulado, lo cual permite calcular la Energía Electroestática del sistema como

$$G_E = \frac{1}{2} \sum q_i \phi_i \quad \text{Ec. 5.13.}$$

La relevancia de las interacciones electrostáticas es particularmente notable para las moléculas con carga neta no nula. En el caso de las proteínas han sido reconocidos, por ejemplo, efectos funcionales de importancia producidos por los dipolos correlacionados de las hélices alfa. Además, en problemas que involucran la presencia de una membrana biológica muchas de las propiedades estructurales de las mismas (rigidez, estabilidad, transición lateral de fase y dinámica) dependen sustancialmente de las interacciones electrostáticas.

Dada la naturaleza ubicua de estas interacciones electrostáticas en los sistemas biomacromoleculares, se ha trabajado fuertemente en el desarrollo de métodos computacionales para el esclarecimiento de los mecanismos y procesos en los cuales subyace una componente electrostática.

Varios programas han sido desarrollados para el cálculo de interacción electrostática en moléculas de interés biológico. Uno de ellos es llamado APBS (Adaptive Poisson Boltzmann Solver) (Baker, 2001).

APBS resuelve la ecuación de Poisson-Boltzmann a partir del método de elementos finitos, donde una porción del espacio continuo se transforma en una matriz discreta para permitir las aproximaciones correspondientes, estableciéndose condiciones de contorno determinadas.

Una vez especificados todos los parámetros se emplea para la obtención de la solución un algoritmo iterativo de enfoque. Refinando el cálculo en cada ciclo y utilizando la solución anterior como punto de partida. La salida de este proceso

consiste en la obtención de los valores de potencial para cada uno de los puntos de la red propuesta.

Un caso de aplicación del cálculo de la componente electrostática de la Energía en macromoléculas es el estudio de la interacción entre la proteína que une ácidos grasos (FABP por sus siglas en inglés) y una membrana biológica y, a partir de los resultados obtenidos, se puede establecer la clasificación de las FABPs de acuerdo a su mecanismo de interacción con la membrana (Zamarreño, 2012) (Figura 5.2).

5.6. Dinámica de Macromoléculas

Así como el cálculo de la componente electrostática de la Energía nos da una visión estática de las posibles configuraciones energéticamente más favorables para un sistema biomolecular, la Dinámica Molecular nos muestra un sistema en movimiento generando la posición y la velocidad de cada partícula del sistema en cada instante de tiempo y nos permite observar el espacio de configuraciones posibles en su totalidad. Además, mediante la Mecánica Estadística podemos pasar de esta información microscópica a la obtención de magnitudes macroscópicas observables.

Una descripción rápida del modelo nos muestra que, dado un sistema compuesto por N partículas, dentro de un volumen V y con una energía fija E , las posiciones y velocidades definen un espacio de fases de $6N$ dimensiones. Obtener la posición y la velocidad de cada una de las partículas, en cada instante, significa obtener la trayectoria de un punto en el espacio de las fases en función del tiempo.

Por medio del formalismo de la simulación lo que se hace es generar una sucesión de diferentes estados (puntos) del espacio de fases, compatibles con las condiciones externas macroscópicas (N , V , E) en este caso, sobre los cuales se toman los promedios.

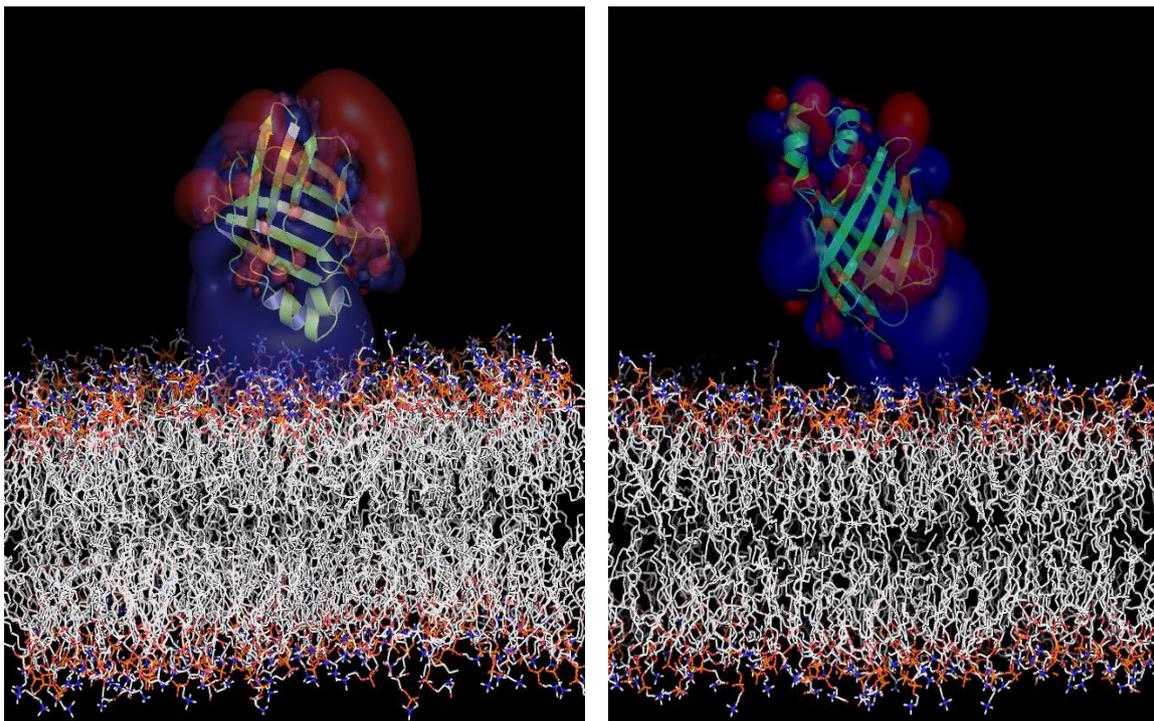


Figura 5.2. Enfoque electrostático inicial de dos diferentes FABP (IFABP y LFABP; izquierda y derecha respectivamente), mostrando como cada una de ellas inicia su interacción con la membrana de manera distinta.

La elección del conjunto bajo el cual llevar a cabo la simulación está dictada fundamentalmente por el tipo de problema a tratar. Los promedios estadísticos pueden llevar a pequeñas diferencias en los diferentes conjuntos, pero éstas desaparecen en el límite termodinámico, que se alcanza incluso con unos pocos cientos de partículas. Sin embargo la elección del conjunto sí influye al momento de calcular las fluctuaciones cuadráticas medias de las magnitudes termodinámicas. Estas permiten calcular, por ejemplo, la capacidad calorífica o el módulo de elasticidad.

Los experimentos típicos de Dinámica Molecular se realizan en el conjunto microcanónico (N, V, E). Mediante algoritmos que acoplan adecuadamente el sistema a un baño térmico o a un “baño” de presión, se pueden realizar simulaciones en el canónico (N, V, T) o en el conjunto isotérmico-isobárico (N, P, T) a presión y temperatura constante, respectivamente.

Típicamente el estudio mediante DM tiene tres fases:

FASE I: Inicialización: Se especifican las condiciones iniciales, la topología, condiciones de borde, las condiciones periódicas de contorno y se describe el sistema a simular.

FASE II: Ejecución de la Dinámica Molecular: Se integran numéricamente las ecuaciones de movimiento que gobiernan el sistema.

Veamos la forma general de un algoritmo de Dinámica Molecular:

1. Se leen los parámetros que especifican las condiciones de la corrida: Temperatura inicial, el número de partículas, la densidad, el intervalo de integración, tiempo total de simulación.

2. Se inicializa el sistema, esto es, se asignan las posiciones y las velocidades iniciales de todas las partículas del sistema. Se leen los parámetros del potencial $V(r)$.

Deben repetirse los siguientes pasos, hasta llegar al último:

3. Se calculan las fuerzas sobre todas los átomos no ligados, más las fuerzas debidas a todas las interacciones ligadas, que pueden depender de 1, 2, 3 o 4 átomos. Se calculan las restricciones, o fuerzas externas si las hubiera. Se calculan las energías cinéticas y el tensor de presiones.

4. El movimiento en el instante de cada átomo se obtiene resolviendo numéricamente las ecuaciones de Newton.

5. Si corresponde se imprimen las posiciones, velocidades, fuerzas, energías, presiones.

Un paso fundamental es la evaluación de la Energía Potencial que resulta la parte más costosa en tiempos de computación.

FASE III: Análisis de los resultados: Se evalúan las propiedades físicas tomando como dato la información de la trayectoria del sistema, que es la *salida* de la etapa anterior. El análisis se realiza comúnmente tomando promedios temporales sobre las diferentes configuraciones. Los valores medios así obtenidos, considerados durante un tiempo suficientemente largo, representan promedios termodinámicos suponiendo un comportamiento ergódico del sistema, donde consideramos que el promedio temporal es igual al promedio espacial.

Las propiedades microscópicas de interés que se estudian a partir de un cálculo de Dinámica Molecular son: distancia entre átomos, superficie expuesta al solvente, desvíos cuadráticos medios, Radios de Giro y Estudio de Puentes de Hidrógeno.

Con todos estos datos podemos, entonces evaluar las características del sistema y obtener un conocimiento más detallado de su comportamiento dinámico.

Siguiendo con el ejemplo anterior, podemos analizar el mecanismo de interacción de FABP con una membrana biológica, observando en este caso la dinámica en la aproximación y los movimientos acoplados en los componentes estructurales involucrados en la interacción (Zamarreño, 2012).

Al igual que para el cálculo electrostático, en el caso de la Dinámica Molecular, podemos encontrar distintos programas para analizar el problema.

En este caso se utilizó el paquete GROMACS (Berendsen, 1995), de amplia distribución y reconocida eficiencia. Como resultado se puede observar una aproximación diferenciada para diferentes FABPs y la formación de un complejo energéticamente estable (Figura 5.3).

Conclusiones

En este capítulo se presentó un conjunto no exhaustivo de técnicas computacionales aplicadas a sistemas moleculares de interés biológico. El alcance y objetivo no ha sido el de ahondar en las técnicas, ni dar un detalle acabado de cálculos posibles, sino presentar posibles alternativas y referenciar ejemplos de resultados obtenidos con este tipo de metodologías.

Seguramente el avance incesante de la informática permitirá el desarrollo de programas cada vez más precisos que nos aproximen a un modelo de características cada vez más cercanas a la realidad, en un continuo acercamiento a la descripción de la relación estructura-función en complejos moleculares de interés biológico.

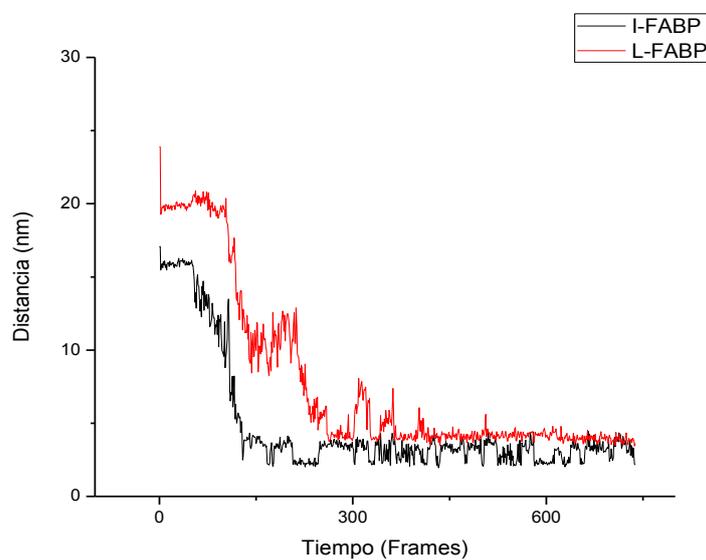
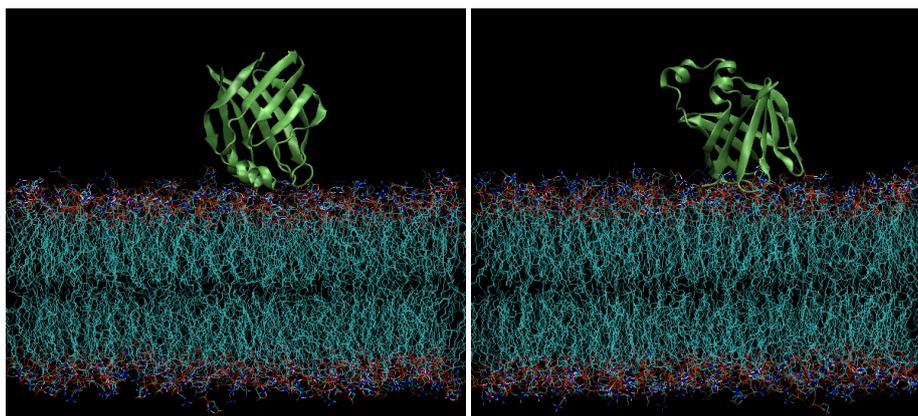


Figura 5.3. Posición final de la interacción entre IFABP (izquierda) y LFABP (derecha), y una membrana biológica modelada a partir de una simulación realizada por Dinámica Molecular. El esquema inferior muestra las curvas de aproximación que indican la distancia entre un átomo de la molécula y uno de la membrana, en función del tiempo de simulación, para cada uno de los casos.

En las referencias bibliográficas que se dan a continuación, podrán encontrar enumerados libros con información detallada que permitirán completar lo desarrollado en el presente capítulo (Leach, 2001; Hinchliffe, 2008; Schlik, 2010).

Bibliografía

Baker NA, Sept D, Joseph S, Holst MJ, McCammon JA. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 10037-10041, 2001. <http://www.poissonboltzmann.org/apbs/>

Berendsen, et al. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation *Comp. Phys. Comm.* **91**: 43-56, 1995 <http://www.gromacs.org/>

Berman HM, Westbrook J, Feng Z., Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28: 235-242, 2000. www.pdb.org

Hinchliffe A. *Molecular Modeling for Beginners*. Second Edition. Wiley and Sons Ltd, United Kingdom, 2008.

Leach A. *Molecular Modeling Principles and applications*. Second Edition Glaxo Wellcome Research and Development. Prentice Hall- Pearson Education Limited. Edinburgh, 2001.

Schlick T. *Molecular Modeling and Simulation: an interdisciplinary guide*. Second Edition. Springer, New York, USA, 2010.

Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171 (4356):737–738, 1953.

Zamarreño F, Herrera F, Córscico B, Costabel MD. Similar structures but different mechanisms. Prediction of FABPs-Membrane interaction by electrostatic calculation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1818(7):1691-1697, 2012.

Capítulo 6

RESOLUCIÓN DE ESTRUCTURAS DE PROTEÍNAS POR LA TÉCNICA DE CRISTALOGRAFÍA DE RAYOS X

Marcelo D. Costabel

Introducción

La Cristalografía de rayos X es el principal método de obtención de información estructural en el estudio de proteínas y otras macromoléculas orgánicas. El análisis de moléculas tan complejas requiere el procesamiento y análisis de un gran cúmulo de información, obtenida a partir de una muestra (proteína) en estado cristalino que se expone a radiación que proviene de un generador de rayos X. Esa complejidad molecular aporta un volumen de información que hacen necesario, para este tipo de estudios, el empleo intensivo de cálculo computacional.

El análisis de la información experimental (mapa de densidad electrónica que se obtiene a partir de la imagen de difracción de un monocristal constituido por la proteína cuya estructura se desea conocer) consiste en ajustar a esa densidad electrónica un modelo teórico (calculado u obtenido a partir de un modelo similar) de la estructura atómica de la proteína estudiada. Cuando ese ajuste es estadísticamente satisfactorio y el modelo atómico posee una estereoquímica adecuada para los aminoácidos constituyentes de la proteína, se dice que 'la estructura está resuelta' y se puede entonces analizar y -eventualmente- comprender la función biológica de la macromolécula. Las proteínas cuya estructura se ha resuelto por rayos X (junto a las obtenidas por RMN) se encuentran en un banco de datos de acceso libre denominado Protein Data Bank (Berman, 2000).

Vamos, entonces a detallar un poco más cada paso del proceso por el cual podemos obtener la estructura tridimensional de una macromolécula biológica, a partir de la técnica de difracción de Rayos X (Figura 6.1), pero antes vamos a recorrer muy rápidamente el proceso histórico que resultó en el desarrollo de esta técnica.

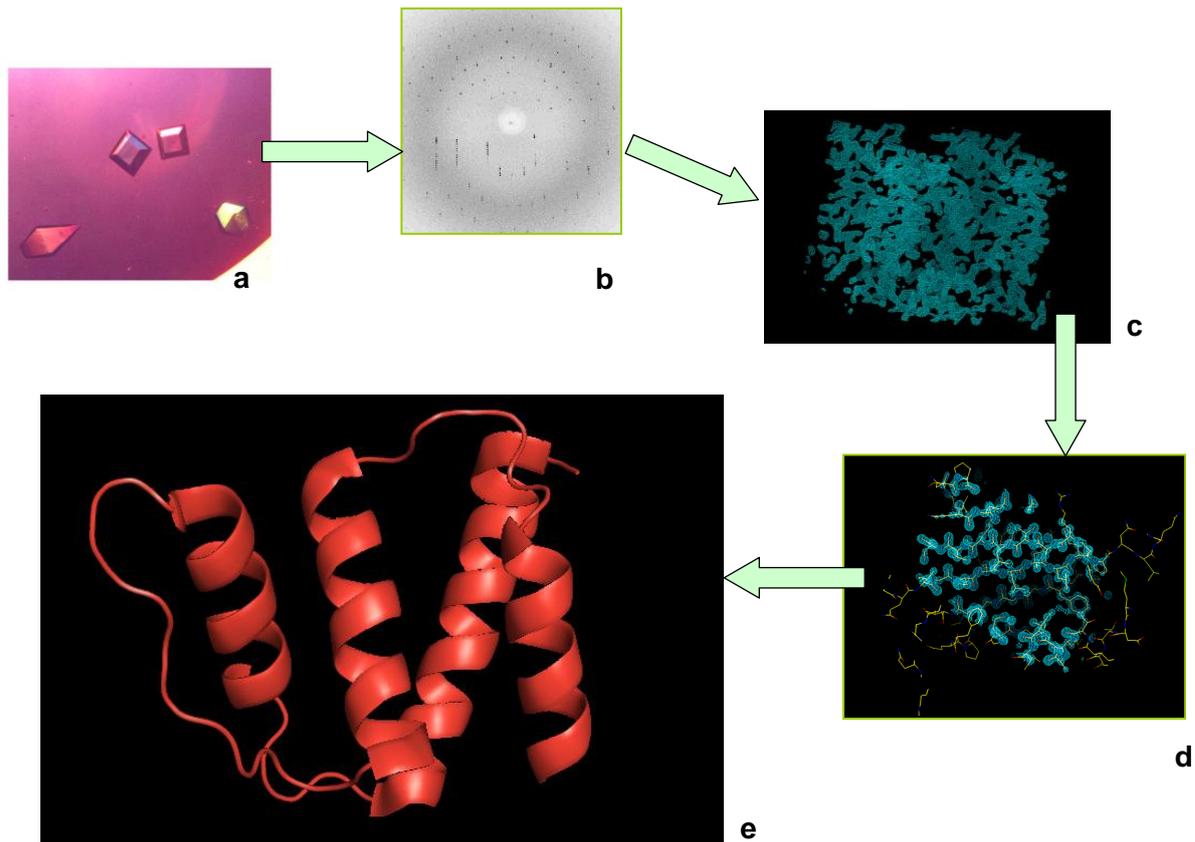


Figura 6.1. Obtención de la estructura tridimensional de una macromolécula empleando difracción de Rayos X. Pasos que componen el proceso de resolución de la estructura cristalográfica de una macromolécula biológica. a) Cristalización de la proteína. b) Colección de los datos de difracción y procesamiento de los datos. c) Armado del modelo inicial. d) Refinamiento del modelo y validación de la estructura final. e) Estructura final depositada en el PDB.

6.1. Un breve (muy breve) Repaso de la Historia

Seguramente la estructura del DNA reportada por Watson y Crick en 1953 (Watson, 1953) a partir de la foto de difracción obtenida por Rosalind Franklin

en 1952, es un punto de referencia que surge inmediatamente cuando buceamos en la historia de la resolución de estructuras de macromoléculas por técnicas de difracción de Rayos X. No obstante, en los albores de esta técnica, hay una serie de hitos que no pueden dejar de mencionarse.

Sobre fines del siglo XIX Roentgen descubre los Rayos X y en 1912 von Laue descubre que los cristales difractan esos Rayos X. Un año después Bragg determina la estructura cristalina del Cloruro de Sodio; pero deben pasar un par de décadas para que Robertson reporte la estructura de pthalocianinas, la primera estructura de una molécula orgánica compleja y en 1948 Bijvoet resuelva la estructura de la estricnina; el primer caso donde la cristalografía decide entre alternativas estructurales planteadas por químicos orgánicos

Un año después, en 1949 Dorothy Crowfoot Hodgkin, resuelve la estructura cristalina de la penicilina. Estos experimentos fueron las bases que llevaron a Kendrew y colaboradores a reportar, en el año 1958, la estructura cristalográfica de la mioglobina, la primera estructura cristalográfica de una proteína. A partir de allí se sucedieron la hemoglobina (Perutz, 1963), la lisozima (Phillips, 1965), la ribonucleasa (Richards, 1967), la papaína (Drenth, 1968) y la insulina (Blundell, 1971).

Precisamente en 1971 se establece en el Laboratorio Nacional de Brookhaven en Long Island, NY, el Protein Data Bank (PDB) que es el banco de datos donde se depositan las estructuras resueltas de las macromoléculas biológicas, y que en su primer publicación, en 1974, contenía 12 estructuras.

Desde ese momento, el incremento incesante de la capacidad computacional, como así también la implementación de la radiación sincrotrón y otras herramientas experimentales, han permitido un crecimiento ininterrumpido que lleva a que hoy el PDB cuente con más de 90000 estructuras depositadas , y sea el punto de referencia para los cristalógrafos de proteínas (Figura 6.2).

(En las referencias al final del capítulo se puede encontrar información complementaria)

6.2. Por qué Rayos X y por qué Cristales?

Cuando queremos conocer la forma de un objeto, lo primero que podemos hacer es mirarlo con los ojos. Cuando el objeto es demasiado pequeño, recurrimos a la lupa o, ante cuerpos de dimensiones muy chicas, intentaremos observarlo a través de un microscopio. No obstante, cuando el tamaño del objeto es menor que la longitud de onda de la luz utilizada, encontramos lo que denominamos el límite de difracción. En este caso, y dado que la luz visible es medida en cientos de nanómetros (nm), mientras que las distancias interatómicas son del orden de 0.1 nm, los rayos X resultan en el rango adecuado; utilizándose a menudo la radiación CuK α , la cual tiene una longitud de onda de 1.5418 Å y es emitida por el cobre luego de ser bombardeado con electrones de alta energía. Pero, como no podemos construir un “microscopio de Rayos X”, podemos pensar un sistema en dos etapas para poder observar estos pequeños objetos. El primer paso es que los rayos “choquen” con la molécula y se difracten en varias direcciones y luego se utilizan diferentes herramientas para rearmar la imagen, con lo cual tenemos el problema solucionado.

Ahora bien, toda molécula expuesta a radiación de Rayos X produce un espectro de difracción a partir del cual podemos dilucidar su estructura; no obstante esa difracción debida a una única molécula no puede ser detectada por encima del nivel de ruido, puesto que tiene una intensidad muy débil. Por este motivo se busca amplificar la señal de forma tal que sea detectable. Precisamente esa amplificación es producto de la cristalización de la macromolécula, ya que, en un cristal encontramos una multiplicidad de moléculas que estadísticamente tendrán una misma orientación relativa y que permitirán amplificar la señal.

Veamos ahora como podemos obtener esos cristales.

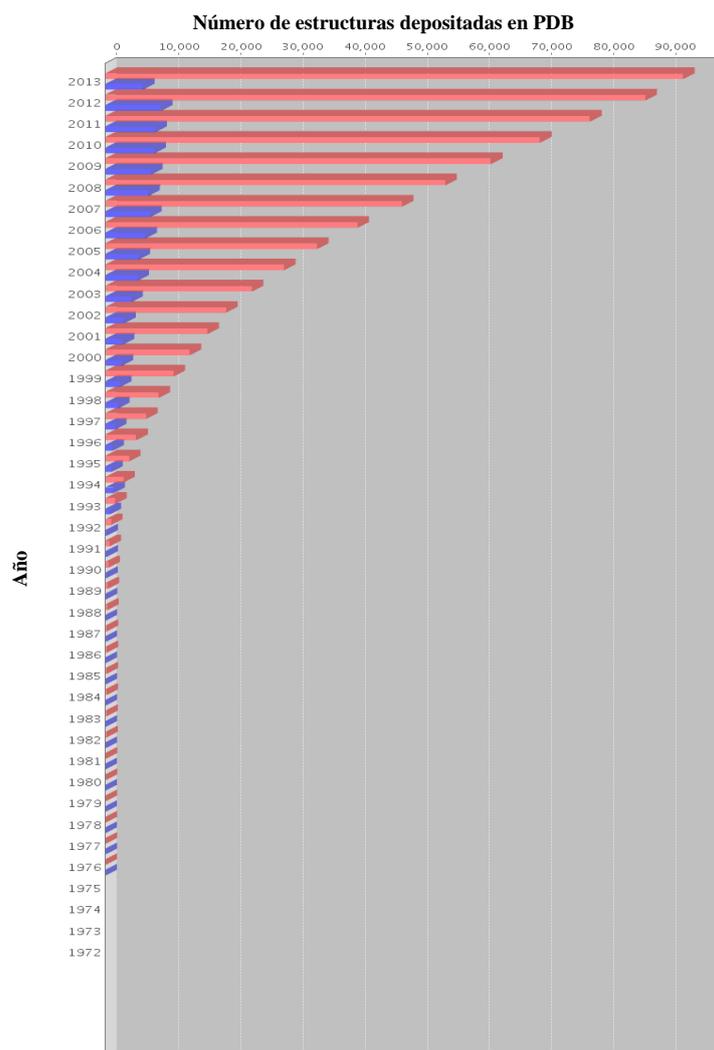


Figura 6.2. Numero de estructuras depositadas en el PDB desde sus inicios. Gráfico indicativo del crecimiento del número de estructuras depositadas en el Protein Data Bank (PDB) a lo largo de los años. En azul se indica el número anual y en rojo el número acumulado.

6.3. Cristalización de la Proteína

Es sabido que el crecimiento de cristales de proteínas constituye un área de investigación en sí mismo y, si bien hay un variado número de inconvenientes para determinar la estructura de una proteína por medio de la cristalografía de rayos X, posiblemente esta etapa constituya uno de los cuellos de botella más dificultosos de resolver.

Antes de comenzar los ensayos, la muestra debe ser llevada a una concentración adecuada para la cristalización; habitualmente valores mayores a 5 mg/ml. A partir de allí, en el caso en que la proteína haya sido cristalizada con anterioridad, se buscarán condiciones similares a las encontradas originalmente, lo cual muchas veces reduce considerablemente el tiempo en que se consigue obtener los cristales.

Si por el contrario, estamos en presencia de una molécula nunca cristalizada, debemos enfrentarnos a un ensayo experimental que permita realizar un muestreo de condiciones diferentes que lleven, a partir de un análisis exhaustivo, a precisar las condiciones en las cuales la muestra cristaliza.

Si bien existen varios métodos alternativos para la obtención de cristales de proteínas, el método más usado es el de difusión de vapor en gotas suspendidas (Figura 6.3). En este método se utilizan cajas de cristalización que permiten realizar múltiples ensayos con diferentes condiciones. Dentro de un reservorio se coloca 1ml de una solución precipitante tal como sulfato de amonio, PEG, o mezcla de sales. En algunos casos es necesario también agregar aditivos como detergentes o iones metálicos los cuales pueden ayudar en el proceso de cristalización. Luego, entre 1 y 5 μ l de la proteína es colocada en un vidrio siliconado junto con un volumen similar del líquido precipitante. El vidrio es invertido, colocado sobre el reservorio y sellado con grasa de vacío para mantener un sistema aislado. El mecanismo se repite el número de veces que permite la caja, en condiciones similares a las que consideramos posibles para la cristalización. En muchos casos y, sobre todo para evaluar las condiciones iniciales, se utilizan kits de cristalización comercializados que permiten un muestreo de condiciones diferentes ya estandarizadas. Del mismo modo, en algunos laboratorios se utilizan las denominadas “granjas” de cristalogénesis, constituidas por un equipamiento que permite un control totalmente automatizado de las muestras y una evaluación periódica de las mismas.

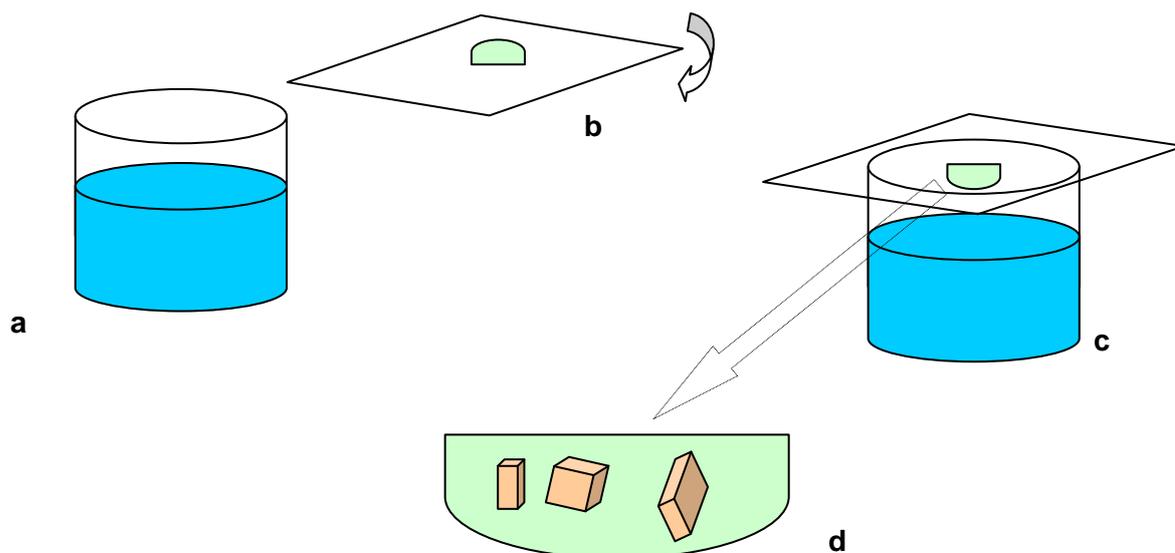


Figura 6.3. Obtención de cristales de proteína. Esquema de un experimento de cristalogénesis por el método de difusión de vapor en gotas suspendidas. a) Reservorio con el líquido precipitante. b) vidrio siliconado con una gota que contiene la proteína en solución mezclada con el líquido del reservorio. c) El vidrio se invierte y se coloca sobre el reservorio, sellado con grasa de vacío. d) crecimiento de cristales en la gota suspendida.

Debe tenerse en cuenta que para optimizar el proceso de cristalización puede ser necesario modificar diferentes variables, como la temperatura, concentraciones de la muestra, geometría, etc.; o variaciones más extremas que pueden incluir trabajar con fragmentos de la proteína bajo estudio y no con la molécula completa.

La evolución del sistema hacia las condiciones adecuadas suele llevar a la obtención de cristales, aunque debe saberse que en muchos casos llegar a estas condiciones es un trabajo arduo y temporalmente extenso, y que no puede asegurarse siempre el éxito del experimento.

También es importante destacar que la existencia de cristales no asegura el final exitoso del trabajo, puesto que se debe conseguir que difracten para, de esa manera, coleccionar los datos que permitan la resolución de la estructura. Por otra parte, en algunos casos, a partir de un solo cristal, se puede lograr obtener la cantidad de datos necesarios para resolver la estructura buscada.

6.4. Colección de Datos de Difracción

Una vez que se logran obtener cristales es el momento de exponerlos a los rayos X. Para esto, se monta el cristal en un capilar de vidrio o se suspende en un pequeño lazo de alambre, pudiéndose congelar posteriormente con nitrógeno líquido para aumentar su durabilidad al ser expuestos a la radiación. Esta exposición se realiza colocando el cristal en una cabeza goniométrica, que es un dispositivo mecánico, controlado electrónicamente, que permite posicionar el cristal frente al haz de rayos X y orientarlo de diferentes maneras respecto al mismo, cubriendo el espacio de configuraciones posibles. En el caso de macromoléculas biológicas los rayos X a los que se expone el cristal son originados por un generador de ánodo rotatorio que por su diseño permite obtener una intensidad de brillo mayor que las fuentes de rayos X convencionales; o, inclusive, también se utilizan fuentes de luz sincrotrón, en las cuales se puede modular la longitud de onda de la radiación y al mismo tiempo obtener un brillo varios órdenes de magnitud superior. Los rayos así emitidos son colimados antes de incidir en el cristal el cual los difracta para producir un patrón de difracción en un detector. Este patrón de difracción es el dato de medición experimental a partir del cual se trazará el modelo estructural y, para ello el detector es conectado a una computadora que almacena la información.

6.5. El mapa de Densidad Electrónica de la Proteína

Cada una de las manchas (puntos) que componen el patrón de difracción de un cristal (todas ellas con una intensidad propia), está producida por un haz de difracción al que contribuyen todos los átomos del cristal.

El haz difractado es una onda cuya ecuación se puede escribir en relación a las coordenadas de cada átomo que ha contribuido a generarla. La función matemática que describe el proceso de difracción se denomina la Transformada de Fourier de la densidad electrónica, que no es una función Real sino Compleja. Si aplicamos una función inversa (antitransformada) al patrón de difracción del cristal podemos calcular el mapa de densidad

electrónica de la celda cristalina, que es la representación tridimensional de la ubicación de los átomos constituyentes de la molécula. Este mapa es la herramienta fundamental que permite deducir la estructura atómica de la proteína. Pero para poder calcular el mapa hay un problema que resolver y que surge de la naturaleza compleja de la función de difracción. Ya que en el experimento de difracción sólo se puede medir la intensidad, la fase correspondiente a la función compleja permanece desconocida. Este problema se conoce como el problema de las fases en Cristalografía.

Cuando se tienen moléculas pequeñas la solución es sencilla: Se inventan fases y se calcula el mapa que se compara con la molécula. Si no es razonable se rechazan las fases y se intenta con otras.

Para macromoléculas, en cambio el problema es más complicado y existen diferentes métodos para la resolución del problema: (a) Reemplazo isomorfo: Se unen átomos pesados (Hg, I, Se) al cristal (este proceso se llama derivatizar) y se comparan los patrones de difracción del cristal original con los de 2 cristales derivatizados distintos. De la comparación de los 3 cristales se calculan las fases. (b) Reemplazo molecular: Se utilizan las fases de una proteína de estructura parecida y conocida (seguramente obtenida del PDB). Una vez conocidas las amplitudes y las fases, la transformada de Fourier calcula el mapa de densidad electrónica. (c) Dispersión anómala por múltiples longitudes de onda: Se utiliza un único cristal con átomos que dispersan de manera anómala y se cambia la longitud de onda de los rayos incidentes obteniéndose una información similar a la que se tiene con el reemplazo isomorfo.

6.6. Ajuste de la Secuencia de Aminoácidos al Mapa

Cuanto más precisamente se han determinado amplitudes y fases, cuanto más ordenado es el cristal y cuantas más reflexiones se han utilizado en los cálculos, más se parece el mapa de densidad electrónica a la estructura de la molécula. Es importante, entonces, en este punto, conocer la secuencia de la

macromolécula para ajustarla al mapa de densidad electrónica y construir el modelo inicial.

Este ajuste puede ser en parte automático y en parte 'manual' y permite obtener ese modelo inicial que debe ser acomodado de forma tal que responda de forma más aproximada a la estructura de la macromolécula bajo estudio. Este acomodamiento es lo que se denomina Refinamiento de la estructura, pero antes de hablar del refinamiento definamos como establecer cuan cerca de la realidad nos podemos acercar con el modelo propuesto.

6.7. Resolución

En cristalografía de proteínas se denomina resolución a la distancia menor entre planos refractantes para la que se ha podido recoger reflexiones (cuanto menor es la resolución, mayor es el número de reflexiones utilizadas).

De esta manera, el término resolución refiere al grado de detalle con el cual podemos determinar la estructura de la molécula. Si los átomos dentro del cristal estuvieran en posiciones precisas y todas las moléculas en idénticas conformaciones, la dispersión de los rayos X estaría dada en fase y el límite sólo estaría dado por la longitud de onda; como esto no sucede, y existe un desorden relativo en la red cristalina, tenemos un limitado detalle para la resolución y en definitiva lo que obtenemos es un mapa de densidad de mayor o menor calidad. Es por esto que una estructura resuelta a alta resolución tendrá un valor de resolución pequeño e implica un detalle preciso de las posiciones atómicas mientras que en una a baja resolución el valor numérico asociado es grande y el grado de incerteza en la ubicación de cada uno de los átomos es mayor (Figura 6.4).

Con este concepto podemos ver de qué manera modificamos el modelo para obtener la estructura final.

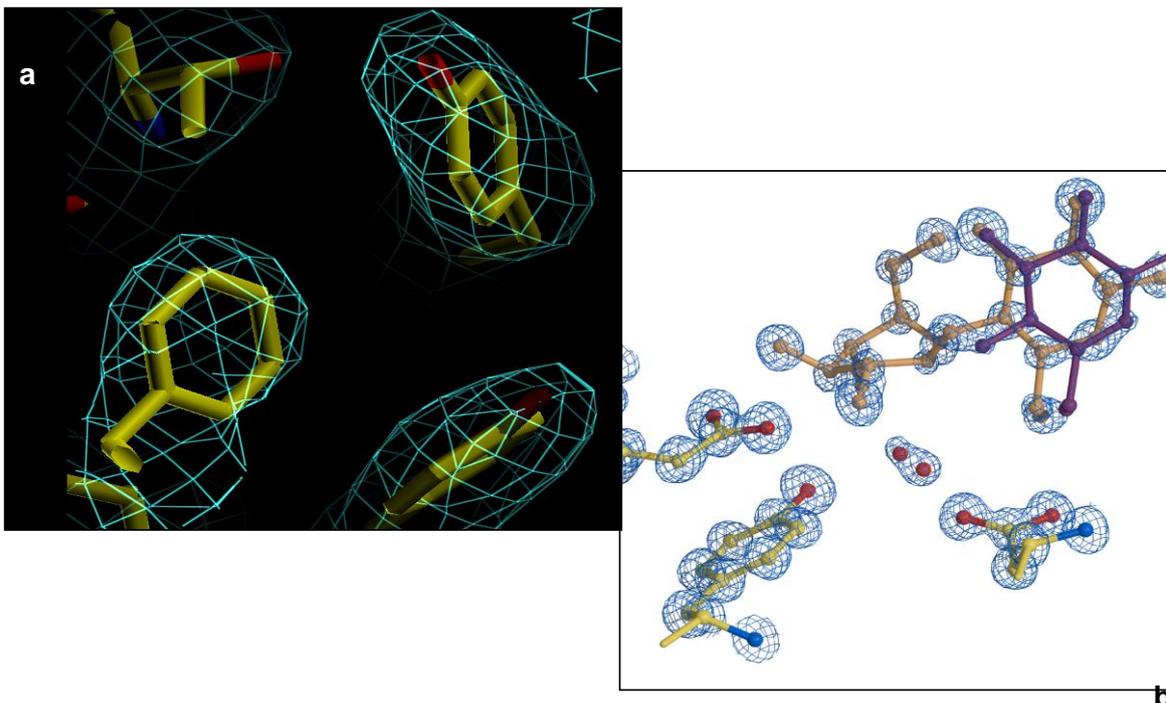


Figura 6.4. Segmentos de moléculas modeladas en la densidad electrónica. a) Resolución de 3.0 Å. b) Resolución de 0.9 Å. Nótese que en la figura b) se puede localizar los átomos con precisión e inclusive determinar conformaciones alternativas para ellos.

6.8. Refinamiento

Una vez que logramos un modelo inicial para la molécula comienza la etapa de refinamiento, donde debemos ajustar los parámetros de manera tal de encontrar un ajuste entre los datos experimentales provenientes del patrón de difracción y el modelo propuesto que se va modificando. Para asegurarnos que el refinamiento va en el sentido correcto, se realiza un seguimiento de este ajuste a partir de un parámetro que se denomina R y que proviene de comparar los factores de estructura observados (vienen de los datos experimentales) y calculados (vienen del modelo que se propone). Un modelo absurdo daría un valor para R del orden de 0.60; mientras que un modelo es aceptable a partir de un valor de R próximo 0.2. Con proteínas se puede llegar hasta $R = 0.1$ y con moléculas pequeñas hasta $R = 0.01$. Para refinar el modelo: se incluyen moléculas de agua, se varía el factor de temperatura de cada átomo (es una

medida de su movilidad), se varían ligeramente las fases y fundamentalmente se modifican las coordenadas ('manualmente' o por dinámica molecular).

El proceso de refinamiento implica una iteración entre el espacio real y lo que denominamos el espacio recíproco del sistema.

En el espacio real observamos el modelo con la ayuda de un programa gráfico y lo ajustamos al mapa de densidad electrónica de acuerdo a las modificaciones que se mencionaron antes.

Una vez obtenido el nuevo modelo, se trabaja en el espacio recíproco minimizando la diferencia entre los factores de estructuras medidos y calculados. Este proceso se lleva a cabo con programas de cálculo específicos y el factor R nos va dando la medida de la evolución del refinamiento en esta etapa.

6.9. Validación

El proceso de evaluación de la calidad de la estructura cristalográfica lograda se denomina validación. Hay varios aspectos de validación que pueden ser considerados.

El primer factor que debe tenerse en cuenta es el ya mencionado factor R, el cual nos muestra el acuerdo entre los factores de estructura observados y los calculados. Una dificultad que puede ocurrir en esta etapa es sobreajustar los datos obtenidos, y llegar a estructuras erróneas a pesar de tener un valor para R adecuado. Para evitar esto, se utiliza un subconjunto pequeño de datos (alrededor del 10%) y se calcula con ellos el mismo valor de R independiente del proceso de refinamiento; a este valor se lo llama R_{free} . Si este valor baja durante el refinamiento, nos aseguramos que el proceso está evolucionando favorablemente y consideramos que el modelo realmente mejora.

Otros tipos de validación se fundan directamente en el modelo, sobre el cual se evalúan diferentes parámetros, como longitudes de unión entre átomos, ángulos de unión y de torsión y contactos de Van der Waals, los cuales deben ser consistentes con las bases de datos.

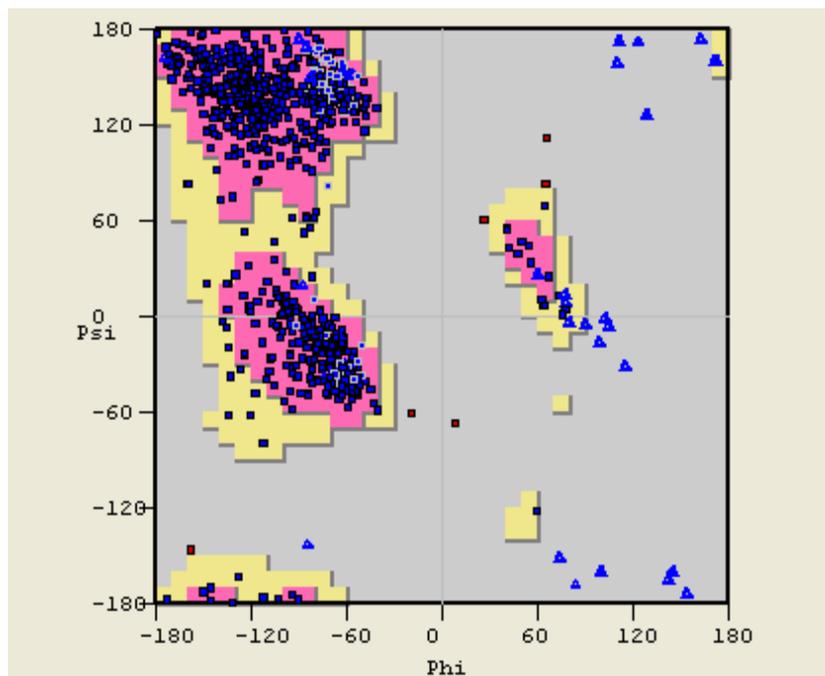


Figura 6.5. Diagrama de Ramachandran. Se utiliza para validar el modelo de estructura propuesto de acuerdo a sus características estereoquímicas. Cada punto representa los valores de los ángulos de torsión para cada aminoácido. El ejemplo muestra una estructura con más de 3000 aminoácidos donde cerca del 99% se encuentra en zonas estructuralmente permitidas.

Uno de los datos característicos de la validación de una estructura es el diagrama de Ramachandran, que grafica los ángulos de torsión de la cadena principal de la estructura y muestra si el modelo se ajusta a las zonas permitidas para esos valores (Figura 6.5).

6.10. Herramientas Computacionales para Resolver una Estructura Cristalográfica

Es claro que en el proceso de resolver una estructura a partir de técnicas de cristalografía de Rayos X se conjugan metodologías experimentales y de cálculo computacional. La primera parte del procedimiento es básicamente experimental y la parte computacional es implementada a partir de la obtención de los datos de difracción.

Lo primero que debe decirse es que existen numerosos programas de cálculo para cada etapa del proceso.

El primer paso implica el procesamiento de los datos para transformar el espectro de difracción en un mapa de densidad electrónica. Luego, hay diferentes etapas para determinar las fases y mejorarlas, tanto a partir de un modelo inicial (reemplazo molecular) cuando es posible, como también por el uso de métodos *ab initio* partiendo por ejemplo de la localización de un átomo pesado en la estructura.

A partir de allí se concatenan programas para el proceso de refinamiento del modelo que implican cálculo específico con algoritmos de minimización de la energía del sistema y que involucran también Dinámica molecular y, por otra parte la necesidad de visualización gráfica que permite la manipulación y modelización de la estructura molecular.

Por último diferentes programas nos permiten evaluar el proceso de refinamiento y validar la estructura final.

Si bien existen comercialmente y, con distribución libre, numerosos programas en cada una de las etapas descriptas, vale mencionar la existencia de una colección de programas y librerías de datos asociadas, enmarcadas en lo que se denomina suite CCP4 (Collaborative Computational Project Number 4) (Wynn, 2011). Los programas provienen de una variedad de fuentes conectadas en una única infraestructura.

CCP4 tiene ya más de 30 años pero continúa en constante progreso y evolución ofreciendo una actualizada herramienta para la resolución de una estructura proteica donde se incluyen paquetes de programas para cada una de las etapas.

Un párrafo aparte merece los programas gráficos que también han evolucionado durante las últimas décadas y constituyen una herramienta fundamental del proceso. En los 80s, el advenimiento de los programas gráficos cambió sustancialmente la Cristalografía de proteínas aportando una herramienta importantísima para el modelado de la estructura. En la actualidad cabe mencionar el programa COOT (Emsley, 2010) asociado a CCP4 que

también ofrece herramientas de modelado, refinamiento y validación intrínsecas, y asociadas a otros programas.

Conclusiones

El diseño racional de fármacos, el entendimiento de la función de las macromoléculas biológicas y otros procesos relacionados a las proteínas, necesitan del conocimiento estructural de esas moléculas. En este sentido, la cristalografía de Rayos X constituye, desde hace varias décadas, la herramienta preponderante para dilucidarlas.

En este capítulo, no se pretendió presentar la cristalografía de proteínas en detalle, ni tampoco la matemática involucrada; sino que se explicitan sucintamente los pasos necesarios de todo el proceso para entender cómo llegar desde la proteína purificada hasta la estructura final y brindar al lector datos de interés para que sepa donde recurrir para aprender en detalle y poder aplicar la técnica de forma específica; para lo cual se sugiere que profundice en la bibliografía citada (Blundell, 1976; Lattman, 2008; Rupp, 2009; Rhodes, 2006; Glusker, 1994; Drenth, 2007; McRee, 1999).

Bibliografía

Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28: 235-242. 2000.

Blundell TL, Johnson LN. *Protein crystallography*. Academic Press, New York 1976.

Drenth J. *Principles of Protein X-Ray Crystallography*. Springer Advanced Texts in Chemistry, New York, 2007.

Emsley P., Lohkamp B., Scott WG, and Cowtan K. Features and Development of Coot. *Acta Crystallographica D* 66, 486-501. 2010.

Glusker, JP, Lewis M, Rossi M, *Crystal Structure analysis for chemists and biologists* Wiley – VCH, Inc. Canada 1994.

Lattman EE, Loll PJ. Protein Crystallography: A Concise Guide. The Johns Hopkins University Press; Maryland. 2008.

McRee D E, David P R. Practical Protein Crystallography. Elsevier, New York, 1999.

Rhodes G. Crystallography Made Crystal Clear, Academic Press, New York, 2006.

Rupp B. Biomolecular Crystallography: Principles, Practice, and Application to Structural Biology. Garland Science, 2009.

Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. Nature,171(4356):737–738, 1953.

Winn M. D., et al. Overview of the CCP4 suite and current developments Acta. Cryst. D67, 235-242, 2011.

Bibliografía complementaria recomendada:

Gale Rhodes. Crystallography Made Crystal Clear, Third Edition: A Guide for Users of Macromolecular Models. Complementary Science Series. Academic Press, 2002. http://www.amazon.com/Biomolecular-Crystallography-Principles-Application-Structural/dp/0815340818/ref=pd_sim_b_1.

Jan Drenth. Principles of Protein X-Ray Crystallography. Springer Advanced Texts in Chemistry Series. Springer, 2006. <http://www.amazon.com/Principles-Crystallography-Springer-Advanced-Chemistry/dp/0387333347>

CAPÍTULO 7

RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Marina Ibáñez Shimabukuro y M. Florencia Rey Burusco

Introducción

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es una técnica espectroscópica muy poderosa que nos permite estudiar a nivel atómico moléculas de interés biológico. Complementaria a la técnica de rayos X, constituye una herramienta fundamental para la determinación de estructuras de proteínas y otras biomoléculas en solución. Sin embargo, a diferencia de otras técnicas del campo de la biología estructural, brinda información sobre procesos dinámicos, lo cual representa una de sus características más sobresalientes y en consecuencia, su versatilidad determina que sea ampliamente utilizada. Respecto a los alcances y aplicaciones, podemos mencionar desde la elucidación de compuestos pequeños en la química orgánica, la determinación de estructuras de moléculas biológicas y sus interacciones, y el estudio cinético de reacciones; hasta el diseño racional de drogas y el diagnóstico por imágenes en medicina.

En este capítulo nos enfocaremos en el uso de RMN para el análisis de estructuras de proteínas en solución. Dada la gran complejidad subyacente a esta técnica, nos ajustaremos a brindar nociones básicas que permitan al estudiante comprender cómo se arriba a un conjunto de estructuras tridimensionales, a partir de información experimental. Desarrollaremos las explicaciones de una manera descriptiva, lo más despojada de formalismos posible, con la intención de acercar al lector inexperto al creciente número de publicaciones científicas que emplean RMN, facilitando su abordaje. Para un estudio riguroso, recomendamos la lectura de los trabajos citados en la sección de Bibliografía. Adicionalmente, discutiremos en forma breve algunas

aplicaciones como el análisis de interacción entre biomoléculas y el estudio de proteínas en células (*in cell NMR*).

7.1. Fundamentos

Como se ha desarrollado en capítulos anteriores, la *espectroscopía* es el estudio de la interacción de radiación electromagnética con la materia. En este sentido, los conceptos de *estados de energía* y *distribución de poblaciones* son fundamentales en la espectroscopía de RMN y determinan la posición en frecuencia e intensidad de las señales espectrales (Keeler, 2005). Pero antes que nada, necesitamos conocer cómo se generan estos estados de energía en los *núcleos* y cuáles son las energías y poblaciones asociadas.

Comencemos recordando que los núcleos atómicos están compuestos por protones y neutrones. Cuando en un dado núcleo atómico, los números másico (A) y atómico (Z) son ambos pares, resulta que su número cuántico de espín es igual a cero ($I = 0$). En consecuencia, esto determina que no se genere ninguna señal de RMN y sea invisible desde el punto de vista de esta técnica. Para aquellos núcleos con A par y Z impar, $I > \frac{1}{2}$; por lo que no poseen simetría esférica de carga y presentan dificultades para su observación por RMN. Por último, para aquellos núcleos con A impar, $I = \frac{1}{2}$ y esto determina que se comporten como dipolos magnéticos: es decir que tienen un momento magnético dipolar, μ_B , asociado a su espín nuclear. Cuando estos núcleos se colocan en un campo magnético B_0 , se comportan como pequeños imanes y tienden a alinearse respecto a la dirección del campo aplicado (Hornak, 1997).

De acuerdo a la mecánica cuántica, un núcleo con número cuántico de espín I , puede asumir $2I + 1$ orientaciones en un campo magnético. De aquí se desprende que para aquellos núcleos con $I = \frac{1}{2}$, hay dos orientaciones posibles: paralelos al campo externo B_0 (estado de baja energía, $E = -\mu_B B_0$) o antiparalelos (estado de alta energía, $E = +\mu_B B_0$) (Figura 7.1). El estado de menor energía determina la orientación preferencial de los núcleos. Sin embargo, puede aplicarse energía en forma de radiación electromagnética, que

obligue a esos núcleos a invertir el sentido de su orientación con respecto al campo externo. En esa situación se dice que el sistema está en resonancia.

Esta energía aplicada, ΔE , que es la que separa a los dos estados, es igual a:

$$\Delta E = 2 \mu_B B_0 \quad \text{Ec. 7.1}$$

donde B_0 es el campo magnético que experimentan los núcleos y μ_B es la componente, a lo largo del eje del campo, del momento magnético nuclear. La magnitud del momento magnético nuclear se relaciona con una cantidad, conocida como constante giromagnética γ , que es característica para cada núcleo (Tabla 7.1) mediante:

$$\mu_B = \frac{1}{2} \hbar \gamma \quad \text{Ec. 7.2}$$

con $\hbar = h/2\pi$, siendo h la constante de Planck.

Isótopo	Espin I	Abundancia Natural [%]	γ [$10^7 \cdot \text{rad}/(\text{T} \cdot \text{s})$]
^1H	$1/2$	99,98	26,7519
^2H	1	0,16	4,1066
^{12}C	0	98,9	-
^{13}C	$1/2$	1,108	6,7283
^{14}N	1	99,63	1,9338
^{15}N	$1/2$	0,37	-2,712
^{18}O	0	98,9	-
^{17}O	$5/2$	0,037	-3,6279
^{31}P	$1/2$	100	10,841

Tabla 7.1. Constantes giromagnéticas (γ) y abundancia natural de algunos núcleos con sus valores de espín I correspondientes. En azul se destacan los núcleos comúnmente empleados en el estudio de moléculas biológicas por RMN.

La energía aplicada que provoca la excitación de los espines nucleares, tiene una frecuencia de resonancia asociada, ν , que conserva la conocida relación de Einstein dada por:

$$h \nu = \Delta E \quad \text{Ec. 7.3}$$

de esta manera, obtenemos

$$h \nu = \Delta E = 2 \mu_B B_0 = \hbar \gamma B_0 \quad \text{Ec. 7.4}$$

y entonces, la frecuencia de resonancia,

$$\nu = \gamma B_0 / 2\pi$$

Ec. 7.5

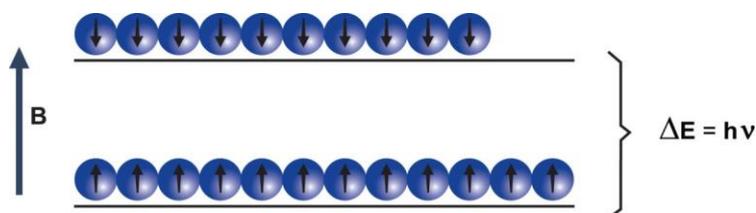


Figura 7.1. Niveles de energía de los dipolos magnéticos nucleares en presencia de un campo B_0 . Nótese el ligero exceso de población en el estado de menor energía, alineado con el campo externo.

Conclusiones:

Hasta aquí podemos resaltar algunos conceptos que serán útiles para comprender las secciones posteriores:

- Los distintos núcleos tienen constantes giromagnéticas, γ , características, que definen la frecuencia de resonancia, y por lo tanto la posición de las señales en los espectros que vamos a adquirir durante los experimentos.
- Ese valor de frecuencia de resonancia también depende, acorde a la ecuación 2.5, del campo sentido por los núcleos. Veremos más adelante la importancia que reviste esta idea, cuando hablemos del llamado corrimiento o desplazamiento químico, que es la herramienta que nos ayudará a identificar a cada uno de los núcleos del sistema de estudio.
- Recordando nociones de fisicoquímica, vemos que existe una relación entre la separación energética de dos estados y la diferencia de población entre ellos. A mayor energía de separación, mayor diferencia entre las poblaciones. A su vez, la diferencia de poblaciones se relaciona con el número de espines que sufren el fenómeno de resonancia y la magnitud observable de este fenómeno. En RMN, esto determina que la sensibilidad vaya de la mano de la fuerza del campo externo y entonces, surge la necesidad de equipamiento poderoso y por añadidura, costoso.

- La relación señal/ruido mejora de forma proporcional a la raíz del número de escaneos, es decir del número de veces que se registren las señales. Como la sensibilidad es un punto clave, un experimento típico de RMN, implica adquirir un mismo espectro un alto número de veces.

7.2. Espectrómetro

Para realizar los experimentos, las muestras se colocan bajo un campo magnético fuerte, en el espectrómetro de RMN. Este equipo consiste en una bobina de un material superconductor a muy bajas temperaturas (menores a 6K), a través de la cual pasa una corriente eléctrica que genera el campo magnético. Una vez que la corriente ha pasado, el campo magnético generado es estable y persistirá indefinidamente sin la necesidad de aplicar más corriente. El espectrómetro está diseñado de modo tal que la zona donde se halla la muestra, entre los polos del imán, se encuentra a temperaturas cercanas a la ambiente (Figura 7.2).

Las frecuencias de resonancia de cada núcleo se determinan usando el campo magnético estático y homogéneo (B_0) que hemos descrito, y además un campo magnético oscilante (B_1). El campo B_1 es aplicado en forma de pulsos de radiofrecuencia mediante una sonda que a su vez detecta las señales recibidas. Los pulsos se generan y controlan mediante una consola (Rule, 2006). Para cada experimento se emplean secuencias de pulsos específicas que el operario comanda desde una computadora, en la cual se van almacenando las señales recibidas previamente amplificadas y digitalizadas en la consola. Posteriormente se procesan y analizan los datos.

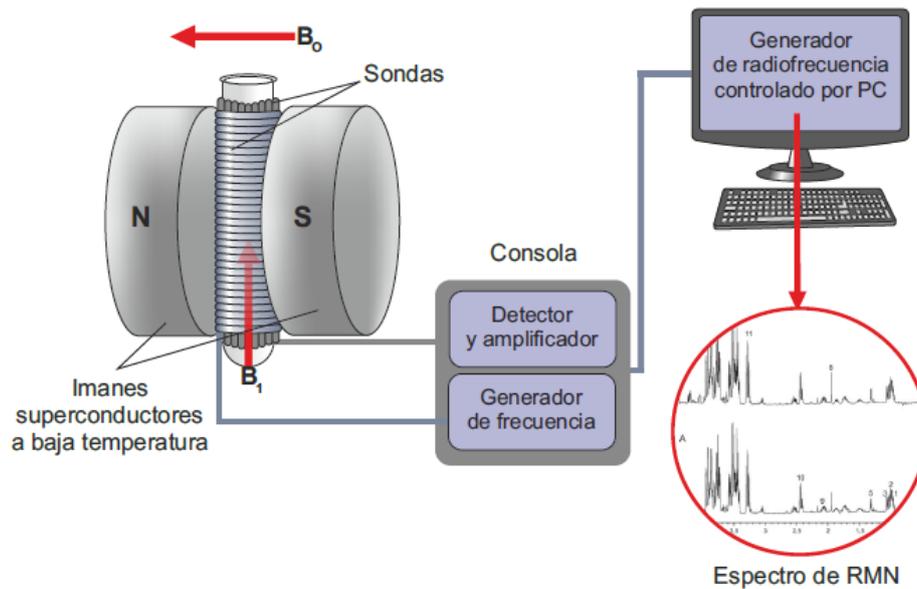


Figura 7.2. Representación esquemática de un espectrómetro de RMN.

7.3. Parámetros Espectrales

Efecto del entorno químico

Como dijimos anteriormente, la frecuencia resonante observada para un núcleo atómico particular depende de dos factores: la naturaleza del núcleo y el campo magnético efectivo que sensa (B_{ef}). Es este segundo factor el que hace de la RMN una técnica tan poderosa, dado que B_{ef} está compuesto no sólo por el campo externo aplicado desde el imán (para simplificar consideramos sólo el B_0 estático), sino también por contribuciones adicionales de otros núcleos y grupos químicos, que actúan como pequeños imanes, modificando el campo magnético local (B_{local}). Las frecuencias de resonancia en RMN son en consecuencia extremadamente sensibles al entorno químico de un núcleo atómico particular, y esto puede ser usado para obtener información estructural precisa (Cooper, 2004). El desplazamiento químico y el acoplamiento espín-espín son modos de describir estas contribuciones adicionales. El primero

consiste en un corrimiento de la señal mientras que el segundo, se manifiesta como un desdoblamiento de la señal. Hay dos tipos de acoplamientos espín-espín: el acoplamiento escalar y el acoplamiento dipolar. El acoplamiento escalar se transmite a través de los enlaces, depende del ángulo diedro y no depende de la orientación espacial. Por otra parte, el acoplamiento dipolar se transmite a través de la distancia decayendo con $1/r^6$ y sí depende de la orientación.

Desplazamiento químico

El desplazamiento químico es el corrimiento en la frecuencia de absorción de un núcleo debido a su entorno químico. Los electrones producen campos magnéticos pequeños que se oponen a B_0 , con una constante de apantallamiento, σ :

$$B_{ef} = B_0 - B_{local} = B_0 (1 - \sigma) \quad \text{Ec. 7.6}$$

En consecuencia, la ecuación para la frecuencia de resonancia toma la forma,

$$\nu = \gamma B_0 (1 - \sigma) / 2\pi \quad \text{Ec. 7.7}$$

Si un núcleo está unido a un elemento de menor electronegatividad, tendrá una alta densidad electrónica que causa un efecto de apantallamiento mayor, corriéndose la señal a regiones de menor frecuencia. Si en cambio el elemento cercano es más electronegativo, los electrones ejercerán un menor apantallamiento y el corrimiento a regiones de menor frecuencia no será tan pronunciado. En el caso de anillos aromáticos el efecto de la corriente de electrones π , puede producir tanto un apantallamiento como un desapantallamiento según la posición del núcleo con respecto al anillo y al campo magnético.

El desplazamiento químico obtenido en unidades de frecuencia no puede compararse directamente con resultados provenientes de equipos diferentes porque, tal como se desprende de la fórmula, depende del campo magnético aplicado.

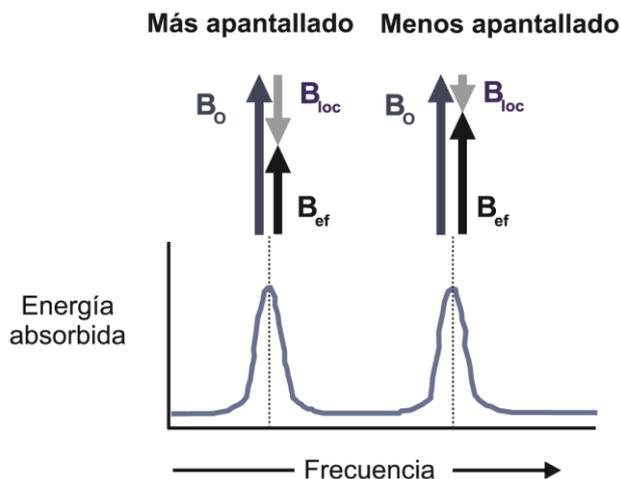


Figura 7.3. Desplazamiento químico. Los núcleos sufren un corrimiento en la frecuencia de absorción que depende del entorno en que se encuentran. Se producirá un corrimiento hacia menores frecuencias si el campo efectivo (B_{ef}) que sensa es menor a B_0 debido a un campo local que se opone, B_{loc} . Este es el caso del apantallamiento generado por una alta densidad de electrones si el núcleo está unido a un elemento menos electronegativo. Si el B_{loc} es menor, porque el elemento vecino es más electronegativo, el núcleo en cuestión no está tan apantallado y, en consecuencia, el corrimiento no es tan pronunciado.

Para independizarse del campo, se define al desplazamiento químico δ en una escala relativa, tomando un núcleo de referencia (como por ejemplo los H equivalentes del compuesto tetrametilsilano), y se calcula la diferencia de resonancias con el núcleo de estudio. Asimismo, como la magnitud δ es pequeña en comparación con B_0 , resulta más práctico expresarla en partes por millón (ppm):

$$\delta = \frac{\nu_x - \nu_{ref}}{\nu_{ref}} 10^6 \quad \text{Ec. 7.8}$$

De este modo el desplazamiento químico δ queda expresado en ppm y es independiente del espectrómetro utilizado.

Un aspecto interesante de los datos de desplazamiento químico, es que partir de ellos se pueden estimar los ángulos de torsión y, en consecuencia, predecir la estructura secundaria.

Acoplamiento escalar

El acoplamiento escalar se manifiesta por la influencia que ejerce un núcleo activo de RMN sobre otro núcleo activo, que se transmite a través de los electrones de enlace.

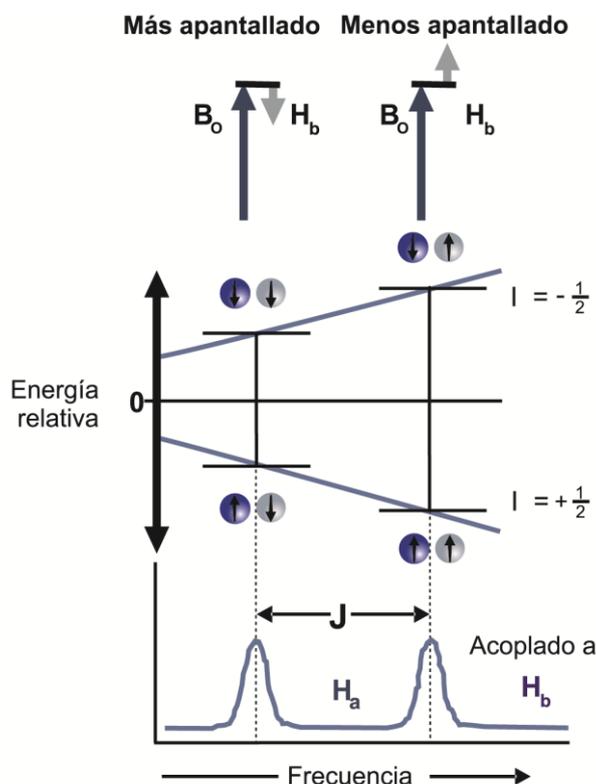


Figura 7.4. Acoplamiento escalar. Para dos núcleos acoplados H_a y H_b , se observa un desdoblamiento en la señal de H_a . La separación en Hertz entre los picos de la señal desdoblada, es el acoplamiento escalar J . El desdoblamiento de la señal se produce porque el campo magnético que percibe H_a disminuye o se incrementa si el espín de H_b se encuentra en contra o a favor del campo.

El origen del acoplamiento escalar se encuentra en la polarización provocada por el espín nuclear en los electrones de enlace. Si se tienen dos núcleos acoplados, uno de ellos siente a través de los enlaces químicos un incremento o disminución en el campo magnético debido al espín a favor o en contra del núcleo vecino. Este fenómeno produce un desdoblamiento de la señal cuya separación medida en Hz se conoce como constante de acoplamiento J .

Esta constante depende de la naturaleza del núcleo y su constante giromagnética γ , de la electronegatividad de los núcleos involucrados, del número de enlaces, y de los ángulos en que están enlazados, pero no depende

del campo magnético aplicado. El acoplamiento escalar será exactamente el mismo en cualquier equipo de RMN independientemente de B_0 .

En base a la cantidad de enlaces que separan a dos núcleos se definen tres tipos de acoplamientos J:

1J acoplamiento escalar de primer orden: Constante de acoplamiento para dos núcleos unidos mediante un enlace.

2J acoplamiento escalar de segundo orden: En este caso, los núcleos se hallan separados por dos enlaces.

3J acoplamiento escalar de tercer orden: Es el acoplamiento más útil para estudios estructurales porque los núcleos relacionados con los ángulos de torsión en las proteínas se encuentran a tres enlaces de distancia.

En la Figura 7.5 se muestran valores de algunas constantes de acoplamiento típicas en proteínas.

En el caso de las proteínas se puede representar 3J mediante la ecuación de Karplus:

$$^3J(\theta) = A \cos^2 \theta + B \cos \theta + C \quad \text{Ec. 7.9}$$

Donde θ es el ángulo diedro entre dos núcleos de hidrógeno y los valores A, B y C son parámetros experimentales.

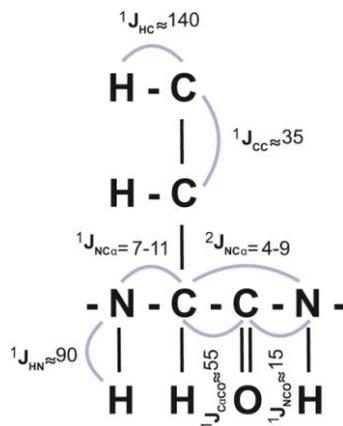


Figura 7.5. Ejemplos de constantes de acoplamiento escalar típicas de proteínas.

Con esta ecuación, se relaciona entonces la constante de acoplamiento con los ángulos diedros, pudiendo por ejemplo obtenerse información estructural de la cadena principal de una proteína.

Los diferentes elementos de estructura secundaria de una proteína tienen valores de ángulos diedros característicos y en consecuencia también valores de 3J .

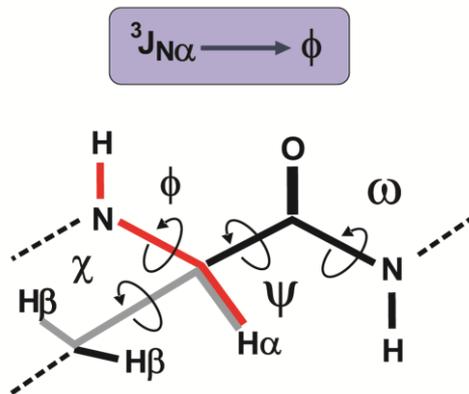


Figura 7.6. Ángulos de torsión en un segmento de cadena polipeptídica. En particular, el ángulo diedro psi, ϕ , guarda relación con la constante de acoplamiento $^3J_{NH-H\alpha}$ mediante la ecuación de Karplus. La orientación relativa del enlace H-N respecto al enlace C α -CO, se puede relacionar con la estructura secundaria.

Acoplamiento dipolar

El acoplamiento dipolar se manifiesta a través del espacio; dependiendo de la proximidad espacial y de la orientación respecto a B_0 .

En solución, las moléculas se mueven aleatoriamente con respecto a B_0 ; esto resulta en que los diferentes acoplamientos que se den en las moléculas se promedien a cero y de allí que el acoplamiento dipolar no se manifieste como un fenómeno directamente observable.

Sin embargo, debemos reparar en dos importantes cuestiones que surgen como consecuencia del acoplamiento dipolar. Una de ellas es el efecto nuclear Overhauser (NOE, de acuerdo a sus siglas en inglés). De forma muy simplificada, este efecto radica en que un núcleo es capaz de modificar los parámetros asociados a la relajación de otro núcleo cercano, y en consecuencia las señales que este último emite se ven intensificadas o atenuadas. La *magnitud* de este efecto guarda relación con la *distancia* que separa dichos núcleos. Debido a que el efecto se transmite a través de la

distancia, decayendo con $1/r^6$ y perdiendo efecto a distancias mayores a 5 Å, se puede correlacionar la intensidad de las señales con distancias internucleares. Estas distancias internucleares son las que nos darán información esencial para determinar el plegamiento tridimensional de las proteínas (Wüthrich, 2003).

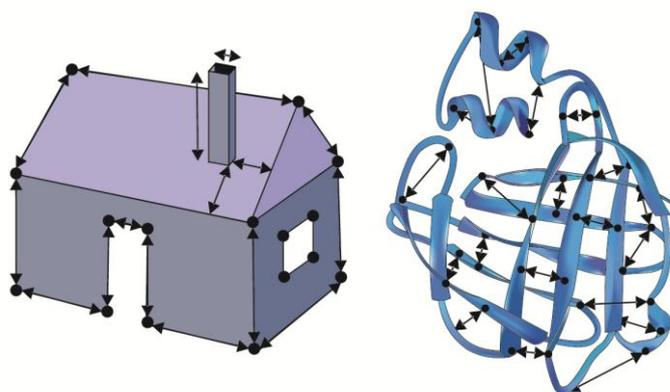


Figura 7.7. Como lo expresó el premio Nobel de química 2002, Kurt Wüthrich: “si uno conoce todas las medidas de una casa, puede construir un esquema 3D de esa casa. De la misma manera, midiendo un gran número de pequeñas distancias en una proteína, es posible crear una imagen de la estructura tridimensional de la misma”.

Por otro lado, si uno pudiera de alguna manera eliminar la condición de movimiento aleatorio de la proteína respecto a B_0 , vería una resultante, producto del acoplamiento dipolar, que de otra manera promedia a cero (Lipsitz, 2004). Esto puede lograrse introduciendo en el medio alguna sustancia que provoque cierto grado de alineamiento en las moléculas proteicas, restringiendo parcialmente su movimiento. Experimentalmente se recurre a micelas, fagos o geles, entre otros, para crear ese medio anisotrópico. Seguidamente, se corren experimentos específicos que permiten calcular los llamados acoplamientos dipolares residuales (RDC, de acuerdo a sus siglas en inglés). Los RDCs reportan información que tiene que ver con la orientación relativa entre dos núcleos, respecto al campo externo B_0 , de manera que pueden brindarnos información de gran interés en cuanto a la disposición de distintos dominios dentro de una proteína, o entre porciones alejadas en el plegamiento (Gronenborn, 2002).

Relajación

La relajación es un proceso mediante el cual los espines de los núcleos perturbados por pulsos de radiofrecuencia vuelven al equilibrio (Keeler, 2005). Desde el punto de vista fenomenológico, pueden indentificarse dos tipos de relajación diferentes: la relajación espín-entorno, caracterizada por una constante T_1 , y relajación espín-espín, asociada a la constante T_2 . Desde el punto de vista práctico, conocer el tiempo que tarda una muestra en volver al equilibrio es importante, debido a que esto determina el tiempo que es necesario esperar para realizar el siguiente escaneo.

Un núcleo aislado no se puede reorientar por sí mismo dado que este proceso requiere una transferencia de energía hacia el entorno, y el tiempo que tarda en relajarse depende de interacciones entre el núcleo perturbado y sus alrededores. La vuelta al estado de equilibrio térmico describe un decaimiento exponencial, con una constante de tiempo T_1 denominada tiempo de relajación longitudinal. El tiempo de relajación T_1 , está relacionado con la fluctuación del campo magnético local percibida por el núcleo como consecuencia de núcleos vecinos, presentes tanto en la misma molécula como en el solvente circundante. Los valores de T_1 dependen de cuán rápido se mueve aleatoriamente en solución la molécula que contiene al núcleo.

Los efectos anisotrópicos espín-entorno son más significativos con muestras sólidas o membranas biológicas, donde el movimiento y los giros son mucho más lentos y restringidos. Para tales casos, se han desarrollado técnicas de RMN en estado sólido.

El tiempo de relajación T_2 está relacionado con el intercambio de espín entre núcleos. Por procesos no conservativos, que dependen de la entropía del sistema se produce una pérdida de coherencia de fase de algún núcleo con respecto a los que presentan la misma frecuencia. Este efecto mecánico-cuántico que no lleva a una transferencia de energía hacia los alrededores, sino a una transferencia de magnetización hacia un núcleo cercano, también ocurre mediante un decaimiento exponencial y su constante de tiempo T_2 se denomina tiempo de relajación transversal. T_2 está relacionada con el ancho de

banda espectral, de modo que el ancho ($\Delta\nu$) es proporcional a $1/T_2$. La relajación espín-espín tiende a ser más eficiente (T_2 es menor) para moléculas con movimientos aleatorios lentos, que es el caso de proteínas y otras macromoléculas de gran tamaño, y lleva a un ensanchamiento y solapamiento significativo de las señales.

En particular, para los núcleos de ^{15}N , las medidas de los tiempos de relajación, en conjunto con otro parámetro denominado NOE heteronuclear, resultan en valiosos aportes al estudio por RMN dado que brindan información acerca de los procesos dinámicos en las moléculas, como la difusión rotacional, las velocidades de fluctuaciones conformacionales y otros movimientos internos.

Conclusiones

En resumen, hasta aquí hemos visto qué tipo de datos se pueden obtener a partir de experimentos de RMN y qué información puede inferirse a partir de ellos. A modo de síntesis podemos agrupar los parámetros espectrales según su origen:

- Información del entorno particular de cada núcleo

Parámetros	Utilidad / Información asociada
Desplazamiento Químico	Identificación individual de espín Ángulos de torsión de la cadena principal

- Información de la interacción entre los núcleos:

Parámetros	Utilidad / Información asociada
Acoplamiento Escalar	Identificación de sistemas de espín Ángulos de torsión
Acoplamiento Dipolar	
NOEs	Distancias entre núcleos cercanos en el espacio
RDCs	Orientaciones relativas

- Información de los residuos individuales y de la proteína en general

Parámetros	Utilidad / Información asociada
Tiempos de relajación T_1 , T_2 y NOEhet, τ_c	Dinámica del sistema

7.4. Cómo se obtiene un espectro

El experimento más sencillo de RMN es el denominado de onda continua. Existen dos alternativas para desarrollar este experimento: a) Barrer la frecuencia del campo de excitación fijando el valor del campo externo, o bien b) manteniendo constante la frecuencia del campo de excitación, aumentar progresivamente la intensidad del campo magnético B_0 . Para ambos casos el fenómeno de resonancia se manifiesta cuando la diferencia de energía de los dos estados de espín, determinada por el campo B_0 , coincide con la energía suministrada por el pulso de radiofrecuencia del campo de excitación. Si bien este enfoque es simple e intuitivo acarrea la desventaja de que podemos determinar un sólo valor de frecuencia por experimento. Además el barrido exhaustivo de cada espectro insume tiempo, que se va acrecentando enormemente si necesitamos repetir el experimento para obtener una mejor relación señal/ruido.

Con el fin de superar estos inconvenientes y gracias al continuo avance tecnológico en el campo de RMN, desde los años 70, los espectros se obtienen mediante un enfoque distinto (Sánchez, 2007). Este nuevo enfoque se conoce como RMN con transformada de Fourier (FT-NMR, de sus siglas en inglés). Aquí, en lugar de barrer campos o frecuencias, se mantiene el campo externo constante y se perturba al sistema con un pulso de radiofrecuencia corto que afecta a un rango de núcleos. Seguidamente se registra cómo responde el sistema frente a esta perturbación. La forma en que esos espines nucleares vuelven al equilibrio se conoce como FID (*free induction decay*) y el ritmo con que esa señal decae guarda relación con la frecuencia de resonancia de cada núcleo. El hecho de que perturbemos un rango de núcleos a la vez y luego

registremos la respuesta de todos ellos en una misma FID trae aparejada la necesidad de decomponer posteriormente esa señal, muy compleja, en sus componentes individuales. Esta labor se resuelve mediante la operación de transformada de Fourier. Resumidamente, esta aplicación matemática devuelve información en el dominio de la frecuencia a partir de los espectros originales que se hallan en el dominio del tiempo. Este formato permite la adquisición múltiple de señales, lo que resulta en una ganancia de tiempo y por ende, de sensibilidad ya que además de una mejora intrínseca en la sensibilidad, el tiempo recuperado puede invertirse para acumular más espectros e incrementar la relación señal/ruido.

7.5. Ejemplo práctico: Determinación de estructura

Para la determinación estructural por RMN de una proteína se pueden seguir diferentes estrategias, con distintos conjuntos de experimentos, que dependerán de cada sistema de estudio en particular. A modo de ejemplo, para una proteína de tamaño intermedio podemos proponer el siguiente esquema:

Obtención de proteína marcada

Para estudios de RMN, es requisito que la proteína se encuentre altamente concentrada y en gran estado de pureza. Por otra parte, para la adquisición de espectros de dos y tres dimensiones es necesario introducir marca isotópica de ^{13}C y ^{15}N . Para ello, resulta práctico recurrir a la tecnología de ADN recombinante y sobreexpresar la proteína a partir de cultivos crecidos en medios mínimos. Dependiendo de los experimentos que se vayan a adquirir, los medios se complementan con reactivos como $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ y ^{13}C -glucosa como únicas fuentes de nitrógeno y carbono. Es esencial remover cualquier contaminante de la muestra, por lo que la purificación debe ser exhaustiva, y

generalmente se incluyen distintas técnicas cromatográficas en el protocolo de obtención (Figura 7.8).

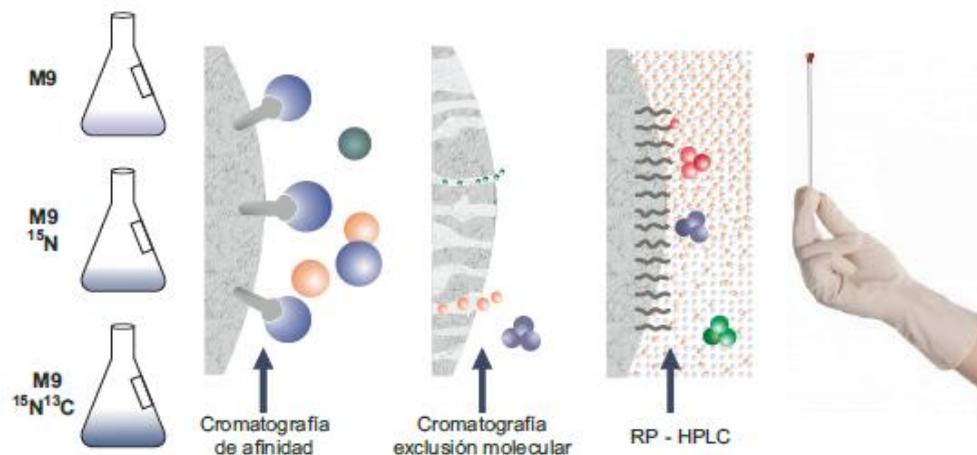


Figura 7.8. Para la obtención de una proteína que va a ser estudiada por RMN, los medios de cultivo se enriquecen isotópicamente, dependiendo de los espectros que vayan a adquirirse. El protocolo de purificación puede incluir distintos pasos cromatográficos tendientes a que la proteína se encuentre en un elevado grado de pureza, altamente concentrada, sin que ocurra agregación ni precipitación. Idealmente la muestra debe ser estable en el tiempo y la proteína no exceder los 30 kDa a fin de no afectar la calidad de las señales, ni dificultar la asignación.

Experimentos y asignación de resonancias

En primer lugar se adquieren espectros de una dimensión 1D-¹H. Estos espectros, en los que se utiliza proteína no marcada, brindan información cualitativa y sirven para comprobar el correcto plegamiento y estado monomérico en solución (Figura 7.9).

A continuación, se toman espectros de dos dimensiones. Un experimento de gran utilidad es el llamado ¹⁵N-HSQC (del inglés *Heteronuclear Single Quantum Coherence*), que relaciona núcleos de nitrógeno e hidrógeno unidos, como los que se encuentran en los enlaces peptídicos de la proteína (excepto en las prolinas). De esta manera, por cada grupo amida se verá un pico en el espectro ¹⁵N-HSQC (Figura 7.9).

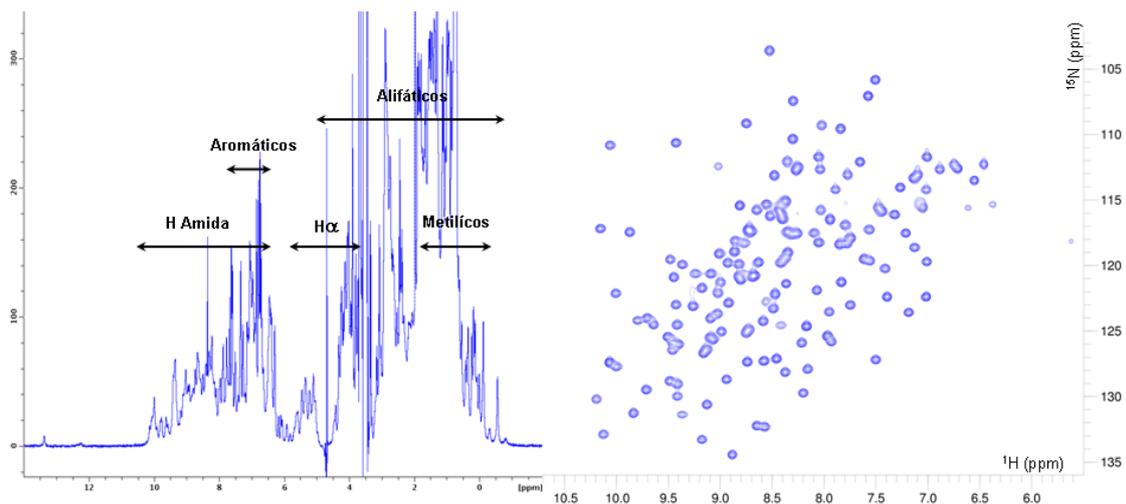


Figura 7.9. A la izquierda: espectro $1D^1H$ de una muestra de proteína, plegada y en estado monomérico. Se señala la distribución de desplazamientos químicos de distintos grupos de protones. A la derecha: espectro ^{15}N -HSQC de una proteína de ~20 kDa. Cada pico corresponde a un grupo NH de la cadena polipeptídica.

El paso siguiente consiste en adquirir juegos de experimentos de tres dimensiones que correlacionan al N amida de cada residuo con sus respectivos $C\alpha$ y $C\beta$ y con los del residuo precedente en la secuencia (Figura 7.10). Conociendo de antemano la secuencia proteica, y sobre la base de algunas frecuencias particularmente distintivas, es posible concatenar y asignar la identidad de cada pico en los espectros. En forma simplificada, encontrar la secuencia relacionando espectros (“asignación secuencial”) se asemeja a ordenar las fichas de un dominó. De esta manera quedan asignadas las resonancias de la cadena principal.

Para extender la asignación a las cadenas laterales se corren experimentos como el HCCH-TOCSY que relaciona a los carbonos e hidrógenos pertenecientes a cada residuo aminoacídico.

Generación de restricciones y cálculo

La resolución de la forma tridimensional de una proteína por RMN consiste en generar un conjunto de estructuras que mejor satisfagan las restricciones experimentales en el marco de un modelo que reúne información empírica

sobre la geometría de la estructura covalente de los aminoácidos, y que además alcanza un valor de mínima energía.

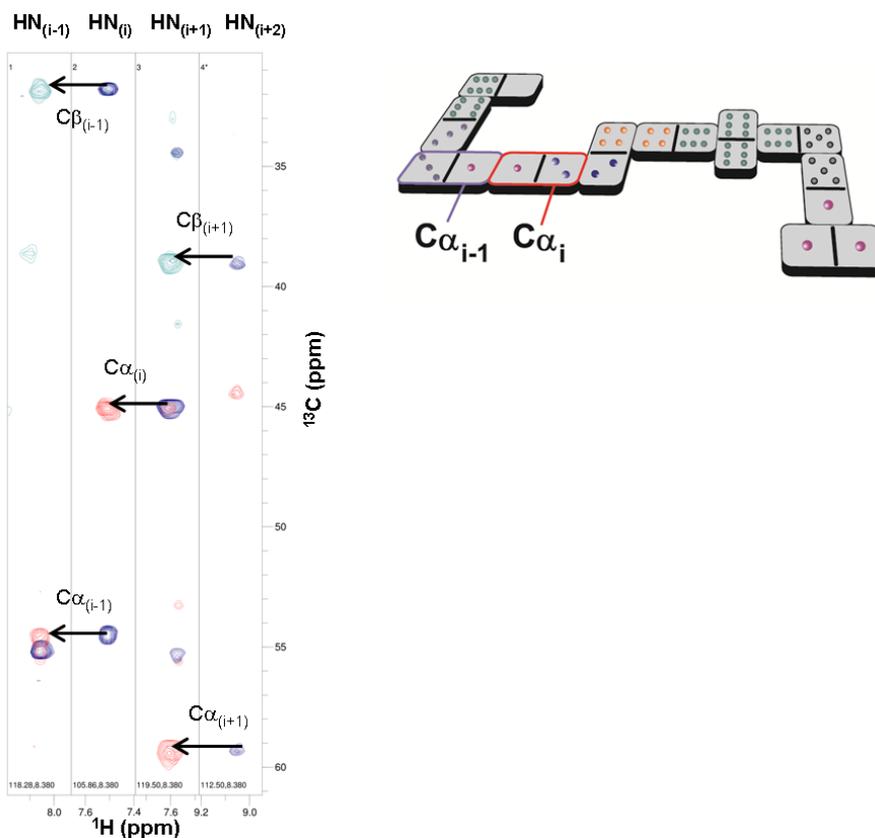


Figura 7.10. Asignación de desplazamientos químicos de $^{13}\text{C}\alpha/\beta$ empleando espectros 3D HNCACB (verde y rojo) y CBCA(CO)NH (azul), con ^1H en el eje x, ^{13}C en y, y ^{15}N en z. Se establece la conectividad haciendo coincidir los desplazamientos químicos de los $^{13}\text{C}\alpha/\beta$ en el HNCACB (relacionados al desplazamiento químico del HN del residuo i), con los desplazamientos químicos de los $^{13}\text{C}\alpha/\beta$ en el CBCA(CO)NH (relacionados al desplazamiento químico del HN del residuo i-1). El proceso se asemeja a acomodar piezas de dominó.

Dentro de la información empírica se incluyen longitudes y ángulos de enlace, y potenciales definidos a fin de que las uniones se mantengan dentro de los límites reales. Para distancias no definidas, los programas de cálculo emplean potenciales que controlan las interacciones electrostáticas y de Van der Waals, asegurando que los átomos no se aproximen entre sí más de lo que el potencial de Lennard-Jones permite. Respecto a la información experimental de RMN, una vez asignada la mayor cantidad posible de señales, y utilizando los parámetros descritos en la sección 2 (constantes de acoplamiento, desplazamiento químico, NOEs, RDCs), se pueden generar distintos conjuntos de restricciones. Estas restricciones experimentales brindan información sobre

la posición relativa de cada núcleo en la proteína. Algunas de ellas, como las que derivan de las constantes de acoplamiento, dan idea de los ángulos de torsión en la proteína y en consecuencia, de su estructura secundaria. Otras, como las que derivan del efecto Overhauser, llamadas NOEs, imparten distancias entre núcleos cercanos (Figura 7.11). Y otras como los RDCs dan información de la orientación relativa a mayores distancias.

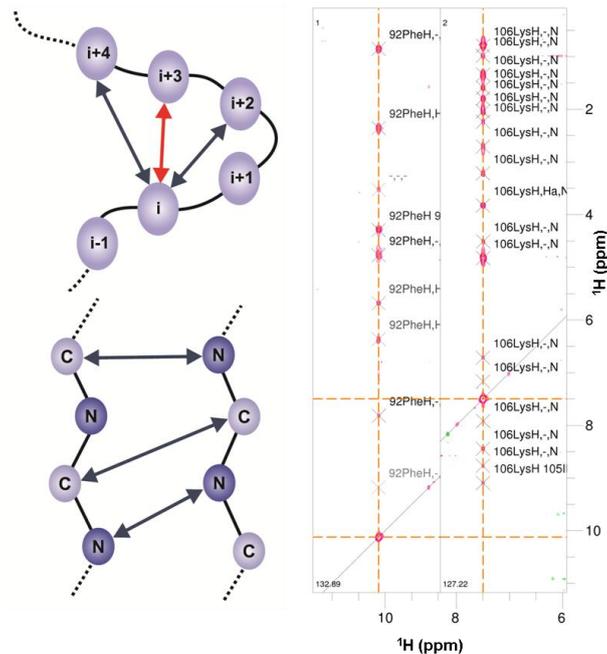


Figura 7.11. A la izquierda: esquema de plegamientos α -hélice y hoja- β , presentes en una proteína. Las distancias regulares en dichos plegamientos dan origen a patrones de NOEs característicos. A la derecha: tiras de un espectro ^{15}N NOESY-HSQC donde se distinguen varios picos de cruce debidos a núcleos de H cercanos para dos grupos NH.

Los programas de cálculo como XPLOR, ARIA-CNS o CYANA integran, mediante distintos algoritmos, la información empírica sobre la topología y geometría de las proteínas en general, con las restricciones experimentales generadas a partir del análisis de los espectros de RMN (Figura 7.12). El proceso mediante el cual se generan los modelos estructurales, involucra sistemas de dinámica molecular que apuntan a la minimización de su energía (Rieping, 2007). A fin de evitar mínimos locales, frecuentemente se recurre al denominado *annealing* simulado (*simulated annealing*), donde se eleva la temperatura de las moléculas, y de esta forma, la energía cinética entregada permite superar las barreras energéticas. Luego, se enfría el sistema

lentamente, permitiendo que evolucione a estructuras energéticamente favorables, al mismo tiempo que se van ponderando las constantes de energía de las restricciones experimentales.

El proceso de cálculo es iterativo y concluye con un conjunto de modelos que mejor satisfacen las restricciones experimentales, que no reducen más allá su energía y que convergen entre sí.

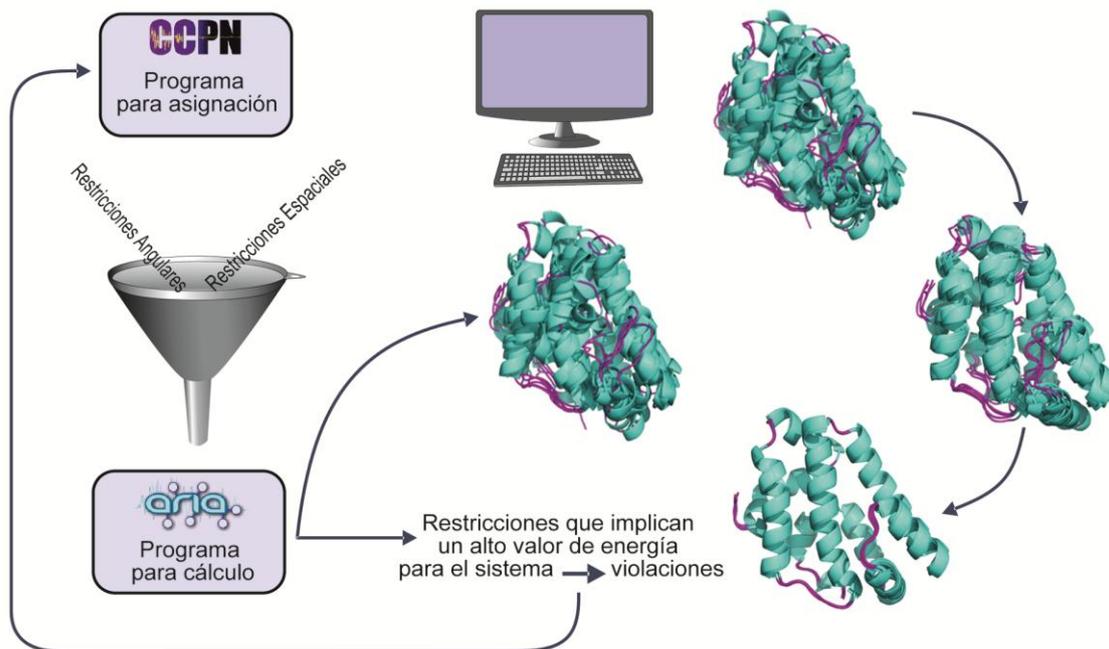


Figura 7.12. A la izquierda: esquema global del proceso de determinación de estructura por RMN. A la derecha: conjunto de estructuras calculadas en distintas etapas del refinamiento.

Refinamiento

Existen programas de cálculo como ARIA que además del conjunto de estructuras-resultado, devuelve una lista de aquellas restricciones experimentales rechazadas que no se acomodaron en el modelo calculado. A partir del análisis de estas restricciones, que representan violaciones, comienza un proceso iterativo de refinamiento (Vranken, 2005). Durante el refinamiento se pueden incorporar más experimentos que ayuden a asignar resonancias cuya identidad hasta el momento, sea ambigua o desconocida; o bien experimentos adicionales a partir de los cuales se generen nuevas

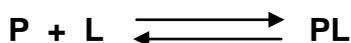
restricciones. Se evalúan además otros posibles orígenes para estas restricciones violadas como la selección de señales espurias como verdaderas, etc. Paulatinamente se va “puliendo” la información experimental y luego de sucesivas instancias de cálculo, las estructuras resueltas van convergiendo y minimizando su energía (Figura 7.12). Finalmente se valida el conjunto de estructuras. Para ello se cuenta con diversos programas que corroboran la consistencia del modelo en términos estadísticos. Parte del proceso de validación comprende la comparación de parámetros esperados a partir del modelo calculado con los derivados de las mediciones experimentales. Se evalúa además, si los ángulos obtenidos caen en regiones favorables de los gráficos de Ramachandran.

7.6. Aplicaciones

Análisis de interacción por RMN

La resonancia magnética nuclear permite caracterizar las interacciones proteína-ligando en términos de afinidad y especificidad, identificar los sitios de unión y evidenciar los cambios estructurales producidos (Goldflam, 2012).

La interacción de un ligando con una proteína tiene como resultado la formación de un complejo que está en equilibrio con las formas libres de la proteína (P) y el ligando (L).



Con la formación del complejo se produce la estabilización de conformaciones diferentes a las que se encuentran para las estructuras más abundantes de ambas especies libres en solución.

Las diferencias conformacionales presentes tienen como resultado un cambio en los parámetros de RMN. Por ejemplo, pueden registrarse cambios en:

- Desplazamientos químicos
- Parámetros de relajación T_1 , T_2 y NOEs
- Otros parámetros dinámicos como τ_c

- Coeficientes de difusión

En consecuencia, la interacción proteína-ligando puede estudiarse mediante diferentes experimentos que evalúen estos parámetros.

Analizando los desplazamientos químicos se puede establecer si la interacción corresponde a un intercambio lento o rápido en la escala de tiempo de RMN y evaluar de este modo la constante de afinidad para la formación del complejo. Para ello, se puede realizar por ejemplo, una titulación agregando cantidades crecientes de L a P marcada con ^{15}N en solución, monitoreando los cambios producidos en las señales en los espectros ^{15}N -HSQC. En la Figura 7.13 se muestra una representación esquemática.

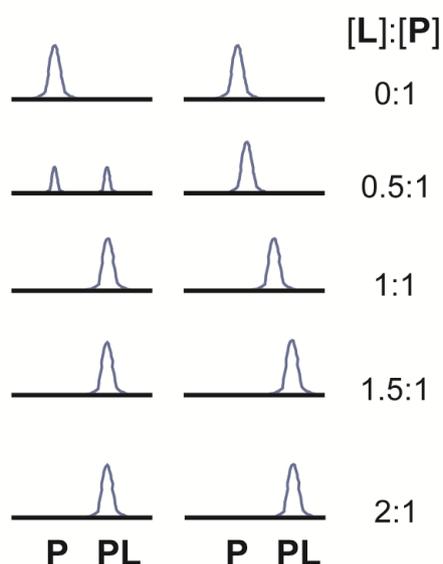


Figura 7.13. Representación esquemática de los desplazamientos químicos registrados para la formación de un complejo PL. A la izquierda se muestra una situación de intercambio rápido; a la derecha, de intercambio lento. Se parte de P libre en solución (en negro) y se van agregando cantidades crecientes de L. En este ejemplo sólo la proteína presenta marca, por lo que no se observan desplazamientos químicos para L.

Si la proteína presenta una alta afinidad por el ligando, la vida media del complejo es larga en la escala de tiempo de RMN, por lo que se observará para aquellos núcleos afectados en el proceso de unión, un pico correspondiente a la conformación P libre y otro para P formando el complejo PL. Esta es la situación de intercambio lento característica de una constante de disociación submicromolar ($K_d < \mu\text{M}$).

En una situación de intercambio rápido, donde la afinidad por el ligando es baja, el complejo se forma y disocia con mayor rapidez. Es por ello que por cada grupo amida de la proteína se observa un único pico que presenta un desplazamiento químico que es una especie de promedio pesado entre los correspondientes a P libre y a P unida a L. En este caso, la constante de disociación del complejo es mayor al orden micromolar ($K_d > \mu\text{M}$).

Es importante destacar que una ventaja del estudio de interacción por RMN es que no está limitado a sistemas de alta afinidad, sino que pueden estudiarse interacciones muy débiles que otras técnicas no detectan. Sin embargo, también es necesario advertir que existen situaciones de intercambio intermedio donde las señales se ensanchan y se pierden dificultando el análisis de esos complejos mediante RMN.

RMN en células (*in cell NMR*)

La espectroscopía de RMN en células permite investigar tanto la *conformación* como la *dinámica* de proteínas en células vivas (Serber, 2005). Dado que la función de una proteína dentro de las células se encuentra estrechamente vinculada a su localización y estado conformacional, la espectroscopía de RMN en células resulta una herramienta sumamente poderosa por su naturaleza no invasiva. Su poder reside en observar cambios en las estructuras de macromoléculas biológicas y sus interacciones con otros componentes celulares (Burz, 2009). El estudio de macromoléculas por medio de esta técnica se basa en la expresión de estas moléculas, marcadas con isótopos activos para RMN (generalmente ^{15}N), para medir espectros directamente a partir de una suspensión de las células productoras de la molécula de estudio. El gran número de líneas de resonancia pertenecientes a estas macromoléculas casi siempre requiere la medida de espectros de RMN de al menos dos dimensiones. Como vimos anteriormente, la posición exacta de la frecuencia de resonancia de un núcleo atómico en una macromolécula depende de forma sensible al entorno magnético que lo circunda. Los cambios que se produzcan

en dicho entorno, causados por modificaciones postraduccionales, cambios conformacionales, o eventos de unión, resultarán en cambios el corrimiento químico (Burz, 2010).

En principio, la espectroscopía de RMN en células resultaría además muy atractiva por ofrecer la gran ventaja de evitar la purificación de la muestra al registrar los espectros de RMN necesarios, directamente dentro de las células que sobreexpresan la macromolécula de interés. Sin embargo, es poco probable que se recurra a la espectroscopía de RMN en células para determinar exhaustivamente estructuras tridimensionales de macromoléculas *in vivo*, ya que los métodos tradicionales *in vitro* ofrecen ventajas fundamentales en cuanto a la nitidez de las señales y a la estabilidad de la muestra en el transcurso de un experimento multidimensional de varios días. Estas últimas cuestiones resultan prioritarias respecto al potencial ahorro de tiempo que significaría saltar los protocolos de purificación.

Los principales desafíos de la espectroscopía de RMN en células aparecen en la preparación de la muestra. Esto se debe a la necesidad de que la misma presente una gran homogeneidad, además de resultar indispensable mantener a las células vivas durante las medidas. Más allá de las dificultades planteadas, el trabajo realizado en pos de superar los desafíos técnicos es muy importante y son numerosos los trabajos publicados en este sentido. La motivación subyacente lo justifica ampliamente: el desarrollo de las tecnologías de RMN en células permiten obtener información a nivel atómico de las proteínas en su ambiente nativo.

Bibliografía

Burz DS, Shekhtman A. Structural biology: Inside the living cell, Nature 458(7234) 37-8, 2009.

Burz DS, Shekhtman A. The STINT-NMR method for studying in-cell protein-protein interactions, Curr Protoc Protein Sci. Chapter 17: Unit 17.11, 2010.

Cooper A. Biophysical Chemistry. 184 páginas. RSC Tutorial Chemistry Text #16, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2004.

Hornak JP. The Basics of NMR, a hypertext book on nuclear magnetic resonance spectroscopy. Copyright © 1997-2010. www.cis.rit.edu/htbooks/nmr.

Goldflam M, Tarragó T, Gairí M, Giralt E. NMR Studies of Protein–Ligand Interactions, Protein NMR Techniques, Methods in Molecular Biology 831 233-259, 2012.

Gronenborn AM. The importance of being ordered: improving NMR structures using residual dipolar couplings, C R Biol 325(9) 957-66, 2002.

Keeler J. Understanding NMR Spectroscopy, Department of Chemistry, University of Cambridge, UK, 2005.

Lipsitz RS, Tjandra N. Residual dipolar couplings in NMR structure analysis, Annu Rev Biophys Biomol Struct 33 387-413, 2004.

Rieping W, Habeck M, Bardiaux B, Bernard A, Malliavin TE, Nilges M. ARIA2: automated NOE assignment and data integration in NMR structure calculation, Bioinformatics 23 381-382, 2007.

Rule GS, Hitchens TK. Fundamentals of Protein NMR Spectroscopy. Series: Focus on Structural Biology, 5 XXVI 531, Springer, Berlin, ISBN 1-4020-3499-7, 2006.

Sánchez Ferrando F. Breve resumen histórico de la resonancia magnética nuclear, www.uam.es/otros/germn/images/01Historia_RMN.pdf, 2007.

Serber Z, Corsini L, Durst F, Dötsch V. In-cell NMR spectroscopy, Methods Enzymol 394 17-41, 2005.

Vranken WF, Boucher W, Stevens TJ, Fogh RH, Pajon A, Llinas M, Ulrich EL, Markley JL, Ionides J, Laue ED. The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline, Proteins 59(4) 687-96, 2005.

Wüthrich K. NMR studies of structure and function of biological macromolecules (Nobel Lecture), J Biomol NMR 1 13-39, 2003.

http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2002/illpres/nmr.html

PARTE III

Caracterización Biofísica de Lípidos y Membranas y sus interacciones con proteínas

CAPÍTULO 8

INTERACCIÓN DE LÍPIDOS CON EL AGUA Y FORMACIÓN DE ESTRUCTURAS

EMPAQUETADAS

Valeria Silva y Jorge L. Pórfido

Introducción

Los lípidos son un conjunto de biomoléculas orgánicas muy diversas que presentan diferentes características químicas, pero que se agrupan en base a una propiedad física en común: son mayoritariamente insolubles en agua y son solubles en solventes orgánicos, tales como éter, cloroformo, benceno, acetona y alcoholes. Están formados básicamente por carbono, hidrógeno y oxígeno, aunque este último se encuentra en proporciones mucho más bajas que los dos primeros. Además, pueden contener fósforo, nitrógeno y azufre.

Dada la diversidad de los compuestos lipídicos y su amplia variedad de grupos funcionales, los lípidos se pueden agrupar utilizando distintos criterios, por lo cual se hace difícil una única clasificación. Una de las clasificaciones generalmente utilizadas los divide de acuerdo a su composición. Así, podemos dividirlos en lípidos simples (no esterificados ni amidados), y en lípidos complejos (esterificados o amidados), como se resume en la Figura 8.1. Las estructuras y funciones de los distintos tipos de lípidos pueden consultarse en los libros de texto de bioquímica (Lehninger, 2013).

Como hemos comentado, la característica distintiva de los lípidos, y de la que derivan sus principales propiedades fisicoquímicas y por consecuencia biológicas, es su hidrofobicidad. La baja solubilidad de los lípidos en agua se debe a que su estructura química es fundamentalmente hidrocarbonada (alifática, alicíclica o aromática), con gran cantidad de enlaces C-H y C-C. Sin embargo, muchos lípidos también poseen una región hidrofílica, ya que

contienen grupos polares o con cargas eléctricas, como grupos hidroxilo, carboxilo o fosfato. Por este motivo, se considera que estos lípidos son moléculas anfipáticas, es decir, moléculas que poseen regiones de hidrofobicidad y regiones hidrofílicas.

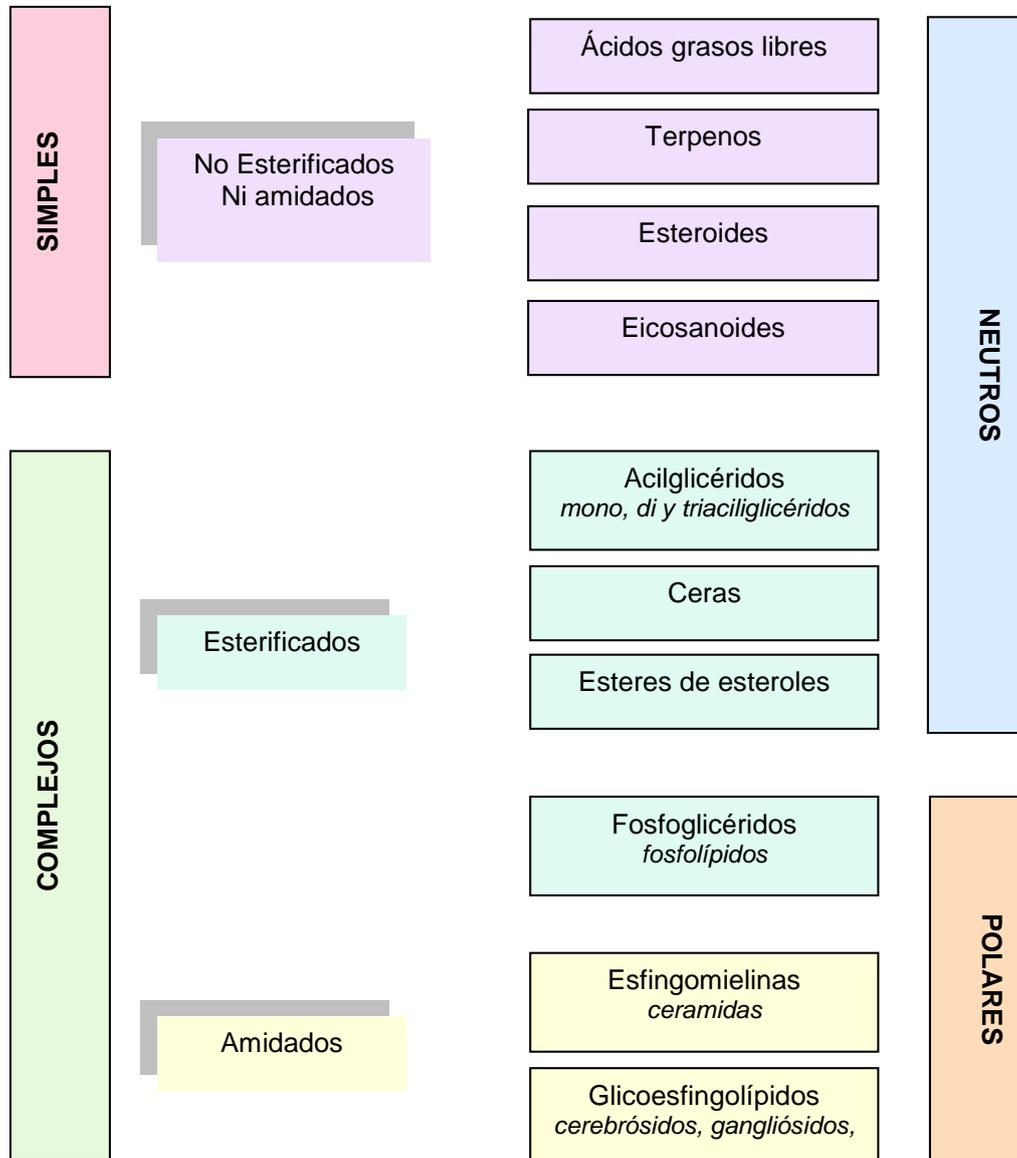


Figura 8.1. Clasificación de los lípidos.

En presencia de agua, las regiones hidrofóbicas tienden a interactuar entre sí, creando un espacio hidrofóbico del que el agua es excluida; mientras que las regiones polares interactúan con el agua, manteniéndose solvatadas y preservando las regiones hidrofóbicas de todo contacto con ésta. Debido a este

efecto, conocido como efecto hidrofóbico, los lípidos son capaces de autoensamblarse en estructuras bien determinadas.

En este capítulo nos centraremos en la formación de estas estructuras empaquetadas, describiremos algunas de ellas y finalmente describiremos la preparación de membranas modelo.

8.1. Interacción Hidrofóbica y Polimorfismo Lipídico.

Tal como se ha mencionado, los lípidos son moléculas de naturaleza anfipática. El agua, al ser una molécula muy polar con gran facilidad para formar puentes de hidrógeno, no es capaz de interactuar con las regiones hidrofóbicas de estas moléculas, las cadenas hidrocarbonadas. En presencia de moléculas lipídicas, el agua adopta en torno a ellas una estructura muy ordenada que maximiza las interacciones entre las propias moléculas de agua, forzando a la molécula hidrofóbica al interior de una estructura en forma de caja, que también reduce la movilidad del lípido. Esto supone una configuración de baja entropía, que resulta energéticamente desfavorable. Esta disminución de entropía es mínima si las moléculas lipídicas se agregan entre sí e interactúan mediante fuerzas de corto alcance, como las fuerzas de Van der Waals. Los dominios polares de los lípidos sí son capaces de interactuar con el agua a través de enlaces de hidrógeno, por lo tanto son energéticamente estables en un entorno acuoso (Vance, 2008).

Es por este fenómeno que los lípidos al encontrarse en soluciones acuosas son capaces de autoensamblarse en diversas estructuras o fases, lo que se conoce como polimorfismo lipídico (Luzzati, 1968; Cullis, 1979). El tipo de empaquetamiento que adopten los lípidos en solución, es decir la fase lipídica resultante, dependerá de varios factores, como el pH, la temperatura, la presión y la fuerza iónica del entorno acuoso en el que se encuentran; su concentración; así como también la forma molecular del propio lípido. El polimorfismo lipídico es importante biológicamente, ya que está implicado en diversos procesos celulares, tales como la formación de vesículas durante la

división celular, la fusión de membranas, el tráfico de macromoléculas mediado por vesículas, la formación de microdominios de membrana, el movimiento de macromoléculas a través de las membranas celulares, la estabilización de complejos proteicos de membrana y los cambios conformacionales de proteínas de membrana para su funcionalidad, entre otros.

Los distintos tipos de empaquetamiento o las distintas fases lipídicas se pueden clasificar utilizando tres criterios, según su organización de largo alcance, según el orden de las cadenas hidrocarbonadas y según la curvatura adoptada por la fase. La nomenclatura más habitualmente utilizada para nombrar las distintas fases fue inicialmente propuesta por Luzzati (Luzzati, 1968). Esta nomenclatura utiliza una letra mayúscula y un subíndice. La letra mayúscula indica la organización de largo alcance o red, así la organización unidimensional laminar se denomina L, la organización unidimensional micelar se denomina M; la organización bidimensional hexagonal se denomina H; la organización tridimensional cúbica se denomina Q y la organización tridimensional cúbica cristalina se denomina C. La conformación que adoptan las cadenas hidrocarbonadas se denominan con un subíndice griego, donde la organización desordenada o fluida se nombra con la letra α , la conformación ordenada o gel y perpendicular al plano de la membrana se denomina β y la conformación ordenada e inclinada se denomina β' . Finalmente según el último criterio, las fases lipídicas también se pueden clasificar dependiendo de la curvatura, donde se indica como de tipo I cuando las cadenas hidrocarbonadas están orientadas hacia el interior o de tipo II o invertida, cuando las cadenas hidrocarbonadas están orientadas hacia fuera. Más adelante en este capítulo volveremos a retomar algunos de estos conceptos al describir algunas estructuras autoensambladas en particular.

Continuando con los aspectos que determinan el polimorfismo lipídico, como comentamos anteriormente, la estructura molecular es uno de los factores que afectan el tipo de empaquetamiento que adopten las moléculas anfipáticas en solución. Esto dependerá de la naturaleza de su cabeza polar (grupo hidrofílico) y de la flexibilidad de su cadena hidrocarbonada (grupo hidrofóbico). Algunas consideraciones geométricas pueden ayudarnos a predecir el tipo de

estructura que adoptaran ciertos lípidos. El parámetro de empaquetamiento p (Israelachvili, 1994) se define según la ecuación 8.1.

$$p = \frac{v}{a_0 \times l_c} \quad \text{Ec. 8.1}$$

Donde v es el volumen del grupo hidrofóbico, a_0 es el área de la cabeza hidrofílica y l_c es la longitud de la cadena hidrofóbica, tal como se muestra en la Figura 8.2.

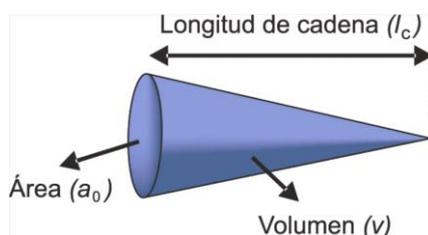


Figura 8.2. Propiedades que definen el parámetro p de una molécula anfipática.

Así, de acuerdo al valor adimensional del parámetro p será el agregado que puedan adoptar los lípidos en solución (Engberts, 1996), como se muestra en la Figura 8.3.

Si la relación p es menor que $1/3$ se forman micelas esféricas, si p se ubica entre $1/3$ y $1/2$ las micelas serán de tipo cilíndricas. Las bicapas poseen un valor p entre $1/2$ y 1 , mientras que si el parámetro de empaquetamiento es mayor que 1 se forman estructuras inversas. Sin embargo, también existen otras estructuras, ya que mezclas heterogéneas de distintos tipos de lípidos pueden presentar diagramas de fases complejos. Por ejemplo una mezcla de lípidos catiónicos y aniónicos con diferente p pueden dar una variedad de conformaciones inesperadas, tales como nanodiscos, icosaedros, etc., dependiendo de la estequiometría (Dubois, 2004). A continuación, describiremos algunas de las estructuras más comunes con mayor detalle.

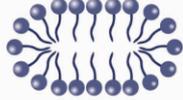
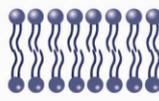
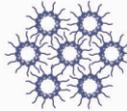
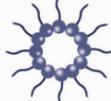
Forma molecular de los lípidos	Parámetro de empaquetamiento (p)	Tipos de lípidos	Tipo de estructura	Esquema
Cono 	$p < 1/3$	Ácidos grasos	Micelas esféricas	
Cilindro deformado 	$1/3 < p < 1/2$	Alcoholes grasos	Micelas cilíndricas	
Cilindro deformado 	$1/2 < p < 1$	Glicerofosfolípidos	Cubicas (HI)	
Cilindro 	$p \sim 1$	Fosfatidilcolina	Bicapas Monocapas	
Cilindro deformado 	$p > 1$	Ácido fosfatídico Fosfatidiletanolamina Cardiolipina	Micelas invertidas (HII)	
Cono invertido 	$p > 1$	Surfactantes	Micelas invertidas	

Figura 8.3. Tipos de empaquetamiento de lípidos en solución según el parámetro p .

8.2. Monocapas

Las monocapas se forman cuando las moléculas anfipáticas se localizan en la interfase aire-agua, donde las colas hidrofóbicas se orientan hacia el aire, mientras que las cabezas polares lo hacen hacia el agua. Dependiendo de la solubilidad de estas moléculas anfipáticas en la subfase acuosa utilizada, las monocapas se pueden clasificar en monocapas de Langmuir o en monocapas de Gibbs. A continuación describiremos brevemente cada una de ellas.

En las monocapas de Langmuir, las moléculas anfipáticas son mayoritariamente insolubles, por lo que también son conocidas como monocapas insolubles. Habitualmente se forman al extender las moléculas anfipáticas disueltas en un solvente orgánico sobre la superficie de una solución acuosa. Las moléculas anfipáticas se distribuyen homogéneamente y una vez que el solvente se evapora, la monocapa se arma de forma

espontánea. De este modo se forma un sistema en dos dimensiones, que es susceptible a compresión mecánica lateral, donde las moléculas quedan empaquetadas en distintos estados de fase, dependiendo la presión lateral a la que son sometidas, proceso similar a lo que se conoce como compresión hidrostática en un sistema de tres dimensiones. Así, en este sistema también se puede diferenciar un estado gaseoso, un estado líquido expandido, un estado líquido condensado o un estado sólido. Asimismo, existen transiciones entre los distintos estados de fase, que se evidencian al graficar las isothermas de compresión, es decir los gráficos de presión superficial (π) versus el área molecular (A). La presión superficial es la diferencia entre la tensión superficial del agua pura (γ_0) y la tensión superficial de la monocapa (γ), como se muestra en la ecuación 8.2.

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad \text{Ec. 8.2}$$

Los gráficos π vs. A nos brindan información de la compresibilidad de las moléculas anfipáticas, la compresibilidad a su vez es característica del estado de fase de la monocapa. La compresibilidad (χ) está dada por la derivada del área respecto a la tensión superficial, según la ecuación 8.3. Si el estado de la monocapa es sólido, la monocapa tiene tendencia a comprimirse menos, mientras que si es gaseoso su compresibilidad va a ser mayor, ya que la monocapa es más laxa.

$$\chi = -\frac{1}{A} \left(\frac{\partial A}{\partial \pi} \right)_T \quad \text{Ec. 8.3}$$

Las transiciones de fase se ponen de manifiesto observando los cambios en la pendiente de las isothermas de compresión, ya que la mayoría de las monocapas adoptan diferentes estados superficiales a medida que se comprimen. Cabe mencionar que las isothermas de compresión de componentes puros son características de cada componente. En la Figura 8.4 se muestra un diagrama de una isoterma de compresión de una monocapa de Langmuir de un ácido graso genérico, como ejemplo de una de las monocapas más extensamente estudiadas.

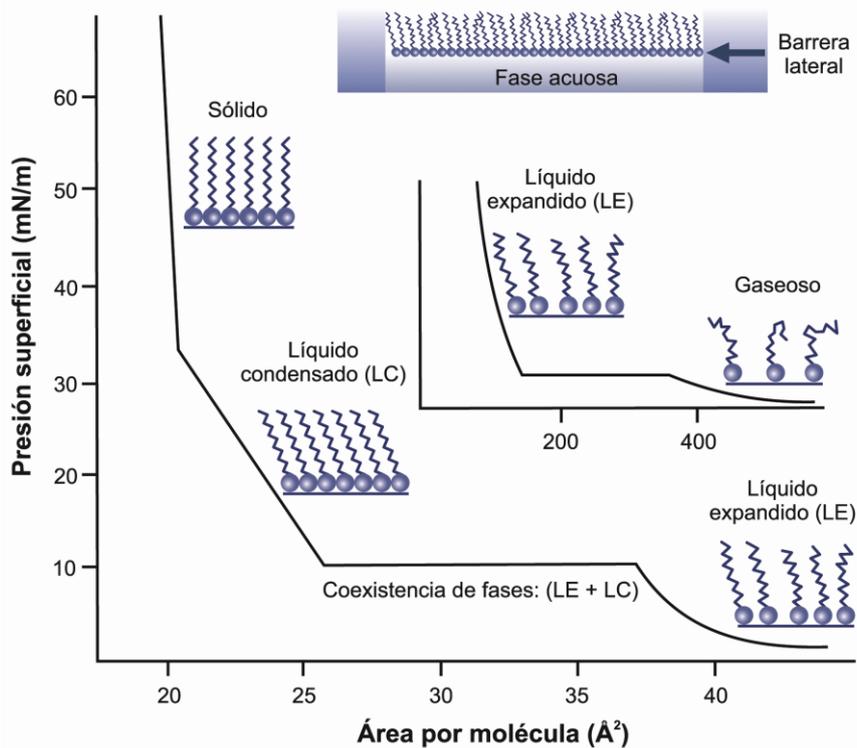


Figura 8.4. Diagrama de una isoterma de compresión de una monocapa de Langmuir de un ácido graso genérico.

Cuando el área por molécula está en el rango de los cientos de Å^2 la fase está bien descrita como un estado gaseoso (G) en dos dimensiones. A medida que disminuye el área por molécula, aumentando la presión, la monocapa pasa a un estado conocido como fase líquido expandida (LE) y posteriormente a mayor presión a una fase líquido condensada (LC). Idealmente, la transición de fase LE-LC se observa en el diagrama como una meseta en la curva (pendiente igual a cero), lo que indicaría una transición de primer orden, es decir que ocurre de modo discontinuo. Sin embargo, en la mayoría de los sistemas experimentales esto no ocurre, es decir la pendiente no llega a ser cero, lo cual constituye un punto de controversia sobre si efectivamente la transición de fase es o no de primer orden. Sin embargo, actualmente más del 90% de los investigadores en este campo sostienen que efectivamente se trata de una transición de fase discontinua o de primer orden y piensan que esta anomalía puede deberse a la existencia de defectos en la monocapa (provocados por la agitación térmica), a la presencia de agujeros causados por fluctuaciones de densidad e, incluso algunos investigadores sostienen que esto

puede atribuirse a la presencia de impurezas (Möhwald, 1995). La fase líquida condensada es menos susceptible a la compresión, a medida que la presión va en aumento se observa un quiebre en la curva, lo que indicaría el cambio a fase sólida. La fase sólida es muy poco compresible, si se continúa aumentando la presión se llega a la situación de colapso de la monocapa, punto en el cuál la presión no se puede seguir aumentando sin que las moléculas anfipáticas escapen a la fase acuosa. Algunos autores (Kaganer, 1999) consideran que en realidad la fase sólida no debe ser considerada como tal, dado que la monocapa tendría el mismo grado de orden traslacional en ambas regiones de la curva (antes y luego del quiebre). Los estudios de rayos X apoyan la idea de que las cadenas hidrocarbonadas se disponen en forma paralela entre sí en ambos casos, pero la diferencia estaría en la orientación respecto a la subfase acuosa, donde las cadenas se pueden ubicar formando un ángulo menor a 90° (es decir con cierta inclinación) o de forma perpendicular. Cuando las cadenas se disponen de forma inclinada son más susceptibles a la compresión lateral, donde una disminución en el área superficial se logra disminuyendo el ángulo de inclinación. Sin embargo, en la disposición perpendicular la fase es mucho menos susceptible a la compresión. Estos autores por lo tanto hablan de fase condensada inclinada y fase condensada no inclinada, en lugar de sólida. En ambas fases las moléculas estarían conformacionalmente alineadas y no desordenadas como ocurre en la fase expandida.

Las monocapas de Gibbs, por el contrario, se forman a partir de la adsorción de las moléculas anfipáticas cuando estas son moderadamente solubles en la subfase acuosa utilizada, por lo que también son conocidas como monocapas solubles. Habitualmente se preparan inyectando las moléculas anfipáticas disueltas en un solvente miscible con el agua, es decir medianamente polar (por ejemplo etanol) en la subfase acuosa y espontáneamente las moléculas anfipáticas son adsorbidas en la interfase aire-agua. Esta monocapa se encuentra en equilibrio reversible con la subfase acuosa, ya que en cada instante un cierto número de moléculas se disuelven en la subfase y, simultáneamente, igual número de moléculas pasan a la monocapa, de modo

que estadísticamente el número de las que constituyen la monocapa permanece invariable. Las monocapas de Gibbs se estudian siguiendo la presión superficial (π) en función del tiempo (t), es decir mediante un análisis cinético de adsorción. Mediante el análisis de la curva $\pi(t)$ se pueden determinar las transiciones de fase en este tipo de monocapas. Un tipo de molécula anfipática muy utilizada para el estudio de estas monocapas es el DHBAA (del inglés *N-dodecyl- γ -hydroxybutyric acid amide*). De forma similar a lo que ocurre con el análisis de las isothermas de compresión π vs. A en las monocapas de Langmuir, el punto de quiebre en la curva de cinética de adsorción $\pi(t)$ del DHBAA indica una transición de fase de primer orden. Sin embargo, el hecho de que se observe este punto de quiebre y la posición a la que aparece depende no solo de la temperatura, sino también de la concentración del DHBAA. La probabilidad de que el punto de quiebre aparezca, aumenta al disminuir la temperatura o al aumentar la concentración del DHBAA (Vollhardt, 2010).

Si bien las monocapas de Langmuir y de Gibbs son generadas de forma distinta, es posible establecer cierta correlación en el comportamiento de las moléculas anfipáticas en ambos tipos de monocapas. Las moléculas anfipáticas ligeramente solubles en solventes acuosos, que presentan una transición de fase de primer orden en las monocapas de Gibbs, usualmente también son solubles en solventes orgánicos, por lo que también pueden ser extendidas en monocapas de Langmuir, permitiendo comparar las características de estas moléculas en ambas monocapas. Sin embargo, para las moléculas anfipáticas solubles en el solvente acuoso, como el DHBAA, la pérdida de moléculas debido a la desorción y disolución debe ser considerada. Por este motivo, la compresión no puede ser muy elevada, para minimizar la pérdida de material. Al analizar las isothermas de compresión del DHBAA a distintas temperaturas se observa la típica región de meseta no horizontal que indica la transición de fase entre la fase LE y LC característica de las monocapas de Langmuir. Es interesante el hecho de que para todas las temperaturas analizadas, el punto dónde ocurre esta transición de fase de primer orden según las isothermas de compresión π vs. A en las monocapas de

Langmuir, concuerda con el punto de quiebre de las curvas de cinética de adsorción $\pi(t)$ obtenidas al analizar el comportamiento del DHBAA en las monocapas de Gibbs. La forma y disposición de los dominios formados en la coexistencia de ambas fases presentan similitudes en ambos tipos de monocapas; mientras que los dominios condensados (o sólidos) formados por adsorción también son similares a los formados por compresión (Vollhardt, 2010). La comparación de ambos sistemas también permite evaluar lo que se conoce como penetración de monocapas, que es el proceso que ocurre cuando una molécula anfipática moderadamente soluble se inserta en una monocapa insoluble formada en la interfase aire-agua. Esta técnica permite evaluar la capacidad de una molécula anfipática de insertarse en una monocapa, y que modificaciones de esta monocapa, como por ejemplo su composición, pueden afectar la cinética de la penetración.

8.3. Micelas

Las micelas se forman cuando las moléculas anfipáticas se encuentran en soluciones acuosas, los grupos polares quedan expuestos al solvente acuoso, mientras que las regiones apolares o hidrofóbicas quedan inmersas en el interior de la micela (Figura 8.5A). Esta disposición permite la solvatación de las cabezas polares y se eliminan los contactos desfavorables entre el agua y las zonas hidrofóbicas. Las moléculas anfipáticas que forman este tipo de estructuras son aquellas que poseen una forma geométrica de tipo cónica, es decir que poseen valores de parámetro de empaquetamiento p pequeños. Si el valor p es menor a $1/3$, como ocurre con la mayoría de los ácidos grasos, la micela será de tipo esférica; si el valor de p se ubica entre $1/3$ y $1/2$, como ocurre con los alcoholes grasos, la micela será cilíndrica. La formación de micelas es un proceso cooperativo. El ensamblaje de pocas moléculas no llega a proteger a las colas hidrofóbicas del contacto con el agua; por lo que es un proceso que depende de la concentración. A concentraciones bajas, las moléculas anfipáticas pueden existir en forma de monómeros. Sin embargo a

medida que la concentración aumenta, su estabilidad en solución como monómeros disminuye, hasta que la fuerza repulsiva desfavorable de los dominios polares cercanos se ve superada por la asociación favorable de los dominios hidrofóbicos. En este punto, un ligero aumento de la concentración resulta en la formación de unidades autoensambladas en equilibrio con una cantidad constante de monómero. En consecuencia, las moléculas anfipáticas en solución no formarán micelas hasta que su concentración no sobrepasa un determinado valor, ésta concentración se conoce como la concentración micelar crítica (CMC). Debido a la naturaleza entrópica de este fenómeno, el valor de la CMC depende de varios factores, tales como la fuerza iónica y pH del medio, la temperatura y el tipo de moléculas anfipáticas que estén formando las micelas. La CMC de una molécula anfipática se reduce frente a un aumento en la temperatura o en la fuerza iónica del entorno. Sin embargo, la adición de agentes caotrópicos que distorsionan la estructura del agua, o solventes orgánicos que disminuyen su constante dieléctrica, conllevan a un aumento de la CMC, ya que estabiliza los dominios hidrofóbicos en el entorno acuoso. Por ejemplo, la CMC del detergente dodecilsulfato de sodio (SDS) se reduce 10 veces cuando la concentración de NaCl pasa de 0 a 0.5 M, pero aumenta luego de agregar urea o etanol (Vance, 2008). Respecto al tipo de molécula, la CMC depende del balance lipofilia/hidrofilia de la molécula anfipática. Las moléculas con regiones hidrofóbicas más largas tienen valores de CMC más bajos; mientras que las moléculas anfipáticas que poseen cargas tienen valores de CMC mayores, debido a la repulsión electrostática de los grupos cargados en la periferia de las micelas iónicas. Las micelas no son estructuras estáticas, por el contrario se agrupan, rearmen y reagregan rápidamente. Una micela es una estructura limitada, normalmente tienen un diámetro menor a 20 nm. Su forma generalmente es esférica, pero a medida que aumentan su tamaño las micelas se hacen más asimétricas, su forma puede cambiar de esférica a más elipsoidal, y luego a cilíndrica. En las micelas cilíndricas las regiones hidrofílicas o polares están expuestas hacia el solvente acuoso, mientras que las regiones hidrofóbicas de las cadenas hidrocarbonadas se ubican hacia el interior de estos cilindros. Estos cilindros a

su vez se agregan bidimensionalmente en grupos formando lo que se conoce como fase hexagonal normal o HI (Figura 8.5D).

8.4. Micelas Invertidas

Las micelas invertidas, contrariamente a las micelas normales que acabamos de describir, contienen sus cabezas polares orientadas hacia el interior de la micela y sus grupos hidrofóbicos ocupan el exterior de la estructura (Figura 8.5B). Como comentamos en secciones anteriores, a estas estructuras invertidas generalmente se las denominan como de tipo II, diferenciándolas de las orientaciones normales o de tipo I. Habitualmente, las moléculas anfipáticas con valores de empaquetamiento p mayores a 1, con forma geométrica de cono invertido, tienden a formar este tipo de estructuras. Debido a que en este tipo de micelas las regiones hidrofóbicas se encuentran orientadas hacia el exterior, las micelas invertidas en solución acuosa tienden a formar agregados tridimensionales o estructuras ordenadas de tipo cúbicas, contrariamente a las micelas de tipo I, que habitualmente se encuentran en estructuras micelares individuales. Por otro lado, de forma similar a lo que comentamos en la sección anterior para las micelas de tipo I, las moléculas anfipáticas con este tipo de geometría invertida también pueden ensamblarse formando cilindros en lugar de micelas, dónde las cabezas polares se orientan hacia un interior de contenido acuoso y las cadenas hidrocarbonadas se orientan hacia el exterior de los cilindros. A su vez, como se muestra en la Figura 8.5.E, estos cilindros también se agrupan formando estructuras bidimensionales denominadas hexagonales que al ser de tipo invertidas se denominan HII (Seddon, 1990). Esta fase es muy común en fosfolípidos tales como la fosfatidiletanolamina que tiene un grupo polar pequeño, poco hidratado y que es capaz de formar puentes de hidrógeno entre sí (Erand, 1998; Erand, 2007). La formación de puentes de hidrógeno entre las cabezas polares compite con la formación de puentes de hidrógeno con el agua. De esta forma, si es más favorable que se establezcan puentes de hidrógeno entre las cabezas polares, como ocurre para

el caso de la fosfatidiletanolamina, se disminuye la hidratación de la cabeza polar y se favorece la formación de estructuras invertidas. Esto mismo ocurre con otros fosfolípidos si se disminuye la hidratación aumentando la concentración salina. En el caso de otros fosfolípidos, además de su forma geométrica, las fuerzas de repulsión entre sus grupos polares dificultan la formación de este tipo de estructuras invertidas, sin embargo el agregado de cationes o la disminución del pH provocan que otros fosfolípidos se rearreglen formando fases hexagonales invertidas, como ocurre con la cardiolipina en presencia de Ca^{2+} u otros fosfolípidos a pH bajos. Biológicamente, la existencia de dominios de fase HII en las membranas, principalmente formados por fosfatidiletanolamina, es muy importante dado que son regiones que pueden adoptar estructuras de mayor curvatura, que resultan favorables para que ocurran diversos procesos celulares, como endocitosis, exocitosis, fusión de membranas y la correcta actividad de enzimas unidas a membranas, como la proteína quinasa C (PKC) y la fosfocolina citidiltransferasa (Epanand, 2007).

Como mencionamos antes, también pueden existir fases tridimensionales cúbicas. Hasta el momento hay descritas varias fases cúbicas distintas, que no describiremos en profundidad en este capítulo (por más detalles ver Luzzati, 1997 y citas). Ya nos referimos más arriba a la fase cúbica formada por estructuras micelares invertidas, ésta fase se denomina Q^{227} o Fd3m (Figura 8.5G). Dentro de la fase cúbica micelar también se ha descrito la estructura cúbica micelar normal denominada Q^{223} o Pm3n, formada por micelas normales o de tipo I (Figura 8.5F), donde las cabezas polares están orientadas hacia fuera. Por otro lado, también existen fases cúbicas denominadas bicontinuas, lo que hace referencia a que la fase lipídica y la acuosa son continuas en el espacio (Figura 8.5H). Estas estructuras consisten en dos laberintos polares separados por una hendidura apolar. Los lípidos pueden adoptar distintas organizaciones dentro de la fase bicontinua invertida, las dos más importantes son la Q^{224} (Pn3m) y Q^{230} (Ia3d). Las fases cúbicas existen en las membranas biológicas, se han encontrado en la membrana plasmática en regiones donde ocurren procesos de endocitosis, en la membrana del retículo endoplasmático liso y en la membrana mitocondrial

(Landhi, 1995; Luzzati, 1997). También se han encontrado similitudes en las fases cúbicas bicontinuas y la formación de poros de fusión en las membranas (Erand, 2007).

8.5. Bicapas

En las bicapas las moléculas anfipáticas se autoensamblan formando estructuras lamelares, con un centro hidrocarbonado rodeado a ambos lados por capas ordenadas de moléculas de agua que interaccionan con las cabezas polares de los lípidos (Figura 8.5C). En este tipo de estructura se logra satisfacer las preferencias hidrofílicas e hidrofóbicas de las distintas regiones de las moléculas anfipáticas; las regiones polares se disponen interaccionando con el medio acuoso y las apolares interaccionando entre sí y aisladas de ese entorno acuoso. Como ya comentamos, la formación de bicapas lipídicas también es un proceso de autoensamblaje que está relacionado con la geometría molecular de los lípidos, de modo que aquellas moléculas con un parámetro de empaquetamiento p cercano a 1, es decir que presentan forma geométrica tipo cilíndrica, como los glicolípidos y fosfolípidos, serán capaces de formar bicapas rápida y espontáneamente en un entorno acuoso. Las interacciones hidrofóbicas son las principales fuerzas que determinan la formación de estas bicapas. También existen fuerzas atractivas de Van der Waals entre las colas hidrocarbonadas que favorecen su empaquetamiento. Además, se producen interacciones electrostáticas y puentes de hidrógeno entre los grupos polares de la cabeza y las moléculas de agua.

Desde el punto de vista biológico, las bicapas son sumamente importantes, puesto que forman parte de la membrana plasmática de todas las células, así como también de las membranas de las distintas organelas celulares. En la membrana plasmática la estructura que los lípidos adoptan generalmente es la lamelar fluida. Sin embargo, los lípidos en las membranas biológicas no se disponen de forma homogénea, sino que se encuentran formando distintos microdominios que participan en diversos procesos celulares. Además, también

existe una distribución heterogénea entre las dos monocapas de una bicapa, es decir, las membranas biológicas son estructuras asimétricas. Esta asimetría también contribuye a la señalización celular. Los fosfolípidos pueden difundir lateralmente por la bicapa y rotar alrededor de su eje, pero raramente migran de una monocapa de la membrana a la otra (movimiento *flip-flop*). Esta baja frecuencia en el movimiento de *flip-flop* permite preservar la asimetría de la membrana (Vance, 2008).

Cuando las bicapas lipídicas se encuentran a baja temperatura las cadenas hidrocarbonadas están ordenadas, formando una estructura rígida donde el movimiento de los lípidos está impedido (Marsh, 1980). En estos casos se dice que es una fase gel ($L\beta$). Esta fase es adoptada cuando la hidratación es baja o cuando la temperatura es baja. Un ejemplo es la que forma la esfingomielina y la ceramida cuando forman dominios en la membrana (Kooijman, 2008). Cuando la temperatura aumenta, las cadenas hidrocarbonadas se desordenan y el área de sección por cadena aumenta significativamente, formándose así otro tipo de fase lamelar, denominada fase fluida ($L\alpha$). A la temperatura a la cual ocurre este cambio de fase gel a fase fluida se le llama temperatura de transición (T_m). Esta temperatura depende fuertemente de la composición de la bicapa, principalmente del número de insaturaciones y del largo de las cadenas hidrocarbonadas que forman los fosfolípidos que las constituyen. De este modo, cuando se mezclan fosfolípidos puros con diferentes T_m , como la dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC, $T_m = 41^\circ\text{C}$) y la dioleoil-fosfatidilcolina (DOPC, $T_m = -20^\circ\text{C}$) y se analiza su estado de fase a una temperatura de 25°C se puede observar que estos fosfolípidos se segregan en diferentes dominios de membrana, la DOPC se encuentra mayoritariamente en fase $L\alpha$ y la DPPC en fase $L\beta$. Este proceso es muy importante en las membranas biológicas, ya que es la base para la formación de los microdominios de membrana denominados "*lipid rafts*", regiones de la membrana (entre 4 a 700nm) ricas en colesterol y fosfolípidos con cadenas saturadas (principalmente esfingolípidos) que funcionan como regiones donde se organizan procesos celulares específicos como transducción de señales o endocitosis mediada por receptor. Las bicapas lipídicas tienden a cerrarse

sobre sí mismas para que no existan zonas con cadenas hidrocarbonadas expuestas que desestabilizarían estas estructuras; *in vitro* esto da lugar a la formación de liposomas, vesículas uni- o multilamelares que incluyen agua en su interior y que pueden tener de 10 hasta 1000 nm de diámetro. Estos liposomas suelen emplearse como modelo para el estudio de diversas propiedades de las membranas.

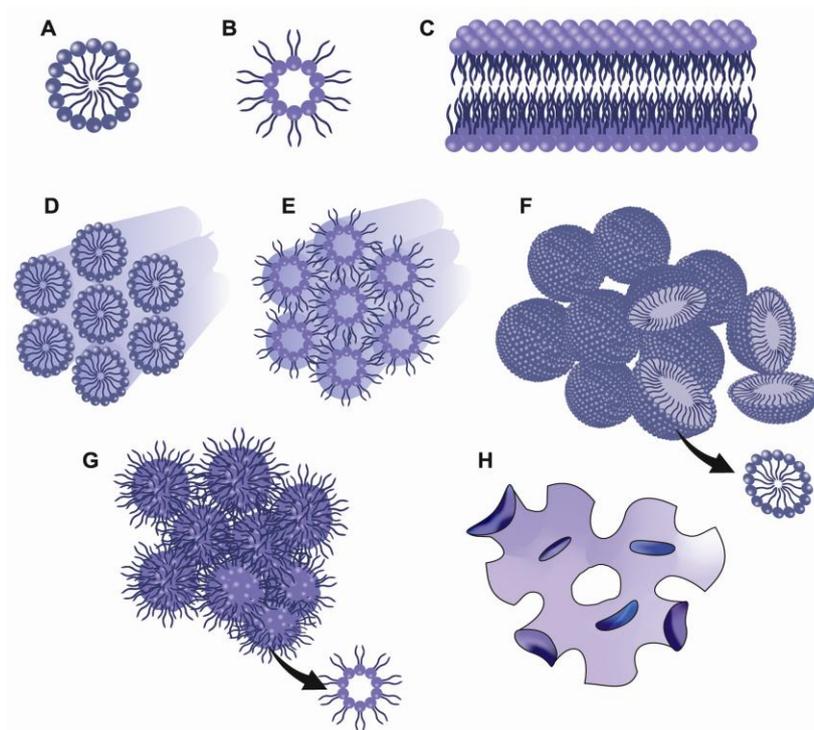


Figura 8.5. Esquema de distintas estructuras adoptadas por las moléculas anfipáticas en solución. (A) micelas tipo I, (B) micelas tipo II, (C) bicapas, (D) fase hexagonal HI, (E) fase hexagonal HII, (F) estructura cúbica micelar de tipo I o Q^{223} , (G) estructura cúbica micelar de tipo II o Q^{227} , (H) fase cúbica bicontinua.

A continuación describiremos los distintos tipos de membranas modelo que existen y describiremos brevemente los métodos para su obtención.

8.6. Membranas Modelo

Una aproximación para abordar el estudio de las membranas biológicas es la utilización de membranas modelo. El uso de estas membranas permite, entre otras cosas, analizar las interacciones lípido-lípido, las interacciones lípido-

proteína y la formación de microdominios de membrana. Comúnmente, las membranas modelo más utilizadas son las monocapas y los liposomas. A continuación describiremos brevemente cómo se obtienen estas membranas modelo, siguiendo el esquema de la Figura 8.6.

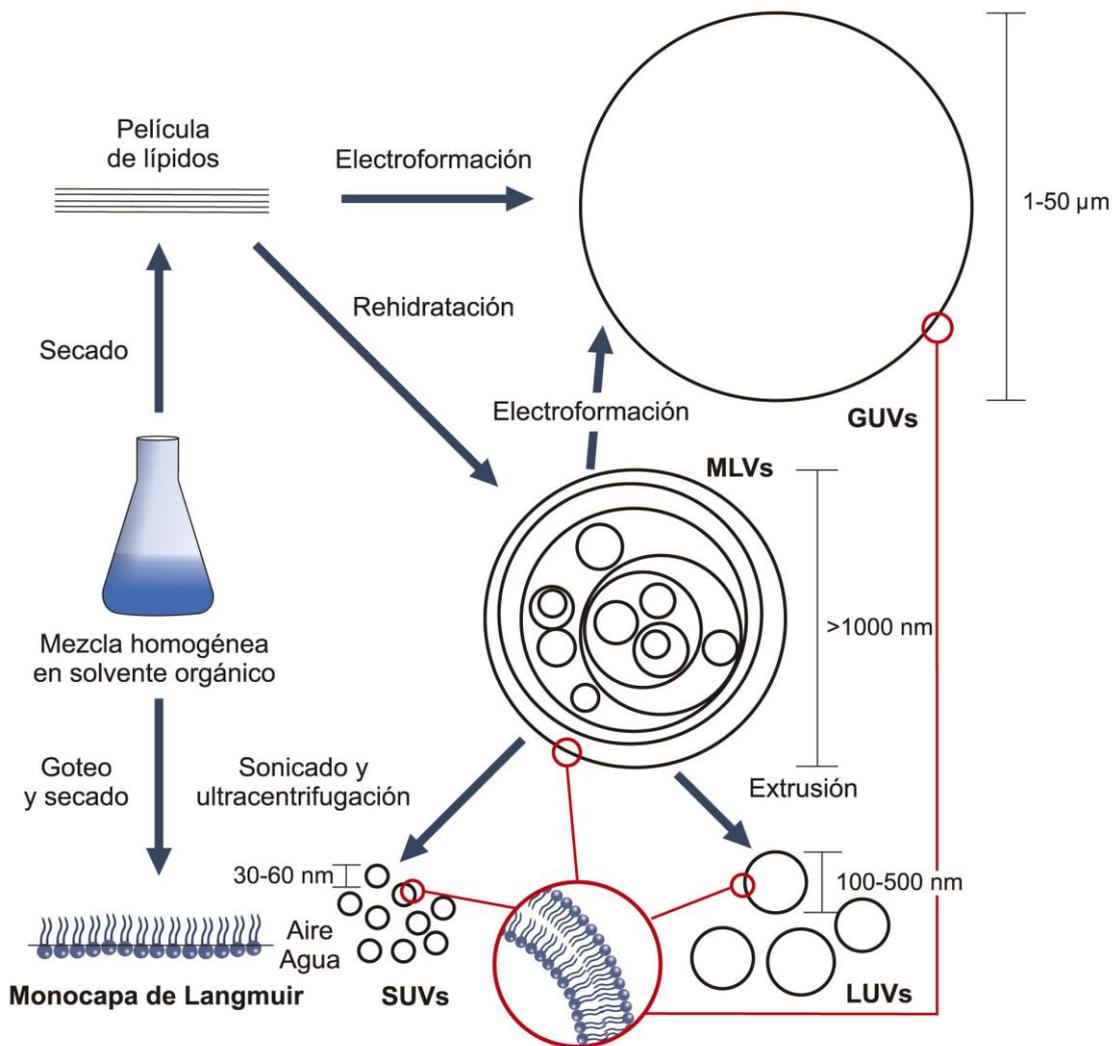


Figura 8.6. Distintos tipos de membranas modelo y sus formas de obtención.

Monocapas

Las monocapas son preparadas en un equipo denominado Balanza de Langmuir, mediante deposición de las moléculas anfipáticas de interés desde un solvente orgánico y dejándolo evaporar para formar la película lipídica. Este

equipo permite obtener las isothermas de compresión π vs. A , así como analizar otros parámetros de la monocapa tales como su potencial de superficie y su viscosidad superficial. Recientemente, se han realizado avances y mejoras en este tipo de equipamiento, adosando otros equipos que permiten utilizar técnicas complementarias para profundizar en el conocimiento estructural y morfológico de las monocapas; como son técnicas espectroscópicas (espectroscopía visible, ultravioleta y de fluorescencia, fundamentalmente) y microscópicas (microscopía electrónica, de fluorescencia y de ángulo de Brewster). Las técnicas basadas en microscopía de fluorescencia permiten analizar los procesos de nucleación de fases durante la compresión. Sin embargo, la necesidad de usar lípidos fluorescentes para este tipo de análisis puede complicar el estudio, dado que las sondas fluorescentes pueden modificar el comportamiento de fases y a altas presiones las sondas pueden integrarse a otras fases. La técnica de microscopía de ángulo de Brewster (BAM) permite realizar este tipo de estudios sin necesidad de utilizar sondas fluorescentes (Hönig, 1991). Esta técnica se basa en que al depositarse una monocapa sobre una interfase, se modifica el índice de refracción del medio, lo que produce modificaciones en el ángulo de Brewster (ángulo de incidencia de luz sobre una superficie para el cual la reflectividad del rayo reflejado con polarización paralela al plano de incidencia se hace 0). Este cambio de reflectividad permite visualizar la monocapa, que se observa como una imagen clara sobre un campo oscuro (que corresponde al agua). Esta técnica tiene como ventaja que no modifica el comportamiento de las fases, se puede analizar a cualquier presión y brinda información de cambios en el índice de refracción y por lo tanto en el espesor de las fases. Asimismo, una vez generada en la Balanza de Langmuir, la monocapa puede ser transferida hacia un soporte sólido mediante su inmersión sobre el líquido para la formación de monocapas o multicapas sobre este soporte, técnica que se denomina de Langmuir-Blodgett (Zasadzinski, 1994). Este soporte sólido puede ser empleado para estudios de microscopía o en estudios electroquímicos. Por otro lado, se puede estudiar el efecto de diferentes moléculas presentes en la subfase sobre la película generada en la interfase y también el fenómeno de

penetración de distintos tipos de moléculas en las monocapas y que factores afectan este proceso.

Liposomas

El otro sistema que se utiliza como membranas modelo, los liposomas, son vesículas de forma aproximadamente esférica, con una fase acuosa interna rodeada por una o más bicapas lipídicas o lamelas concéntricas de tamaño variable (desde unos pocos nanómetros hasta los micrómetros). Los liposomas o vesículas pueden clasificarse de acuerdo a su tamaño y lamelaridad, como MLV (del inglés *Multi-Lamellar Vesicles*), GUV (del inglés *Giant Unilamellar Vesicles*), LUV (del inglés *Large Unilamellar Vesicles*) y SUV (del inglés *Small Unilamellar Vesicles*). El uso de los distintos tipos de vesículas dependerá del sistema experimental con el que estemos trabajando, por ejemplo para ciertas aplicaciones de microscopía conviene usar GUVs ya que su tamaño permite su correcta visualización, mientras que para otros tipos de ensayos es conveniente usar vesículas de menor tamaño, como las SUVs ya que éstas presentan mayor curvatura.

Las MLVs tienen un tamaño variable, pueden ir desde 10 a 1000 nm aproximadamente, se obtienen por rehidratación de una película de lípidos previamente formada por evaporación de una solución de lípidos disueltos en solvente orgánico, generalmente cloroformo. Esta hidratación con agitación debe realizarse por encima de la temperatura de transición de fase (T_m) de los lípidos que se estén utilizando. La distribución del tamaño y la lamelaridad de las MLVs obtenidas por este método son muy heterogéneas. Partiendo de estas MLVs y aplicando diferentes procedimientos es posible obtener las vesículas unilamelares, como las GUVs, las LUVs y las SUVs.

Las GUVs son las vesículas más grandes, su tamaño oscila entre 1 y 50 μm . Hay varias maneras de preparar GUVs, la primera que fue puesta a punto y que resulta más sencilla es la preparación de GUVs mediante fusión de LUVs, manteniendo la preparación de LUVs a temperatura ambiente por 1-2 días, sin

embargo este método no permite producir vesículas de tamaño mayor a 10 μm . Otra forma de generar las GUVs es a través del método de deshidratación y rehidratación de una película de lípidos depositada en un soporte de vidrio (Needham, 1988) o en un soporte de teflón rugoso (Yang, 1996). La forma más utilizada actualmente para generar las GUVs de forma más controlada se denomina electroformación (Angelova, 1986), y consiste en la aplicación de un campo eléctrico sobre una película de lípidos depositada en un alambre de platino (Bagatolli, 1999) o en un portaobjetos recubierto con una aleación conductora (ITO del inglés *Indium Tin Oxide*, Herold, 2012).

Las LUVs son vesículas más pequeñas, su tamaño oscila entre los 100 y 500 nm. Se generan realizando extrusiones repetidas de una suspensión de MLVs a través de membranas de policarbonato, con poros de tamaño bien definido. Las LUVs producidas por este método tienen un diámetro que puede oscilar entre 80–400 nm, dependiendo de la membrana utilizada en el proceso de extrusión (Olson, 1979).

Las SUVs son las vesículas más pequeñas, tienen un tamaño entre 10 y 100 nm, aunque más comúnmente se usa el tamaño entre 20 y 50 nm. Las SUVs se generan mediante sonicación, es decir la aplicación de ondas de ultrasonido para disgregar las MLVs en vesículas más pequeñas. Esto se realiza bajo corriente de nitrógeno y posteriormente la mezcla se ultracentrífuga (centrifugación a alta velocidad) para separar las SUVs del resto del material lipídico (Huang, 1969).

Otro procedimiento para la preparación de liposomas es el método de evaporación en fase reversa (REV, del inglés *reverse-phase evaporation vesicles*; Szoka, 1979). Este método se basa en la disolución de la mezcla lipídica en un solvente orgánico, generalmente etanol o éter. Si los lípidos tienen baja solubilidad en estos solventes, se puede agregar cloroformo o metanol para incrementar su solubilidad. Luego se agrega la fase acuosa, lográndose una emulsión en la que se generan las vesículas de fase reversa. Esta emulsión es sonicada bajo corriente de nitrógeno hasta su clarificación y posteriormente la fase orgánica es evaporada mediante presión reducida en un rotavapor. Cuando el solvente es evaporado el sistema se encuentra en estado

tipo gel semisólido, a medida que el proceso continúa el sistema se vuelve una solución acuosa con una mezcla de SUVs, LUVs y MLVs. Las vesículas generadas por este método tienen como ventaja que presentan una alta capacidad de encapsulación, la cual puede oscilar entre el 20 y el 65%, variando la fuerza iónica de la solución acuosa utilizada (a menor fuerza iónica mayor eficacia de encapsulación). Para obtener una mezcla de vesículas menos heterogénea, posteriormente pueden aplicarse pasos adicionales, como centrifugación, extrusión o exclusión molecular, aunque estos procesos reducen la capacidad de encapsulación. La capacidad de encapsulación es importante cuando se quieren obtener liposomas para ser utilizados como *carriers* de fármacos, por ejemplo. Para lograr la encapsulación de otro tipo de biomoléculas, como ácidos nucleicos y proteínas puede ser necesario el uso de otro tipo de técnicas que no involucren etapas drásticas, como el uso de algunos solventes. Para lograr esto, se utiliza otro tipo de técnica conocida como deshidratación y rehidratación (DRV del inglés *dehydration-rehydration vesicles*; Kirby, 1984). Este método se basa en la mezcla de LUVs o SUVs preformadas “vacías” con una solución acuosa que contiene la biomolécula a encapsular y mediante varios pasos de congelación-secado y rehidratación, se induce la fusión de membranas adyacentes encapsulando la biomoléculas en MLVs de 0.1 a 2 μm con una capacidad de encapsulación de hasta un 80%.

Una vez obtenidos los liposomas, dependiendo los ensayos en los que se vayan a emplear, muchas veces es necesario verificar su tamaño, heterogeneidad y morfología. La estimación de su tamaño se puede realizar mediante distintos métodos, generalmente basados en técnicas espectrofotométricas (Goni, 2000). Como primer paso se puede hacer una medida de la turbidez de la muestra, lo que se hace normalmente en un espectrofotómetro convencional a una longitud de onda entre 340-400 nm. Si bien la turbidimetría no permite estimar el tamaño de las partículas obtenidas, al ser un método fácil permite un chequeo rápido para evaluar la reproducibilidad de distintas preparaciones o para monitorear la solubilidad y reconstitución de las vesículas. Para estimar el tamaño de los liposomas se utiliza la técnica de dispersión de luz, que es la medida de luz dispersada a 90°

en relación a la luz incidente. Esta medida se puede realizar de forma estática en un espectrofluorómetro o de forma dinámica en un instrumento equipado con un láser (DLS del inglés *Dynamic Light Scattering*). Mediante DLS es posible estimar el radio hidrodinámico promedio de las partículas en suspensión. Esta técnica cubre un rango entre unos pocos nanómetros hasta los micrómetros (Jin, 1999). También la técnica de cromatografía de exclusión molecular puede emplearse para estimar el tamaño de las vesículas, y puede utilizarse acoplada a un sistema de DLS. Por otra parte, la homogeneidad y morfología de los liposomas puede visualizarse mediante diferentes técnicas de microscopía (Bibi, 2011). La microscopía de campo claro ha resultado útil como una primera aproximación, permitiendo una observación más general de la preparación, teniendo como ventaja que es un método rápido, disponible en la mayoría de los laboratorios y que permite observar agregación de las vesículas, así como información sobre su morfología en general. Sin embargo, las ventajas de este tipo de microscopía dependen del tamaño de los liposomas que estemos observando y no permite obtener detalles o visualizar ultraestructuras, como si lo permiten otras técnicas de microscopía. Existen varias opciones que permiten mejorar la visualización de los liposomas por microscopía de campo claro, como el uso de sondas hidrofílicas como isotiocianato de fluoresceína (FITC) y carboxi-fluoresceína, o el uso de sondas lipofílicas, como el *Sudan Black* o el *Red Oil*. Para obtener un mayor detalle estructural de los liposomas se utiliza la microscopía electrónica de transmisión (TEM del inglés *Transmission Electron Microscopy*). La TEM con tinción negativa brinda una visión directa de la distribución del tamaño de las partículas (asumiendo que no hay artefactos debido al pH, iones y osmolaridad), aunque esta técnica no siempre es útil para evaluar la lamelaridad de los liposomas y en algunos casos la tinción negativa ha demostrado modificar la estructura vesicular original. En la TEM con congelación-fractura se expone la superficie hidrofóbica entre dos monocapas y se logran describir rasgos y detalles que la caracterizan. Estas imágenes permiten distinguir la geometría del empaquetamiento de las fases lamelares y hexagonales, así como también la morfología de las rugosidades. Por otra

parte, la crio-TEM es un procedimiento muy conveniente para visualizar la geometría tridimensional de las estructuras vesiculares atrapadas dentro una capa fina de hielo, aun cuando el contraste es comparativamente bajo. Actualmente, también es posible aplicar otros tipos de microscopía que evitan la fijación, tinción o congelamiento de la muestra y permiten observar los liposomas en su entorno natural de hidratación, tal es el caso de la microscopía de barrido en su modalidad conocida como ambiental, o ESEM (del inglés *Environmental Scanning Electron Microscopy*), la microscopía de fuerza atómica o AFM (del inglés *Atomic Force Microscopy*), o la microscopía láser confocal de barrido o CLSM (del inglés *Confocal Laser Scanning Microscopy*), aunque esta última si bien permite ver las estructuras lipídicas en su estado de hidratación, requiere el uso de sondas fluorescentes para su aplicación (Bibi, 2011; Ruozi, 2011).

Por otra parte, la estabilidad de los liposomas, de particular importancia en aquellos liposomas que funcionan como *carriers* de drogas, generalmente se establece por su capacidad para retener las moléculas encapsuladas por diferentes períodos de tiempo en distintas condiciones experimentales o bajo diferentes condiciones de almacenamiento. Idealmente, estos liposomas deben mantener su integridad con cambios en la fuerza iónica del medio o por dilución, fenómenos a los cuales normalmente se enfrentan al ser administrados *in vivo*. Para abordar el estudio de cambios estructurales que involucran a la bicapa lipídica, se ha desarrollado distintas estrategias, muchas de ellas basadas en la espectroscopía de fluorescencia, tales como la fusión de membranas, la exposición de dominios hidrofóbicos o su desestabilización y la liberación del contenido de las vesículas (Ulrich, 2002).

Bibliografía

Angelova MI, Dimitrov DS. Liposome Electroformation. Faraday Discussion. Chem. Soc. 81: 303-311, 1986.

- Bagatolli L.A, Gratton E. Two-photon fluorescence microscopy observation of shape changes at the phase transition in phospholipid giant unilamellar vesicles. *Biophys. J.* 77:2090–2101, 1999.
- Bibi S, Kaur R, Henriksen-Lacey M, McNeil SE, Wilkhu J, Lattmann E, Christensen D, Mohammed AR, Perrie Y. Microscopy imaging of liposomes: from coverslips to environmental SEM. *Int J Pharm.* 417(1-2):138-50, 2011.
- Cullis PR, de Kruijff B. Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes. *Biochim Biophys Acta.* 559(4):399-420, 1979.
- Dubois M, Lizunov V, Meister A, Gulik-Krzywicki T, Verbavatz JM, Perez E, Zimmerberg J, Zemb T. Shape control through molecular segregation in giant surfactant aggregates. *Proc Natl Acad Sci* 101(42):15082-7, 2004.
- Engberts J., Kevelam J. Formation and stability of micelles and vesicles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 1, 779-789, 1996.
- Epanand RM. Lipid polymorphism and protein-lipid interactions. *Biochim Biophys Acta.* 1376(3):353-68, 1998.
- Epanand RM. Membrane lipid polymorphism: relationship to bilayer properties and protein function. *Methods Mol Biol.* 400:15-26, 2007.
- Goni FM, Alonso A. Spectroscopic techniques in the study of membrane solubilization, reconstitution, and permeabilization by detergents. *Biochim. Biophys. Acta.* 1508, 51–68, 2000.
- Herold C, Chwastek G, Schwille P, Petrov EP. Efficient electroformation of supergiant unilamellar vesicles containing cationic lipids on ITO-coated electrodes. *Langmuir* 28(13):5518-21, 2012.
- Hönig D, Möbius D. Direct visualization of monolayers at the air-water interface by Brewster Angle Microscopy. *J. Phys. Chem.* 95, 4590–4592, 1991.
- Huang C. Studies on phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics. *Biochemistry.* 8(1):344-52, 1969.
- Israelachvili J. The science and applications of emulsions - an overview. *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 91:1-8, 1994.
- Jin AJ, Huster D, Gawrisch K, Nossal R. Light scattering characterization of extruded lipid vesicles. *Eur. Biophys. J.* 28:187–199, 1999.
- Kaganer VM, Möhwald H, Pulak D. Structure and phase transitions in Langmuir monolayers. *Rev. Mod. Phys.* 71(3):779–819, 1999.

Kirby C y Gregoriadis G. Dehydration-rehydration vesicles: A simple method for high yield drug entrapment in liposomes. *Biotechnology* 2:979-984, 1984.

Kooijman EE, Sot J, Montes LR, Alonso A, Gericke A, de Kruijff B, Kumar S, Goñi FM. Membrane organization and ionization behavior of the minor but crucial lipid ceramide-1-phosphate. *Biophys J* 94(11):4320-30, 2008.

Landh T. From entangled membranes to eclectic morphologies: cubic membranes as subcellular space organizers. *FEBS Lett.* 369(1):13-7, 1995.

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. *Principles of Biochemistry*. 6th ed. New York : W.H. Freeman, 2013.

Luzzati V. Biological significance of lipid polymorphism: the cubic phases. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 7:661-8, 1997.

Luzzati V, Gulik-Krzywicki T, Rivas E, Reiss-Husson F, Rand RP. X-ray study of model systems: structure of the lipid-water phases in correlation with the chemical composition of the lipids. *J Gen Physiol.* 51(5):37-43, 1968.

Luzzati V, Tardieu A, Gulik-Krzywicki T. Polymorphism of lipids. *Nature* 217 (5133):1028-30, 1968.

Marsh D. Molecular motion in phospholipid bilayers in the gel phase: long axis rotation. *Biochemistry.* 19(8):1632-7, 1980.

Möhwald H. Phospholipid monolayers. *Handbook of Biological Physics*, Ed. R. Lipowsky y E. Sackmann, Cap. 4, p. 161-211, 1995.

Needham D, Evans E. Structure and mechanical properties of giant lipid (DMPC) vesicles bilayers from 20°C below to 10°C above the liquid crystal-crystalline phase transition at 24°C. *Biochemistry* 27:8261–8269, 1988.

New R. *Liposomes: A Practical Approach*, Ed. B. D. H. D. Rickwood, IRL Press at Oxford University Press, Vol. 58, 1994.

Olson F, Hunt CA, Szoka FC, Vail WJ, Papahadjopoulos D. Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. *Biochim Biophys Acta.* 557(1):9-23, 1979.

Ruozi B, Belletti D, Tombesi A, Tosi G, Bondioli L, Forni F, Vandelli MA.. AFM, ESEM, TEM, and CLSM in liposomal characterization: a comparative study. *Int J Nanomedicine* 6:557-63, 2011.

Seddon JM. Structure of the inverted hexagonal (HII) phase, and non-lamellar phase transitions of lipids. *Biochim Biophys Acta*. 1031(1):1-69, 1990.

Szoka FC, Papahadjopoulos D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75(9): 4194-4198, 1978.

Ulrich A. S. Biophysical Aspects of Using Liposomes as Delivery Vehicles. *Bioscience Reports*, 22:129-150, 2002.

Vance DE, Vance JE. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. 5th Ed. Elsevier B.V, 2008.

Vollhardt D., Fainerman V.B. Characterisation of phase transition in adsorbed monolayers at the air/water interface. *Advances in Colloid and Interface Science* 154(1-2):1–19, 2010.

Yang L., Glaser M. Formation of membrane domains during the activation of protein Kinase C. *Biochemistry* 35:13966–13974, 1996.

Zasadzinski JA, Viswanathan R, Madsen L, Garnaes J, Schwartz DK. Langmuir-Blodgett films. *Science*. 263(5154):1726-1733, 1994.

CAPÍTULO 9

INTERACCIÓN LÍPIDO-PROTEÍNA

Jorge L. Pórfido y Valeria Silva

Introducción

Las interacciones lípido-proteína son de gran importancia en muchos procesos que resultan fundamentales para la vida en nuestro planeta. A modo de ejemplo, cabe destacar que gran parte de los procesos de la fotosíntesis y la respiración celular son llevados a cabo por proteínas que se encuentran formando parte de membranas biológicas. Asimismo, el transporte de triglicéridos y colesterol a través del plasma sanguíneo sería imposible si no se formaran las lipoproteínas encargadas de solubilizar y direccionar dichos lípidos a los órganos correspondientes. A la luz de lo antes mencionado, es evidente que resulta importante contar con herramientas que permitan el estudio de este tipo de interacciones, lo cual representa el objetivo central de este capítulo.

Antes de adentrarnos en las técnicas empleadas para el estudio de las interacciones entre lípidos y proteínas, es útil hacer un repaso de los distintos tipos de proteínas involucradas en este tipo de interacciones.

1. Proteínas de membrana
2. Lipoproteínas plasmáticas
3. Proteínas solubles que unen lípidos

Proteínas de membrana

Las proteínas de membrana pueden ser clasificadas en dos grandes grupos: proteínas periféricas y proteínas integrales de membrana, tal como se muestra

en el esquema de la Figura 9.1. Aquellas proteínas pertenecientes al primer grupo se encuentran vinculadas con las membranas celulares mediante interacciones no covalentes con las cabezas polares de los fosfolípidos que componen la membrana, o bien con las regiones hidrofílicas de las proteínas integrales de membrana que se extienden por fuera de la bicapa lipídica. Por otro lado, las proteínas integrales se caracterizan por interactuar con las regiones hidrofóbicas de la bicapa lipídica, en algunos casos llegando a atravesar a la misma por completo (proteínas transmembrana). Considerando las características hidrofóbicas del interior de la bicapa fosfolipídica, es claro que la estructura nativa de las proteínas transmembrana debe consistir en un arreglo “inverso” al que presentan las proteínas hidrosolubles, es decir, los aminoácidos menos polares deben quedar expuestos para interactuar con las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos, mientras que los aminoácidos polares deben agruparse alejados de la fase hidrofóbica. Cabe destacar que las estructuras de proteínas de membrana resueltas hasta el momento muestran que las mismas presentan dos tipos básicos de plegamiento: un haz de α -hélices o un barril- β . Dichos plegamientos presentan, a su vez, una correlación con la localización de dichas proteínas: mientras que los haces de α -hélices se encuentran principalmente formando parte de canales iónicos y receptores de membrana plasmática o de retículo endoplásmico, los barriles- β se encuentran en la membrana externa de bacterias Gram-negativas, mitocondrias y cloroplastos. El hecho de que las proteínas integrales de membrana posean los motivos antes mencionados se debe a que ellos satisfacen los puentes de hidrógeno que pueden formarse entre los grupos amino y carbonilo de la cadena peptídica, al tiempo que minimizan la exposición de los aminoácidos polares hacia el ambiente hidrofóbico del interior de la membrana. Los segmentos transmembrana de una proteína pueden llegar a predecirse teniendo en cuenta la composición aminoacídica de la secuencia, ya que se ha visto que las características de la membrana imponen ciertas restricciones al plegamiento de las proteínas transmembrana. Se ha observado que las hélices transmembrana requieren de al menos 15 aminoácidos, predominantemente hidrofóbicos, para poder atravesar la bicapa

lipídica. Las hojas β , por su parte, consisten en secuencias de más de diez aminoácidos, en donde los polares y los hidrofóbicos se van alternando. Por otro lado, ciertos segmentos que no atraviesan la membrana (quedan del lado citosólico) y conectan dos segmentos transmembrana han demostrado estar enriquecidos en aminoácidos cargados positivamente (Punta, 2007; Smith, 2011).

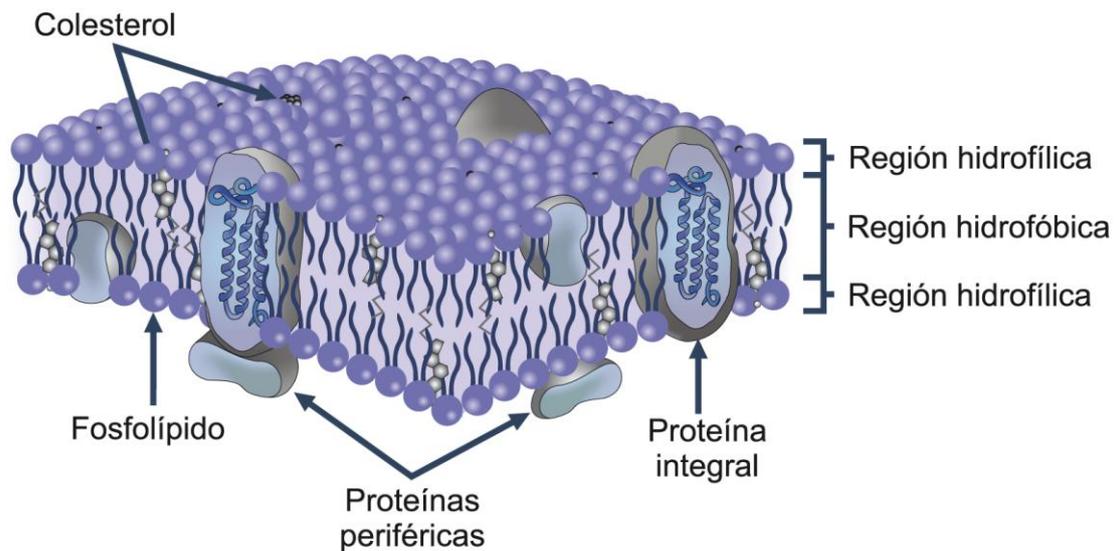


Figura 9.1. Esquema de una membrana biológica y sus proteínas.

Lipoproteínas plasmáticas

En vertebrados, así como en insectos, las lipoproteínas son las encargadas de solubilizar y transportar por la circulación diversos lípidos tales como colesterol, triglicéridos y fosfolípidos. En líneas generales, las lipoproteínas consisten en partículas globulares que contienen un centro hidrofóbico compuesto por lípidos no polares como triglicéridos y ésteres de colesterol recubiertos por una capa anfílica de proteínas, conocidas como apolipoproteínas, fosfolípidos y colesterol no esterificado (ver Figura 9.2). En los mamíferos, las lipoproteínas plasmáticas son sintetizadas en el hígado y en el intestino, y en circulación su estructura y composición son altamente dinámicas. En este entorno, las

lipoproteínas pueden sufrir modificaciones enzimáticas de sus componentes lipídicos, transferir sus lípidos o sus apolipoproteínas solubles hacia otras lipoproteínas, y por consiguiente sufrir cambios conformacionales en respuesta a estas modificaciones en su composición. Luego de estas modificaciones, las lipoproteínas son catabolizadas en el hígado, en el riñón y/o en los tejidos periféricos, generalmente vía endocitosis mediada por receptor. La interacción con estos receptores, así como el metabolismo, la estructura y el armado de las distintas partículas lipoprotéicas en circulación, está determinado en gran parte por sus apolipoproteínas. Si bien existen varias apolipoproteínas diferentes, la mayoría de ellas se caracterizan por poseer una gran proporción de α -hélices anfipáticas, es decir α -hélices que tienen una cara no polar que puede establecer interacciones hidrofóbicas con los lípidos no polares del interior de las lipoproteínas; y una cara polar que puede establecer interacciones con los lípidos polares que están en la superficie de las partículas lipoprotéicas y/o con el agua. Es por ello que algunas de estas apolipoproteínas son relativamente solubles en agua, aún en su forma libre de lípidos, y de hecho suelen ser sintetizadas en su forma apo para luego adquirir los lípidos en circulación. Por otro lado, frente a distintos estímulos, estas apolipoproteínas solubles pueden ser transferidas con relativa facilidad de una partícula lipoprotéica a otra, es por eso que también reciben el nombre de apolipoproteínas intercambiables. Las apolipoproteínas intercambiables suelen ser proteínas relativamente pequeñas, aunque sus tamaños pueden variar desde 6 hasta 45 kDa. Las apolipoproteínas intercambiables se agrupan en distintas familias: Apo A, Apo C, Apo D y Apo E, muchas de las cuales poseen varios miembros. Por otro lado, existe otro grupo de apolipoproteínas no intercambiables, que se caracterizan por ser muy insolubles en agua en su forma libre de lípidos y, de hecho, deben unirse a sus ligandos a medida que son sintetizadas en el retículo endoplásmico en las células del hígado o del intestino. Si bien la estructura de estas apolipoproteínas no ha podido ser determinada en forma libre de lípidos debido a su baja solubilidad en agua, ensayos llevados a cabo con las partículas lipoprotéicas o con fragmentos de apolipoproteínas solubilizados en detergentes han revelado que tienen un alto contenido de

hojas β conjuntamente con α -hélices anfipáticas. Las apolipoproteínas no intercambiables son la Apo B48 y la Apo B100, las cuales tienen un peso molecular mucho mayor, siendo de 212 kDa en el caso de la Apo B48 y de 512 kDa en el caso de la Apo B100.

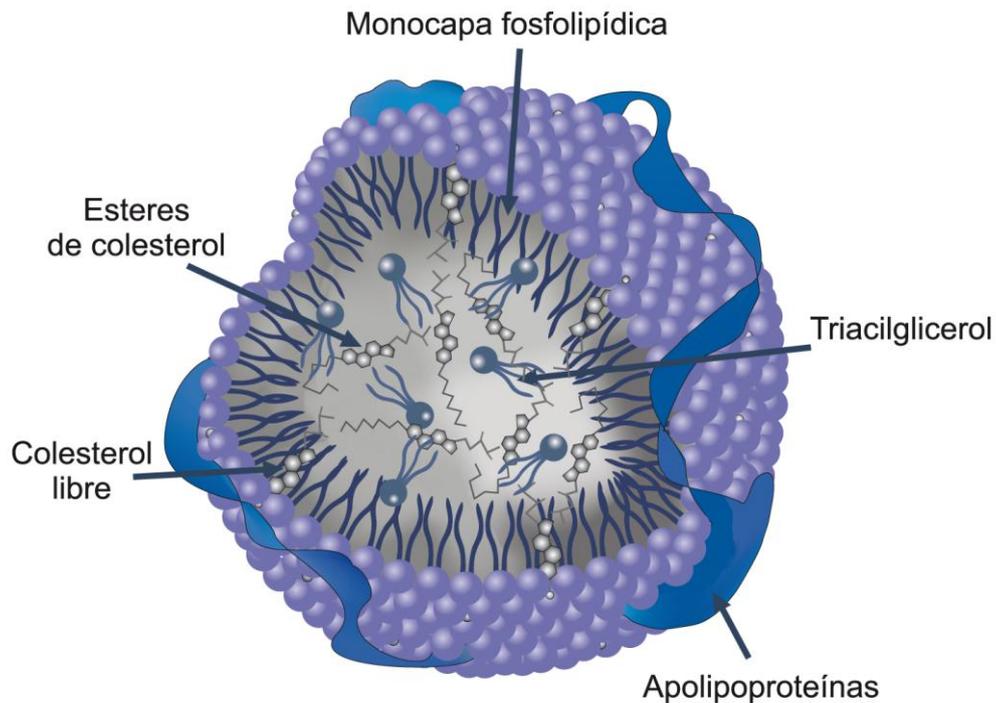


Figura 9.2. Esquema representativo de una lipoproteína y sus componentes.

Además de variar en la composición de apolipoproteínas, conteniendo apolipoproteínas intercambiables o no intercambiables, las distintas lipoproteínas plasmáticas de mamíferos se clasifican de acuerdo a su densidad. Esta clasificación denomina a las lipoproteínas como quilomicrones, VLDL (del inglés *Very Low Density Lipoprotein*), LDL (del inglés *Low Density Lipoprotein*) y HDL (del inglés *High Density Lipoprotein*). Su densidad varía debido a su contenido de lípidos respecto al de proteína, siendo los quilomicrones las partículas menos densas, puesto que su porción proteica constituye tan solo el 1-2 % de su peso, mientras que en el caso de las HDL la porción proteica constituye el 50 % de su masa. Asimismo, el diámetro de las lipoproteínas se correlaciona inversamente con su densidad, siendo de 6000 Å para los quilomicrones hasta 70 Å para las partículas de HDL más pequeñas.

Las funciones específicas de estas lipoproteínas no serán tema de estudio del presente capítulo. Brevemente sólo mencionaremos que los quilomicrones son sintetizados en el intestino y son las partículas encargadas de transportar los triglicéridos provenientes de la dieta, mientras que las partículas de VLDL son sintetizadas en el hígado para transportar los triglicéridos endógenos. Las partículas de LDL derivan de los cambios metabólicos que sufre la VLDL en circulación y su función es la de transportar principalmente los esteres de colesterol hacia los tejidos periféricos y hacia el hígado. Las partículas de HDL son sintetizadas en el hígado y en el intestino, y también son formadas a partir de los cambios metabólicos de otras lipoproteínas en circulación. Su función es la de transportar el exceso de colesterol desde los tejidos hacia el hígado para su remoción y excreción (Vance, 2008).

Proteínas solubles que unen lípidos

En esta sección se tratará un grupo heterogéneo de proteínas que no están relacionadas evolutivamente, pero sí comparten ciertas características: todas son proteínas relativamente pequeñas, solubles y que tienen la capacidad de unir ligandos hidrofóbicos.

Dentro de dicho grupo, las más estudiadas son las que se conocen como iLBP (del inglés *intracellular Lipid Binding Proteins*), las cuales incluyen tanto a las FABP (del inglés *Fatty Acid Binding Proteins*) como a las CRBP (del inglés *Cytosolic Retinoid Binding Proteins*) (Schaap, 2002). A pesar de que el conjunto de las iLBP difiere en el tipo y número de ligandos que unen, y se proponen distintas funciones para cada una de ellas, todas coinciden en gran medida en su estructura tridimensional. La misma consiste en un barril- β formado por diez hebras β antiparalelas, coronado con dos α -hélices a modo de tapa del barril, como se muestra en la Figura 9.3 para la FABP de intestino (IFABP). Si bien las funciones de las iLBP aún no son del todo claras, se ha propuesto que participarían en la solubilización y transporte de compuestos hidrofóbicos en el interior de la célula, así como en el direccionamiento de

dichos compuestos hacia diversas organelas. Asimismo, se han propuesto para algunas de estas proteínas funciones de regulación de enzimas y de genes involucrados en el metabolismo lipídico, así como su participación en vías de señalización (Furuhashi, 2008; Storch, 2008).

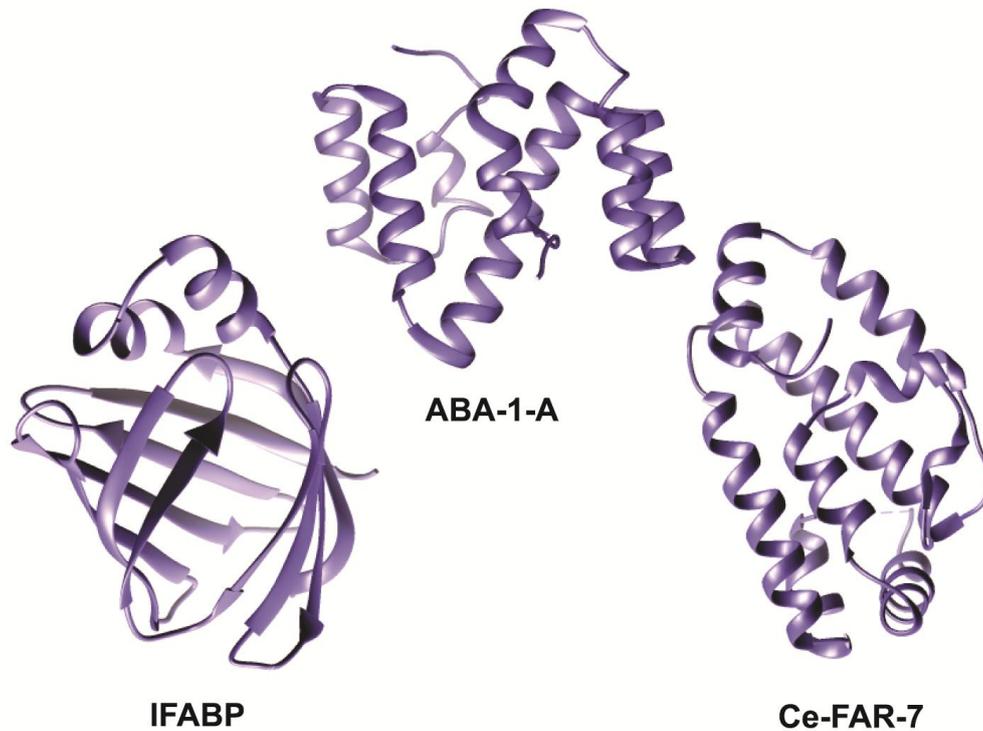


Figura 9.3. Esquemas de cintas de distintas proteínas solubles que unen lípidos: IFABP (PDB: 1KZW); ABA-1-A (PDB: 2XV9) y Ce-FAR-7 (PDB: 2W9Y)

Existen otras proteínas pequeñas de unión a lípidos exclusivas de nematodos que se conocen como FAR (del inglés *Fatty Acid and Retinol binding proteins*) y NPA (del inglés *Nematode Polyprotein Antigens/Allergens*). Aparte de ser exclusivas de nematodos, las proteínas pertenecientes a estos dos grupos tienen en común la característica de ser secretadas al medio por los organismos que las producen, y de estar compuestas en su mayor parte por estructuras α -helicoidales. En la Figura 9.3 se muestran las estructuras de dos proteínas miembros de estas familias, la proteína ABA-1-A perteneciente a la familia de las NPA y la proteína Ce-FAR-7, una proteína de la familia de las FAR. Asimismo, se ha demostrado que ambos grupos son capaces de unir tanto ácidos grasos como retinol *in vitro*. Las NPA tienen a su vez la

característica de ser sintetizadas como poliproteínas, es decir como un polipéptido de 10-11 subunidades en tándem que son cortadas post-traduccionalmente para dar origen a las proteínas funcionales. En algunos organismos todas las subunidades sintetizadas en el tándem son iguales, mientras que en otros difieren unas de otras. La función de estas proteínas es aún desconocida, aunque se propone su participación en la adquisición de nutrientes y el control de la respuesta inmune del hospedador para el caso de las NPA producidas por parásitos (Kennedy, 2011)

Finalmente, existe también un grupo de proteínas que es exclusivo de cestodos, las HLBP (del inglés *Hydrophobic Ligand Binding Proteins*) (Alvite, 2012). Cabe destacar que, a diferencia de las demás proteínas que se han mencionado previamente, las HLBP están compuestas por subunidades proteicas de 7-11 kDa que forman oligómeros de mayor peso molecular y son capaces de unir una gran diversidad de clases lipídicas, incluyendo lípidos polares y lípidos neutros. Por este motivo son consideradas lipoproteínas y en base a su composición y proporción lipídica, se ha propuesto que en algunos casos podría tratarse de lipoproteínas con estructura similar a las lipoproteínas plasmáticas de mamíferos (Obal, 2012).

9.1. Lípidos en la Estabilización y Regulación de Proteínas

Las últimas décadas han traído un cambio de paradigma respecto a los modelos de estructura de las membranas biológicas. El modelo del mosaico fluido va dando paso lentamente a un modelo más complejo, donde los lípidos y las proteínas no están distribuidos homogéneamente, sino que pueden estar organizados en microdominios que difieren unos de otros en su composición lipídica y proteica. Este hecho ha puesto de relevancia la importancia de los lípidos en la estabilización y regulación de ciertas proteínas. Tal es así, que existen en la actualidad grupos de investigación en todo el mundo estudiando estas relaciones. Como frutos de dichos estudios han surgido varios modelos que intentan explicar la formación de dominios en las membranas biológicas.

Dichos modelos difieren en las fuerzas que dirigen la formación y el reclutamiento de los componentes de membrana necesarios para formar los microdominios. Uno de los modelos propone que los dominios pueden formarse por interacciones proteína-proteína específicas. Otro modelo pone de manifiesto la importancia de las interacciones lípido-lípido, las cuales iniciarían la formación de subdominios de composiciones lipídicas definidas, que atraerían posteriormente a las proteínas de membrana mediante interacciones proteína-lípido específicas. Los complejos lípido-proteína resultantes luego se unirían para formar complejos mayores.

Las interacciones de las proteínas de membrana con los lípidos pueden clasificarse en distintos grupos de acuerdo al tiempo de residencia relativo de un determinado lípido en la interfase proteína-lípido. Los lípidos considerados "*bulk lipids*", es decir, que forman parte del seno de la membrana biológica, son aquellos que presentan una baja interacción con los dominios transmembrana de las proteínas. El tiempo de residencia de un lípido junto a la superficie de la proteína puede verse modificada por interacción de aminoácidos específicos de la proteína con la cabeza polar del lípido, por interacciones hidrofóbicas con las cadenas hidrocarbonadas del lípido, o por ambas. Este tipo de interacciones puede hacer que un lípido pase del seno de la membrana a formar parte de una estructura tipo anillo (o cáscara) alrededor de la proteína de membrana. Claramente, esto involucra un aumento en los tiempos de residencia de dichos lípidos alrededor del segmento transmembrana en cuestión. Los lípidos que tienen una tasa de recambio aún menor (esto es, tiempos de residencia mayores) se denominan lípidos no-anulares. Con frecuencia residen dentro de grandes complejos de proteínas de membrana o dentro de proteínas que poseen varios dominios transmembrana. Contribuyen no sólo a estabilizar las estructuras proteicas, sino que también pueden funcionar como moduladores alostéricos de las mismas o influir incluso en su localización intracelular.

Existen varios factores que influyen sobre la interacción de las proteínas de membrana con los lípidos. Entre ellos se encuentran el espesor hidrofóbico de la bicapa lipídica, la presión lateral que ejerce la membrana, la distribución de cargas en la interfase lípido-proteína y la presencia de algunos aminoácidos

estratégicamente ubicados dentro de la proteína. El espesor hidrofóbico es la distancia entre las cabezas polares de los lípidos que componen ambas caras de la membrana. Esta propiedad está determinada principalmente por la composición lipídica de la bicapa. El perfil de presiones laterales de membrana es un factor importante que influye la estructura, y función, de las proteínas de membrana. La misma es mayor en la interfase entre regiones hidrofóbicas e hidrofílicas. Estas presiones estarían influenciadas por el grado de orden de los lípidos que rodean a la proteína de membrana en estudio, así como por el grado de *mismatch* hidrofóbico en la interfase lípido-proteína. Se conoce como *mismatch* hidrofóbico a cualquier desviación de la compatibilidad hidrofóbica ideal que exista entre un dominio transmembrana y los lípidos que lo rodean.

La disponibilidad creciente de estructuras de proteínas de membrana resueltas por cristalografía de rayos X ha permitido profundizar los conocimientos sobre las interacciones entre los lípidos y las proteínas. En la mayoría de las estructuras publicadas, las interacciones lípido-proteína están estabilizadas principalmente por interacciones polares entre aminoácidos específicos y las cabezas de los lípidos. Los aminoácidos aromáticos también suelen estar involucrados en la estabilización de la unión con lípidos. Los residuos de tirosina que están presentes en la interfase interactúan con los grupos fosfatos de los lípidos (por interacción iónica o puente hidrógeno), a veces en combinación con aminoácidos cargados positivamente. Del mismo modo, los residuos de triptófano suelen ubicarse en la región interfásica, con su grupo indol apuntando al centro de la bicapa lipídica. Puede observarse puentes de hidrógeno entre el átomo de nitrógeno del grupo indol y el grupo fosfato de los fosfolípidos. Por otro lado, interacciones no polares entre las cadenas hidrofóbicas de los lípidos y los dominios transmembrana de las proteínas estabilizan la unión proteína-lípido.

Tal como se ha mencionado previamente, se ha propuesto que las interacciones lípido-proteína serían críticas para la inserción, plegamiento y función de las proteínas de membrana. Tal es así que hay quienes proponen que se llame lipochaperonas a los lípidos que intervienen en este tipo de interacciones. Más allá de las confusiones que podrían surgir con el uso de

dicho término (denominaciones similares se han empleado para referirse a las proteínas transportadoras de lípidos), cabe destacar que algunos estudios han demostrado que la situación planteada no estaría lejos de la realidad. Por ejemplo, se ha visto que la fosfatidiletanolamina es fundamental para la función del transportador de lactosa LacY (lactosa permeasa) de *Escherichia coli*. En ausencia de dicho fosfolípido, la proteína puede incorporarse en la membrana, pero no es funcional. La disminución de la actividad de transporte en ausencia de fosfatidiletanolamina se debe a que en esas condiciones algunos dominios transmembrana se encuentran invertidos. Se ha observado que la adición de fosfatidiletanolamina luego de la inserción de la proteína en la membrana es capaz de restaurar la actividad transportadora de la lactosa permeasa (Contreras, 2011)

9.2. Estrategias para el Estudio de las Interacciones Lípido-Proteína

En esta sección describiremos diversas estrategias experimentales para el análisis de la interacción lípido-proteína. Como comentamos en las secciones anteriores este tipo de interacciones pueden ser muy variadas, dependiendo si se trata de proteínas integrales o periféricas de membrana, si son parte de una lipoproteína o si son proteínas solubles de unión a lípidos. Para analizar las interacciones lípido-proteína, en el caso de las proteínas de membrana primeramente realizaremos una breve revisión de los métodos para su obtención, ya que se aplican métodos más drásticos respecto a los métodos tradicionales de purificación de proteínas.

Estrategias para el estudio de proteínas de membrana.

A. Purificación de proteínas de membrana

El procedimiento a aplicar al momento de purificar una proteína de membrana va a depender, inicialmente, del tipo de proteína de membrana de la cual se

trate: periférica o integral. Esta determinación es empírica, salvo que se posea cierta información de antemano. Es decir, si una vez que la muestra es tratada con la finalidad de solubilizar las proteínas periféricas de membrana, la actividad biológica de interés se conserva en la fracción sedimentable, entonces se considera que la proteína es integral. Teniendo en cuenta las características previamente comentadas de ambos tipos de proteínas, es claro que el procedimiento a seguir para solubilizar y purificar cada una de ellas será diferente.

Las proteínas periféricas pueden solubilizarse empleando métodos suaves, de los mismos utilizados para romper interacciones proteína-proteína (recordar que muchas de ellas se mantienen unidas a las membranas por interacción con proteínas integrales). Una vez que están solubilizadas, puede trabajarse con ellas como si se tratara de proteínas solubles. Algunos métodos utilizados para separar a las proteínas periféricas de las membranas incluyen la extracción salina con agentes caotrópicos, la ultrasonificación, extracción alcalina, etc.

Los tratamientos con alta concentración salina permiten disminuir las interacciones electrostáticas que pueden mantener unidas a las proteínas con ciertos lípidos cargados. Por otro lado, el empleo de ciertos iones caotrópicos como I^- , ClO_4^- y SCN^- ayudan a desorganizar la estructura del agua y, de ese modo, debilitar las interacciones hidrofóbicas que en muchos casos mantienen unidas a las proteínas en los entornos cercanos a las membranas. Cuando estas sales son utilizadas en concentraciones muy altas pueden llegar a desnaturalizar a las proteínas, pero a concentraciones más bajas permiten su solubilización selectiva.

La variación del pH es otra manera de solubilizar proteínas que están unidas a membrana. La titulación de grupos cargados en la membrana puede inducir la disociación de las proteínas que se encuentran interactuando con ellos. Cabe destacar que a pH demasiado alto, si bien se obtiene un alto grado de solubilización, es más probable que ocurra desnaturalización y pérdida de actividad de las proteínas.

Teniendo en cuenta el análisis que se hizo previamente sobre las proteínas de membrana, resulta claro que para poder obtener una proteína integral de

membrana en estado monomérico, es necesario utilizar medios más drásticos, capaces de romper la bicapa lipídica. Por otro lado, para evitar que las proteínas extraídas formen agregados insolubles, es necesario brindarles un entorno hidrofóbico adecuado que haga que su estructura se mantenga termodinámicamente estable. La ruptura de la bicapa lipídica puede lograrse con solventes orgánicos o detergentes, siendo esta última alternativa la más usada.

La extracción con n-butanol utiliza un sistema bifásico donde se aprovecha la baja solubilidad de ese alcohol en agua y su preferencia por entornos lipídicos, que hacen que las proteínas sufran una desnaturalización mínima. De este modo, se solubilizan las proteínas de membrana en *buffers* acuosos diluidos. No obstante, como se mencionó anteriormente, lo más utilizado para solubilizar proteínas de membrana son los detergentes. Los detergentes son moléculas anfipáticas, cargadas o no, capaces de formar micelas (ver capítulo 8). La solubilización de las proteínas se produce, por lo tanto, por la interacción de una parte de la molécula de detergente con las zonas hidrofóbicas de las proteínas, mientras que la otra parte interacciona con el agua. El detergente ideal es aquel que solubiliza adecuadamente a las proteínas sin llegar a desnaturalizarlas. Esa determinación es netamente empírica y depende tanto de las propiedades de las proteínas como de las metodologías que haya que aplicarles subsecuentemente. Generalmente, es necesario probar diversos detergentes, en diferentes concentraciones, durante tiempos de incubación variados, y a distintas temperaturas y concentraciones salinas para poder elegir el compuesto que brinde una solubilización adecuada de nuestra proteína de interés. Al momento de analizar los detergentes es importante prestar atención a la concentración micelar crítica (CMC), que es una característica propia de cada molécula. Esto se debe a que las micelas son las estructuras que permiten la solubilización de las proteínas. Los detergentes cumplen, de este modo, dos funciones: por un lado inhiben las interacciones hidrofóbicas intra- o inter-proteínas, y por otro lado previenen la pérdida de proteínas integrales de membrana por agregación o adsorción. Idealmente, cada proteína (o complejo proteico) debería localizarse en micelas independientes, de modo que se

comportaría como una entidad aislada, susceptible de ser estudiada usando las mismas metodologías que se emplean para proteínas solubles, pero en presencia de concentraciones adecuadas del detergente correspondiente. Cabe destacar, sin embargo, que algunas técnicas ampliamente usadas en la purificación de proteínas no son compatibles con los detergentes. Por ejemplo, el *salting out* con sulfato de amonio hace que el detergente Triton X-100 se separe y forme una capa flotante. Otra característica de los detergentes a tener en cuenta es el peso molecular de las micelas que forma. Este valor puede determinarse experimentalmente y es muy dependiente de la composición del *buffer* con el cual se trabaja. Es importante tener en cuenta que, por ejemplo, un detergente que forme micelas de alto peso molecular será más difícil de remover por diálisis (Smith, 2011).

B. Reconstitución de proteínas de membrana en proteoliposomas.

Ya se ha mencionado la relevancia que tienen las proteínas transmembrana en diversos procesos biológicos, y la importancia de contar con metodología adecuada que permita el estudio de las mismas. Una de las herramientas más útiles para analizar la función de este grupo de proteínas es la reconstitución de las mismas en proteoliposomas. De este modo, es posible tener proteínas purificadas, inmersas en vesículas lipídicas de composición definida, que permiten el análisis de propiedades catalíticas o de transporte de la proteína en estudio sin interferencias de otros componentes de membrana. El principal inconveniente que ha existido respecto al empleo de proteoliposomas radica en la dificultad que hubo de estandarizar una metodología que diera como resultado proteoliposomas reproducibles y de alta calidad.

En lo que respecta a los métodos utilizados para incorporar proteínas de membrana en liposomas, se pueden enumerar cuatro como los principales: métodos mecánicos, congelamiento-descongelamiento, uso de solventes orgánicos y uso de detergentes. A pesar de que las técnicas mencionadas han demostrado ser muy útiles al momento de producir vesículas de fosfolípidos

puros, ciertas complicaciones han surgido al momento de incorporar proteínas a dichas vesículas. Cabe destacar que para el caso de los proteoliposomas se deben tener en cuenta ciertos factores adicionales como la homogeneidad de la inserción de las proteínas en las vesículas, la correcta orientación de las proteínas, la morfología y el tamaño de los proteoliposomas, y su permeabilidad residual.

La aplicación de los métodos mecánicos de reconstitución de proteoliposomas se ha visto desalentada en muchos casos por complicaciones difíciles de evitar. Para el caso de la sonicación por ejemplo, el aumento local de temperatura en la punta del sonicador puede conducir a desnaturalización y degradación de las proteínas. Por otro lado, el pequeño tamaño de los proteoliposomas resultantes (10-20 nm) limita el volumen interno de los mismos, lo cual limita a su vez la cantidad de solutos que pueden acumularse en su interior. Dicha característica es importante si se quieren estudiar proteínas transportadoras.

La aplicación de las técnicas de preparación de liposomas que emplean solventes orgánicos se ha visto limitado a la reconstitución de sólo algunas proteínas de membrana como rodopsinas y bacteriorrodopsina capaces de resistir la desnaturalización que los solventes orgánicos provocan a la mayoría de las otras proteínas anfifílicas de membrana (Darszon, 1979; Rigaud, 1983).

Muchos de los métodos de preparación de liposomas no han podido aplicarse con facilidad a la preparación de proteoliposomas debido a que la mayoría de las proteínas de membrana se purifican mediante el uso de detergentes que interfieren en el proceso de la formación de vesículas. Es por esto que la mayoría de las técnicas exitosas de reconstitución de proteínas de membrana en proteoliposomas se han desarrollado incluyendo el uso de detergentes.

El procedimiento estándar (ver esquema en Figura 9.4) de reconstitución involucra la comicelización de la proteína de membrana purificada con un exceso de fosfolípidos y un detergente adecuado. El detergente debe ser luego removido para dar como resultado la formación de bicapas cerradas en las que se insertan las proteínas. La diferencia entre los distintos procedimientos de reconstitución mediados por detergentes radica únicamente en las técnicas utilizadas para remover el detergente de la solución.

Dentro de las técnicas aplicadas para remover los detergentes, la diálisis es la que ha sido más ampliamente usada. El método más simple consiste en colocar la solución de micelas de lípido-proteína-detergente en una bolsa de diálisis de corte 14 kDa y dializarlo contra un volumen grande de *buffer* sin detergente. En estos experimentos, sólo los monómeros de detergente atraviesan la membrana de diálisis. Debe tenerse en cuenta que los detergentes con mayor CMC se remueven más fácilmente por diálisis que los que tienen menor CMC (1 a 2 días contra 1 a 2 semanas). Las ventajas obvias de la diálisis como método para remover el detergente radican en su simplicidad y bajo costo. Sin embargo, este método también posee ciertas desventajas, tales como: baja reproducibilidad, imposibilidad de controlar el grado de diálisis, posible retención de moléculas en la membrana de diálisis, y la duración del experimento, que en algunos casos puede extenderse demasiado tiempo, incluso más de lo que algunas proteínas pueden resistir.

Una alternativa para evitar largos tiempos de contacto entre las proteínas y los detergentes durante los procesos de reconstitución consiste en emplear columnas cromatográficas de exclusión molecular. Esta técnica aprovecha la diferente accesibilidad a los poros del gel que tienen las micelas mixtas respecto a los liposomas puros. A medida que la mezcla es eluida a través de la columna, la dilución resultante de la difusión molecular y del acceso diferencial de los agregados más pequeños a los poros del gel da como resultado la formación de vesículas. La principal ventaja de esta técnica es su rapidez, lo que posibilita reducir el tiempo de contacto de la proteína con el detergente. Esta ventaja, sin embargo, puede ser a la vez la principal desventaja, ya que puede dar como resultado una incorporación incompleta o no homogénea de las proteínas en los liposomas. Por lo tanto, si bien la filtración por geles es una técnica muy usada para la preparación de liposomas, la misma actualmente no es tan utilizada para la reconstitución de proteínas de membranas mediada por detergentes.

Una tercera estrategia para remover el detergente de las micelas mixtas de detergente-lípido-proteína consiste en diluir la muestra con *buffer* libre de detergente. Al diluir la concentración de detergente en la muestra por debajo de

su CMC, el mismo se retira espontáneamente de las micelas, lo que da lugar a la formación de proteoliposomas. Las principales ventajas de la técnica radican en su obvia sencillez, que implica la necesidad de tiempos muy cortos para disminuir la concentración de detergente, y la posibilidad de regular la tasa de dilución mediante adiciones sucesivas de *buffer* empleando bombas adecuadas. Por otro lado, la técnica también presenta desventajas tales como la imposibilidad de remover el detergente por completo (lo cual equivaldría a una dilución infinita), la necesidad de trabajar con detergentes que tengan una CMC alta, y la necesidad de algún paso extra para concentrar los liposomas una vez que se separan del detergente.

Los detergentes que no pueden removerse fácilmente por las técnicas antes mencionadas (por ejemplo, los detergentes con CMC muy baja) pueden ser removidos mediante adsorción hidrofóbica sobre resinas de poliestireno. Las resinas de poliestireno pueden ser utilizadas con buenos resultados en ensayos en *batch* (es decir, agregando directamente las bolitas de poliestireno a la mezcla de proteínas-lípidos-detergentes). Estas resinas han permitido el empleo de detergentes tales como el Triton X-100 para la reconstitución de proteínas en proteoliposomas. Si bien este detergente es adecuado para extraer proteínas de membrana, su baja CMC lo hacía difícil de remover por las técnicas antes mencionadas. Otra ventaja que se plantea a favor del uso de las resinas de poliestireno es que se puede controlar el grado de remoción de detergente regulando la cantidad de resina que se utiliza en el ensayo. Finalmente, el hecho de que esta técnica pueda remover gran parte del detergente presente en soluciones micelares, permite la formación de proteoliposomas con permeabilidad iónica baja; una característica muy buscada al momento de estudiar proteínas de membrana con funciones de transportadores de iones.

Una vez obtenidos los proteoliposomas, los mismos deben caracterizarse. Existen ciertas variables que son muy importantes al momento de evaluar la calidad de los proteoliposomas producidos, algunas de ellas son: actividad de la proteína en estudio, grado de incorporación de las proteínas a los liposomas, orientación de las proteínas, distribución de tamaño y permeabilidad de los

liposomas. Sólo se mencionarán las técnicas empleadas para tales fines, ya que los detalles técnicos pueden ser encontrados en bibliografía más específica.

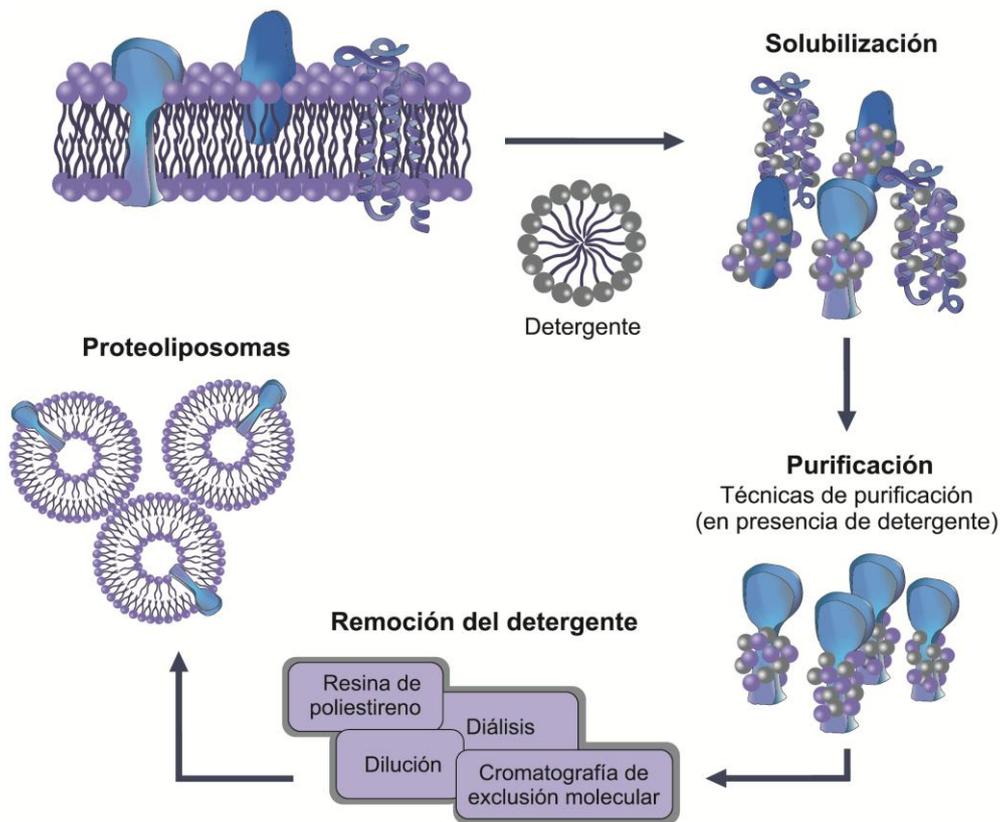


Figura 9.4. Esquema de la reconstitución de proteínas de membrana en proteoliposomas.

Respecto a la medida de actividad de la proteína, la misma dependerá de cuál sea la proteína en estudio. Si bien dicha medida puede dar cierta información sobre la correcta reconstitución de una proteína de membrana en liposomas, podría ocurrir que moléculas de proteína no incorporadas a los liposomas, o incluso agregados proteicos, presentaran actividad, por lo que debe evaluarse la incorporación de las proteínas a los liposomas. Para tal fin, pueden emplearse centrifugaciones en gradientes de densidad, de modo de separar las proteínas no incorporadas de los proteoliposomas bien constituidos. En cuanto a la correcta orientación de las proteínas en los liposomas, una técnica de gran ayuda consiste en emplear SDS-PAGE de muestras antes y después de digestiones enzimáticas con proteasas específicas. El análisis de los patrones de digestión y la cuantificación de los mismos por densitometría permiten

dilucidar la cantidad relativa de proteína que se encuentra bien orientada. Para analizar la distribución de tamaños de los proteoliposomas pueden emplearse técnicas tales como *light-scattering* o cromatografías de permeación por geles, que ya están bien establecidas para el estudio de las distribuciones de tamaños tanto de liposomas puros como de agregados proteicos. La microscopía electrónica puede ser también una técnica útil para estos fines. Finalmente, para analizar la permeabilidad de las membranas, hoy en día se cuenta con técnicas que emplean sondas fluorescentes que han demostrado ser muy útiles para este tipo de aplicaciones (Rigaud, 2003).

Estrategias para el estudio de interacción proteína-ligando

En esta sección describiremos algunas aproximaciones experimentales que pueden utilizarse para abordar el estudio de la interacción entre las proteínas de unión a lípidos y sus ligandos. La aplicación de las distintas técnicas dependerá de la proteína y del tipo de ligando que constituya nuestro sistema de estudio, así como también del tipo de información que estemos interesados en obtener. Aplicando diferentes estrategias, se puede conocer desde la preferencia de una proteína por distintos ligandos hasta la constante de afinidad que ésta tiene por ellos. Para obtener este tipo de información se puede mirar el sistema tanto desde la proteína de interés como desde el ligando. A continuación describiremos en más detalle algunas técnicas que pueden emplearse para seguir el proceso de unión al ligando observando el sistema desde ambos puntos de vista.

A. Unión proteína-ligando monitoreando cambios en la proteína

La interacción proteína-ligando se puede seguir observando los cambios que ocurren en la proteína tras la unión al lípido. Estos cambios en la proteína se pueden observar utilizando distintas técnicas, algunas de ellas

espectroscópicas y otras bioquímicas. Dentro de las técnicas espectroscópicas, la fluorescencia es una de las más utilizadas (ver capítulo 2), pero su aplicación dependerá de la proteína que estemos analizando. Si la proteína tiene uno o más triptófanos puede ser muy útil, dado que la emisión de los triptófanos es muy sensible al entorno local, mostrando un corrimiento espectral importante en distintos entornos. El máximo de emisión del triptófano es reflejo de su grado de exposición al solvente, en este sentido cuando está en un entorno más apolar, por ejemplo al estar formando parte de un bolsillo hidrofóbico en una proteína su máximo de emisión puede correrse de 350 nm (triptófano en agua) a 335-340 nm. Asimismo si este triptófano se encuentra cercano al sitio de unión de la proteína a un ligando hidrofóbico también pueden observarse cambios en el espectro de emisión de fluorescencia a medida que ésta se une al ligando. Estos cambios son útiles para hacer una titulación de la proteína con concentraciones crecientes del ligando para obtener la constante de afinidad que describe el proceso de unión (Franchini, 2009; De Gerónimo, 2010). En este sentido, es conveniente excitar selectivamente a los triptófanos utilizando una longitud de onda de excitación de 295 nm. Por el contrario, si la proteína no posee triptófanos o si éstos no son sensibles a la unión del ligando también puede utilizarse la emisión de las tirosinas o de las fenilalaninas, dado que estos aminoácidos también contribuyen a la emisión intrínseca de las proteínas. En este caso, se deberá utilizar una longitud de onda de excitación de 280 nm en lugar de 295 nm. Si a través de la medida de la fluorescencia intrínseca no es posible monitorear la unión al ligando, también puede recurrirse a la marcación de la proteína con fluoróforos que sean sensibles al entorno, pero debe considerarse que esto puede afectar la estructura de la proteína y por consiguiente su capacidad de unión al ligando. Sin recurrir a este tipo de modificaciones, también pueden emplearse otras técnicas espectroscópicas que nos permitan analizar la unión. Una de ellas es el dicroísmo circular (ver capítulo 4), principalmente lo que se conoce como medida en el ultravioleta cercano (250 a 350 nm). En esta región los cromóforos más importantes son los grupos aromáticos de las cadenas laterales del triptófano, la tirosina y la fenilalanina. La asimetría en estos grupos

químicos se debe exclusivamente a su entorno y cómo los residuos aromáticos se encuentran distribuidos en toda la proteína, por lo que los espectros en esta región son un reflejo de su conformación global. Asimismo las señales en esta región son extremadamente sensibles a los cambios en la conformación. Cuando una proteína se une a su ligando por lo general sufre cambios en dicha conformación, por lo que es posible monitorear la unión del ligando empleando esta técnica e incluso obtener constantes de afinidad a través de este método (Arighi, 2003; Franchini, 2009). La técnica de resonancia magnética nuclear (RMN) es otro método espectroscópico que también puede emplearse para analizar la interacción proteína-ligando (ver capítulo 7). Esta técnica resulta muy sensible, ya que permite analizar en detalle que residuos particularmente participan de la interacción e incluso permite determinar de forma eficiente la estequiometría de la unión. Esto se logra monitoreando los corrimientos químicos de los distintos residuos en ausencia y presencia del ligando (Meenan, 2011). Para ello es necesario marcar la proteína con isótopos activos en RMN (^{15}N o ^{13}C), por lo cual generalmente se puede aplicar a proteínas que puedan ser obtenidas mediante técnicas de ingeniería genética. Como comentamos anteriormente, además de las técnicas espectroscópicas pueden aplicarse otras técnicas bioquímicas que evidencien la unión del ligando a la proteína siguiendo los cambios que sufre la proteína tras la unión. Uno de estos métodos es la proteólisis parcial, es decir la utilización de proteasas que cortan a la proteína en aminoácidos específicos. Este método permite obtener información acerca de la localización del sitio de unión o de los cambios conformacionales que puede sufrir la proteína tras unirse al lípido, dado que revela la exposición diferencial de los sitios proteolíticos en ausencia o presencia del ligando (Arighi, 2003; Pórfido, 2012). Otro método bioquímico para evidenciar la unión de la proteína al ligando consiste en la utilización de agentes caotrópicos, como por ejemplo el cloruro de guanidinio. Empleando este método se puede determinar si los ligandos son capaces de estabilizar a la proteína, ya que si esto ocurre se requerirá una mayor concentración de cloruro de guanidinio para pasar del estado plegado al desplegado, es decir para que ocurra la desnaturalización de la proteína (Franchini, 2009).

B. Unión proteína-ligando monitoreando cambios en el ligando

Como ya comentamos anteriormente, otra forma de abordar el análisis de la interacción proteína-ligando es mirar el sistema siguiendo los cambios que ocurren en el ligando. Del mismo modo que en el caso anterior, se pueden usar técnicas espectroscópicas o técnicas bioquímicas para monitorear el proceso de unión. De las técnicas espectroscópicas la más comúnmente utilizada es la fluorescencia. Cabe mencionar que la mayoría de los lípidos no son naturalmente fluorescentes, salvo algunas excepciones como el ácido *cis* o *trans*-parinámico, el ácido retinoico, y algunos otros. Por este motivo, la mayoría de estos ligandos hidrofóbicos deben ser modificados químicamente para que se puedan analizar empleando fluorescencia. En este sentido, hay actualmente disponibles una amplia variedad de lípidos modificados con distintos fluoróforos. Tal es el caso de ácidos grasos y sus derivados más complejos modificados con grupos dansilo, pireno, antroilo, NBD (*4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol*) y BODIPY, por mencionar algunos de los fluoróforos más usados (Haughland, 2005). Estos lípidos marcados se pueden utilizar para obtener constantes de afinidad, ya sea mediante titulación directa, es decir agregando concentraciones crecientes de lípido fluorescente a una concentración fija de proteína; o de forma inversa, es decir manteniendo una concentración fija de ligando e incrementando la concentración de la proteína de interés. Cabe destacar que para poder seguir la unión por este método es importante que la sonda modifique su espectro de emisión luego de unirse a la proteína. La mayoría de estas sondas presentan una intensidad de emisión baja en solventes acuosos y cuando se unen a la proteína aumentan su emisión debido al entorno hidrofóbico que ésta le brinda. El grado de aumento en la intensidad variará de acuerdo al sistema en estudio y por lo general puede acompañarse de un corrimiento en el máximo de longitud de onda de emisión. En la mayoría de las sondas este corrimiento se da hacia longitudes de onda menores, lo que se conoce como corrimiento hacia el azul o *blue shift*. Este corrimiento es indicativo de que el ligando está en un entorno más hidrofóbico al unirse a la proteína. Sin embargo, no debemos perder de vista que tanto el aumento de la

intensidad como el corrimiento hacia el azul dependerán del sistema en estudio y siempre deberemos verificar el comportamiento del fluoróforo al unirse a la proteína antes de realizar la titulación propiamente dicha. Puede ocurrir que tras la unión la intensidad del fluoróforo baje en lugar de aumentar, esto no necesariamente indica que no hay unión de la proteína al ligando. Por ejemplo, utilizando antroiloxi-derivados se ha podido observar que dependiendo del tipo de ácido graso que se trate y la posición donde se encuentre la molécula de antroilo la intensidad de fluorescencia puede aumentar o disminuir al unirse a una misma proteína. Tal es el caso de una proteína de la familia de las FABPs (ver introducción en este mismo capítulo) con las sondas 12AS (*12-(9-anthroyloxy) stearic acid*) y 16AP (*16-(9-anthroyloxy) palmitic acid*) (Pórfido, 2012). A través de estos métodos podemos describir la unión de una proteína a un determinado ligando hidrofóbico modificado químicamente con un fluoróforo. Esta información puede ser útil como aproximación experimental para describir la unión de la proteína a sus ligandos, sin embargo, muchas veces nos interesa determinar a que ligandos naturales se une esta proteína y cuáles son sus afinidades por ellos. Para abordar este análisis también podemos valernos de los derivados fluorescentes de los lípidos, pero realizando ensayos de desplazamiento. Esto es, incubar la proteína con un exceso del análogo fluorescente y luego agregar concentraciones crecientes del ligando natural a evaluar y monitorear los cambios en la emisión de la sonda fluorescente. Para este análisis podemos valernos de distintas sondas fluorescentes como los que ya describimos: ácido *cis* o *trans*-parinárico, antroiloxi-derivados, NBD-derivados, dansil-derivados (siendo el *11-(dansylamino)undecanoic acid* o DAUDA y el *dansyl-D,L-alpha-amino-octanoic acid* o DACA los más comunes) o BODIPY-derivados. Otro conjunto de sondas ampliamente utilizadas para estos ensayos son los derivados del 1-anilino-8-naftaleno sulfonato (1,8-ANS; 2,6-ANS; bis-ANS), ya que tienen la característica de ser sondas muy poco fluorescentes en solvente acuoso y aumentar notoriamente su emisión de fluorescencia al unirse a una proteína (Haughland, 2005). Una vez unido, es posible desplazarlo con distintos ligandos y así determinar cuáles de éstos poseen una afinidad mayor que el ANS por el sitio de unión, e incluso

determinar y comparar las distintas constantes de afinidad de diferentes ligandos mediante este método (Arighi, 2003; Franchini, 2009). Por otro lado, una de las técnicas bioquímicas que se pueden emplear para monitorear la unión de la proteína al ligando siguiendo el ligando es mediante el uso de resinas hidrofóbicas que permiten separar el ligando unido a la proteína de la fracción no unida. Una de las resinas hidrofóbicas más utilizadas es la Lipidex1000. Esta resina se emplea habitualmente como paso para remover los ligandos de diversas proteínas de unión a lípidos y de este modo obtenerlas de forma libre de éstos ligandos. Sin embargo, se ha determinado que si en lugar de utilizarla a 37°C como se hace normalmente para este fin, se la usa a 0 °C, es posible lograr separar el ligando unido del ligando no unido (Glatz, 1983). De este modo y empleando ligandos marcados radiactivamente (con ¹⁴C, por ejemplo) se puede obtener una medida de la fracción de ligando que permanece unida a la proteína versus el ligando total y determinar así la constante de afinidad que describe el proceso de unión (Glatz, 1983; Lagakos, 2013).

Estrategias para el estudio de interacción proteína-membrana

En este apartado analizaremos técnicas empleadas para el estudio de la interacción proteína-membrana. Todas las técnicas que se abordarán incluyen el empleo de los diferentes tipos de liposomas que se han descrito en el capítulo 8. Variando la composición lipídica de los liposomas y/o la composición de los *buffers* en los cuáles se los prepara, es posible desarrollar una serie de técnicas muy variadas para estudiar la interacción de proteínas con membranas. Algunas de estas técnicas brindan información sobre contacto físico, en el estado estacionario, entre las proteínas y las membranas; mientras que otras nos permiten hacer estudios cinéticos de transferencia de ligandos entre las proteínas y las membranas. A continuación analizaremos algunas de dichas técnicas.

A. Ensayo de unión a liposomas cargados con sacarosa

Los liposomas que se utilizan para esta técnica se preparan en un *buffer* que contiene sacarosa. De este modo, dicho *buffer* queda encerrado en el espacio acuoso del interior de los liposomas, otorgándole a éstos mayor densidad cuando el *buffer* del exterior de los liposomas es cambiado por uno sin sacarosa. Para realizar dicho cambio, se puede agregar un *buffer* isosmótico respecto al que se encuentra dentro de las vesículas, pero sin sacarosa, seguido de ultracentrifugación. De este modo, se pueden sedimentar los liposomas, separarlos del sobrenadante, y volver a resuspenderlos en el *buffer* isosmótico adecuado. Otra técnica que se puede aplicar para hacer el cambio de *buffer* es la cromatografía de exclusión molecular. Una vez preparados los liposomas, se los incuban junto a la proteína en estudio en un *buffer* adecuado, y se procede a centrifugar las muestras a alta velocidad (~100000xg). Inmediatamente, se separan los sobrenadantes y se los transfieren a tubos nuevos. La presencia de LUVs debe evaluarse tanto en los sobrenadantes como en los sedimentos. Para tal fin, puede incluirse, por ejemplo, algún fosfolípido marcado radiactivamente en la preparación de los liposomas. Por otro lado, debe analizarse también la presencia de la proteína en estudio en ambos grupos de muestras. Esto se puede hacer, por ejemplo, por SDS-PAGE seguido de densitometría. Si el ensayo se realiza para diferentes concentraciones de vesículas, pueden calcularse constantes de disociación (K_D). Lo mismo puede realizarse para diferentes composiciones de vesículas, diferentes concentraciones salinas, temperaturas, etc.; lo cual puede brindar información importante sobre los parámetros que influyen sobre la interacción de las proteínas con membranas fosfolipídicas (Falomir-Lockhart, 2011; y referencias allí incluidas).

B. Ensayo de competencia con citocromo c.

Para realizar este ensayo se aprovecha la capacidad del citocromo c de unirse a vesículas cargadas negativamente. Dicha unión puede evidenciarse haciendo

uso de SUVs (ver capítulo 8) marcadas con dansilfosfatidiletanolamina (de sus siglas en inglés: *DPE*), ya que el grupo hemo del citocromo c es un *quencher* de la fluorescencia del grupo dansilo de la *DPE* (ver capítulo 2). Dado que se emplean vesículas con cardiolipina, se debe incluir EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) en los *buffers* para mantener estables los liposomas. Este ensayo se lleva a cabo incubando las vesículas con concentraciones crecientes de la proteína de interés. Luego se registra la fluorescencia del *DPE*, y se agrega una cantidad previamente determinada de citocromo c (aquella que produce el máximo *Quenching* de la fluorescencia del *DPE* en ausencia de otras proteínas). Una vez incubadas las vesículas con el agregado del citocromo c, se vuelve a medir la fluorescencia del *DPE*. Una inhibición del *Quenching* mediado por citocromo c se interpreta como evidencia de la interacción de la proteína en estudio con las membranas fosfolípídicas. Esto es, la proteína en cuestión estaría compitiendo con el citocromo c por la unión a las vesículas, lo cual se evidencia como un recobro de fluorescencia respecto a las muestras donde se incubaba el citocromo c con vesículas en ausencia de la otra proteína (Pórfido, 2012; Falomir-Lockhart, 2011; y referencias allí incluidas).

C. Ensayo de goteo de terbio

Para el ensayo de goteo de terbio se emplean SUVs cargadas con un complejo fluorescente de Tb^{+3} /DPA (ácido dipicolínico). Las mismas se preparan por sonicación de una suspensión de fosfolípidos en un *buffer* que contiene $TbCl_3$ y DPA, y luego, como en el caso de las vesículas cargadas con sacarosa, se debe cambiar el *buffer* en el cual están suspendidas las SUVs. En este caso, dicho cambio se hace por cromatografía de exclusión molecular. El *buffer* debe ser isosmótico respecto al que está encapsulado en las vesículas, para evitar la ruptura de las mismas. A su vez, debe incluir EDTA, que actúa como quelante del Tb^{+3} . La captura del Tb^{+3} por parte del EDTA causa una disminución en la intensidad de emisión de fluorescencia.

El ensayo consiste, por lo tanto, en incubar las SUVs con las proteínas en estudio y registrar la fluorescencia del complejo Tb⁺³/DPA. La interacción de la proteína con la membrana genera una perturbación en la estructura de esta última que permite que se libere el Tb⁺³ (goteo de Tb⁺³), lo cual hace que el mismo sea secuestrado por el EDTA. Tal como se dijo previamente, esto se traduce como una disminución en la fluorescencia emitida por el Tb⁺³. El mismo experimento puede realizarse con otros compuestos tales como el par ácido 8-aminonaftalen-1,3,6-trisulfónico (de sus siglas en inglés: ANTS)/bromuro de p-xilen-bis-piridinio (de sus siglas en inglés: DPX), o carboxifluoresceína. En el caso del par ANTS/DPX, el DPX resulta ser un *quencher* de la fluorescencia del ANTS. Por lo tanto, se puede encapsular el ANTS junto al DPX en las SUVs y trabajar con ellas en un *buffer* sin ninguno de los dos compuestos. De este modo, si por interacción con las proteínas se disrumen las membranas, se libera su contenido y, dado que el DPX es un *quencher* colisional, al diluirse la solución, aumenta la fluorescencia del ANTS. En el caso de la carboxifluoresceína, este compuesto fluorescente tiene la propiedad de *self-quenching*, lo que implica que cuando se encuentra en concentraciones mayores a 100 mM, su fluorescencia se ve disminuida. De este modo, si se encapsulan soluciones concentradas de este compuesto dentro de SUVs, y se elimina el mismo del *buffer* que rodea a las vesículas, se las puede usar para evaluar la interacción de proteínas con SUVs. Si la proteína disrumpe la membrana, la carboxifluoresceína se libera, se diluye en el *buffer* circundante y por ende, aumenta su fluorescencia. En cualquiera de los casos, las vesículas pueden romperse por completo con algún detergente, como Tritón X-100, para determinar el punto final de la reacción (Falomir-Lockhart, 2011; Haughland, 2005).

D. Ensayos de “crosslinking” con reactivos fotoactivables

La interacción específica proteína-membrana puede evaluarse también haciendo uso de una combinación de marcación radiactiva y *crosslinking* con

reactivos fotoactivables, los cuales requieren de la activación por luz ultravioleta para reaccionar con sus blancos. Para los estudios de interacción proteína-membrana, en particular, pueden usarse fosfolípidos que tengan en su estructura un grupo fotoactivable, y que a su vez tengan algún isótopo radiactivo (como por ejemplo ^3H), para preparar vesículas. Luego se incuban las vesículas con la proteína de interés y se fotoactivan los lípidos por irradiación con una longitud de onda adecuada. Cabe destacar que los lípidos fotoactivables también pueden usarse en células en cultivo, con la finalidad de que las mismas los metabolicen y los incorporen a lípidos de membrana antes de fotoactivar. El análisis de los datos se hace mediante SDS-PAGE seguido de autorradiografía. El mismo dependerá de la información que se quiera obtener. Si se quiere conocer, por ejemplo, qué subdominio de una proteína es el que interactúa con la membrana, una vez aislada la misma, se la puede digerir con alguna proteasa que corte en sitios específicos, para luego separar los fragmentos y analizar a cuál de ellos se halla unido el lípido marcado (Falomir-Lockhart, 2011). En el caso de trabajar con células en cultivo, la proteína de interés puede separarse por inmunoprecipitación, y mediante SDS-PAGE/autorradiografía se puede visualizar si el lípido usado interacciona o no con nuestra proteína (Thiele, 2000; Haberkant, 2008). Actualmente, existen variaciones de estas técnicas que en lugar de utilizar lípidos fotoactivables radiactivos emplean lípidos bifuncionales, es decir: lípidos que por un lado cuentan con un grupo fotoactivable, y por otro lado, poseen un grupo capaz de reaccionar de manera específica con ciertos grupos funcionales, lo cual permite marcar al lípido con, por ejemplo, biotina. De este modo, se puede detectar fácilmente al lípido fotoactivable (y a lo que haya reaccionado con él) sin tener que utilizar isótopos radiactivos. Para más detalles al respecto se puede consultar el artículo de Haberkant y van Meer (Haberkant, 2009).

E. Ensayo de transferencia de ligando hacia membranas aceptoras

Este ensayo cinético se basa en la técnica de FRET (ver capítulo 2) y ha demostrado ser útil en la caracterización de varias proteínas solubles de unión

a lípidos (Storch, 2008). Para llevarlo a cabo se requiere de algún lípido fluorescente que sea ligando de la proteína en estudio, y que a su vez actúe como donador FRET para algún fosfolípido fluorescente. Con el fosfolípido fluorescente, que actuará como aceptor FRET, se pueden preparar SUVs con diferente composición que se utilizarán para el experimento. Cabe destacar que para establecer las condiciones en las cuáles se hace el experimento, previamente se debe calcular el coeficiente de partición del ligando entre la proteína y las membranas. Brevemente, se incuba la proteína con el ligando y luego se titula fluorimétricamente la mezcla con vesículas que contienen el fosfolípido fluorescente. De este modo, si el ligando se transfiere de la proteína a las vesículas, se producirá FRET y se verá una caída en la fluorescencia del ligando. Como se puede observar, la medida del K_P (coeficiente de partición) es una medida en el equilibrio. Conocer su valor es importante para establecer las condiciones en las cuales se hará el experimento cinético de manera que haya una transferencia unidireccional desde la proteína a las membranas.

Para llevar a cabo la medida cinética de la velocidad de transferencia del ligando hacia las SUVs se hace uso de un dispositivo de mezclado rápido de tipo *stopped-flow* adosado al espectrofluorómetro. Este aparato nos permite realizar la mezcla de la proteína previamente incubada con el ligando y las vesículas de manera casi instantánea, y simultáneamente seguir la fluorescencia del ligando, la cual debe decaer en función del tiempo si el ligando es transferido a las membranas. La medida se debe hacer para distintas relaciones proteína/SUVs, para las cuáles se obtendrán distintas velocidades de transferencia. Si dicha velocidad aumenta de modo proporcional a la concentración de las vesículas, la proteína en estudio emplearía un mecanismo “colisional” para transferir sus ligandos a membrana, mientras que si la velocidad no varía con los cambios de concentración de SUVs, la proteína en cuestión emplearía un mecanismo de tipo “difusional” (Storch, 2008). Variando la composición de las SUVs (por ejemplo, incluyendo fosfolípidos con carga neta diferente) y/o del *buffer* (variando la fuerza iónica) pueden obtenerse datos adicionales sobre el mecanismo de transferencia de ligandos y la naturaleza de las interacciones que sobre él influyen.

Bibliografía

Alvite G, Esteves A. Lipid binding proteins from parasitic platyhelminthes. *Front Physiol.* 3:363, 2012.

Arighi CN, Rossi JP, Delfino JM. Temperature-induced conformational switch in intestinal fatty acid binding protein (IFABP) revealing an alternative mode for ligand binding. *Biochemistry. Biochemistry.* 42(24):7539-51, 2003.

Contreras FX, Ernst AM, Wieland F, Brügger B. Specificity of intramembrane protein-lipid interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3(6). pii: a004705, 2011.

Darszon A, Vandenberg CA, Ellisman MH, Montal M. Incorporation of membrane proteins into large single bilayer vesicles. Application to rhodopsin. *J Cell Biol.* 81(2):446-52, 1979.

De Gerónimo E, Hagan RM, Wilton DC, Córscico B. Natural ligand binding and transfer from liver fatty acid binding protein (LFABP) to membranes. *Biochim Biophys Acta.* 801(9):1082-9, 2010.

Falomir-Lockhart LJ, Franchini GR, Guerbi MX, Storch J, Córscico B. Interaction of enterocyte FABPs with phospholipid membranes: clues for specific physiological roles. *Biochim Biophys Acta* 1811(7–8):452–9, 2011.

Franchini GR, Curto LM, Caramelo JJ, Delfino JM. Dissection of a beta-barrel motif leads to a functional dimer: the case of the intestinal fatty acid binding protein. *Protein Sci.* 18(12):2592-602, 2009.

Furuhashi M, Hotamisligil GS. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat Rev Drug Discov.* 6:489-503, 2008.

Glatz JF, Veerkamp JH. A radiochemical procedure for the assay of fatty acid binding by proteins. *Anal Biochem.* 132(1):89-95, 1983.

Haberkant P, Schmitt O, Contreras FX, Thiele C, Hanada K, Sprong H, Reinhard C, Wieland FT, Brügger B. Protein–sphingolipid interactions within cellular membranes. *J Lipid Res* 49: 251–262, 2008.

Haberkant P, van Meer G. Protein–lipid interactions: Papparazzi hunting for snap-shots. *Biol Chem* 390:795–803, 2009.

Haughland, Richard P. *The Handbook. A guide to fluorescent probes and labeling technologies.* Tenth edition. Molecular Probes. Invitrogen Corp, 2005.

- Kennedy MW. The polyprotein allergens of nematodes (NPAs) - structure at last, but still mysterious. *Exp Parasitol.* 29(2):81-4, 2011.
- Lagakos WS, Guan X, Ho SY, Sawicki LR, Corsico B, Kodukula S, Murota K, Stark RE, Storch J. Liver Fatty Acid-binding Protein Binds Monoacylglycerol in Vitro and in Mouse Liver Cytosol. *J Biol Chem.* 288(27):19805-15, 2013.
- Meenan NA, Ball G, Bromek K, Uhrín D, Cooper A, Kennedy MW, Smith BO. Solution structure of a repeated unit of the ABA-1 nematode polyprotein allergen of *Ascaris* reveals a novel fold and two discrete lipid-binding sites. *PLoS Negl Trop Dis.* 5(4):e1040, 2011.
- Obal G, Ramos AL, Silva V, Lima A, Batthyany C, et al. Characterisation of the Native Lipid Moiety of *Echinococcus granulosus* Antigen B. *PLoS Negl Trop Dis* 6(5):e1642, 2012.
- Pórfido JL, Alvite G, Silva V, Kennedy MW, Esteves A, Córscico B. Direct interaction between EgFABP1, a fatty acid binding protein from *Echinococcus granulosus*, and phospholipid membranes. *PLoS Negl Trop Dis.* 6(11):e1893, 2012.
- Punta M, Forrest LR, Bigelow H, Kernytsky A, Liu J, Rost B. Membrane protein prediction methods. *Methods.* 41(4):460-74, 2007.
- Rigaud JL, Lévy D. Reconstitution of membrane proteins into liposomes. *Methods Enzymol.* 372:65-86, 2003.
- Rigaud JL, Bluzat A, Buschlen S. Incorporation of bacteriorhodopsin into large unilamellar liposomes by reverse phase evaporation. *Biochem Biophys Res Commun.* 111(2):373-82, 1983.
- Schaap FG, van der Vusse GJ, Glatz JF. Evolution of the family of intracellular lipid binding proteins in vertebrates. *Mol Cell Biochem.* 239(1-2):69-77, 2002.
- Smith SM. Strategies for the purification of membrane proteins. *Methods Mol Biol.* 681:485-96, 2011
- Storch J, Córscico B. The emerging functions and mechanisms of the mammalian fatty acid-binding proteins. *Ann Rev Nutrition* 28:73–95, 2008.
- Thiele C, Hannah MJ, Fahrenholz F, Huttner WB. Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. *Nat Cell Biol* 2: 42–49, 2000.
- Vance D. E, Vance J. E. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes.* 5th Ed. Elsevier B.V, 2008.

CAPÍTULO 10

TÉCNICAS BIOFÍSICAS PARA EL ESTUDIO DE LÍPIDOS Y MEMBRANAS

Carolina Bagnato

10.1. Partición de Fases y Solubilidad de Lípidos

Los lípidos son un grupo diverso de moléculas que cumplen variadas funciones celulares que van desde formar parte de las membranas celulares, constituir una de las principales formas de reserva energética hasta intervenir en complejos sistemas de señalización celular. Desde el punto de vista químico se los define como un grupo heterogéneo de moléculas que se caracterizan por ser solubles en solventes orgánicos y por presentar una baja solubilidad en agua. Una descripción sobre los criterios y la clasificación de los lípidos comúnmente utilizada se puede consultar en el capítulo 8 del presente libro. La función y estructura química de los distintos tipos de lípidos pueden consultarse en los libros de texto de bioquímica (Lehninger, 2013).

Los lípidos, al igual que otras sustancias, experimentan fenómenos de partición al ser expuestos a mezclas de líquidos inmiscibles por los que presentan diferente afinidad. El concepto de partición implica la disolución y distribución de un compuesto de manera selectiva entre las dos fases de un sistema de solventes. Esta idea puede graficarse por la *ley de Distribución* o *ley de Partición* que establece que: Si a un sistema heterogéneo de dos fases líquidas se le agrega un tercer componente soluble en ambas fases este se distribuirá, en cada una de ellas, de forma tal que el cociente resultante de dividir las concentraciones en cada fase será una constante que solo dependerá de la temperatura. La distribución de un compuesto entre las fases responde a las diferencias de solubilidad que un compuesto presenta en cada una de dichas fases lo que refleja el grado de similitud en la estructura química del compuesto con una u otra fase.

Solubilidad de los lípidos

En su conjunto los lípidos se definen como un grupo heterogéneo cuya característica común es su baja o poca afinidad por el agua y por presentar una gran afinidad y solubilidad en solventes orgánicos tales como hidrocarburos, cloroformo, benceno y alcoholes. Como se explica en el capítulo 8, los lípidos forman un grupo de sustancias químicamente diversas pero con una propiedad física común que es la de ser poco o nada solubles en agua, son hidrofóbicos. Los lípidos, en general, puedan ser disueltos por solventes químicamente similares y con propiedades de momento dipolar parecidas a la de los lípidos. Pese a esta generalización, cabe destacar que hay diferencias remarcables en los distintos tipos de lípidos que determinan variabilidad en el comportamiento de los mismos en un solvente o una mezcla de solventes dada. Por ejemplo, muchos lípidos tales como ácidos grasos y fosfolípidos son anfipáticos característica que aumenta el momento dipolar del lípido lo cual hace que mejore su solubilidad, en agua. En tanto que, por ejemplo, esto no sucede con los lípidos neutros tales como los triacilglicéridos. La heterogeneidad en estructura química de los lípidos determina que no se pueda generalizar sobre las propiedades de solubilidad de los mismos. Sin embargo, gran parte de las propiedades físico-químicas de las distintas clases de lípidos, simples y complejos, responden a la de los ácidos grasos que son uno de sus principales componentes. Los ácidos grasos, ácidos carboxílicos de cadena larga, son moléculas anfipáticas formadas por una región polar, el grupo ácido que a pH neutro se encuentra dissociado con una carga negativa, y una cadena carbonada, de longitud variable que constituye la región apolar. A su vez, la cadena carbonada puede ser saturada o insaturada. La región de la cabeza con el grupo funcional carboxilo determina la afinidad del ácido graso por solventes polares y la cadena carbonada contrarresta este efecto disminuyendo la solubilidad en agua o solventes polares. La longitud de cadena y la presencia y número de dobles enlaces afectan la solubilidad de los ácidos grasos: a

mayor longitud de cadena disminuye la solubilidad en agua y solventes orgánicos polares, en tanto que la presencia de dobles enlaces la aumenta. Las propiedades de solubilidad de la cadena carbonada de un ácido graso son extensivas a los lípidos que estos constituyen. Sin embargo, cabe destacar que pueden existir en los lípidos otros grupos que se encuentren contribuyendo a las propiedades de solubilidad de los mismos. Este resulta ser el caso en los lípidos polares. Al igual que sucede con los ácidos grasos, los fosfolípidos también son moléculas anfipáticas y presentan, dependiendo del grupo de cabeza polar y tipo de ácidos grasos presentes, distinto grado de solubilidad en solventes orgánicos polares e incluso en mezclas con cierto porcentaje de agua. Por su parte los triacilglicéridos son lípidos neutros, insolubles en agua, que muestran buena solubilidad en solventes como cloroformo o hexano así como alcoholes. Sin embargo, al igual que el resto de lípidos que hemos mencionado la solubilidad variará con la composición de ácidos grasos.

10.2. Extracción de Lípidos Totales

El análisis de los lípidos que se encuentran formando parte de los sistemas biológicos implica la separación de los distintos lípidos, clases y especies, la identificación de los mismos y su cuantificación. Para esto resulta fundamental extraer los lípidos de las matrices complejas en las que se encuentran. El paso previo al análisis, la extracción, es imprescindible para la caracterización de los lípidos de un sistema determinado o de cierta condición fisiológica y/o patológica. Si esta no se realiza de manera adecuada se genera la degradación, pérdida y/o formación de artefactos en los extractos. En este sentido, es importante en cada paso del proceso de extracción tomar precauciones de modo de evitar la hidrólisis de los lípidos así como la autooxidación de los ácidos grasos insaturados.

Existen distintos sistemas desarrollados para la extracción de lípidos totales; la elección de uno u otro dependerá de las características de la matriz de donde los lípidos deben ser extraídos, que varía dependiendo de si se trata de tejido

animal, vegetal o de algún tipo particular de microorganismo. Otro factor que será determinante para decidir qué sistema de extracción se utilizará es la información que se pretende obtener de la muestra. Si lo que se quiere es analizar un tipo particular de lípido en el cual el tejido en cuestión se encuentra enriquecido, el método de extracción será orientado a esa clase de lípido y no se necesitará de una extracción exhaustiva. En tanto que si lo que se pretende es obtener un análisis detallado de las clases y especies de lípidos en la muestra se requerirá, muy probablemente, de la combinación de métodos lo que complejizará el proceso de extracción. En la siguiente sección se presentan los conceptos relacionados a la extracción de lípidos y se detallan las principales técnicas utilizadas en la actualidad.

Almacenamiento y preservación de la muestra previo a la extracción de lípidos

Como regla general, para evitar cambios en la composición original del contenido de lípidos en células y tejidos, se sugiere que la muestra se procese de manera inmediata para la extracción de lípidos. Esta precaución resulta crítica en aquellos tejidos donde se registra una alta actividad de enzimas lipolíticas. En caso de que la extracción no se realice de inmediato, el material a extraer debe ser congelado rápidamente y guardado a -20°C en atmósfera de nitrógeno, sin embargo no se recomienda un almacenamiento prolongado. El riesgo en el almacenamiento surge debido a que, durante el proceso de congelamiento, las estructuras celulares se alteran y liberan enzimas que originalmente no se hallan en contacto con los lípidos y, una vez liberadas, pueden actuar degradando y modificándolos. La presencia abundante de intermediarios tales como, ácidos grasos libres, monoacilglicéridos, diacilglicéridos y ácido fosfatídico son un claro indicio de degradación lipídica. Las oxidaciones también contribuyen a la pérdida de lípidos en general debido a que cuando se oxidan pueden fijarse a proteínas de membrana, lo que los mantiene unidos a estructuras celulares no extraíbles (Christie, 1982).

Extracción por solventes

Cuando pensamos en la extracción de lípidos a partir de una matriz compleja hay dos aspectos fundamentales a tener en cuenta: 1) la extracción debe ser lo más exhaustiva posible, y 2) se debe realizar de modo tal de evitar la co-extracción de compuestos no lipídicos. Esto significa que el procedimiento que se utilice debe mantener un compromiso entre una extracción máxima y la no co-extracción de contaminantes. En caso de que lo último no sea posible y exista una co-extracción significativa, se deben considerar pasos de lavado y/o remoción de los compuestos contaminantes (Christie, 1982). La extracción implica la separación selectiva de un compuesto determinado del resto de componentes del entorno. Esto se logra mediante la separación del compuesto del seno de la mezcla por acción de un solvente que lo disuelve selectivamente. Cuando el compuesto a extraer se halla en contacto con dos fases líquidas, se establece un equilibrio de distribución del mismo entre dichas fases. La distribución del compuesto entre una u otra fase depende de sus propiedades de partición y solubilidad entre dos fases líquidas y la eventual adsorción a la matriz en que se encuentra (Halim, 2012). En función de su estructura química los lípidos muestran diferencias de solubilidad en distintos solventes. Un solvente será capaz de extraer los lípidos de un tejido o una matriz compleja si logra sobrepasar las interacciones y fuerzas moleculares que mantiene unidos los lípidos al resto de componentes y estructuras celulares. Por este motivo no resulta trivial predecir el comportamiento de un determinado solvente para la extracción de lípidos. Debido a que constituyen un conjunto de compuestos heterogéneo, la capacidad de extracción por un solvente dado también dependerá del tipo de lípido que se intente extraer. De manera general podemos decir que los lípidos simples suelen formar grandes agregados donde se concentran formando fuertes asociaciones entre sí, tal es el caso de las gotas de lípidos en tejidos de reserva. En contraposición, los lípidos complejos se encuentran formando parte de las membranas celulares donde interactúan íntimamente con otras macromoléculas tales como proteínas y polisacáridos. Estas asociaciones están gobernadas por interacciones débiles

del tipo fuerzas de van der Waals, puentes de hidrógeno e interacciones iónicas. Otro factor que puede afectar la eficiencia de extracción de lípidos son los eventuales impedimentos físico-mecánicos, tal como sucede en los tejidos u organismos unicelulares que poseen pared celular: tejidos vegetales, bacterias y hongos. Estructuras como la pared celular representan una barrera para el ingreso de solventes orgánicos al interior de la célula, interfiriendo en la interacción del solvente con los lípidos a extraer. Esto también resulta un problema en tejidos animales donde la matriz extracelular puede llegar a ser muy densa y compleja. Estas estructuras representan superficies de interacción y eventual adsorción para los lípidos, lo que afecta el proceso de extracción. Es por todo esto que, en muchos casos, resulta necesario el pre-tratamiento del tejido para su extracción.

Para poder extraer los lípidos de un tejido, el solvente debe tener cierto carácter polar pero no tanto como para reaccionar con los lípidos o excluir a los lípidos neutros en el proceso de extracción. Como se mencionó anteriormente, el solvente no debe sólo poder solubilizar a los lípidos a extraer sino que debe ser capaz de vencer las interacciones moleculares entre los lípidos y las otras moléculas en el interior celular. Considerando esto, un solvente debería tener, idealmente, cierto carácter polar y apolar al mismo tiempo. En la realidad los mejores sistemas de extracción son los que surgen de la combinación de dos o más solventes. Numerosas combinaciones de alcoholes (etanol, metanol, isopropanol, butanol, etc.) con otros solventes orgánicos (cloroformo, hexano, diclorometano, dietileter, etc.) han sido probadas en distintas proporciones para la extracción de lípidos mostrando buenos resultados en distintos tejidos. La mezcla cloroformo: metanol (2:1 v/v), ha sido evaluada exhaustivamente y representa en la actualidad la técnica de referencia. Este sistema es conocido como método de extracción de Folch (Folch, 1957). Una variante de este es el método de Bligh y Dyer (B&D), es el segundo más usado en la extracción de lípidos y, desde su introducción a fines de la década del 50, se ha utilizado intensamente en la extracción de lípidos de distintos tejidos y tipos celulares (Bligh, 1959).

El método de Folch consiste en la extracción de lípidos del tejido utilizando una mezcla de solventes de composición cloroformo: metanol: solución acuosa (8:4:3 v/v/v). De manera similar el método de B&D consiste en la extracción de lípidos del tejido utilizando una mezcla de solventes de composición cloroformo: metanol: agua (1:2:0,8 v/v/v). En ambos casos, el procedimiento implica la homogeneización del tejido con la mezcla de solventes de modo tal de promover la disolución y extracción de los lípidos de la matriz. Luego de un período de incubación, que dependerá del tejido o muestra de partida, se deja estabilizar la mezcla para obtener la formación de las fases orgánica y acuosa. La fase acuosa se retira en tanto que la orgánica se recupera y en esta los lípidos disueltos. El método de B&D surgió como una alternativa económica para la extracción de fosfolípidos de tejidos con bajo contenido lipídico y alto contenido de agua. Si bien la técnica se desarrolló para la extracción de tejido muscular de pescado, se ha demostrado que puede utilizarse en cualquier tejido con un alto contenido de agua (alrededor del 80%).

Se han realizado trabajos con el objetivo de comparar ambos métodos que han arrojado resultados interesantes. Es de destacar que, en muestras con un contenido menor al 2% de lípidos, ambos métodos funcionan con eficiencias muy similares. Sin embargo, a medida que el porcentaje de lípidos aumenta, por encima del 3% se comienza a observar una mayor eficiencia de extracción por el método de Folch (Iverson, 2001). La Figura 10.1 muestra un esquema comparando ambos métodos.

Debido a la naturaleza diversa de los tejidos y/o material a extraer, así como la co-existencia de distintos tipos de lípidos, resulta difícil encontrar un sistema de solventes que extraiga de manera eficiente los lípidos polares y los neutros. Esto se debe, en gran medida, a que la eficiencia de extracción depende de la polaridad del solvente y de los lípidos. Por ejemplo los lípidos polares, tales como fosfolípidos o glicolípidos, son más solubles en solventes polares como alcoholes y tienden a ser menos solubles en solventes no polares tales como el hexano. Sucede lo inverso con los lípidos neutros, resultan más solubles en solventes apolares que en los polares. En este sentido, los sistemas de solventes a base de cloroformo y metanol han mostrado buenos resultados. Sin

embargo, es importante resaltar que existe una búsqueda en el desarrollo de sistemas de solventes alternativos que se ajusten a necesidades específicas en la extracción de distintos tipos de lípidos y que utilicen solventes menos tóxicos que la mezcla cloroformo: metanol. Este es el caso de los trabajos en los que se utiliza isopropanol: hexano en proporciones 2:3 (Halim, 2011). Para procesos industriales que requieren de grandes cantidades de solvente de extracción, la búsqueda de sistemas alternativos se torna particularmente relevante.

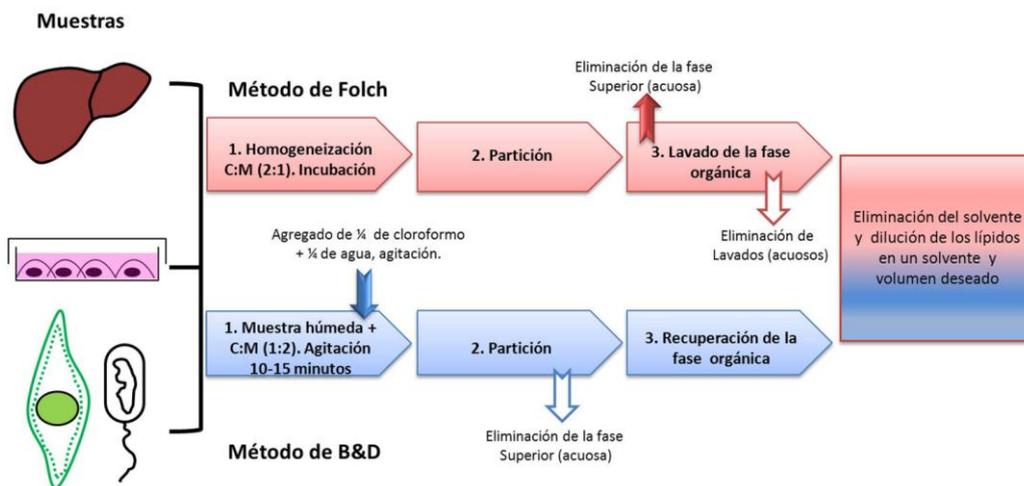


Figura 10 .1. Extracción por solventes. C:M cloroformo: metanol, B&D: Bligh y Dyer.

Independientemente del método que se utilice, hay una serie de consideraciones generales a tener en cuenta respecto del procedimiento. Una vez recuperada la fase orgánica que contiene los lípidos, el solvente debe ser eliminado por evaporación al vacío. Una vez evaporado el solvente, el extracto no debe guardarse seco; se debe resuspender en solvente orgánico, comúnmente hexano, en atmósfera de argón o nitrógeno libre de oxígeno, a una temperatura igual o inferior a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Extracción por fluidos supercríticos

Una variante de la técnica de extracción por solventes es la que utiliza fluidos supercríticos conocida como SFE del inglés *Supercritical Fluid Extraction*. La

extracción de compuestos hidrofóbicos por fluidos supercríticos es una técnica emergente que podría reemplazar, en algunos casos, a la extracción por solventes convencional. Esta técnica utiliza solventes en su estado supercrítico. Cuando la temperatura y la presión de un fluido se llevan a valores superiores al punto crítico, T_c y P_c respectivamente, el compuesto entra en estado supercrítico y adquiere un comportamiento particular con características del estado líquido y gaseoso (King, 1998). Uno de los solventes más utilizado en la actualidad en este procedimiento es el dióxido de carbono debido a que es relativamente inerte, inocuo, fácil de conseguir y a que se puede trabajar a baja temperatura, resultando ideal para la extracción de compuestos termosensibles. Las propiedades de fluido supercrítico se logran trabajando a 72,9 atmósferas y 31,1 °C de temperatura o por encima de estos valores donde queda definida una región supercrítica. La Figura 10.2.A muestra un esquema del equipo utilizado en este tipo de extracción. El material a extraer se coloca en el vaso de extracción, este posee un dispositivo para calentar y se conecta a una bomba que entrega el CO_2 a una presión mayor que P_c . Luego el vaso extractor se calienta por encima de la T_c del CO_2 , alcanzando las condiciones del estado supercrítico. El CO_2 en estado supercrítico ($\text{CO}_2\text{-SC}$) viaja sobre la superficie de la muestra solubilizando los lípidos. En este procesos se logra la disolución de los lípidos en el CO_2 supercrítico debido a que este forma un complejo [$\text{CO}_2\text{-SC}/\text{lípidos}$]. El complejo se desplaza hacía un vaso colector que se encuentra en condiciones ambiente de presión y temperatura. A partir de este punto se recupera el solvente en estado gaseoso y los lípidos extraídos en un precipitado libre de solvente. Al igual que en la extracción por solventes convencional, esta técnica también puede utilizar la mezcla de solventes para mejorar y/o maximizar la extracción de lípidos o, mejor aún, para acoplar reacciones como la de derivatización de ácidos grasos para su posterior análisis. En este sentido, se han desarrollado protocolos en los que al CO_2 se agregan alcoholes, tales como metanol o etanol (McDaniel, 1999). Esto resulta en una mejor extracción de lípidos polares y, en algunos casos, se utiliza para acoplar al proceso de extracción el de derivación de los ácidos grasos concretamente la formación de metil-ésteres. Este método posee una serie de

ventajas para la extracción de lípidos: 1) La técnica posibilita una transferencia de masa de los lípidos favorable debido a que presenta una mayor penetración de la muestra, que los solventes en su estado normal, aumentando el rendimiento en menos tiempo. Una mayor extracción también se ve favorecida por un mejor coeficiente de difusión del soluto en el fluido supercrítico en comparación con el de un solvente convencional. 2) Una vez alcanzada la zona crítica para el solvente, la temperatura y la presión se pueden variar de modo tal de aumentar el poder de solvatación, que es función de la densidad del solvente. 3) El modo de eliminación del solvente resulta sencillo debido a que,

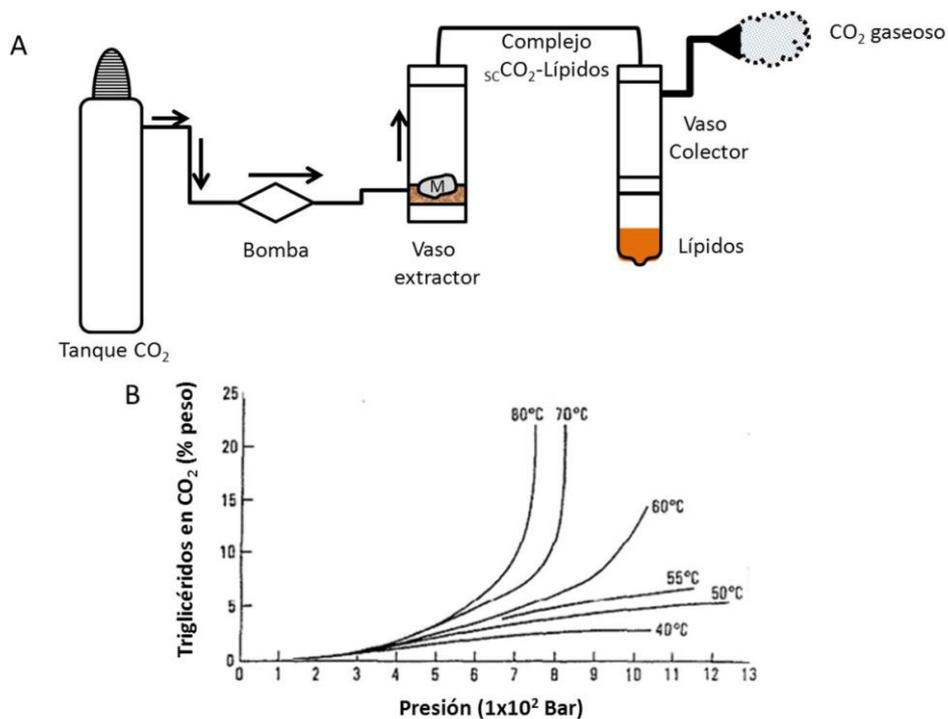


Figura 10.2. Extracción por Fluidos Supercríticos en dióxido de carbono. A. Esquema del equipo utilizado en la extracción por fluidos supercríticos. M: muestra. B. Solubilidad de triacilglicéridos de porotos de soja como función de la presión y temperatura (Reproducido y adaptado de *Journal Of AOAC International* Vol. 81 pp. 9-17, 1998 y con permiso de Jerry W. King).

una vez terminado el proceso de extracción, la muestra se lleva a condiciones tales de presión y temperatura que permiten recuperar el solvente en fase gaseosa y el extracto crudo de lípidos puros. La extracción por fluidos supercrítico se ha utilizado con buenos resultados en la extracción de distintos tipos de lípidos y, en la actualidad, la técnica se ha optimizado de modo tal de

mejorar los rendimientos. El gráfico de la Figura 10.2.B muestra los resultados obtenidos para la extracción de triacilglicéridos de porotos de soja en diferentes condiciones de presión y temperatura (King, 2002). En este se puede ver claramente cómo la modificación de los parámetros en la región supercrítica del CO₂ puede mejorar la eficiencia de la extracción.

Extracción en fase sólida

El término extracción en fase sólida alude al aislamiento de compuestos, en este caso lípidos, mediante la adsorción o partición del soluto entre una fase sólida y una líquida. Estas fases corresponden a la fase estacionaria y la fase móvil, respectivamente. La separación de los componentes de la muestra dependerá de las características de la fase estacionaria. Un sistema de extracción en fase sólida consiste típicamente en una columna formada por la fase estacionaria que, generalmente, adsorbe los compuestos de interés presentes en la mezcla, en tanto el resto de componentes pasan a través de la columna arrastrados por la fase móvil. Luego los componentes retenidos en la columna son liberados mediante una serie de lavados con solventes que compiten con la fase estacionaria solubilizando los lípidos. Este sistema puede operar de manera inversa, es decir, adsorbiendo los contaminantes no lipídicos. En este caso los lípidos se recuperan con el pasaje de la fase móvil a través de columna. En el caso de la extracción de lípidos, los sistemas suelen estar formados por una fase estacionaria, constituida por un soporte conocido como ODS del inglés *Octadecilsylane* o C18, sobre la cual se hacen pasar distintos solventes correspondientes a la fase móvil. La columna de ODS representa un material apolar, hidrofóbico, por lo que resulta útil para la separación y aislamiento de lípidos. Las porciones alifáticas de los lípidos interactúan con las colas no polares del material C18 mediante interacciones hidrofóbicas, fuerzas de dispersión y/o de Van der Waals. De esta manera los lípidos, presentes en medio acuoso, quedan retenidos en la fase estacionaria. Los compuestos más polares y, entre ellos, los contaminantes no lipídicos

atraviesan la columna acompañando la fase móvil que suele ser un solvente polar, algún alcohol, acetonitrilo, tetrahidrofurano, o una mezcla de estos solventes con agua (Christie, 1992). La técnica de extracción en fase sólida encuentra distintas aplicaciones en la bioquímica de lípidos. La Figura 10.3 esquematiza los principales pasos y materiales utilizados en la técnica con columnas de ODS. Esta técnica puede emplearse con distintos objetivos: 1) Para la extracción de lípidos totales de matrices complejas tales como distintos tipos de tejidos. En este caso un extracto crudo proveniente del tratamiento de la muestra con solventes, por ejemplo cloroformo: metanol, se aplica sobre el reservorio de la columna de ODS. La muestra se eluye con una mezcla de metanol: agua y se recuperan los lípidos. La elución con distintas mezclas y proporciones de solventes puede permitir, además de la extracción, la separación de las distintas clases de lípidos presentes en la muestra. 2) Se utiliza en la separación y/o pre-fraccionamiento de mezclas complejas de lípidos con fines preparativos. La técnica se emplea en la separación y preparación de lípidos con diferentes propiedades de polaridad. Entonces un extracto proveniente de la extracción con solventes, por ejemplo por el método de Folch, puede ser separado de modo tal de obtener distintas fracciones conteniendo los lípidos neutros, los fosfolípidos ácidos, el colesterol, y así sucesivamente. Una vez que se obtienen las fracciones estas pueden ser separadas y analizadas por otras técnicas cromatográficas. 3) Finalmente, la técnica se ha aplicado con éxito para la extracción de mezclas complejas de determinados tipos de lípidos con características polares, como en el caso de glicolípidos, leucotrienos, prostaglandinas y eicosanoides. Un ejemplo del último caso resulta ser la extracción de lípidos complejos polares, tales como los gangliósidos (Marcia, 1980), que suelen quedar en la fracción acuosa durante la extracción en procedimientos del tipo Folch. En estos casos se utiliza la extracción en fase sólida para extraer los lípidos que quedaron solubilizados en la fase acuosa. Se toma la fracción acuosa de la extracción por Folch y se la hace pasar por una columna de ODS, los glucolípidos quedan retenidos en la columna y son eluidos mediante el pasaje de una mezcla cloroformo: metanol.

Las precauciones mencionadas para el almacenamiento de muestras y tejidos previas a la extracción también aplican al guardado y preservación de los extractos. Una vez extraídos los lípidos se encuentran expuestos a la autooxidación y consecuente pérdida de ácidos grasos insaturados. Para evitar estos inconvenientes se recomienda guardar los extractos en contenedores de vidrio, en solventes apolares, a la temperatura de -20 °C o inferior, en una atmósfera libre de oxígeno, y preferentemente en presencia de compuestos antioxidantes.

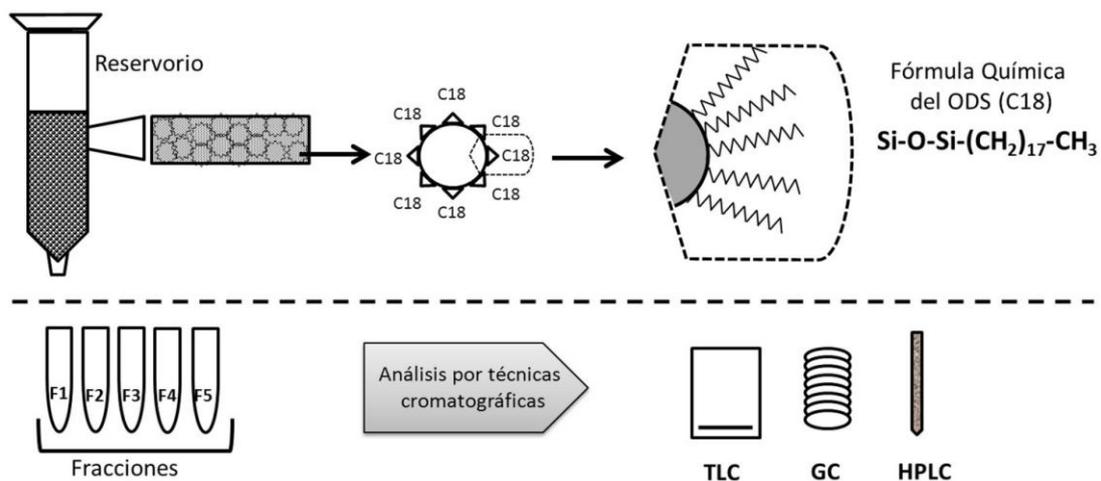


Figura 10.3. Extracción de lípidos en Fase Sólida. ODS: Octadesylsilane; TLC: Cromatografía en capa fina; GC: Cromatografía gaseosa; HPLC: Cromatografía líquida de alta performance.

10.3. Separación y Análisis de Lípidos

Una vez que se ha obtenido el extracto de lípidos del sistema a estudiar, el próximo paso consiste en realizar un análisis de los distintos componentes de la muestra. Esto comprende la separación del extracto en fracciones menos complejas a fin de facilitar su análisis. Las técnicas de cromatografía, con sus distintas variantes, son las de elección al momento de fraccionar y analizar muestras de lípidos. De manera general las podemos clasificar en *cromatografías de partición*, donde se incluyen la cromatografía líquido-líquido y cromatografía gas-líquido, y en *cromatografía de adsorción*, donde

encontramos la cromatografía en capa fina (*Thin Layer Chromatography, TLC*), cromatografía líquida en columna (*Liquid Chromatography, LC*) y una de sus variantes más importantes, la cromatografía líquida de alta performance (*High Performance Liquid Chromatography, HPLC*). En el siguiente apartado se presenta una descripción de los aspectos más importantes de las técnicas y su utilización en el análisis de lípidos.

Cromatografía gas-líquido

La técnica de cromatografía gas líquido representa una cromatografía de partición en la cual moléculas volatilizadas, en fase gaseosa, se distribuyen y/o particionan entre una fase líquida y otra gaseosa. Los solutos son inyectados en una columna formada por un soporte sólido embebido en un líquido, la fase estacionaria, y son arrastrados a lo largo de la misma por un gas transportador que constituye la fase móvil. En esta cromatografía, las sustancias se separan según sus coeficientes de partición que dependerán de su volatilidad y solubilidad en la fase estacionaria. Esto determina que los solutos pasen distintos tiempos en la fase móvil y en la fase estacionaria en relación a su afinidad por esta última. Finalmente los solutos emergen de la columna y son detectados. Esto permite monitorear y caracterizar la separación de los componentes y eventualmente cuantificarlos (James, 1952; Christie, 1989).

Un cromatógrafo gas líquido consiste en un inyector donde se siembra la muestra, una columna formada por un tubo de vidrio o metálico rellena con un soporte sólido sobre el cual se forma una película de líquido, y un detector que registra los compuestos a medida que van emergiendo de la columna. La figura 10.4.A muestra un esquema de un cromatógrafo gaseoso donde se distinguen las partes mencionadas y cómo se relacionan una con otra. La columna representa la parte central del equipo y es donde se produce la separación de los lípidos. Debido a su estructura, permite la partición de los componentes de la muestra entre las fases estacionaria y móvil. Este proceso de separación es muy eficiente debido a la formación de una fina película de líquido en torno a

las pequeñas partículas de la columna, lo que genera una gran superficie sobre la cual pasa el gas con las sustancias a separar. A medida que la muestra avanza sobre la columna, las moléculas del compuesto particionan entre ambas fases de acuerdo a su coeficiente de distribución o constante K_D . Esta es una constante de equilibrio que resulta específica para cada compuesto a una temperatura determinada. En el caso de que una mezcla de compuestos se introduzca en el cromatógrafo, los distintos componentes de la mezcla difunden en el líquido según sus coeficientes de partición (K_D) lo que determina que se desplacen por la columna dejándola a diferentes tiempos, lo que se conoce como Tiempo de Retención (T_R). El tiempo de retención representa el tiempo transcurrido medido entre que la muestra entró a la columna, que se registra como un pico característico correspondiente al solvente de la muestra, y el registro de la salida de la columna de un componente dado. La Figura 10.4B muestra un esquema de un cromatograma indicando estos elementos. La diferencia en los tiempos de retención de los distintos compuestos permite su separación. El tiempo de retención resulta ser constante si se mantienen las condiciones en las cuales se lleva a cabo la cromatografía: temperatura, tipo y longitud de columna, gas transportador, etc. y, como depende de la constante de partición, es característico para cada sustancia.

La cromatografía gaseosa se utiliza en el análisis de compuestos susceptibles de ser volatilizados sin sufrir fenómenos de descomposición. Esta técnica se ha aplicado ampliamente al análisis cualitativo y cuantitativo de lípidos y en particular al de ácidos grasos (Gutnikov, 1995). Lo interesante es que, en combinación con otras técnicas de separación y fraccionamiento, tales como la extracción en fase sólida o la cromatografía en capa fina, permite analizar la composición de lípidos formados por la esterificación de alcoholes y ácidos grasos.

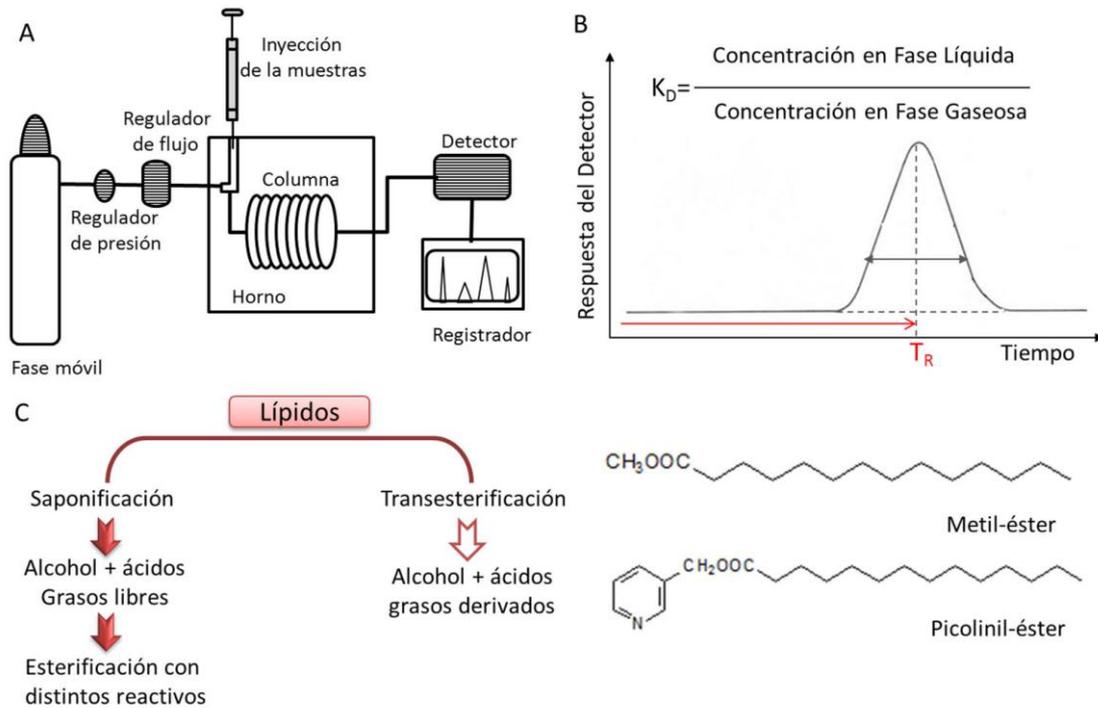


Figura 10.4. Cromatografía Gas Líquido. A. Esquema del cromatógrafo. B. Cromatograma. T_R : tiempo de retención K_D : Coeficiente de Partición. C. Diagrama que indica las posibilidades en la derivación de lípidos y estructura química de dos de los derivados comúnmente utilizados en el análisis por CG de lípidos.

La mayoría de los lípidos son moléculas polares y/o de alto peso molecular lo que no permite el análisis directo por cromatografía gaseosa. Es por eso que las muestras deben ser preparadas y modificadas para su posterior análisis en el cromatógrafo. Las modificaciones consisten en transformar los lípidos en sustancias aptas para la volatilización y en la eliminación de cargas, transformándolos en compuestos de menor peso molecular y apolares. Partiendo de una muestra correspondiente a un extracto de lípidos totales hay distintas opciones para la preparación y derivación de los ácidos grasos de la muestra para su análisis por cromatografía gaseosa. El diagrama de la Figura 10.4C muestra un esquema con las opciones de los procedimientos comúnmente utilizados. El primer paso en el análisis de lípidos formados por ésteres de ácidos grasos consiste en la liberación de los mismos para su derivación. Esto se logra mediante la reacción de hidrólisis del éster en medio básico o reacción de saponificación. Esta reacción libera los ácidos grasos que en medio básico quedan como las sales del ácido. En el paso siguiente de

derivación lo que se hace es eliminar la carga y polaridad del ácido graso. Existen distintas reacciones de derivación, una de las más ampliamente utilizadas es la de formación de ésteres del metanol. Mediante este procedimiento se obtienen los metilésteres de los distintos ácidos grasos presentes en los lípidos de la muestra. Alternativamente, se puede realizar un protocolo de transesterificación entre el lípido y un alcohol de cadena corta obteniendo directamente los ésteres para el análisis (Christie, 1989; Brondz, 2002)

La cromatografía gaseosa permite la separación de una muestra de derivados de ácidos grasos en función de su volatilidad y solubilidad en la fase estacionaria. Los compuestos son detectados a medida que abandonan la columna a distintos tiempos. En este sentido es fundamental conocer las características de la misma ya que, en combinación con la naturaleza de la fase móvil y las condiciones de temperatura, determina la eficiente separación de los ácidos grasos. Existe una gran variedad de columnas que difieren en la forma en cómo se dispone la fase estacionaria y en la composición de la misma que comprende el soporte sólido y el líquido que lo recubre. Las primeras eran empaquetadas, sólidas, pero actualmente tienen un mayor uso las columnas huecas o denominadas columnas abiertas tubulares. Las columnas abiertas representan una parte importante del proceso de optimización de la técnica de cromatografía gaseosa y han ganado popularidad debido a que permiten una mejor separación de la muestra. En cuanto al líquido que embebe al soporte sólido se distinguen, en líneas generales, fases líquidas del tipo i) altamente polares ii) medianamente polares iii) y de baja polaridad. Las columnas utilizadas suelen tener dimensiones de entre 25-30 m de longitud y 0,25 mm de diámetro. La fase móvil consiste en un gas conocido como gas transportador. La naturaleza y velocidad del gas a utilizar también resultan importantes variables a considerar. El gas debe ser inerte y presentar una velocidad lineal adecuada ya que esto influye en la forma y curva de elución de los compuestos. El hidrógeno es uno de los gases más apropiados debido a que posee una alta capacidad de difusión. En general se usa una combinación de hidrógeno y helio, ambos con un comportamiento similar. Debido a que la

temperatura tiene un marcado efecto en el comportamiento tanto de la fase móvil como del soluto, una vez determinada la temperatura óptima para el sistema con que se trabaja se realizan corridas isotérmicas. Sin embargo, también se utilizan corridas con incrementos programados de temperatura para promover una mejor separación de ciertos ácidos grasos. Los componentes de la muestra que van abandonando la columna son detectados y medidos. Existe una gran variedad de detectores que pueden ser acoplados al cromatógrafo de gases. Los que se utilizan con mayor asiduidad en el análisis de lípidos son el FID, sigla que proviene del inglés *Flame Ionization Detector*, y el espectrómetro de masa. Los resultados del análisis se obtienen en un cromatograma.

La naturaleza de la fase estacionaria, dada por el líquido en que se haya embebido el soporte sólido, es determinante en el tipo de separación a obtener. Fases líquidas poco o nada polares, permiten la separación de los ésteres de ácidos grasos esencialmente en base a su peso molecular. Variando la composición porcentual de la fase líquida, llevándola a valores bajos de entre 1-3%, se logra la separación de los ácidos grasos insaturados para un mismo número de átomos de carbono. Este tipo de separación también se obtiene con fases líquidas hidrocarbonadas de alto peso molecular que logran separar los ésteres en base a su peso molecular y resolver ácidos grasos insaturados de igual longitud de cadena. Lo que se observa es que los ácidos grasos insaturados eluyen antes que los saturados de igual longitud. Esto se debe a que la presencia del doble enlace aumenta la polaridad del ácido graso, lo cual lo hace menos afín por la fase estacionaria. La menor afinidad se traduce en una elución más temprana. Esto genera un patrón de picos en el cual se ve un *cluster* en torno al ácido graso saturado, no habiendo superposición entre los ésteres insaturados de ácidos grasos de diferente longitud de cadena. El problema de estas fases estacionarias reside en que, como la separación es por peso molecular, puede suceder que la resolución de ácidos grasos insaturados no sea completa. Por el contrario, las fases líquidas polares son especialmente útiles para la separación de estos lípidos ya que permiten una buena resolución entre ácidos grasos de una misma longitud de cadena con diferentes grados de insaturación. En este tipo de columnas los ácidos grasos

se separan en base al número de átomos de carbono y los ésteres de ácidos insaturados eluyen más tarde que sus contrapartes saturadas (Christie, 1982). La identificación de los ácidos grasos se realiza mediante la comparación de sus tiempos de retención con el de ácidos grasos puros, estándares, en iguales condiciones de cromatografía. En general se suele utilizar mezclas de composición conocida, que se obtienen comercialmente, constituidas por metil ésteres de ácidos grasos saturados, mono y poliénoicos. Además, suele ser de mucha utilidad en la identificación de ácidos grasos provenientes de muestras naturales consultar en la literatura estudios donde se ha realizado la caracterización de ese tipo de muestra. Los resultados de estos estudios pueden utilizarse como guías en el análisis de los nuevos resultados. Sin embargo puede suceder que ciertos ácidos grasos de la muestra se presenten como dudosos y que no puedan ser determinados; en ese caso se debe recurrir a la literatura en busca de información sobre datos de medidas de tiempos de retención para los distintos ácidos grasos. En general estos se encuentran en la literatura como: i) tiempos de retención relativos, ii) índice de retención de Kováts, o iii) equivalente de longitud de cadena (ECL, del inglés *Equivalent Chain Length*). El valor más comúnmente utilizado es el de ECL. El ECL surge de la relación lineal entre el logaritmo de los tiempos de retención de una serie de ácidos grasos, saturados no ramificados, y el número de carbonos o longitud de cadena. Esta correlación se obtiene graficando los tiempos de retención de los ácidos grasos saturados versus el valor entero de la longitud de cadena expresado como número de átomos de carbono. Cabe recordar que, los valores de ECL son válidos para realizar determinaciones siempre que se utilice la misma fase estacionaria y en las mismas condiciones. La identificación de ácidos grasos por comparación de los tiempos de retención con auténticos estándares o valores de la literatura de ECL resultan procedimientos sencillos y rápidos. La utilización de estándares tiene otra aplicación fundamental en el análisis de lípidos por cromatografía gaseosa que es la cuantificación de los lípidos analizados (Cruz-Hernandez, 2013). La detección de los compuestos genera una señal en forma de pico o campana a la que corresponde una determinada área que es calculada, integrando

electrónicamente, por el equipo. La cuantificación de los ácidos grasos se obtiene de comparar el área bajo la curva de los distintos componentes de la muestra con el área bajo la curva de un ácido graso estándar, no natural o raro en la naturaleza, que se agrega a la muestra y se utiliza en concentración conocida.

Cromatografía en capa fina.

Las técnicas de cromatografía de adsorción, entre ellas de capa fina (TLC, del inglés *Thin Layer Chromatography*) son de gran utilidad en el estudio y análisis de lípidos. En el siguiente apartado se describe el principio, el método y sus aplicaciones. La cromatografía de adsorción se basa en la adhesión diferencial de los componentes de la muestra sobre un soporte sólido, fase estacionaria, lo que determina la separación de los mismos. Las moléculas interactúan por fuerzas intermoleculares tales como puentes de hidrógeno, fuerzas de Van de Waals e interacciones iónicas, con la superficie de la fase estacionaria. En la cromatografía en capa fina los lípidos se separan según su estructura química y polaridad. Las diferencias de polaridad de las distintas clases de lípidos determinan la distribución diferencial entre las fases estacionaria y móvil. En el caso de la cromatografía de adsorción donde la fase estacionaria consiste en sílica observamos que, la presencia de grupos polares en la molécula aumenta la adsorción al soporte sólido. Contrariamente, las colas apolares de los ácidos grasos contribuyen poco o nada en dicha interacción. A medida que progresa la corrida cromatográfica, los lípidos son liberados y arrastrados progresivamente por el solvente (fase móvil) que presenta diferencias de polaridad con el soporte. El solvente compite por las interacciones que las moléculas de lípidos forman con la fase estacionaria y cuando las vence el lípido pasa de la fase estacionaria a la fase móvil. El material adsorbente puede empaquetarse en una columna de vidrio, cromatografía en columna, o disponerse como una fina capa en una placa de vidrio, cromatografía en capa fina (TLC) (Christie, 1982; Dijkstra, 2007). En la

cromatografía en capa fina, la sílica es el adsorbente más común y se encuentra adherida formando una delgada capa (0,25-1 mm) sobre una placa de vidrio. En la actualidad es común utilizar placas comerciales. Los pasos de una cromatografía en capa fina se muestran en la Figura 10.5A.

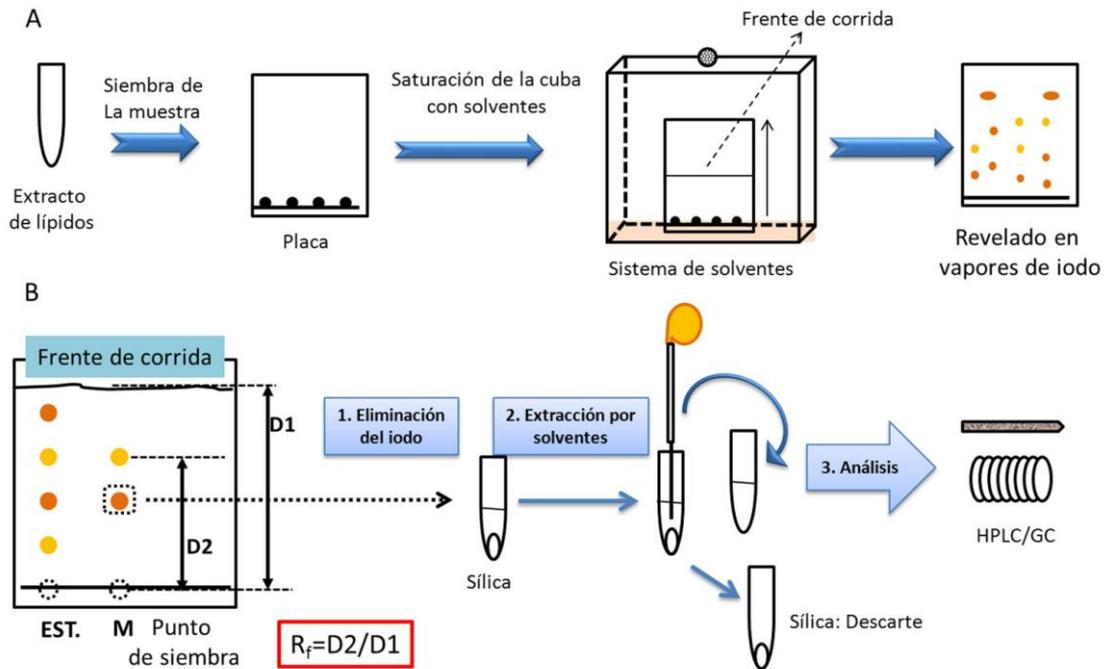


Figura 10.5. Cromatografía en capa fina (TLC). A. Esquema con los pasos de la TLC. B. Análisis de la placa. EST: Estándar; M: muestra; D: distancia 1 y 2. R_f : Retardation Factor, HPLC: Cromatografía líquida de alta performance; GC: Cromatografía gaseosa.

La cromatografía en capa fina presenta una gran versatilidad y numerosas aplicaciones (Touchstone, 1995; Fuchs 2011). El hecho de poder combinar distintos adsorbentes y sistemas de solventes, junto a lo inmediato de la visualización de resultados, la sencillez y los bajos costos de operación, la han transformado en una de las técnicas más utilizadas en el análisis de lípidos. Esta cromatografía se aplica a la separación y análisis de muestras complejas de lípidos conteniendo ácidos grasos, lípidos simples, colesterol y sus ésteres, así como lípidos complejos. La técnica se emplea con fines analíticos y/o preparativos, en ambos casos resulta fundamental la separación y la identificación de los lípidos presentes en la muestra. Debido a la gran variabilidad que se observa en los valores del factor R_f , del inglés *Retardation Factor*, merced a diferencias poco reproducibles en el estado de hidratación y

activación de la placa y diferencias entre distintos proveedores resulta inevitable la utilización de estándares para la identificación de los lípidos. Por otra parte la utilización de estándares permite, además de la identificación, la cuantificación de los lípidos en la muestra.

Como los lípidos son incoloros se debe recurrir a algún tipo de agente químico que nos permita visualizarlos. Estos pueden reaccionar de manera selectiva con un grupo funcional característico presente en algunos lípidos o de manera general con todos los lípidos presentes en la muestra. Los distintos agentes a utilizar pueden ser destructivos o no destructivos, lo que resulta importante al momento de elegir un tipo de revelador ya que con los segundos se podrán recuperar los lípidos de la placa para posteriores análisis. Algunos de los agentes no específicos y no destructivos más comúnmente utilizados son la 2,7-diclorofluoresceína y la rodamina, ambas permiten visualizar los lípidos bajo la luz ultravioleta. A estos dos compuestos se puede agregar la utilización de vapores de yodo que al entrar en contacto con los lípidos generan un patrón de manchas marrones sobre la placa que se visualiza a simple vista. Entre los métodos de visualización destructivos se destaca el de *charring* o carbonizado. En este los lípidos presentes en la placa son expuestos a una solución ácida y llevados a altas temperaturas lo que determina su carbonización. El resultado se ve como una mancha parda-oscura sobre la placa que representa el depósito de carbono presente en el lípido. Adicionalmente, las manchas pueden ser raspadas y cuantificadas por fotodensitometría.

Resulta muy útil de esta técnica el hecho de que una vez que los lípidos se han separado y detectado por métodos no destructivos pueden ser recuperados del adsorbente. Para esto se delimita la banda en la placa y se raspa la sílica correspondiente a cada una de estas en tubos separados. Los lípidos son extraídos con solventes y sometidos a posterior análisis por técnicas que permitan su identificación y cuantificación, cromatografía gaseosa, cromatografía líquida de alta performance o cualquiera de estas técnicas cromatográficas acopladas a espectrometría de masa (Figura 10.5B).

Cromatografía líquida de alta performance

La cromatografía líquida de alta performance (HPLC del inglés *High Performance Liquid Chromatography*) es un tipo de cromatografía en la que los componentes de una mezcla pasan a través de una columna, fase estacionaria, conforme se hace pasar un solvente, fase móvil, que va separando los distintos compuestos. Las moléculas de la mezcla se separan según sus propiedades de partición, solubilidad, entre las fases estacionaria y móvil. La principal diferencia entre este tipo de cromatografía líquida y la cromatografía en columna común reside en que el solvente se hace pasar por la columna a alta presión por acción de una bomba haciendo que la separación sea más eficiente. Un equipo para HPLC consiste típicamente en un reservorio del solvente, fase móvil, conectado a una bomba y esta al inyector. Luego encontramos una columna donde se separan los componentes y finalmente un detector (Figura 10.6A). Existen diferentes tipos de columnas para la HPLC, lo que le da una gran versatilidad a la técnica. Las diferentes columnas permiten utilizar este tipo de cromatografía en el modo de adsorción, de partición o incluso de intercambio iónico. Debido a estas posibilidades, la técnica de HPLC se emplea en el análisis de todo tipo de lípidos. Se usa para ácidos grasos provenientes de lípidos simples y complejos e incluso para el análisis de estos lípidos intactos. Sin embargo, las principales aplicaciones en la literatura se encuentran para ácidos grasos y fosfolípidos (Borch, 1975; Olsson, 1997). Sumado a la variedad de fases estacionarias y múltiples fases móviles, la HPLC cuenta con la ventaja de que trabaja a temperatura ambiente lo cual la hace muy útil para sustancias termolábiles. Dependiendo de la muestra y el tipo de lípidos que se quiera separar se selecciona una u otra fase estacionaria. La mayoría de estudios y análisis de lípidos por HPLC se realizan utilizando columnas de fase reversa formadas por cadenas alquílicas de distintas longitudes, de 4 a 30 átomos de carbono (C4-C30), unidas a una base de microesferas de sílica. Sin embargo, también se encuentran estudios donde se utilizan fases estacionarias constituidas por sílica, ósea de fase directa o fase normal, que se aplican principalmente para la separación de clases de lípidos,

por ejemplo lípidos simples de lípidos complejos y/o esteroides. Las columnas de fase reversa se utilizan para el análisis de ácidos grasos y la separación de especies dentro de una clase de lípido particular, por ejemplo, especies de fosfatidilcolina que difieren en la composición de ácidos grasos. El grado de retención y selectividad de la fase estacionaria de tipo reversa aumenta conforme lo hace la longitud de la cadena alquílica de los ácidos grasos y/o lípidos que los contienen. En este tipo de fases estacionarias, los lípidos se separan según el grado de insaturación y largo de la cadena de sus ácidos grasos. El ODS (del inglés *Octadecilsylane*) o C18 resulta ser la fase reversa más utilizada en el análisis de ácidos grasos y constituye una fase estacionaria no polar. Cuando se utilizan columnas con esta fase estacionaria, la presencia de cada doble enlace produce una reducción del tiempo de retención equivalente a tener dos grupos metilenos menos. Esto es particularmente evidente cuando se analizan series del tipo: 14:0, 16:1 y 18:2, los tres ácidos grasos, pese a la diferencia de longitud de su cadena, eluyen próximos en tiempo, de la columna. En la cromatografía líquida de alta performance la fase móvil consiste en una mezcla con distintas proporciones de un solvente orgánico, comúnmente metanol o acetonitrilo, en combinación con uno de mayor polaridad que suele ser agua, o los tres juntos. Resulta interesante, y de gran ventaja metodológica, el hecho de que la proporción de los solventes se puede variar durante la corrida generando un gradiente de la fase móvil que puede ir de menos a más polar o viceversa. En este sentido, la técnica de HPLC presenta más opciones para lograr la adecuada separación de muestras complejas en relación a otras cromatografías. Para la detección de compuestos separados por HPLC es fuertemente sugerido que se realice la derivación de los lípidos. La derivación consiste en la adición de una molécula que mejora sensiblemente las propiedades del derivado para ser detectado. Este método de aumento de la detección debe ser evaluado para cada caso y siempre resulta un compromiso entre la resolución que se desea obtener y la necesidad de aumentar la detección del lípido. Esto se debe a que la introducción de un agente de derivación o cromóforo tiene efecto sobre las propiedades de partición de los lípidos en el sistema cromatográfico. Para el caso de ácidos

grasos, una de las derivaciones comunes consiste en la formación de ésteres metílicos, adicionalmente se utiliza el agregado de cromóforos mediante la formación de ésteres de fenacilo con el 2-bromo 1-feniletanon (Borch, 1975) (Figura 10.6B). En particular, la adición de estos grupos que poseen dobles enlaces conjugados mejoran sensiblemente la detección de los compuestos mediante el monitoreo de los eluyentes con luz ultravioleta a cortas longitudes de onda. Como se desataca más adelante, los detectores UV son de los más utilizados en la HPLC.

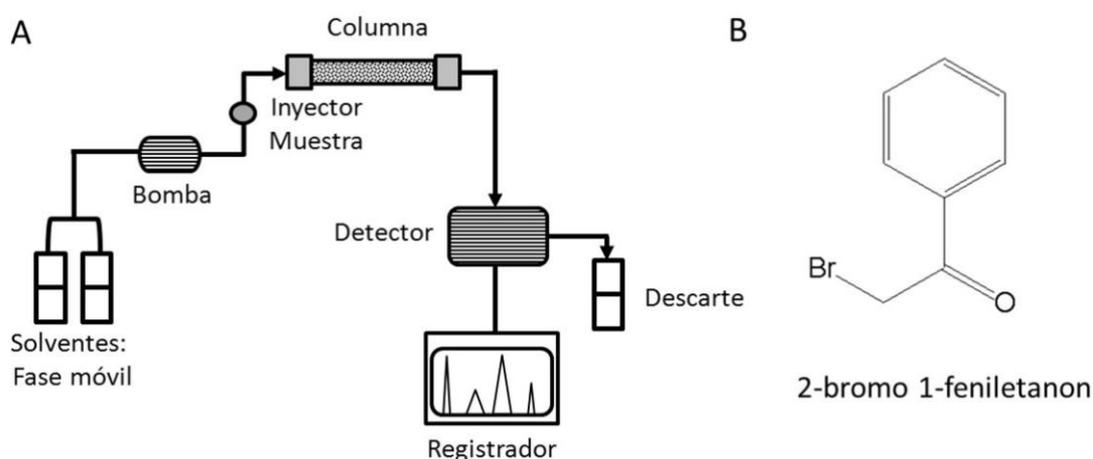


Figura 10.6. *Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC). A. Esquema del equipo utilizado en el análisis por HPLC. B. Fórmula química de un compuesto comúnmente utilizado en la derivación de lípidos para el análisis por HPLC.*

En términos de resolución de una muestra, el sistema de separación ideal es aquel que pueda combinar sensibilidad, velocidad y eficiencia en la separación (Gutnikov, 1995). Generalmente sucede que una de estas características va en detrimento de la otra. La velocidad puede aumentarse utilizando columnas cortas que suelen afectar la separación, en tanto que columnas de mayor longitud aumentan los tiempos de corrida pero mejoran sensiblemente la separación de los componentes de la muestra. La sensibilidad aumenta con el agregado de un compuesto para la derivación, pero esto también va en detrimento de la resolución. Esto sucede porque, en la cromatografía de fase reversa, la separación se da en relación a las características estructurales de la cadena carbonada del ácido graso. Un aumento en el volumen del cromóforo incrementa la proporción de la porción no selectiva de la molécula reduciendo

la separación en base a la porción selectiva. En este sentido se debe tener en cuenta al seleccionar el cromóforo que la polaridad del mismo tienda a mejorar la selectividad y separación de los ácidos grasos en la columna. No obstante la regla es que una mayor sensibilidad en general se consigue a expensas de la resolución de la muestra.

La detección de lípidos resueltos por HPLC dependerá ampliamente de las características estructurales de los mismos, específicamente, de la presencia de grupos funcionales susceptibles de ser detectados por uno u otro método. Por otra parte la fase móvil (solventes) utilizada en la HPLC también será determinante, en lo que al uso de uno u otro detector se refiere, ya que no todos los solventes son igualmente compatibles con los distintos detectores. En el caso de la ausencia de grupos funcionales visibles para los detectores, la detección dependerá de las propiedades del cromóforo elegido para la derivación de los lípidos. Existen actualmente numerosos detectores que se acoplan a la HPLC siendo los más utilizados los Detectores por espectrofotometría de luz UV, Índice de refracción (RI del inglés *Refractive Index*) y el de Dispersión de luz por el soluto una vez evaporado el solvente (ELSD del inglés *Evaporative Light Scatter Detector*). También se puede utilizar un detector fluorométrico, en este caso la derivación se realiza con un fluoróforo, comúnmente el antraceno. A los detectores mencionados se suma el espectrómetro de masas; este puede además de permitir monitorear la cromatografía dar información útil sobre aspectos estructurales de los lípidos. En la actualidad se prefieren aquellos detectores que muestran la mayor sensibilidad y que se puedan usar en corridas con gradientes de la fase móvil. Con los detectores UV la sensibilidad resulta baja y estrechamente dependiente de la cantidad de dobles enlaces. Los detectores IR y ELSD son considerados universales y pueden ser muy útiles. La principal desventaja con el IR es que solo puede ser usado en corridas isocráticas y resulta muy sensible a cambios de temperatura. El ELSD es un detector robusto, el principal inconveniente es que no se observa una relación lineal entre la concentración del soluto y los picos generados durante la detección, con lo cual sólo puede utilizarse con fines cualitativos. Sin embargo, la separación y

análisis con este tipo de detectores se usa con fines preparativos. Para fines analíticos es recomendable la derivación de ácidos grasos y lípidos para mejorar la sensibilidad de los detectores y por ende la detección. Para esto es importante utilizar agentes que presenten una alta absortividad molar. De este modo la señal será proporcional a la cantidad molar del cromóforo o agente de derivación. Esto significa que, para un sistema de cromatografía dado, la sensibilidad será función de la concentración molar del reactivo y su derivado lipídico, lo que implica que su formación debe ser cuantitativa y mantener una cierta estequiometría. Un factor importante en la elección de este tipo de agentes es que no deben modificar significativamente el comportamiento de los lípidos durante el desarrollo de la cromatografía. Posterior a la modificación, el compuesto derivado debe comportarse de manera similar a como lo hace el compuesto parental.

En adición al análisis de ácidos grasos se han realizado numerosos estudios de fosfolípidos extraídos de diversas fuentes naturales. Esta técnica se ha utilizado con éxito para resolver satisfactoriamente la separación de muestras conteniendo distintas clases de fosfolípidos tales como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol y ácido fosfatídico. Cabe mencionar que, si bien es menos común, también se ha utilizado con buenos resultados en el análisis de especies de triacilglicéridos (Nikolova, 1995).

Un buen ejemplo de lo útil que puede resultar esta técnica en el análisis de fosfolípidos se observa en el estudio publicado por Patton (Patton, 1982). En dicho trabajo los autores obtienen una muy buena separación de las clases de fosfolípidos presentes en un extracto de lípidos de hígado obtenido por el método de Folch. Los lípidos disueltos en hexano: 2-propanol: agua se separan por HPLC en el modo de fase directa mediante la utilización de una columna de sílica gel (250 x 4,6 mm). La corrida se desarrolla en condiciones isocráticas utilizando una mezcla de solventes hexano: isopropanol: *buffer* fosfato 25 mM: etanol: ácido acético (367:490:62:100:0.6 v/v).

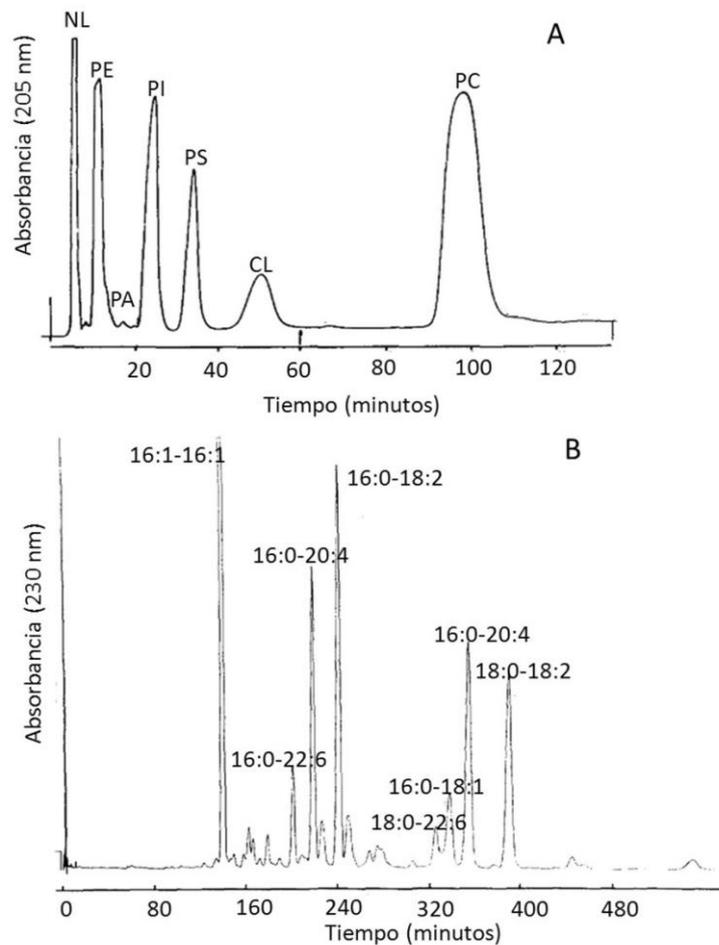


Figura 10.7. A. Cromatograma del análisis de clases de lípidos por HPLC de fase directa. NL: lípidos neutros; PE: fosfatidiletanolamina; PA: ácido fosfatídico; PI: fosfatidilinositol; PS: fosfatidilserina; CL: cardiolipina; PC: Fosfatidilcolina (Reproducido y adaptado de J. Lipid Res. 23:190-196, 1982. y con permiso de Sander J. Robins). B. Separación de especies de fosfatidilcolina por HPLC de fase reversa la anotación asociada a cada pico indica la composición en ácidos grasos (Reproducido y adaptado de J. Nutr. Biochem., 1:549-556, 1990. y con permiso de Sander J. Robins).

En este mismo estudio se precedió a la separación de distintas especies de los fosfolípidos fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol y fosfatidilserina. La separación de las especies de fosfolípidos se realizó por HPLC en columna de fase reversa C18 (ODS) utilizando distintos sistemas de solventes. Las fracciones detectadas fueron colectadas para la posterior determinación de las especies de fosfolípidos por análisis de la composición de ácidos grasos por CG. Las figuras 10.7.A y B muestran cromatogramas obtenidos en fase directa y reversa, respectivamente, utilizando este tipo de análisis.

Espectrometría de masa en el análisis de lípidos: lipidoma.

La técnica de espectrometría de masa se basa en la generación de iones a partir de compuestos, inorgánicos u orgánicos por alguno de los métodos adecuados, para luego separar estos iones en base a su relación de masa a carga, m/z . El método permite la detección, análisis cualitativo, así como la determinación de la abundancia de los iones, análisis cuantitativo. Los compuestos pueden ser ionizados térmicamente, por acción de un campo eléctrico, por el impacto de electrones, otros iones o incluso fotones. Los iones generados pueden consistir en simples átomos, moléculas o fragmentos de estas, así como asociaciones de estos elementos. En cualquier caso, la separación de los iones se efectúa por exposición de los mismos a la acción de un campo magnético que los separa (Gross, 2004).

La espectrometría de masa es una de las técnicas de química analítica más ampliamente utilizada en la actualidad para distintos compuestos y tiene un amplio campo de aplicación en la bioquímica de lípidos, constituyendo uno de los tipos de detectores que puede acoplarse a la cromatografía líquida o gaseosa líquida. En este sentido representa una valiosa herramienta para el análisis estructural de lípidos. Sus primeras aplicaciones, sobre lo que se encuentra abundante bibliografía, se realizaron en el campo del estudio de ácidos grasos (Kuksis, 1995). Posteriormente fueron surgiendo otras aplicaciones en el análisis de fracciones o mezclas de lípidos simples y complejos mediante la técnica de cromatografía líquida y espectrometría de masa (LC-MS del inglés *Liquid Chromatography- Mass Spectrometry*). A esto se sumaron los estudios de *Shotgun lipids*, en los cuales la muestra compleja de lípidos es inyectada directamente en el espectrómetro de masa.

Existe actualmente una gran diversidad en cuanto a equipos de espectrometría de masas. Sin embargo, todos comparten una serie de rasgos y partes comunes, a saber: una fuente de iones, punto de entrada al equipo, un analizador de masas que puede ser de una o varias cámaras y el detector (Gross, 2004).

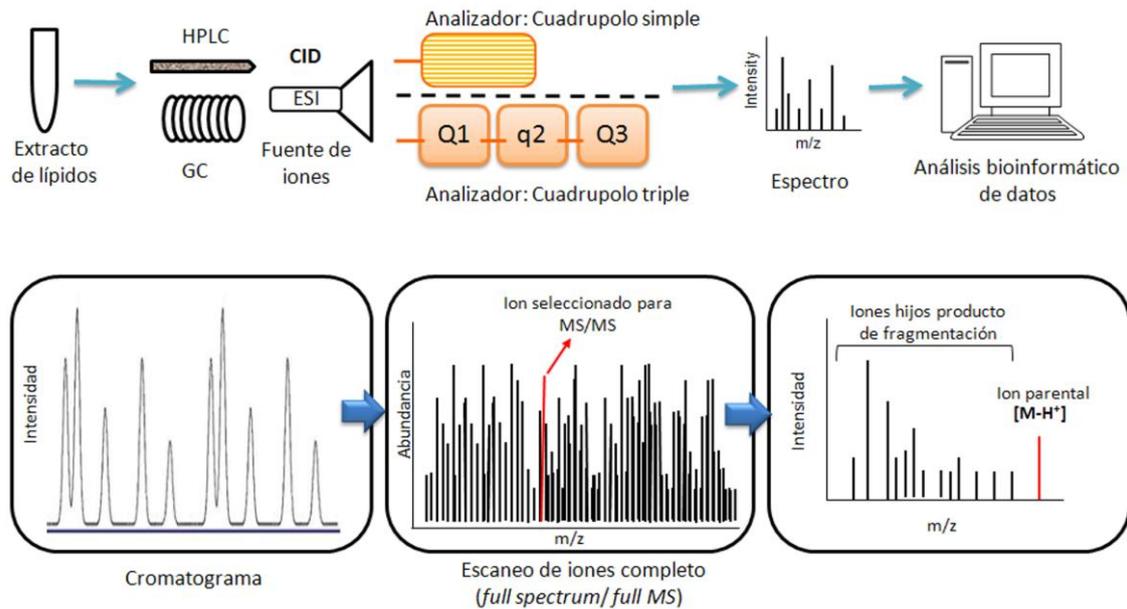


Figura 10.8. Análisis de lípidos por espectrometría de masa

Las muestras lipídicas entran a través de la fuente de iones desde donde son conducidas al analizador de masa. Este consiste en un fuerte campo electromagnético a lo largo del cual los iones migran a diferentes velocidades según su relación de m/z , lo que determina que los iones sean registrados por el detector a distintos tiempos. La Figura 10.8 muestra de manera esquemática el procedimiento. En la figura (panel inferior) se muestra el resultado del análisis en el espectrómetro, un espectro de masa. A medida que los iones van alcanzando el detector se va generando un gráfico de barras, histograma, donde se muestra la abundancia de los iones, en la ordenada, versus la relación de m/z en abscisas. La intensidad de cada pico indica la abundancia relativa para esa determinada relación de masa/carga (m/z). El conjunto de picos representa lo que se denomina espectro completo (*full ms*). El pasaje de compuestos por el analizador genera un espectro de iones que han sido detectados a distintos tiempos y en base al cual el equipo construye un cromatograma que se correlaciona de manera directa con dicho espectro. De esta manera se puede, a partir de un pico del cromatograma, mapear o identificar en el espectro a qué ion/iones corresponde dicho pico y viceversa, desde el espectro se puede seleccionar un pico correspondiente a un ion y ver en el cromatograma en que momento dejó la columna. El pico de mayor intensidad en el espectro se denomina pico de base y los espectros suelen

mostrarse con intensidades relativas respecto de este al cual se asigna una intensidad del 100%. La identificación de los distintos lípidos en el espectrómetro se realiza, de manera general, al igual que para los otros compuestos orgánicos analizados por esta técnica. Las moléculas lipídicas se cargan positiva o negativamente en la fuente de generación de iones y entran al analizador donde se produce un filtrado de los mismos para, individualmente, promover su fragmentación y analizar los resultados. La fragmentación que es un proceso conocido como disociación inducida por colisión (CID del inglés *Collision Induced Dissociation*) se produce por el impacto de los iones con un gas inerte y resulta ser característica y reproducible en condiciones determinadas para cada compuesto. El producto de la colisión, los iones, es analizado por el equipo generando un segundo espectro que se conoce como espectro de masa en tándem o simplemente MS/MS. En este se puede observar un pico con la relación de m/z mayor, resultado de la detección del ion original sin fragmentar, denominado ion parental, el cual suele estar acompañado de una serie de picos que son el producto de la fragmentación del ion parental o molecular. Mediante el análisis y reconocimiento del patrón de fraccionamiento comparado con el obtenido y estudiado utilizando compuestos puros (estándares) se obtiene la identificación de los compuestos de la muestra. El proceso de fraccionamiento depende de la estructura química del lípido y, en la medida que se mantengan las condiciones de operación del equipo, es altamente reproducible. Esto permite que cada compuesto pueda ser analizado en base a un ion parental/molecular de relación m/z (z en general es igual 1) y una colección de fragmentos característicos que se observan en un mismo espectro (tándem MS/MS). De esta manera se obtiene un patrón de iones que caracteriza a una molécula dada y que puede ser enfrentada a una base de datos formada por espectros generados en base a estándares y de este modo realizar su identificación. Adicionalmente, conociendo la masa de los iones generados y la del ion parental se puede proceder de manera manual a la elucidación de la fórmula molecular del ion y la predicción de su estructura. Es importante mencionar que, si bien el espectrómetro de masas puede utilizarse en el análisis directo de los lípidos, lo más común es que se lo utilice

como detector asociado a distintos tipos de cromatografía. La cromatografía, además de reducir la complejidad de la muestra y mejorar sensiblemente la capacidad analítica del espectro, brinda importante información en términos de tiempos de retención que contribuye a la identificación de los lípidos. En relación al análisis por espectrometría de masa de lípidos se debe mencionar que, dependiendo del proceso de ionización que se utilice, también se puede obtener el fraccionamiento de la molécula lipídica durante la generación de iones. En este caso el escaneado de cada tipo de lípido se obtiene como un ion parental, correspondiente a la molécula original intacta y los fragmentos asociados a este, el análisis del conjunto nos permite elucidar la estructura química del lípido en cuestión y su identificación.

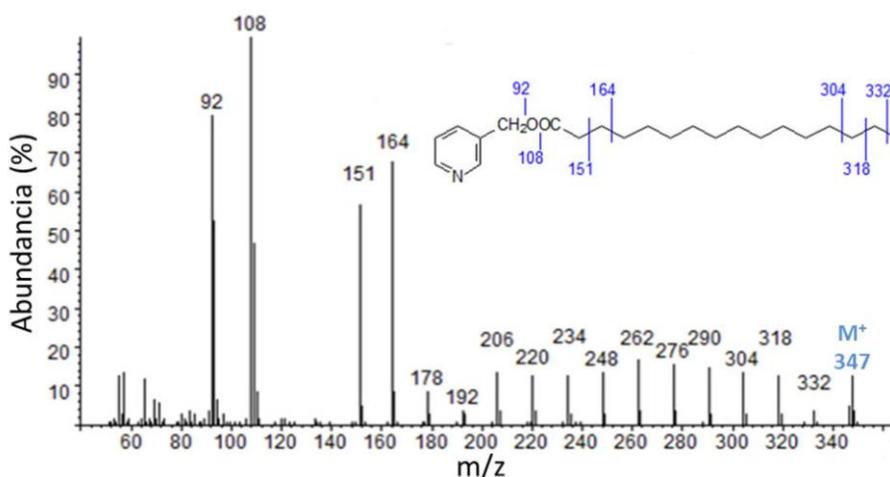


Figura 10.9. Análisis de ácidos grasos por espectrometría de masa. Espectro correspondiente al tándem MS/MS del derivado de ácido palmítico (Reproducido y adaptado de Lipid Library, Saturated and branched-chain fatty acids en lipidlibrary.aocs.org y con permiso de William W. Christie).

En la Figura 10.9 se muestra un espectro representativo obtenido en el análisis del ácido graso palmítico (16:0) para graficar el modo en que el espectrómetro nos permite la elucidación de la estructura de una molécula y eventualmente su identificación. La figura muestra el espectro correspondiente al derivado del ácido palmítico, el 3-picolinil éster. Los ácidos grasos pueden ser analizados en el modo de iones positivos o negativos del espectrómetro según el tipo de iones que se generen. Esto dependerá de si se analizan los ácidos grasos naturales o sus derivados, metil-ésteres, sulfo o nitroderivados (Harvey, 1982).

En el caso de los nitroderivados, la presencia del átomo de nitrógeno hace que los compuestos que se forman con el ácido graso presenten la tendencia a formar iones positivos y por esto el análisis se realiza operando el espectrómetro de masa en el modo positivo. En este ejemplo el análisis muestra un ion parental o molecular positivo M^+ ($m/z= 347$) que se distingue fácilmente. Debido a que la carga del ion (z) es de 1 el valor de 347 nos indica la masa del ion molecular. Adicionalmente se observan una serie iones producto de la fragmentación del ion molecular que, como se mencionó, ocurre de manera característica y es función de la estructura y energía interna del ácido graso analizado y de las condiciones en que se opera el equipo. La aparición sistemática de estos iones da cuenta de la estructura e identidad del ácido graso. En el espectro que se muestra se puede ver que, además del ion 347, aparecen con distintas intensidades una colección de iones que van desde el 332 hasta el 151 y que se generan por la pérdida y/o remoción de un grupo metileno cada vez (CH_2). Además se observan dos iones muy prominentes y característicos, 108 y 92, producto de la fragmentación en distintos puntos del éster. La detección del ion de relación $m/z= 347$ sumado a los iones que se mencionan indican la presencia del éster del 3-picolinil del ácido palmítico. Como se desprende del análisis de este caso resulta fundamental para una rápida y adecuada interpretación de los resultados contar con una buena caracterización, basada en el análisis de estándares de lípidos puros, del comportamiento de los distintos ácidos grasos y/o derivados al pasar por el espectrómetro. Cabe destacar que este tipo de análisis y caracterizaciones es resultado del trabajo de varios grupos que investigan en el área de la bioquímica e identificación de lípidos (Navas Iglesias, 2009). A la identificación por espectrometría de masa se suma la información y simplificación que otorga el análisis por cromatografía. El hecho de poder acoplar y trabajar en línea (*on line*) con HPLC o CG y MS ha transformado ambas técnicas en uno y otro sentido, aumentando la selectividad y sensibilidad de las mismas. Las cromatografías aportan su selectividad y poder resolutivo para muestras complejas entregando al analizador, de manera continua, clases y especies de

lípidos reduciendo el trabajo del espectrómetro lo que se traduce en una mejor detección e identificación.

La técnica y equipamiento utilizado en el análisis por espectrometría suele variar en función de la complejidad de las muestras y del tipo de lípido que se quiera analizar. Generalmente se utiliza la ionización por *electrospray* o ESI, del inglés *Electrospray Ionization*, que permite obtener los lípidos cargados (iones) en nano-gotas del solvente listos para pasar a la fase gaseosa y entrar al analizador del espectrómetro. Esta es considerada una técnica suave de ionización que, dependiendo de la estructura química de los lípidos y de la presencia de iones inorgánicos en la solución generarán iones positivos o negativos. De esta manera los iones se conducen mediante un capilar al analizador de tipo “atrapa iones” o *ion trap*. Este puede ser simple, una sola cámara, conocido como cuadrupolo simple, o estar compuesto por tres cámaras conocido como cuadrupolo triple. En este hay tres cuadrupolos o regiones para el análisis de iones, QqQ (Q1, q2, Q3). La mayoría de los analizadores de masa poseen un detector donde los iones impactan y generan un impulso eléctrico que es magnificado y traducido en una señal que es registrada. Como se mencionó anteriormente, resulta fundamental la fragmentación y análisis de los iones generados para la identificación del compuesto. Esto se realiza por el proceso de Disociación Inducida por Colisión, (CID). Dependiendo del equipo que se utilice el proceso de disociación puede realizarse durante la generación de iones, como suele ser en el caso en que se utiliza *electrospray* (ESI), o en una cámara de disociación (q2) entre los cuadrupolos (Q1 y Q3). En el primero de los casos esto se logra incrementando y ajustando la corriente (voltaje) que se aplica. En el análisis de lípidos se observó que aumentando el voltaje (energía) en el proceso del ESI se obtiene una buena colección del ion original y sus fragmentos (Kuksis, 1995). Los iones así generados son luego analizados por el analizador de una cámara, el *ion trap*. En el caso del cuadrupolo triple los iones que ingresan al espectrómetro son seleccionados en Q1 y dirigidos a q2 donde se bombardean con un gas para producir la fragmentación. Finalmente los iones así generados son analizados en Q3. Si bien ambas estrategias de análisis se usan en la

actualidad se ha observado que combinando la técnica de HPLC con *ESI-CID-Ion Trap* se obtienen resultados similares a los generados utilizando MS-CID-MS en un cuadrupolo triple. Debido a que el primero de los métodos resulta menos costoso se ha transformado en la técnica de elección.

Alternativamente al análisis de fracciones puras constituidas por una clase de lípido y sus especies ha surgido también en este campo de la bioquímica una metodología de análisis global conocida como lipidoma. El lipidoma es una especialidad dentro del campo del metaboloma dedicada al análisis exhaustivo de compuestos hidrofóbicos de alto peso molecular, de baja polaridad y bajo recambio. Uno de los principales desafíos ha sido trabajar con la gran diversidad y heterogeneidad que los lípidos reportan, lo cual ha obligado a desarrollar estrategias de análisis para cubrir el amplio espectro de las muestras (Layre, 2013; Navas-Iglesias, 2009). El objetivo de esta área dentro de la bioquímica de lípidos consiste en poder realizar un análisis que permita conocer de manera exhaustiva el conjunto de lípidos que se encuentran en un sistema dado en simultáneo. Metodológicamente esto implica combinar una o más cromatografías, idealmente en línea, con un espectrómetro de masas de modo tal de determinar la gran variedad de lípidos presentes. Adicionalmente se requiere de un sistema automatizado de análisis de datos para realizar la identificación de los compuestos detectados por el equipo. Para el desarrollo de esta área ha sido necesaria la caracterización del comportamiento de los distintos lípidos conocidos en condiciones controladas, y reproducibles, de trabajo del espectrómetro. Producto de este trabajo se han obtenido bases de datos que resultan en la actualidad fundamental para la etapa de identificación de los compuestos y análisis de datos, tal es el caso de LIPIDMAP (<http://www.lipidmaps.org>). El procedimiento implica la extracción de lípidos totales de la matriz biológica y su separación por cromatografía líquida (HPLC) en un sistema de trabajo en línea. Conforme los lípidos se van separando pasan por la zona donde se generan los iones, la fuente de iones, y entran al analizador. Los resultados así obtenidos se analizan aplicando estrategias bioinformáticas que permiten la identificación y cuantificación de los lípidos en la muestra, así como la comparación de resultados provenientes de analizar

muestras distintas. En la última década se han publicado de manera creciente varios estudios donde se aplica esta metodología al análisis y caracterización de muestra de gran relevancia. Inclusive se han desarrollado protocolos de “*high throughput*” por *Shotgun* o análisis directo por inyección de la muestra en el espectrómetro que permiten el análisis de varias muestras (cientos) en tiempo de horas (Stahlmana, 2009). Uno de los trabajos pioneros en el análisis global de lípidos por inyección directa en el espectrómetro fue el publicado a mediados de la década del 90 por Han y Gross (Han,1994) sobre la caracterización de fosfolípidos del eritrocito provenientes de la extracción de lípidos con cloroformo. En este estudio se utilizó el ESI como fuente de iones y los lípidos fueron analizados directamente, sin previa cromatografía, en los modos negativo y positivo en un *Ion Trap*. Más de 50 fosfolípidos de la membrana del eritrocito fueron identificados por infusión directa en un sistema de tipo ESI-CID-MS a partir de extractos de sangre.

Resumiendo podemos decir que el análisis de lípidos por espectrometría de masa comprende un conjunto de técnicas y/o posibilidades que va desde el análisis de fracciones puras provenientes de sistemas *off line* de cromatografía, pasando por el análisis de fracciones con clases de lípidos ricas en especies que se resuelven y analizan mediante sistemas de cromatografía *on line* con el espectrómetro, hasta los denominados sistemas de análisis de tipo *Shotgun* donde muestras con distinta complejidad son analizadas directamente en el espectrómetro.

Bibliografía

Bligh EG and Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Med Sci*, 37(8):911-917, 1959.

Borch RF. Separation of Long Chain Fatty Acids as Phenacyl Esters by High Pressure Liquid Chromatography *Analytical Chemistry*, 47:2437-2439, 1975.

Brondz I. Development of fatty acid analysis by high-performance liquid chromatography, gas chromatography, and related techniques *Analytica Chimica Acta* 465:1–37, 2002.

Christie WW. Gas Chromatography and Lipids published in by P.J. Barnes & Associates, The Oily Press Ltd, 1989.

Christie WW. Solid-phase extraction columns in the analysis of lipids. *Advances in Lipid Methodology – One*, Ed. WW. Christie, Oily Press, Ayr pp. 1-17, 1992.

Christie WW. Lipid analysis: isolation, separation, identification, and structural analysis of lipids. 2nd ed. Pergamon international library of science, technology, engineering, and social studies. Oxford, Oxfordshire, England; New York: Pergamon Press. xvi, 207, 1982.

Cruz-Hernandez C, Goeuriot S, Giuffrida F, Thakkar SK, Destailats F. Direct quantification of fatty acids in human milk by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1284 :174–179, 2013.

Dijkstra AJ, Christie WW and Knothe G. Handbook of Lipids, 3^{era} edición , Capítulo 6: Analisis. Editado por Frank D. Gunstone, John L. Harwood, Albert J. Dijkstra. CRC Press, Taylor and Francis Boca Raton London, New York, 2007.

Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226(1):497-509,1957.

Fuchs B, Süß R, Teuber K, Eibisch M, Schiller J. Lipid analysis by thin-layer chromatography—A review of the current state *Journal of Chromatography A*, 1218:2754–2774, 2011.

Gross JH. Mass Spectrometry a Textbook. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2004.

Gutnikov G. Fatty acid profiles of lipid samples, *Journal of Chromatography B*, 671:71-89, 1995.

Halim R, Gladman B, Danquah MK, Webley PA. Oil extraction from microalgae for biodiesel production. *Bioresource Technology*. 102(1):178–85, 2011.

Halim R., Michael K. Danquah, Paul A. Webley Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review *Biotechnology Advances* 30:709–732, 2012.

Harvey DJ. Picolinyl Esters as Derivatives for the Structural Determination of Long Chain Branched and Unsaturated Fatty Acids *BIOMEDICAL MASS SPECTROMETRY* 9:33-38, 1982.

Iverson SJ, Lang SL, and Cooper MH. Comparison of the Bligh and Dyer and Folch Methods for Total Lipid Determination in a Broad Range of Marine Tissue. *Lipids* 36:1283–1287, 2001.

James AT and Martin AJP. Gas-liquid Partition Chromatography: the Separation and Micro-estimation of Volatile Fatty Acids from Formic Acid to Dodecanoic Acid 50:679-690, 1952.

King JW. Analytical Supercritical Fluid Techniques and Methodology: Conceptualization and Reduction to Practice. *Journal of AOAC International*. 81:9-17, 1998.

King JW. Supercritical Fluid Extraction: Present Status and Prospects. *Grasas y Aceites*. 53:8-21, 2002.

Kuksis A, Myher JJ Application of tandem mass spectrometry for the analysis of long-chain carboxylic acids *Journal of Chromatography B*, 671:35-70, 1995.

Layre E, Moody DB Lipidomic profiling of model organisms and the world's major pathogens. *Biochimie* 95:109-115, 2013.

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. *Principles of Biochemistry*. 6th ed. New York : W.H. Freeman, 2013.

McDaniel LH, Taylor LT. Esterification of decanoic acid during supercritical fluid extraction employing either methanol-modified carbon dioxide or a methanol trap. *Journal of Chromatography A*, 858:201–207, 1999.

Navas-Iglesias N, Carrasco-Pancorbo A, Cuadros-Rodríguez L. From lipids analysis towards lipidomics, a new challenge for the analytical chemistry of the 21st century. Part II: Analytical lipidomics. *Trends in Analytical Chemistry* 28(4), 2009

Nikolova-Damyanova Boryana, Christie WW, Bengt G. Herslöf. Retention properties of triacylglycerols on silver ion high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 694:375-380, 1995.

Olsson NU, Salem N. Molecular species analysis of phospholipids. *Journal of Chromatography B*, 692:245-256, 1997.

Patton GM, Fasulo JM, Sander JR. Analysis of lipids by high performance liquid chromatography. Part II: Phospholipids. *J. Nutr. Biochem.* 1:549-556, 1990.

Patton GM, Fasulo JM, Sander JR. Separation of phospholipids and individual molecular species of phospholipids by high-performance liquid chromatography. *J. Lipid Res.* 23:190-196, 1982.

Ståhlman M, Ejsing CS, Tarasov K, Perman J, Borén J, Ekroos K. High-throughput shotgun lipidomics by quadrupole time-of-flight mass spectrometry *Journal of Chromatography B*, 877:2664–2672, 2009.

Touchstone JC. Thin-layer chromatographic procedures for lipid separation *Journal of Chromatography B*, 671:169-195, 1995.

Williams MA, McCluer RH. The Use of Sep-Pap C, Cartridges During the Isolation of Gangliosides. *Journal of Neurochemistry* 35(l):266-269, 1980.

PARTE IV

Estudio Funcional de Proteínas

CAPITULO 11

INTERACCIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA

Luciana Rodriguez Sawicki y Natalia Bottasso Arias

Introducción

Las interacciones proteína-proteína (IPP) son intrínsecas a todos los procesos celulares, incluyendo la expresión génica, crecimiento celular, proliferación, asimilación de nutrientes, morfología, motilidad, comunicación intercelular y apoptosis, entre otros. Pero las células responden a un gran número de estímulos, por lo tanto la expresión celular es un proceso dinámico, aquellas proteínas que cumplen funciones específicas pueden no estar siempre expresadas o activadas. Asimismo, no todas las células son iguales, y muchas proteínas se expresan de modo dependiente del tipo celular. Estas características propias de las proteínas hacen que la investigación de las IPP sea compleja, especialmente cuando se trata de entender la función de una proteína en su contexto biológico adecuado (Golemis, 2002).

Dentro de los aspectos críticos requeridos para entender la función de una proteína se incluyen:

- Secuencia y estructura de la proteína – se usa para descubrir motivos que ayuden a predecir la función.
- Historia evolutiva y secuencias conservadas – identifica residuos regulatorios clave.
- Perfil de expresión – revela la especificidad del tipo celular y cómo la expresión es regulada.
- Modificaciones post-traduccionales – fosforilación, acilación, glicosilación, y ubiquitinación sugieren localización, activación y/o función.
- Interacciones con otras proteínas – la función puede extrapolarse al conocer la función de sus ligandos.

- Localización intracelular – puede ayudar a inferir la función de la proteína.

Hasta los años 90, el análisis de la función de una proteína se focalizaba en su estudio de modo individual. Sin embargo la gran mayoría de las proteínas interactúan con otras al momento de cumplir su función, por ende, las mismas deben ser estudiadas en el contexto de sus compañeros interactuantes para comprender de modo integral el rol que desempeñan.

El estudio de las IPP requiere de la utilización de conocimientos y técnicas de diversas áreas como biología, genética, bioquímica, biofísica y biología molecular. Comprender completamente la naturaleza de estos procesos es uno de los principales objetivos en la era de la proteómica. El conocimiento completo de las redes de interacción proteica no solo es importante para comprender los procesos celulares y sus implicancias desde un punto de vista biológico; sino también por los fines aplicados que de él se desprenden, como son el tratamiento de muchas enfermedades y desórdenes que tienen base en defectos en IPP, diseño de drogas, tratamientos anti-virales y contra otros patógenos, etc.

El descubrimiento de nuevos compañeros interactuantes para una proteína de interés puede proveer evidencia significativa sobre su rol funcional. La identificación de proteínas de unión con un rol celular definido normalmente lleva a la investigación en nuevas direcciones. Se han desarrollado múltiples técnicas para la identificación de IPP. Generalmente, se utiliza una proteína “cebo” de interés para buscar en un pool de proteínas celulares posibles interacciones, acoplado con algún modo de detección. Una técnica comúnmente utilizada, que se detallará a lo largo de este capítulo, es el sistema de doble híbrido de levadura. Esta técnica utiliza la activación transcripcional de un gen reportero en la levadura como lectura de IPP.

En este capítulo se comentarán, en primer lugar, aspectos generales de la interacción entre proteínas, como la existencia de dominios de interacción, los distintos aspectos que caracterizan una interacción proteica, la diversidad de estas interacciones, etc. Después se mencionarán y desarrollarán diversas técnicas utilizadas para la detección, *screening*, de interacciones entre proteínas. Asimismo, se comentarán brevemente las herramientas de

predicción *in silico* actualmente disponibles, las cuales poseen un alto valor predictivo que luego debe contrastarse con la experimentación. A continuación, se detallarán metodologías que sirven para la confirmación de las IPP tanto *in vitro* como *in vivo*.

El presente capítulo no pretende ser más que una introducción (por cierto muy limitada) a la identificación, confirmación y caracterización biológica de la interacción entre proteínas. El lector interesado puede profundizar en cada uno de los temas tratados en la vasta y creciente bibliografía existente. Vale decir que la selección de los temas tratados es de alguna manera “forzada”, porque sería realmente muy difícil abarcar y resumir todos los aspectos de las IPP en un solo trabajo, esto implicaría mencionar solo cuestiones superficiales y muy generales de cada tema, en detrimento de aspectos esenciales.

Tipos de interacción proteína-proteína.

Las IPP, fundamentalmente, podemos clasificarlas en estables o transitorias, y ambos tipos pueden ser tanto fuertes como débiles. Las interacciones estables son aquellas asociadas con proteínas que son purificadas como complejos de múltiples subunidades, siendo las subunidades de estos complejos idénticas o diferentes. La hemoglobina y la RNA polimerasa son ejemplos de interacciones entre múltiples subunidades que forman complejos estables (Golemis, 2002).

Las IPP que controlan la mayoría de los procesos celulares se espera sean de carácter transitorio. Como el nombre lo indica, las interacciones transitorias son de naturaleza temporal y típicamente requieren de condiciones que promuevan la interacción, tales como fosforilación, cambios conformacionales o localización en un área discreta de la célula. Este tipo de interacciones pueden ser tanto débiles como fuertes, rápidas o lentas. Mientras están en contacto con sus compañeros interactuantes, las proteínas que interactúan transitoriamente se encuentran involucradas en un amplio rango de procesos celulares, incluyendo modificación de la proteína, transporte, plegado, señalización, y ciclo celular.

Las proteínas interactúan entre sí mediante una combinación de interacciones hidrofóbicas, fuerzas de van der Waals, y puentes salinos en dominios de unión específicos de cada proteína. Estos dominios pueden ser pequeñas o grandes superficies de unión y puede tratarse de unos pocos péptidos de longitud o expandirse a lo largo de cientos de aminoácidos, y la fuerza de unión está influenciada por el tamaño del dominio de unión. Un dominio de superficie común que facilita la estabilización de IPP son las cremalleras de leucina, las cuales consisten en α -hélices en cada proteína que se unen entre sí paralelamente a través de interacciones hidrofóbicas entre los residuos de leucina regularmente espaciados en cada α -hélice proyectada en las cadenas peptídicas adyacentes. Debido a su ajustado empaquetamiento molecular, las cremalleras de leucina proveen uniones estables en el caso de complejos multiprotéicos (por ej. el heterodímero Fos/Jun y su unión al DNA), aunque todos los dominios de este tipo no se unen de modo idéntico debido a los residuos no-leucina en la α -hélice reduciendo el empaquetamiento molecular y en consecuencia, la fuerza de la interacción.

Los dominios homólogos Src (*Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src*), SH2 (**S**rc **H**omology 2) y SH3 (**S**rc **H**omology 3), son ejemplos de dominios de unión transitorios que unen secuencias de péptidos cortos y se encuentran comúnmente en proteínas involucradas en la señalización. El dominio SH2 reconoce secuencias peptídicas que poseen residuos de tirosina fosforilados, comúnmente indicativos de activación proteica. El dominio SH2 juega un rol fundamental en la señalización de factores de crecimiento. La fosforilación de residuos de tirosina en el receptor luego de la unión del ligando recluta efectores *downstream* que reconocen estos residuos mediante sus dominios SH2. Los dominios SH3 reconocen secuencias peptídicas ricas en prolina y son comúnmente usados por quinasas, fosfolipasas y GTPasas para identificar proteínas blanco. Aunque tanto SH2 como SH3 generalmente se unen a estos motivos, la especificidad en las distintas interacciones proteicas está dada por los aminoácidos vecinos a los respectivos motivos.

Más allá de las diferencias entre los distintos dominios y las especificidades de ligando; todas las interacciones implican la habilidad de un dominio de

interacción plegado de reconocer un motivo particular en otro péptido. En este punto cabe comentar dos características importantes de los dominios de interacción: su relativa versatilidad, y el hecho que frecuentemente varios dominios de interacción diferentes se encuentran unidos covalentemente en una misma cadena polipeptídica, generando una proteína que puede mediar múltiples IPP distintas.

Efectos biológicos de las IPP.

El resultado de 2 o más proteínas que interactúan con un objetivo funcional puede demostrarse de diversos modos. Los efectos medibles de las interacciones entre proteínas se pueden resumir del siguiente modo:

- Alterar las propiedades cinéticas de las enzimas, que puede ser el resultado de cambios sutiles en la unión al sustrato o efectos alostéricos.
- Permitir canalizar un sustrato mediante su movimiento a través de dominios o subunidades, resultando en un producto final.
- Crear un nuevo sitio de unión, típicamente para pequeñas moléculas efectoras.
- Inactivar o destruir una proteína.
- Cambiar la especificidad de la proteína por su sustrato a través de su interacción con diferentes compañeros de unión, por ejemplo, exhibiendo una nueva función que ninguna proteína evidencia sola.
- Actuar de modo regulatorio en un evento *upstream* o *downstream*.

Métodos experimentales para el análisis de IPP: niveles de confianza.

Los métodos experimentales disponibles para detectar interacciones entre las proteínas tienen distintos niveles de resolución (Tabla 11.1) y pueden clasificarse en cuatro categorías. La primera categoría comprende el análisis atómico, donde la interacción es detectada por métodos muy sensibles como la

difracción de rayos-X que aporta información específica sobre los átomos y residuos que participan en la interacción. La segunda categoría agrupa a los métodos que detectan la interacción de forma directa, por ejemplo, experimentos de doble-híbrido y mediciones por SPR (del inglés *Surface Plasmon Resonance*). La tercera categoría agrupa a los métodos de detección de complejos mediante técnicas de inmunoprecipitación o de espectrometría de masas. La cuarta categoría comprende bioensayos realizados a escala celular, por ejemplo, la proliferación celular estimulada por la interacción ligando-receptor. La segunda y tercera categorías, a diferencia de la primera, indican cuales proteínas están formando parte del complejo en un instante de tiempo pero no revelan el detalle químico de la interacción (Torre Russis, 2003). Algunos métodos experimentales abarcan más de un nivel de resolución como se observa en la Tabla 11.1.

Método	Nivel de resolución			
	Atómico	Directo	Complejos	Celular
Rayos X y RMN	X	X		
Ensayos de competencia		X		
ELISA		X	X	
Ensayos de retardación en gel		X	X	
Y2H		X	X	
Cromatografía de afinidad (Pull Down)		X	X	
SPR		X	X	
Micro-arreglo de proteínas		X	X	
Resonancia paramagnética electrónica	X	X	X	
Cromatografía de filtración por gel		X	X	
Espectrometría de masas		X	X	
Enlazamiento molecular (crosslinking)		X	X	
Co-inmunoprecipitación		X	X	
Co-sedimentación		X	X	
Sedimentación en gradiente de sacarosa		X	X	
Co-purificación			X	
Microscopía electrónica			X	
Inmunofluorescencia				X
Inmunolocalización				X
Inmunotinción				X
FRET	X	X	X	X
Ensayo de bloqueo con Ac. monoclonales			X	X
Ensayos de adhesión				X
Knock-out				X
Co-expresión transitoria				X

Tabla 11.1. Con una cruz (X) se indican los niveles de resolución de cada uno de los métodos de análisis de IPP.

A lo largo del presente capítulo sólo detallaremos algunas de las técnicas experimentales usadas al momento de realizar un ensayo de *screening* de IPP, y algunas técnicas de confirmación *in vivo*. Nos pareció importante mostrar la presente tabla dado que realiza una enumeración bastante completa de la multiplicidad de técnicas disponibles para el estudio de IPP desde diversos puntos de vista.

11.1. Estudio *in silico* de interacciones proteína-proteína

Bases de datos sobre interacciones entre proteínas.

Para documentar y describir las interacciones entre proteínas, se ha desarrollado un grupo de bases de datos que incluyen toda la información obtenida por los diferentes métodos experimentales así como la información publicada en la literatura científica. A continuación se expone una revisión acotada de algunas de las bases de datos disponibles, centrandó la atención en el tipo de datos que contienen y cómo acceder a ellas. Es importante conocer la existencia de estas herramientas al momento de adentrarse en el estudio de las IPP de un determinado sistema.

DIP (Database of Interacting Proteins), <http://dip.doe-mbi.ucla.edu>. Documenta interacciones moleculares, proteína-proteína, determinadas experimentalmente por los métodos de doble-híbrido, inmunoprecipitación, ensayos de bloqueo con anticuerpos monoclonales y anotaciones extraídas de la literatura científica, entre otros. DIP está implementada como una base de datos relacional formada por cuatro tablas. Una primera con información sobre las proteínas, una segunda sobre interacciones proteína-proteína, una tercera que describe detalles sobre los experimentos, y la cuarta tabla contiene la lista de todas las referencias en Medline. DIP permite la representación visual de las interacciones así como navegar a través de la red de interacciones proteicas mediante una interfase WWW (Xenarios, 2001).

BIND (Biomolecular Interaction Network Database), <http://bind.ca>. Documenta interacciones moleculares que incluyen proteína-proteína, proteína-RNA, proteína-DNA, proteína-moléculas pequeñas, complejos moleculares, y vías metabólicas. Los datos experimentales obtenidos por doble-híbrido, espectrometría de masas, cristalografía, bibliotecas de fagos, y las anotaciones complementarias se encuentran almacenadas en forma de objetos en el formato ASN.1 (Abstract Syntax Notation.1; <http://www.oss.com/asn1/index.html>), utilizado por el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI), y pueden ser interrogados a través de una interfase WWW (Bader, 2003).

InterDom (Database of interacting domains), <http://InterDom.lit.org.sg>. InterDom combina datos sobre fusiones de dominios, interacciones entre proteínas, complejos proteicos, e información de la literatura científica. Esta base de datos es una compilación de interacciones tentativas entre dominios de proteínas, obtenidas por métodos teóricos, que puede ser utilizada para la anotación y validación “*in silico*” de las interacciones detectadas experimentalmente. La estrategia fundamental es utilizar múltiples métodos teóricos y datos experimentales independientes, para predecir interacciones entre dominios de proteínas y asignar mayor puntuación a aquellas donde coincida la mayor cantidad de evidencias (Ng, 2003).

KDBI (Kinetic Data of Bio-molecular Interactions database), <http://xin.cz3.nus.edu.sg/group/kdbi/kdbi.asp>. Documenta datos experimentales sobre la cinética de interacción entre proteínas, proteína-ARN, proteína-ADN, proteína-ligando, ARN-ligando, ADN-ligando, y reacciones descritas en la literatura. Posee enlaces a referencias en MEDLINE y a estructuras 3D depositadas en las bases de datos PDB y NDB. Los parámetros cinéticos anotados incluyen constantes de asociación, disociación, orden de la reacción, constantes de inhibición, de afinidad, constante catalítica, todos ellos pueden ser interrogados mediante una interfase WWW (Ji, 2003).

MINT (Molecular INteraction database), <http://cbm.bio.uniroma2.it/mint/index.html>. MINT contiene información sobre complejos moleculares, interacción entre dominios, modificaciones enzimáticas

de las proteínas interactuantes, constantes de unión y otros datos cinéticos. Toda la información contenida en MINT es curada de manera manual por expertos (Zanzoni, 2002).

WISTdb (Worm Interaction Sequence Tag database). Contiene el mapa de las interacciones proteicas del nematodo *C. elegans* obtenidas por doble-híbrido (Stein, 1999).

FlyNets, http://gifts.univ-mrs.fr/GIFTS_home_page.html. Contiene las interacciones proteína-ADN, proteína-ARN y proteína-proteína, descritas en la mosca *D. melanogaster* (Sanchez, 1999).

MYGD (MIPS Yeast Genome Database), <http://mips.gsf.de>. MYGD contiene información detallada sobre el genoma de *S. cerevisiae*, y las secuencias aminoacídicas codificadas. Además, contiene información complementaria sobre la función de los genes y proteínas, complejos proteicos, fenotipo de los mutantes, interacciones proteína-proteína, y vías metabólicas (Mewes, 2002).

BioKnowledge Library, <http://www.proteome.com>. BioKnowledge es una base de datos relacional que contiene información específica sobre las proteínas. La información es recopilada de la literatura científica e incluye: función bioquímica, función y localización celular, interacciones genéticas y con otras proteínas, regulación, dominios y patrones de secuencia característicos. Todas estas características; concernientes a los organismos modelos *S. cerevisiae*, *C. elegans*, *Schizosaccharomyces pombe*; y otros organismos como *Candida albicans* y *Homo sapiens*. BioKnowledge es curada manualmente por expertos, y la información sobre cada proteína está organizada en formato HTML, con una página WWW para cada molécula (Costanzo, 2001).

PIM, <http://www.hybrigenics.fr>. Contiene los resultados del análisis por doble-híbrido del genoma de *H. pylori* (Rain, 2001).

INTERACT, <http://www.cl.cam.ac.uk/~wb204/GD99/>. Es una base de datos orientada a objetos, que contiene información sobre las interacciones entre proteínas descritas para los organismos *S. cerevisiae*, *C. elegans*, Human, y *Escherichia coli*. Cada interacción es representada como un grafo, con las proteínas individuales en los vértices y la interacción entre pares de ellas formando los bordes. La información contenida en esta base de datos puede

ser interrogada a través de una interfase WWW, que incluye lenguaje para modelado en realidad virtual (VRML; del inglés “Virtual Reality Modelling Language”) (Eilbeck, 1999).

Métodos teóricos de predicción de interacciones entre proteínas.

En el análisis funcional de un genoma, un paso crítico es la comprensión de las interacciones entre las proteínas codificadas. Por ello se ha desarrollado un conjunto de métodos teóricos para abordar el problema de la predicción de interacciones entre proteínas a partir del análisis de sus secuencias aminoacídicas, de información de los genomas y de datos cristalográficos de complejos macromoleculares. De manera general, todos los investigadores utilizan como hipótesis que si se conoce el modo de interacción entre dos proteínas o dos dominios de proteínas, cualquier interacción que pueda ocurrir entre proteínas homólogas involucra contactos del mismo tipo. Sin embargo, existen casos en los que proteínas homólogas poseen diferentes modos de interacción. Por ejemplo, la enzima nucleótido difosfato quinasa se presenta en la naturaleza en forma de hexámero o tetrámero dependiendo de la especie. Las sialidasas virales forman tetrámeros, mientras que las bacterianas y de tripanosoma aparecen como monómeros de proteínas multidominio.

El reconocimiento proteína-proteína está determinado por las propiedades físicas y químicas de la interfase, la cual ha sido caracterizada en términos de su geometría (tamaño, forma y complementariedad) y de su naturaleza química (tipo de grupo químico y aminoácido, hidrofobicidad, interacciones electrostáticas y enlaces por puente de hidrógeno). El análisis de las superficies de contacto entre proteínas o interfase tuvo sus inicios con el trabajo de Chothia y Janin en 1975. A partir de ese año y hasta el 2002, han aparecido diferentes trabajos sobre el tema, de varios autores. De estos trabajos se ha derivado un conjunto de reglas útiles para los métodos de predicción de interacción proteína-proteína. La utilización de los métodos de acoplamiento proteína-proteína, para predecir las regiones de interacción y la

estructura de complejos proteicos, es un tema que merece una descripción detallada y se aleja del objetivo del presente capítulo.

Varios investigadores han utilizado la información contenida en los genomas (la fusión de dominios, la conservación del orden génico, la distribución filogenética), para predecir interacciones entre proteínas. Si dos cadenas polipeptídicas son subunidades de una misma proteína o complejo, sus genes están frecuentemente adyacentes en el genoma, y se expresan y regulan de manera conjunta al nivel de ADN.

El método desarrollado por Pellegrini *et al.* (Pellegrini, 1999), denominado perfiles filogenéticos (del inglés “*phylogenetic profiles*”), se basa en la coevolución de proteínas que interactúan, dicho de otra manera presencia-ausencia de genes ortólogos en genomas diferentes. Si el patrón de proteínas ortólogas (presencia-ausencia) se conserva en organismos de la misma especie, se debe probablemente a que una de las proteínas no puede ejercer su función sin la otra. Huynen *et al.* (Huynen, 2000) aplicaron este método al genoma de *Mycoplasma genitalium*, prediciendo 34% de los pares como interactuantes y un 29% adicional pertenecientes a la misma vía metabólica o proceso funcional. Marcotte *et al.* (Marcotte, 1999) y Enright *et al.* (Enright, 1999) desarrollaron métodos basados en la fusión de dominios (del inglés “*fused domain approach*”). Los métodos utilizan la hipótesis de que cuando dos proteínas A y B contienen dominios homólogos a dominios diferentes de una tercera proteína en otro organismo, pero A y B no son homólogas entre sí, entonces A y B interactúan. El método desarrollado por Marcotte y colaboradores (Marcotte, 1999), conocido como “*Rosetta stone method*”, utiliza la información anotada en las bases de datos Pfam (Bateman, 2002) y ProDom (Corpet, 2000) para determinar homología entre dominios de proteínas individuales.

La limitación de los métodos descritos radica en que sólo son aplicables a genomas secuenciados completamente, para tener la certeza de la ausencia de genes específicos; por otro lado son aplicables solamente en bacterias, donde el orden de los genes es una característica relevante; y por último dependen de la calidad del alineamiento múltiple de las proteínas en estudio.

Gallet y colaboradores (Gallet, 2000) desarrollaron un método simple de predicción que identifica secuencias de aminoácidos, denominadas dominios de unión al receptor, basado en el análisis de sus propiedades hidrofóbicas. Las secuencias de aminoácidos más propensas a interactuar, se obtuvieron de un análisis estadístico de las frecuencias de aparición de los aminoácidos en sitios de interacción conocidos. El método identificó el 95% de los residuos involucrados en la interacción ADN-proteína y el 83% en los dominios de unión a calcio.

Bock y Gough (Bock, 2001) utilizan la información contenida en 70 heterocomplejos extraídos de la base de datos PDB, para entrenar un algoritmo de clasificación denominado “*Support Vector Machine (SVM)*” capaz de reconocer y predecir interacciones, basado solamente en la identidad de secuencia de aminoácidos. Wojcik y Schächter (Wojcik, 2001) combinan métodos de búsqueda de similitud de secuencia aminoacídica y agrupamiento de secuencias (del inglés “*clustering*”) con la información contenida en las bases de datos acerca de dominios en proteínas que interactúan, para predecir mapas de interacción proteína-proteína.

Pazos y Valencia (Pazos, 2001; Pazos, 2002) combinan información de secuencias aminoacídicas e información de genomas para calcular las distancias evolutivas entre proteínas que pertenecen a familias relacionadas y para calcular la correlación de mutaciones entre posiciones de un alineamiento múltiple de secuencias. Esta idea se basa en observaciones previas que indican una correspondencia entre los árboles filogenéticos de proteínas asociadas.

Lu *et al.* (Lu, 2002) desarrollaron un método denominado MULTIPROSPECTOR que extiende la metodología de compatibilidad secuencia-estructura (del inglés “*threading*”) a la predicción de estructura cuaternaria, y que consta de dos fases. Una primera fase ejecuta el método de “threading” PROSPECTOR, para generar un conjunto de estructuras 3D potenciales de la proteína en estudio. En una segunda fase, re-evalúan la compatibilidad de las estructuras 3D generadas con las estructuras molde que forman parte de complejos cristalográficos determinadas experimentalmente.

Una lista de métodos de predicción con sitios WWW, se muestra a continuación:

- <http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/PP/server/>
- maine.ebi.ac.uk:8000/services/allfuse/
- <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>
- gpcr.biocomp.unibo.it/predictors
- www.russell.embl.de/interprets
- <http://cbm.bio.uniroma2.it/iSPOT>

El objetivo de esta sección del capítulo fue pensado para nombrar y explicar brevemente algunas de las múltiples herramientas actualmente existentes, bases datos y métodos de predicción de IPP, que complementan las metodologías experimentales desarrolladas. La sumatoria de la información proveniente de múltiples fuentes tiene como finalidad colaborar para completar las redes de interacción de proteínas en los diversos sistemas de estudio.

11.2. Técnicas de screening.

Sistema de doble híbrido en levaduras: “Y2H (Yeast two Hybrid) System”.

Esta técnica fue primero descrita en 1989 por Fields y Song (Fields, 2009). Durante estos años se ha enriquecido y dado lugar a diversas variantes. Se trata de una técnica ampliamente utilizada ya que permite de una forma relativamente simple, descubrir y comprobar interacciones entre proteínas en un entorno más cercano a las condiciones fisiológicas, a diferencia de ensayos *in vitro*. El fundamento de la técnica implica dos dominios funcionales de un factor de transcripción que pueden ser separados físicamente, los cuales en proximidad uno con el otro gracias a proteínas interactuantes, cada una fusionada a uno de los dominios del factor de transcripción, reconstituyen la capacidad de éste de regular la expresión génica (activando genes reporteros

que varían de acuerdo al sistema y la cepa de levadura utilizados) (Westermarck, 2013).

Aplicaciones:

- Identificación de nuevas proteínas interactuantes
- Confirmación de proteínas candidatas
- Reconocimiento de dominios de interacción dentro de una proteína

Este sistema aprovecha la flexibilidad de los factores de transcripción de levaduras: Gal4 y LexA. El factor de transcripción Gal4 se encuentra dividido en dos proteínas: DNA-BD (dominio de unión de ADN) y DNA-AD (dominio de activación de ADN). Estos dos dominios son incapaces de interactuar entre sí o de activar la expresión génica por sí solos. Los mismos se fusionan por separado a dos plásmidos diferentes (Gietz, 1997):

1) Plásmido para proteína cebo (*bait*) que contiene gen para la expresión de triptófano (permitirá una posterior selección de levaduras en un medio carente de este aminoácido). En éste se insertará en marco la construcción *DNA-BD:proteína bait*.

2) Plásmido para proteína presa (*prey*) que contiene gen para la expresión de leucina (permitirá una posterior selección de levaduras en un medio carente de este aminoácido). En éste se insertará en marco la construcción *DNA-AD:proteína prey*. Las proteínas *prey* en un ensayo de tamizaje (*screening*) se incorporarán como una biblioteca de cDNA, la cual se preparará a partir de ARNm del organismo, línea celular o tejido de interés a probar. Cuando se trata de un ensayo de confirmación, la proteína *prey* será el cDNA de aquella identificada por experimentos previos como candidata.

En la Figura 11.1 se muestra brevemente la metodología de screening Y2H. Al comienzo se tienen dos cepas haploides de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, cada una contiene uno de los plásmidos mencionados anteriormente. Se cultivan en medios carentes de triptófano o leucina, respectivamente. Luego se mezclan colonias de los dos tipos de cepas y se cultivan en medio sin triptófano ni leucina. Producto del apareamiento entre ambas cepas se generarán zigotos diploides capaces de crecer en el medio que carezca de ambos aminoácidos. En las células diploides se expresará

tanto DNA-BD: proteína *bait* como DNA-AD: proteína *prey*. Si las proteínas bait y prey interactúan, la construcción DNA-BD:*bait* unida a la secuencia de activación *upstream* (UAS) del promotor de GAL1 se fusionará con la construcción DNA-AD:*prey* y se estimulará la transcripción de genes reporteros *downstream* del promotor (por ej.: HIS3, lacZ, etc.). Esto permitirá distinguir las colonias que presenten interacción de proteínas *bait:prey* a través de medios selectivos, por ejemplo carentes de histidina o con actividad beta galactosidasa volviéndose azules en presencia de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-galactopiranosido (X-Gal) (Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System User Manual Clontech, 2010).

Sistema de doble híbrido en levadura

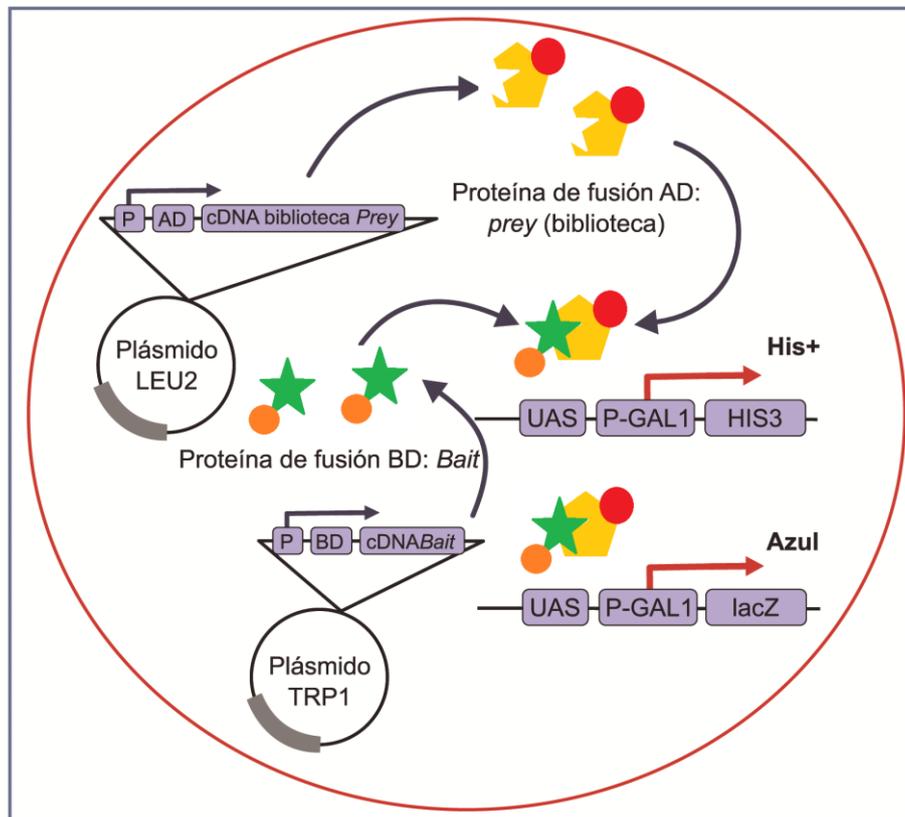


Figura 11.1. Diagrama del Sistema de Doble Híbrido en levadura. P: promotor, AD: dominio de activación, BD: dominio de unión, UAS: secuencia de activación río arriba, lacZ/HIS3: genes reporteros, Plásmido LEU2: para biblioteca prey con expresión de leucina, Plásmido TRP1: para proteína bait con expresión de triptófano.

Se deben incluir en el ensayo:

1) Control positivo: dos construcciones (DNA-BD:proteína X y DNA-AD:proteína Y) cuyas proteínas es sabido por literatura que interactúan. Deben dar colonias positivas en medios selectivos y activación de genes reporteros.

2) Control negativo: dos construcciones (DNA-BD:proteína X y DNA-AD:proteína Z) que es sabido por literatura que no interactúan. Deben dar negativo para la activación de genes reporteros.

Una vez identificada una proteína candidata, se puede repetir el ensayo realizando la fusión de su cDNA a DNA-AD. También es posible identificar cuál es el dominio de interacción con la proteína *bait* mediante mutaciones puntuales y deleciones en el cDNA de la proteína *prey* identificada.

Tipos de falsos positivos posibles (Gietz, 1997):

1) Productos de fusión DNA-AD:*prey* que activen la transcripción de genes reporteros sin interactuar con DNA-BD:*bait*.

2) Activación de genes reporteros en presencia de cualquier fusión DNA-BD que no es con la proteína *bait* de interés.

3) Activación de genes reporteros en presencia de un vector con DNA-BD vacío.

Debido a que puede existir la presencia de falsos positivos los resultados obtenidos mediante este screening deben ser complementados y confirmados por otras técnicas como: ensayos de *pull-down*, *Mammalian Two Hybrid*, *Yeast three Hybrid* (para complejos ternarios), Coimmunoprecipitación, FRET-FLIM, SPR, etc.

Limitaciones de la técnica y soluciones posibles (Westermarck, 2013):

1) Las levaduras no expresan per se tirosina kinasas (Tyr-K), por lo que en principio no se podría aplicar a proteínas que requieran fosforilaciones. Esto se puede solucionar generando la expresión ectópica de Tyr-K en levaduras.

2) Las proteínas utilizadas como *bait* no pueden exhibir actividad de transactivación en el sistema de genes reporteros.

3) La interacción tiene lugar en el núcleo con lo que, por ej., proteínas integrales de membrana no pueden ser estudiadas. Existen para solucionar este inconveniente técnicas como el *Split-ubiquitin system* que modifica el sistema de doble híbrido en levadura. Brevemente la molécula de ubiquitina se

divide en dos mitades y estas se fusionan a las proteínas *bait*:factor de transcripción y *prey*. Si interactúan, la molécula de ubiquitina se reconstituye, una deubiquitinasa en la levadura corta el fragmento de ubiquitina:factor de transcripción de la proteína *bait* y ese fragmento puede activar en el núcleo la transcripción de genes reporteros.

Ensayos de pull down.

Implica métodos *in vitro* utilizados para determinar interacciones físicas entre dos o más proteínas. Los ensayos de *pull down* se utilizan tanto para *confirmación* como para *identificar* nuevas proteínas interactuantes. El requerimiento mínimo para estos ensayos es la disponibilidad de una proteína *bait* purificada y, en general, marcada. La cual se utilizará para capturar proteínas interactuantes (*prey*) (Thermo Scientific Pierce Protein Interaction Technical Handbook Version 2. 2010).

Los ensayos *pull down* son una forma de purificación por afinidad y son muy similares a la inmunoprecipitación (ver más adelante), excepto que una proteína *bait* es utilizada en vez de un anticuerpo. Pueden proveer una mayor resolución y selectividad que otros ensayos basados en anticuerpos.

La proteína *bait* marcada es capturada en una matriz por la cual es afín, lo cual genera un soporte de afinidad secundario para purificar otras proteínas que interactúan con la proteína *bait*.

Para ensayos de confirmación se pueden utilizar sistemas de expresión en células de diversos orígenes, proteínas purificadas, productos de reacciones de transcripción/traducción.

Las fuentes proteicas para *screening* de proteínas interactuantes se encuentran generalmente en una mezcla compleja considerada como el ambiente nativo de la proteína *bait*. Cualquier lisado celular o fluido biológico en donde la proteína *bait* es normalmente expresada, constituye una fuente apropiada de proteínas *prey*.

La marca de la proteína *bait* puede ser generada por marcación *in vitro* de proteína purificada (por ej. sulfo-NHS-Biotina) o por expresión de proteínas recombinantes fusionadas a una etiqueta (por ej. oligoHis/poliHis o glutatión S-transferasa, GST).

Aquellas *interacciones estables* entre proteínas son más simples de aislar por métodos físicos como estos ensayos dado que el complejo proteico no se desensambla con el tiempo (poseen una baja constante de disociación). A ese tipo de complejos se los puede someter a lavados con *buffers* (soluciones amortiguadoras) de elevada fuerza iónica con el fin de eliminar falsos positivos por interacciones inespecíficas. Dependiendo de la constante de disociación que presente el complejo, se pueden ajustar las condiciones del ensayo (como el pH, concentración de sales, etc.).

En cambio las proteínas de *interacciones transitorias o lábiles* son más difíciles de identificar utilizando métodos físicos. Esto se debe a que el complejo puede disociarse durante el ensayo. Como en general se dan en proteínas de transporte y enzimas, suelen requerir la incorporación de cofactores y sustratos energéticos. Este tipo de interacciones pueden ser fortalecidas con la incorporación de *crosslinkers* (ver más adelante) que unen covalentemente el complejo previo al ensayo de *pull down*.

Para identificar una nueva interacción, la proteína *prey* desconocida debe estar presente en cantidades suficientes para permitir la visualización de la interacción por el método de detección elegido. Lisados celulares radiomarcados con ³⁵S constituyen una fuente frecuentemente utilizada de proteína para estos ensayos.

Por otro lado se puede eluir selectivamente las proteínas *prey*, manteniendo la proteína *bait* inmovilizada. Se puede lograr mediante un gradiente creciente de concentración de sales o disminuyendo el pH. Mediante esta técnica se evita la desnaturalización proteica y puede brindar información sobre la fuerza iónica relativa.

Las muestras eluidas pueden analizarse mediante SDS-PAGE y Western Blot o autorradiografía. Para luego aislar la banda de interés del gel de poliacrilamida

y realizar sobre esa muestra una *identificación por espectrometría de masa* (MS).

Controles de los ensayos pull-down (Thermo Scientific Pierce Protein Interaction Technical Handbook Version 2. 2010):

Control negativo: soporte de afinidad sin tratar con proteína bait. Sirve para identificar falsos positivos debido a uniones inespecíficas entre el soporte y las proteínas de la muestra.

Control sin muestra: soporte de afinidad tratado con proteína *bait*, sin incorporar la muestra (proteínas *prey*). Elimina falsos positivos por unión inespecífica a la marca de la proteína *bait*. Funciona también como control positivo para verificar que el soporte captura adecuadamente la proteína *bait* marcada.

Dominio SH2 (del inglés Src Homology 2)

Está técnica permite la medición de eventos transitorios como los estados de fosforilación y señalización celular. A diferencia de la co-inmunoprecipitación (tratada más adelante), es independiente de los anticuerpos que en el caso de fosfoproteínas suelen presentar una elevada señal de fondo y baja recuperación de proteínas.

SH2 es un dominio de proteínas estructuralmente muy conservado en la oncoproteína Src y en muchas otras proteínas críticas para la señalización celular desde receptores asociados a tirosina quinasas. Los dominios SH2 sirven para separar proteínas fosforiladas de mezclas complejas como lisados celulares. Reconocen y unen residuos específicos de tirosina fosforilada (pY) presentes en muchas proteínas de señalización. Estas interacciones, SH2-pY, son cruciales para la transmisión de la señal desde el receptor hacia el resto de las moléculas de la vía (Thermo Scientific Pierce Protein Interaction Technical Handbook Version 2. 2010).

Se encuentran conformados por alrededor de 100 aminoácidos y su unión a las proteínas blanco depende de la fosforilación de residuos específicos de tirosina en secuencias aminoacídicas consenso.

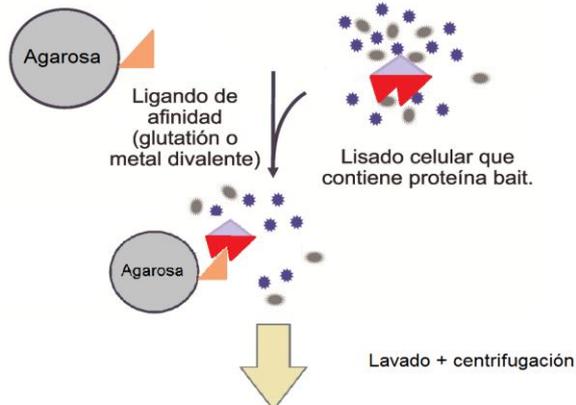
Fusión a GST, Biotina y poli-His

Esta técnica utiliza la afinidad de *GST* (glutati6n S transferasa) por el glutati6n (unido a un soporte o matriz) para purificar prote6nas interactuantes de una mezcla proteica. La prote6na *bait* fusionada a GST es expresada y purificada de bacterias. La misma es incubada junto con la mezcla proteica a probar ya sea en el formato *batch* (seguida de centrifugaci6n) o columna (con posterior eluci6n). El complejo puede ser eluido de la matriz con glutati6n libre (no unido, en soluci6n) o con buffer en condiciones reductoras y desnaturizantes (ver Figura 11.2). Es una t6cnica especialmente 6til para probar interacciones en soluci6n que pueden no ser detectadas en un ensayo como Far Western Blot, realizado sobre membranas de nitrocelulosa o PVDF.

Las prote6nas marcadas con *poli-histidina* (6 residuos Histidina) se unen a una resina de agarosa derivatizada con 6cido nitrilo triac6tico (NTA-Agarosa por sus siglas en ingl6s) cargada con iones divalentes (n6quel, cobalto, zinc, cobre, hierro). Las prote6nas contaminantes pueden ser removidas con lavados apropiados, seg6n las condiciones del ensayo. La prote6na marcada podr6 luego ser eluida mediante un quelante soluble (Imidazol o EDTA, siendo el primero m6s selectivo). Generalmente la marca de 6-His se coloca por biolog6a molecular en el extremo N- o C-terminal, siempre y cuando sea un sitio expuesto y flexible. Se pueden incorporar en esta marca sitios de corte 6nicos para una proteasa, pudiendo eliminarse la cola de His luego de la eluci6n o puede utilizarse como herramienta para despegar la prote6na de la matriz. Una prote6na que interacciona con aquella marcada con poli-His puede ser eluida selectivamente siempre que las prote6nas contaminantes que se unen a la matriz no se liberen de la resina bajo esas condiciones de eluci6n (ver Figura 11.2).

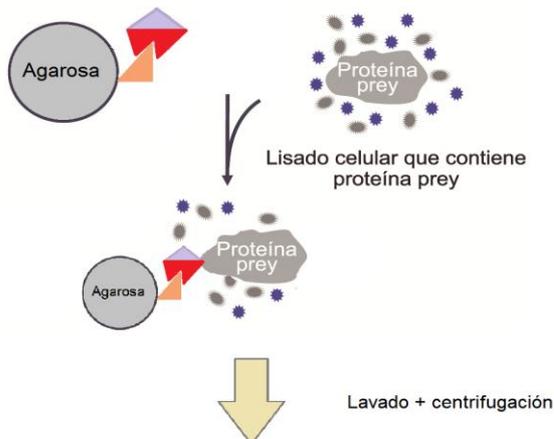
En el caso de *proteínas biotiniladas*, cuya marca es también lograda por biología molecular, se unen por afinidad a una matriz que contiene estreptavidina. Luego se coloca una solución que contiene potencialmente proteínas interactuantes con la proteína biotinilada. Las proteínas *prey* son eluidas mediante una solución de bajo pH.

Inmovilizar la proteína de fusión bait con GST o poliHis del lisado celular.

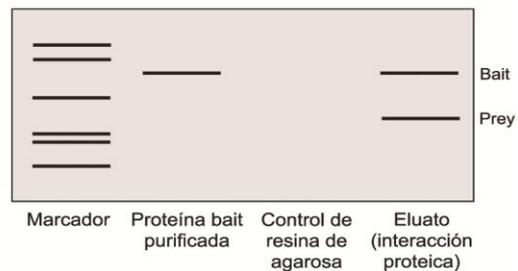


Ensayo de *Pull-Down* utilizando GST o PoliHis

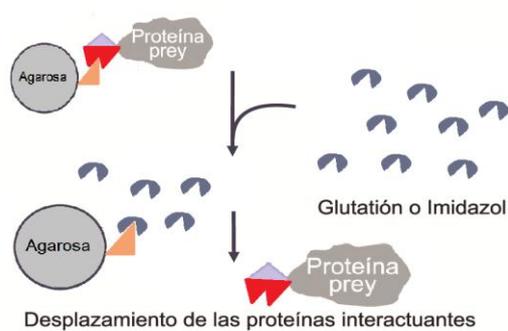
Unir la proteína prey a la proteína bait inmovilizada



Analizar la interacción proteína-proteína mediante SDS-PAGE.



Eluir complejos de interacción proteína-proteína.



= GST o polihistidina

Figura 11.2. Esquema del sistema de pull down utilizando una proteína bait marcada con GST o polihistidina.

En general todos estos métodos requieren del análisis por *espectrometría de masa* con el fin de descubrir cuáles son las proteínas que fueron eluidas en cada tipo de ensayo de pull-down.

Ventajas respecto al Far Western Blot (descrito a lo largo del capítulo): La proteína *bait* es incubada con sus potenciales proteínas interactuantes en un ambiente más cercano a las condiciones nativas, por lo tanto aumentando la eficiencia de las interacciones (Thermo Scientific Pierce Protein Interaction Technical Handbook Version 2. 2010).

Crosslinking (unión covalente por compuestos químicos).

En los sistemas biológicos, cuando dos o más proteínas tienen afinidad entre sí se produce un acercamiento y unión entre las mismas. En general estas uniones son transitorias y ocurren brevemente para promover un evento de señalización o reacción metabólica dada. Con la finalidad de poder estudiar estos complejos proteicos se busca capturarlos o congelarlos para estudiar cuales son las proteínas involucradas y cómo interactúan. Estas uniones creadas artificialmente en el laboratorio son de tipo covalente y garantizan la estabilidad del complejo para permitir su aislamiento y caracterización.

La reacción que llevan a cabo los *crosslinkers* es sobre grupos nucleofílicos ya sea en los extremos o en la cadena lateral. Con sólo pocas excepciones, son las cadenas laterales de los aminoácidos polares ionizables (arginina, tirosina, lisina, cisteína, histidina, ácido aspártico y glutámico) las que son susceptibles al ataque

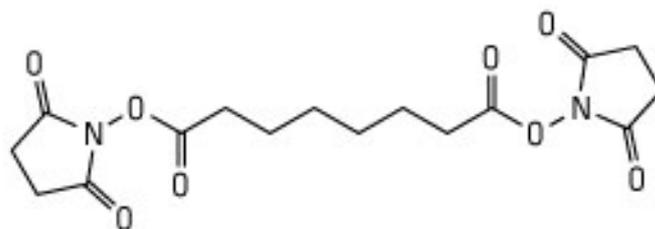
de los *crosslinkers*. No todos los residuos de este tipo son igualmente reactivos, sino que depende de la localización del mismo en la proteína (accesibilidad, polaridad, interacciones con otros residuos o con el solvente, etc.). Como consecuencia, el *crosslinking* debe ser considerado como un procedimiento empírico, debido a las diferencias en reactividad de los grupos involucrados (Golemis, 2002).

Los más comúnmente utilizados son bifuncionales ya que contienen dos grupos reactivos que reaccionan con dos cadenas laterales para generar un complejo unido covalentemente. La parte que funciona como puente entre dichos grupos reactivos se le llama espaciador. El mismo delimita la distancia entre los grupos reactivos y confiere otras propiedades (por ej. un disulfuro escindible). Además el espaciador contribuye a la geometría y a la solubilidad del *crosslinker*. Este brazo espaciador puede ir entre cero (por ej. carbodiimidas: EDC) y varios átomos de longitud (por ejemplo: DSS, ABH, etc.). Los compuestos homobifuncionales (Figura 11.3) contienen grupos funcionales idénticos a ambos lados del espaciador mientras que en los heterobifuncionales son diferentes. Estos últimos tienen ciertas ventajas como permitir el ataque a distintos grupos nucleofílicos proteicos y permitir dividir la etapa de *crosslinking* en dos pasos separados, en diferentes condiciones. Un ejemplo de ellos son los *crosslinkers* fotoactivables que combinan reactividad química con grupos que se activan frente a la exposición lumínica de longitud de onda adecuada (por ej. NHS-Diazirina). Estos últimos limitan los artefactos generados por uniones inespecíficas pero disminuyen el rendimiento, además pueden reaccionar con el solvente, “quencheando” el intermediario fotoreactivo. A su vez existen *crosslinkers* con marca isotópica que incorporan deuterio en posiciones determinadas lo cual permite marcar las proteínas además de unirlos covalentemente. De esta manera se simplifica la identificación por MS. Los *crosslinkers* son utilizados generalmente para dos fines en la deducción de las interacciones proteicas (Phizicky, 1995):

- 1) Para identificar la estructura de un complejo aislado.
- 2) Para detectar proteínas interactuantes en extractos celulares, células o purificados parciales.

En cuanto a la determinación de la arquitectura del complejo aislado, se utilizan *crosslinkers* del tipo RSSR' que contienen un enlace disulfuro escindible por agentes reductores. Se lo deja actuar formando un aducto P-RSSR'-P' (siendo P y P' las proteínas del complejo), con posterior fraccionamiento por electroforesis en SDS-PAGE sin agentes reductores. Luego se corre una segunda dimensión del gel previo tratamiento con agentes reductores que

corten el enlace S-S. Aquellas especies no unidas por el *crosslinker* no modifican su peso molecular (PM) respecto a la primer dimensión, mientras que las que fueron unidas por el *crosslinker* darán bandas de menor PM correspondientes a las de las especies P y P' puras. Cuando en la detección se utilizan anticuerpos específicos para las especies involucradas se podría evitar la segunda dimensión del gel.



DSS
Disuccinimidil Suberato
PM 368.34
Espaciador 11.4 Å

Figura 11.3. Estructura del DSS como ejemplo de *crosslinker* homobifuncional.

Para la detección de proteínas interactuantes existen dos aproximaciones:

In vivo: Se consigue mediante la utilización de *crosslinkers* hidrofóbicos capaces de atravesar la membrana celular seguido de inmunoprecipitación de la proteína *bait* (lo cual incrementa la sensibilidad de esta última técnica).

In vitro: se basa en la adición de una proteína pura a un sistema proteico complejo al cual se le agrega un *crosslinker* determinado. La posterior detección del complejo se simplifica en gran medida cuando la proteína es marcada antes del *crosslinking*, ya que de esta manera existe sólo una fuente de material marcado para detectar (poliHis, GST, isótopos radiactivos, etc.)

La simple adición de *crosslinkers* homo- o heterobifuncionales a las suspensiones celulares o a sus homogenatos causará la formación de gran cantidad de conjugados proteicos, no todos estarán involucrados en interacción proteica real, algunas simplemente resultan unidas por encontrarse en la vecindad al momento de reaccionar con el *crosslinker*. El desafío de esta

técnica radica en el análisis de los resultados una vez que los complejos han sido aislados.

Coinmunoprecipitación.

El fundamento de esta técnica se basa en la generación de un lisado celular al cual se le agrega anticuerpo, se precipita el antígeno, se lava y las proteínas unidas son eluidas y analizadas por SDS-PAGE y Western Blot. El antígeno utilizado para obtener el anticuerpo puede ser una proteína purificada o un péptido sintético acoplado a un transportador. El anticuerpo puede ser mono- o policlonal. Alternativamente, si la proteína tiene una marca incorporada como c-Myc, GST o poliHis, existen anticuerpos comerciales disponibles para detectarla. Este procedimiento puede realizarse en *batch* o en columna, en ambos casos la resina generalmente contiene proteína A o G, las cuales unen la fracción Fc de anticuerpos tipo IgG (Phizicky, 1995).

La inmunoprecipitación y la coinmunoprecipitación comparten el mismo principio, sin embargo en esta última el anticuerpo al precipitar el antígeno, co-precipita la/s proteína/s interactuante/s con la proteína contra la que está dirigido. Es posible que esta técnica no sea útil cuando el antígeno o proteína *bait* presenta interacciones transitorias con otras proteínas del entorno celular, las cuales serían arrastradas con los lavados previos a la elución final. Es en estos casos que la incorporación de *crosslinkers* sería útil para la captura de complejos transitorios.

Se asume usualmente que las proteínas co-precipitadas están relacionadas en cuanto a su función a nivel celular, pero esto debe ser verificado y demostrado por otros métodos.

Uno de los inconvenientes de esta técnica es que suelen existir interferencias en el análisis del gel producidas por bandas del anticuerpo que se eluye junto con el complejo proteico. Una solución en este sentido es la inmovilización *Directa* a través de los grupos amino superficiales del anticuerpo a un soporte de agarosa activado con N-hidroxi succinimida (NHS). En la técnica *Indirecta*

se utiliza un *crosslinker* como DSS para unir químicamente el anticuerpo a la proteína A o G de la resina. En el mismo sentido si se tiene un anticuerpo biotinilado puede ser unido a una resina de agarosa con estreptavidina inmovilizada. De esta forma el anticuerpo se une fuertemente a la matriz y no es arrastrado en las condiciones de elución del antígeno (Thermo Scientific Pierce Protein Interaction Technical Handbook Version 2. 2010).

En la coimmunoprecipitación tradicional el complejo inmune se forma en solución antes de precipitarlo con proteína A o G inmovilizada. En cambio cuando se utiliza anticuerpo inmovilizado la formación del complejo inmune y su precipitación ocurre en un único paso.

Al momento de analizar los datos obtenidos es importante definir si esta interacción ocurre *in vivo* y qué importancia tiene a nivel celular. Con el fin de verificar la interacción es importante determinar los siguientes ítems (Phizicky, 1995):

- 1) Confirmar que la proteína co-precipitada se obtiene por el anticuerpo contra la proteína bait/antígeno: el suero policlonal no debe poseer clones que unan directamente otras proteínas del extracto celular. Se puede lograr “purificando” el suero al pasarlo por una columna que contenga la proteína *bait* inmovilizada.
- 2) Determinar que el anticuerpo contra la proteína *bait*/antígeno no reconozca directamente a la/s proteína/s *prey*: se puede lograr descartar tal efecto repitiendo el ensayo con un anticuerpo específico para la proteína *prey*, en cuyo caso se debe obtener el mismo complejo *bait:prey*. Esta técnica puede ser utilizada como una herramienta de confirmación.
- 3) ¿La interacción es mediada por una tercera proteína? Será necesario aplicar MS para descubrirlo.
- 4) Determinar si la interacción ocurre en la célula o es un artefacto de la lisis celular: serán necesarios estudios de co-localización y mutagénesis puntual que perturbe el sitio de unión.

Esta técnica presenta las siguientes *ventajas*:

- 1) Detecta interacciones en una mezcla proteica compleja como es un lisado celular crudo.

2) El antígeno/*bait* y las proteínas interactuantes se encuentran en la misma concentración relativa que en la célula.

3) Los complejos se encuentran en su estado natural para la co-precipitación.

4) Las proteínas se encuentran en su estado postraduccionales correspondientes.

A la vez presenta sus *desventajas*:

1) Las proteínas co-precipitadas no necesariamente interactúan directamente, pueden ser parte de complejos mayores.

2) No es tan sensible como otros métodos, por ej. la cromatografía de afinidad a proteína (*pull down*, ver más arriba), debido a que la concentración de antígeno es menor. Esto se puede evitar agregando exceso de antígeno al lisado celular. Otra forma es, como se mencionó previamente, agregando un *crosslinker* en un paso previo a la precipitación.

Far Western Blot.

En el ensayo clásico, una proteína *bait* (marcada o detectable mediante un anticuerpo específico) es utilizada para sondear y detectar la/s proteína/s *prey* en una membrana. La muestra que contiene una mezcla compleja de proteínas es separada por SDS-PAGE o PAGE nativo (colocando un patrón de peso molecular de tipo Rainbow, GE) y luego se transfiere a una membrana. En este formato la/s proteína/s *prey* se vuelve/n accesible/s para ser incubada/s con la proteína *bait*. Luego de la transferencia la membrana es bloqueada y luego se le agrega una solución con proteína *bait* purificada. Un sistema de detección específico para la proteína *bait* es utilizado para identificar las bandas correspondientes (Thermo Scientific Pierce Protein Interaction Technical Handbook Version 2. 2010).

Las proteínas desnaturalizadas pueden no ser capaces de interactuar (falso negativo) o generar interacciones apócrifas (falso positivo). Esto no implica que la identificación de interacciones reales no sea posible sino que deben tomarse recaudos como el uso de controles y una validación apropiada.

El tipo de membrana (por ej. nitrocelulosa o PVDF) utilizado para transferir las proteínas es crítico, debido a que algunas se unen selectiva o preferentemente a un tipo de membrana en particular. La tasa de transferencia proteica es inversamente proporcional a su peso molecular. Para el análisis es esencial que al menos el dominio de interacción de las proteínas en la membrana no esté desnaturalizado. Para lo cual si se desnaturalizó en la transferencia debe ser capaz de plegarse nuevamente para dejar el sitio de interacción intacto. Generalmente un porcentaje significativo de la población de proteínas se recompone luego de la remoción del SDS.

Las interacciones proteicas detectadas dependen de varios factores: la naturaleza de las proteínas, el pH, la concentración de sales y la presencia de ciertos cofactores en la incubación con la proteína *bait*. Algunas interacciones pueden incluso requerir la presencia de otras proteínas. Las condiciones necesarias deben ser mantenidas a lo largo de todo el proceso para preservar la interacción hasta el momento de la detección.

El método de detección puede ser:

- 1) Directo cuando la proteína *bait* tiene marca radiactiva
- 2) Indirecto con un anticuerpo específico para la proteína *bait*
- 3) Indirecto con un anticuerpo contra la marca (GST, poliHis, etc.) de la proteína *bait*
- 4) Indirecto cuando una proteína *bait* está marcada con biotina, mediante el agregado de una enzima (HRP, *horseradish peroxidase*, o PAL: fosfatasa alcalina) unida a estreptavidina.

Es aconsejable correr dos geles idénticos, una vez finalizada la electroforesis, uno de los geles se transfiere y se procede con el Far Western Blot como se indicó previamente y al otro se le realiza Tinción de plata o Coomassie coloidal para poder observar todas las proteínas presentes y corroborar que aquellas detectadas en la membrana también se encuentren presentes en el gel sin transferir.

Es importante incluir controles que permitan distinguir interacciones proteicas verdaderas de artefactos inespecíficos. Con este fin se puede incorporar en la incubación una proteína no relevante a los fines del estudio en vez de la

proteína *bait*. Otro control negativo sería realizar el procedimiento completo, obviando la incorporación de la proteína *bait*. Estos controles deben ser llevados a cabo en paralelo al tratamiento de la muestra.

Existen alternativas al procedimiento clásico (Figura 11.4):

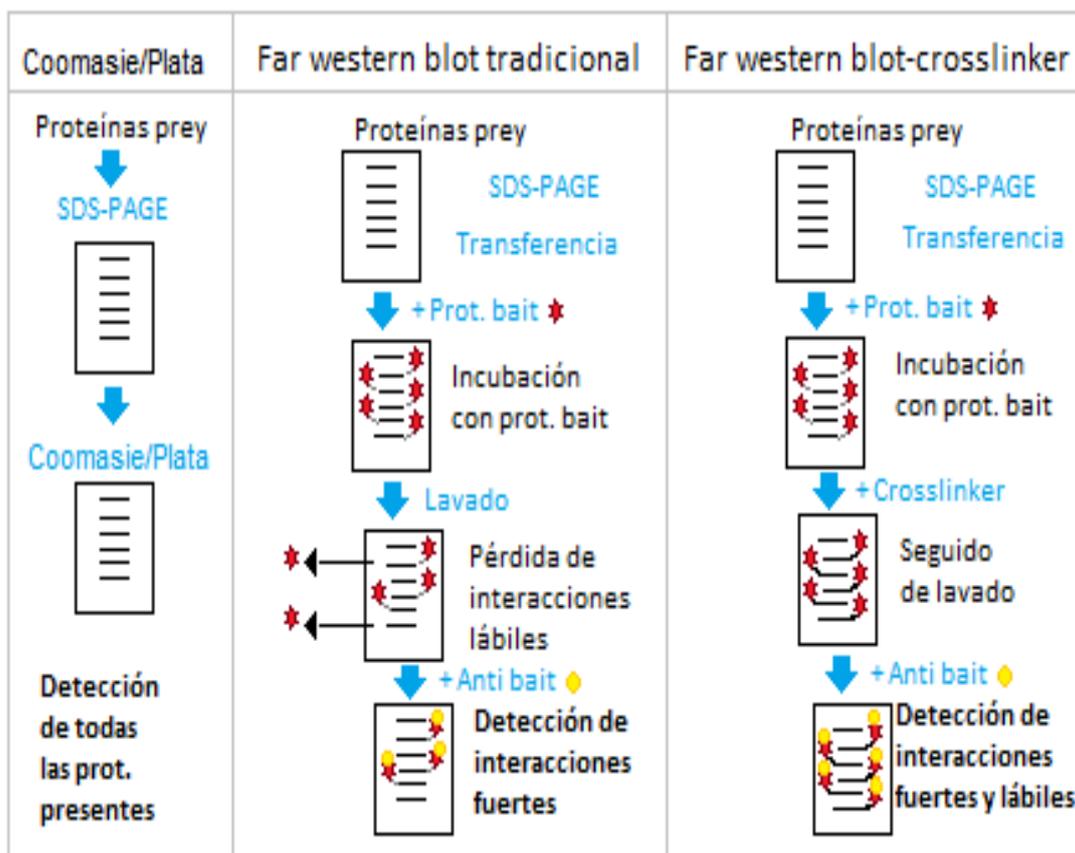


Figura 11.4. Comparación de una técnica de detección general de proteínas (Coomassie o Tinción de Plata) vs. Far Western Blot. Ventajas de la utilización de crosslinkers.

- 1) Far western blot con *crosslinker* (Sato, 2011): Cuando se sospecha que las interacciones proteicas son transitorias, se puede incorporar un paso en el que se agrega un *crosslinker* (por ej. EDC) el cual cimente las proteínas *bait* y *prey* para que en los posteriores lavados no se pierdan y queden sin ser detectadas.
- 2) Far western blot en gel: se procede como en la técnica clásica salvo que no se transfiere a ninguna membrana sino que la interacción se lleva a cabo incubando el gel con proteína *bait*. Para esto es necesario remover el SDS luego de la electroforesis mediante isopropanol 50% lo cual va a permitir el plegamiento correcto de las proteínas. La desventaja es que son necesarias

mayores cantidades de proteínas *bait* y *prey* para que la interacción pueda ser detectada.

11.3. Técnicas de confirmación *in vivo*.

Förster Resonance Energy Transfer.

El uso de herramientas bioinformáticas así como las diversas técnicas de screening previamente explicadas, pueden darnos como resultado un par de proteínas candidatas a interactuar entre sí. El paso siguiente en el estudio de IPP es la confirmación *in vivo* de esta interacción. Una vez establecida la interacción *in vivo*, puede estudiarse la constante de asociación de las proteínas, mapear las áreas de interacción entre las mismas, etc. El objetivo de esta sección del capítulo consiste en explicar dos técnicas de microscopía útiles para la comprobación *in vivo* de IPP.

La microscopía confocal (ver Capítulo 13 Microscopía) es una técnica ampliamente utilizada para el estudio de los componentes intracelulares así como sus asociaciones entre sí. Esta técnica permite el estudio *in vivo* de IPP, y la colocalización es un prerrequisito para que dos especies moleculares interactúen. Una proteína promedio como la albúmina (67 kDa) mide 3x8 nm aproximadamente. El límite de resolución teórico de un microscopio confocal en el eje XY es de ~200 nm. La colocalización de dos proteínas que permite evidenciar esta metodología posee un margen de error muy alto. Dos proteínas marcadas por fluoróforos distintos pueden encontrarse a más de 100 nm entre sí, y sin embargo, mediante la simple observación de las mismas por microscopía, colocalizar en el plano XY. El límite de resolución del microscopio no es lo suficientemente pequeño para aportar información válida que nos permita corroborar la interacción entre dos proteínas que colocalizan.

Afortunadamente, otras técnicas que pueden ser empleadas en células vivas pueden proveer esta información, como FRET (del inglés *Förster resonance*

energy transfer). El fenómeno de FRET implica la transferencia de energía desde un fluoróforo dador a un fluoróforo aceptor adyacente que posee una superposición espectral significativa y orientación apropiadas (Figura 11.5) (Lakowicz, 1999). El fenómeno de FRET es un *quencher* de la fluorescencia muy eficiente (Fricker, 2006). El término *Quenching* de la fluorescencia hace referencia a cualquier proceso que produzca una disminución en la intensidad de la fluorescencia emitida por una determinada sustancia. Una gran variedad de procesos pueden provocar la desactivación de la fluorescencia, entre ellos, la transferencia de energía; en el caso de FRET, desde el dador (que se *quenecha*) al aceptor. El fenómeno de FRET puede detectarse espectralmente como una disminución (*Quenching*) en la emisión del dador con un incremento proporcional en la emisión del aceptor sensibilizado.

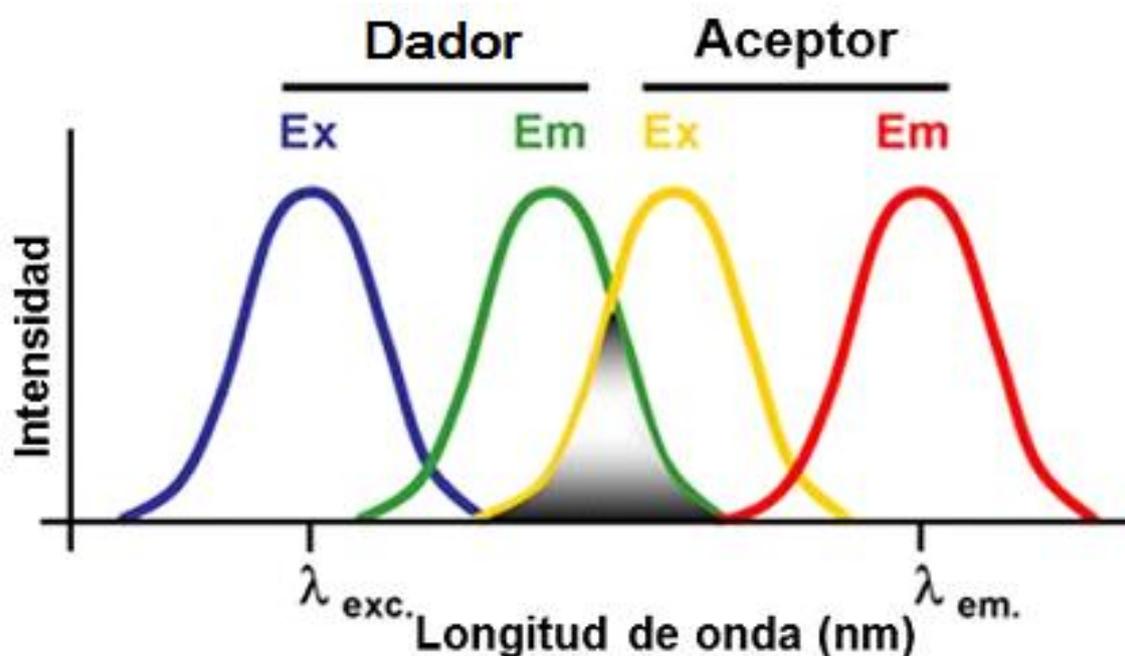


Figura 11.5. La superposición espectral entre el espectro de emisión del dador (espectro verde) y el espectro de excitación del aceptor (espectro amarillo), sumado a la correcta orientación de los fluoróforos en el espacio permiten la transferencia de energía, Esta transferencia de energía es evidenciada como una disminución de la intensidad de fluorescencia del espectro del dador, y un aumento de la intensidad de fluorescencia del espectro del aceptor.

En capítulos anteriores se mencionó la siguiente ecuación de la teoría de Förster:

$$KT(r) = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 \quad \text{Ec. 11.1}$$

donde KT es la velocidad de decaimiento del estado excitado del dador (en ausencia de aceptor), transferencia de energía de Förster, τ_D es la vida media del donante, R_0 es el radio crítico de Förster, donde la transferencia de energía y el decaimiento espontáneo del estado excitado del dador son igualmente probables, y r es la distancia entre el donante y el aceptor. De esta ecuación se deduce que la eficiencia de FRET disminuye con la inversa de la sexta potencia de la separación entre los fluoróforos. La distancia a la que la energía de transferencia disminuye un 50% (conocida como radio de Förster) es alrededor de 3-6 nm para un par común dador-aceptor.

Uno de los muchos factores que pueden influenciar la medida del tiempo de vida de una población de fluoróforos es la proximidad a una segunda molécula fluorescente con las propiedades espectrales que permitan a ésta absorber la energía de emisión del primer fluoróforo a través de FRET. El decaimiento del tiempo de vida (τ) del primer fluoróforo (dador) puede ser usado como una medida de la interacción FRET con el segundo fluoróforo (aceptor) (Figura 11.6). Esta medida se conoce como FLIM (del inglés *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*) (Lleres, 2007). La transferencia de energía entre dador y aceptor sólo puede ocurrir cuando las dos moléculas se encuentran muy cercanas (~1 a 10 nm), consistente con el hecho de estar molecularmente en contacto. Entonces, debido a esta dependencia a la proximidad, FRET provee un ensayo que permite detectar interacciones entre 2 proteínas que se encuentran marcadas con un dador y aceptor FRET respectivamente (Lleres, 2007).

Para obtener medidas cuantitativas, particularmente la asociación de proteínas en estado estacionario, es necesario tener en cuenta una serie de fenómenos que pueden interferir en la determinación. Se deben realizar controles para corregir el *background*, autofluorescencia (fluorescencia debida a sustancias

presentes en la muestra que son fluorescentes, pero no han sido marcadas intencionalmente para ser observadas), sangrado de los espectros (los canales de detección de la emisión a veces no son lo suficientemente estrechos para detectar sólo la emisión del aceptor excitado, se corre el riesgo de tener algo de señal proveniente de la cola del espectro de emisión del dador), fotoblanqueo (destrucción fotoquímica del fluoróforo, puede suceder por la exposición prolongada a longitudes de onda de excitación), y diferente sensibilidad de los fluoróforos al ambiente.

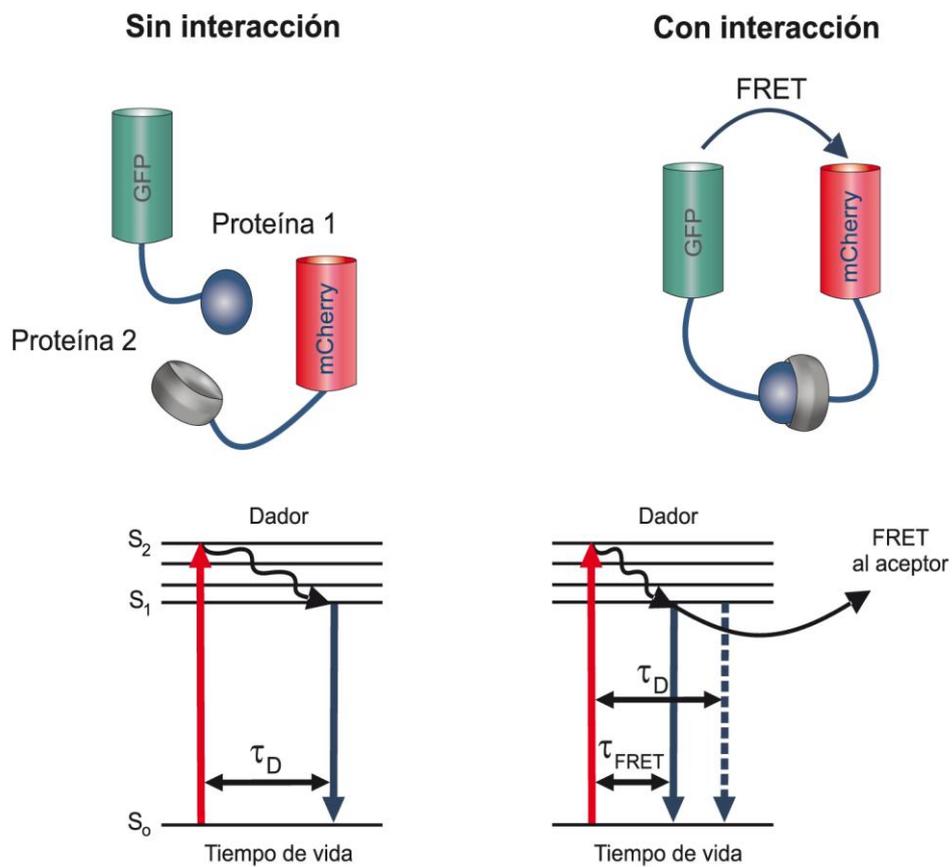


Figura 11.6. La proteína 1 se encuentra marcada con la proteína fluorescente verde GFP mientras que la proteína 2 se encuentra marcada con la proteína fluorescente roja mCherry. GFP-mCherry son capaces de formar un par FRET. El diagrama de Jablonski en la situación sin interacción (ver cap. Fluorescencia) muestra el tiempo de vida τ_D del dador GFP. Cuando las proteínas 1 y 2 interaccionan, GFP y mCherry están lo suficientemente cerca y correctamente orientadas para que la transferencia de energía entre el dador GFP y el aceptor mCherry se produzca. El diagrama de Jablonski en la situación con interacción muestra la disminución del τ_D del donador cuando se produce la transferencia de energía, ahora llamado τ_{FRET} .

Para llevar a cabo una medida FLIM-FRET, las dos proteínas de las que se pretende estudiar su interacción deben estar marcadas cada una con un fluoróforo adecuado. El modo más conveniente de obtener este par de proteínas marcadas in vivo es expresar cada una de ellas fusionada a su respectiva proteínas fluorescentes (ver Capítulo 2 Fluorescencia). Las dos proteínas fluorescentes usadas como marca deben poseer las propiedades espectrales apropiadas que les permitan funcionar como par FRET. Un par FRET muy comúnmente utilizado consiste en usar EGFP (*Enhanced-Green Fluorescent Protein*) como dador y mCherry (*monomeric Cherry red fluorescent variant*) como receptor (Figura 11.7). Otra combinación que puede ser usada como par FRET es CFP (*Cyan Fluorescent Protein*, como dador) y YFP (*Yellow Fluorescent Protein*, como receptor). Idealmente, el experimento de FLIM-FRET debería ser llevado a cabo en líneas celulares que expresen de modo estable ambas proteínas de fusión. Sin embargo, dado el hecho que FLIM-FRET es generalmente insensible a la concentración relativa de los fluoróforos, es posible llevar a cabo el protocolo en células que expresen de modo transitorio una o ambas proteínas de fusión (Lleres, 2007).

En la Figura 11.7 se muestra un ejemplo de una medida de FLIM-FRET que permite evidenciar la asociación del par FRET GFP-mCherry. GFP es el fluoróforo dador y mCherry el fluoróforo receptor. En la Figura 11.7A, células HeLa fueron cotransfectadas con las proteínas GFP y mCherry, ambas expresadas de modo independiente. En el primer recuadro, se observa la medida del τ_D (tiempo de vida media del dador, GFP). El siguiente recuadro muestra el τ_{FRET} . En el caso que el fenómeno FRET se estuviera dando, τ_{FRET} debería ser menor que el τ_D . Dado que τ_{FRET} es igual al τ_D , en esta situación, GFP y mCherry coexpresadas de modo independiente en células HeLa no interactúan, se encuentran entre sí a distancias mayores que las necesarias para que ocurra el fenómeno FRET. El tercer recuadro muestra el porcentaje de eficiencia FRET. En el caso A, la eficiencia FRET es nula.

En la Figura 11.7B, se repite el ensayo, esta vez transfectando las células HeLa con una construcción de GFP unida a mCherry por 17 aminoácidos. En el primer recuadro se muestra la medida del τ_D , 2.11ns en este caso (como

previamente mencionamos, el τ de un fluoróforo se ve influenciado por su entorno, la presencia de mCherry modifica el τ_D de GFP). En el segundo recuadro, se muestra la medida del τ_{FRET} . En este caso, el τ_{FRET} es de 1.95ns, menor que el τ_D , indicando que el fenómeno FRET está ocurriendo.

En la Figura 11.7C, las células se transfectaron con una construcción de GFP unida a mCherry por sólo 7 aminoácidos. En el primer recuadro el τ_D es 2.05ns mientras que el τ_{FRET} que muestra el segundo recuadro es 1.58ns. La mayor cercanía entre GFP y mCherry aumenta la eficiencia FRET (tercer recuadro) así como disminuye el τ_{FRET} .

El rango de interacciones moleculares comprobados mediante FRET está creciendo e incluye la dimerización de factores de transcripción o receptores, formación de dominios lipídicos, interacciones entre subunidades en un único complejo proteico funcional o “metaboloma”, asociación de proteínas regulatorias o de señalización.

Correlación de espectroscopía de fluorescencia (FCS).

La caracterización cuantitativa de interacciones biomoleculares es de fundamental importancia para comprender los mecanismos celulares. En los últimos años, dos desarrollos han revolucionado el modo según el cual estas interacciones pueden ser medidas: el descubrimiento de proteínas autofluorescentes y la posibilidad de detectar estas moléculas con una sensibilidad de una única molécula. La óptica confocal ha sido la mejora en microscopía que nos permite, hoy en día, detectar moléculas con una sensibilidad de una única molécula por campo (Langowski, 2008).

La difusión de partículas fluorescentes dentro y fuera del volumen de detección (aprox. 1fl) hace que la intensidad de fluorescencia en los detectores fluctúe aleatoriamente. La correlación de espectroscopía de fluorescencia (FCS) mide y analiza estas fluctuaciones, a través de la información colectada sobre la movilidad de las moléculas que cruzan el haz de láser (Figura 11.8). FCS permite la medida de interacciones biomoleculares. Cuando un ligando

fluorescente se une a una macromolécula, su movilidad se verá restringida por la presencia de su compañero de interacción de mayor tamaño (Fricker, 2006). En biología celular, la movilidad que hemos mencionado está caracterizada por el coeficiente de difusión D expresado normalmente en unidades de $\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$. La medida de D revelará eventualmente interacciones entre el ligando fluorescente y macromoléculas de mayor tamaño, siempre y cuando D cambie significativamente.

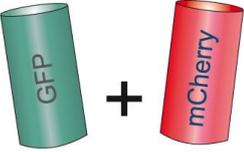
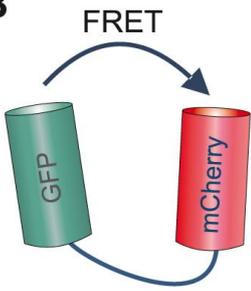
	Tiempo de vida medio del dador τ_D	τ_{FRET}	Eficiencia FRET (%)
A  GFP + mCherry	2.34 ns	2.34 ns	0 %
B  FRET 17 Aminoácidos	2.11 ns	1.95 ns	20 %
C  FRET 7 Aminoácidos	2.05 ns	1.58 ns	60 %

Figura 11.7. Medida *in vivo* de FLIM-FRET. Células HeLa vivas que coexpresan EGFP libre y mCherry libre (A). (B) Células expresando EGFP unida directamente a mCherry por un linker de 17 aminoácidos. (C) Expresión de EGFP unida a mCherry por 7 aminoácidos en células HeLa. Se calcularon los tiempos de vida y eficiencia FRET del dador (EGFP) en cada una de las 3 situaciones (Lleres, 2007).

En una primera aproximación, D es proporcional a la mayor dimensión lineal de la macromolécula, su dependencia de la masa molecular M de una proteína

globular no es muy fuerte; para que D se duplique, M debería aumentar $2^3=8$ (Ley de Fick $M=-D_x A_x t(dc/dn)$, A es la superficie normal a la dirección de la difusión en m^2 , t es el tiempo en segundos y dc/dn el gradiente de concentración). Una asociación entre dos ligandos de tamaño similar disminuiría D aproximadamente un 26%, cambio poco detectable en presencia de ruido en la señal (Langowski, 2008).

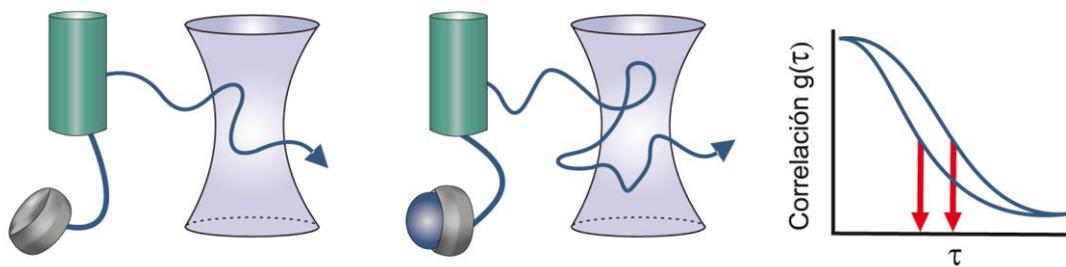


Figura 11.8. El movimiento de una proteína marcada fluorescentemente dentro y fuera del volumen de iluminación provoca fluctuaciones en la intensidad de fluorescencia detectada. Cuando una proteína se asocia a otra, las fluctuaciones debidas al pasaje dentro y fuera del volumen de detección cambian. La función de autocorrelación permite estudiar estas fluctuaciones de intensidad de fluorescencia. El decaimiento de la función de autocorrelación se relaciona con la disminución de la movilidad difusional de las especies que atraviesan el volumen de detección.

Un modo más sensible para utilizar el movimiento aleatorio de macromoléculas para detectar su interacción consiste en utilizar dos colores en la correlación cruzada de espectroscopía de fluorescencia (FCCS). En este caso, ambos componentes de la interacción son marcados con fluoróforos que son espectroscópicamente distinguibles. Si forman un complejo, entrarán y saldrán del foco del láser al mismo tiempo; si no interaccionan, sus respectivos movimientos (y fluctuaciones de fluorescencia) no estarán correlacionados. FCCS es un modo conveniente de demostrar unión entre dos macromoléculas marcadas con diferentes fluoróforos porque el complejo mostrará fluorescencia correlacionada a ambas longitudes de onda.

Debido al pequeño foco del haz láser, las medidas dentro de células vivas se han hecho posibles. Las lentes de un típico microscopio de alta resolución poseen un punto focal de 300nm de diámetro y 1,5 μ m de largo, de este modo, los procesos que implican difusión dentro de una célula u organela pueden ser comprobados de un modo posición-dependiente.

El primer dato que se obtiene en un experimento de FCS es la intensidad de fluorescencia dependiente del tiempo $F(t)$, que es proporcional al número de partículas en el volumen de observación al tiempo t (Langowski, 2008).

Función de autocorrelación.

Las fluctuaciones en la intensidad de fluorescencia se caracterizan por su función de autocorrelación $G(\tau)$, que describe el movimiento aleatorio del fluoróforo.

$$G(\tau) = \frac{\langle F(t)F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad \text{Ec. 11.2}$$

Donde $F(t)$ es la intensidad de fluorescencia dependiente del tiempo. Esta función de autocorrelación se grafica usando los datos experimentales obtenidos.

Para obtener cantidades tales como coeficientes de difusión, concentraciones, o evaluar constantes de reacción, se ajusta una función de correlación teórica a la medida $G(\tau)$, la cual está basada en un modelo que contiene estas cantidades como parámetros libres (Langowski, 2008).

$$G(\tau) = \frac{1}{cV_{\text{eff}}} \left(1 + \frac{4D\tau}{w_0^2} \right)^{-1} \left(1 + \frac{4D\tau}{z_0^2} \right)^{-1/2} + 1 \quad \text{Ec. 11.3}$$

Correlación cruzada de dos colores (FCCS).

Cuando el coeficiente de difusión D cambia suficientemente al producirse la unión/interacción de dos macromoléculas, el complejo puede distinguirse en $G(\tau)$ como una segunda especie y su concentración ser determinada. Sin

embargo, en casos donde D cambia sólo ligeramente o no cambia, como en el caso en el que un ligando no fluorescente se une a una partícula fluorescente de tamaño mucho mayor, esta estrategia no puede ser utilizada.

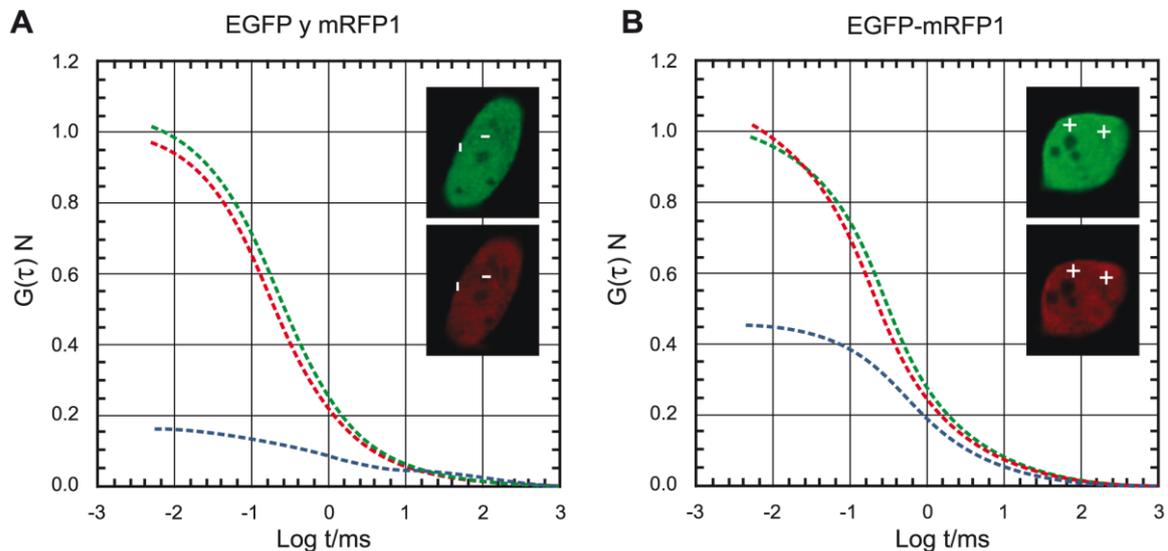


Figura 11.9. A, B- FCCS controles *in vivo* para fluoróforos independientes (A) y covalentemente unidos (B). Se muestran las amplitudes de autocorrelación normalizadas $G(\tau)$ en los canales rojo (línea roja) y en verde (línea verde) medidos en células HeLa expresando (A) EGFP y mRFP1 separadamente; (B) una construcción de ambas proteínas EGFP y mRFP1 unidas covalentemente. La función de correlación cruzada se muestra en azul. Los rombos representan la información medida, las líneas las curvas ajustadas. Imágenes insertas: imágenes confocales de las células en los canales para EGFP (verde) y mRFP1 (rojo). Las cruces blancas indican el punto de medida (Langowski, 2008).

En FCCS, la fluorescencia es detectada simultáneamente a dos longitudes de onda distintas en el mismo volumen de detección. Es simple de observar que en una mezcla de dos moléculas fluorescentes emitiendo a dos longitudes de onda diferentes sin interactuar entre ellas, las mismas difundirán independientemente y la amplitud de la función de correlación cruzada será cero (Figura 11.9A). Por el contrario, cuando la partícula está marcada con dos fluoróforos que emiten simultáneamente a las dos longitudes de onda respectivas, la función de correlación cruzada es igual a la función de autocorrelación para un único color en FCS (asumiendo eficiencias de detección iguales y superposición exacta de los volúmenes de detección para ambos canales). Este último caso se da, por ejemplo, cuando las especies fluorescentes forman un complejo (Figura 11.9B) (Langowski, 2008).

En FCCS, la cantidad de complejo formada entre dos biomoléculas marcadas fluorescentemente puede obtenerse midiendo la amplitud de la correlación cruzada.

Bibliografía

Bader GD, Betel D, Hogue CWV. BIND: the biomolecular interaction network database. *Nucleic Acids Res*; 31:248-50; 2003.

Bateman A, Birney E, Cerruti L, Durbin R, Eddy SR, *et al.* The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res*; 30:276-280; 2002.

Bock JR, Gough DA. Predicting protein-protein interactions from primary structure. *Bioinformatics*; 17:455-60; 2001.

Chothia C, Janin J. Principles of proteinprotein recognition. *Nature*; 256:705-8; 1975.

Corpet F, Servan F, Gouzy J, Kahn D. ProDom and ProDom-CG: tools for protein domain analysis and whole genome comparisons. *Nucleic Acids Res*; 28:267-9; 2000.

Costanzo MC, Crawford ME, Hirschman JE, Kranz JE, Olsen P, Robertson LS, *et al.* YPDTM, PombePDTM and WormPDTM: model organism volumes of the BioKnowledgeTM library, an integrated resource for protein information. *Nucleic Acids Res* 2001; 29:75-9.

Eilbeck K, Brass A, Paton N, Hodgman C. INTERACT: an object oriented protein-protein interaction database. *ISMB* 1999; 7:87-94.

Enright A, Iliopoulos I, Kyripides N, Ouzounis C. Protein interaction maps for complete genomes based on gene fusion events. *Nature*; 402:86-90; 1999.

Fricker M, Runions J, Moore I. Quantitative Fluorescence Microscopy; from art to science. *Annual Review Plant Biology*. 57:79-107. 2006.

Gallet X, Charlotiaux B, Thomas A, Brasseur R. A fast method to predict protein interaction sites from sequences. *J Mol Biol*; 302:917-26; 2000.

Gietz R.D. *et al.* Identification of proteins that interact with a protein of interest: Applications of the yeast two hybrid system. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 172: 67–79; 1997.

Golemis E. Protein-protein interactions: A molecular cloning manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2002.

- Hink MA, Bisseling T, Visser AJ.. Imaging protein-protein interactions in living cells. *Plant Mol. Biol.* 50:871–83; 2002.
- Howard CV, Reed MG. *Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy.* Oxford: BIOS Sci. Publ. 1998.
- Huynen M, Snel B, Lathe W, Bork P. Predicting protein function by genomic context: quantitative evaluation and qualitative. *Genome Res*;10:1204-10; 2000.
- Ji ZL, Chen X, Zhen CJ, Yao LX, Han LY, Yeo WK, et al. KDBI: kinetic data of bio-molecular interactions database. *Nucleic Acids Res*;31:255-7. 2003.
- Kato N, Pontier D, Lam E. Spectral profiling for the simultaneous observation of four distinct fluorescent proteins and detection of protein-protein interaction via fluorescence resonance energy transfer in tobacco leaf nuclei. *Plant Physiol.* 129:931–42. 2002
- Lakowicz, J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy 2nd Edition. Springer, New York. 1999.
- Langowski J. Chapter 20: Protein-protein interactions determined by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Methods in cell biology*, vol. 85. Elsevier Inc. 2008.
- Lleres D, Swift S, Lamond AI. Detecting Protein-Protein Interactions *in vivo* with FRET using Multiphoton Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM). *Current Protocols in Cytometry.* 2007.
- Lu L, Lu H, Skolnick J. MULTIPROSPECTOR: an algorithm for the prediction of proteinprotein interaction by multimeric threading. *Proteins*;49:350-64. 2002.
- Marcotte EM, Pellegrini M, Ho-Leung N, Rice DW, Yeates TO, Eisenberg D. Detecting protein function and protein-protein interactions from genome sequences. *Science*; 285:751-3. 1999.
- Marcotte EM, Pellegrini M, Thompson MJ, Yeates TO, Eisenberg D. A combined algorithm for genome-wide prediction of protein function. *Nature*; 402:83-6. 1999.
- Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System User Manual Clontech. PT4084-1 (PR033493) Cat. No. 630489. 2010.
- Mewes HW, Frishman D, Güldener U, Mannhaupt G, Mayer K, Mokrejs M, et al. MIPS: a database for genomes and protein sequences. *Nucleic Acids Res*;30:31-4. 2002.
- Ng SK, Zhang Z, Tan SH. Integrative approach for computationally inferring protein domains interactions. *Bioinformatics*;19:923-9; 2003.
- Pazos F, Valencia A. Similarity of phylogenetic trees as indicator of protein-protein interaction. *Protein Eng*;14:609-14; 2001.

- Pazos F, Valencia A. In silico two-hybrid system for the selection of physically interacting proteins pairs. *Proteins*;47:219-27; 2002.
- Pellegrini M, Marcotte EM, Thompson MJ, Eisenberg D, Yeates TO. Assigning protein functions by comparative genome analysis: protein phylogenetic profiles. *Proc Natl Acad Sci USA*; 96:4285-8; 1999.
- Phizicky E. M. and Fields S. Protein-protein interactions: Methods for detection and analysis. *Microbiol Rev.* 59:94-123. 1995.
- Rain JC, Selig L, De Reuse H, Battaglia V, Reverdy C, Simon S, *et al.* The protein-protein interaction map of *Helicobacter pylori*. *Nature* 2001;409:211-5.
- Sánchez C, Lachaize C, Janody F, Bellon B, Röder L, Euzenat J, *et al.* Grasping at molecular interactions and genetic networks in *Drosophila melanogaster* using FlyNets, an internet database. *Nucleic Acids Res*; 27:89-94. 1999.
- Sato, Y., *et al.*, Detecting weak protein-protein interactions by modified far-western blotting, *J. Biosci. Bioeng.* 2011.
- Stein L, Thierry-Mieg J. Scriptable access to the *Caenorhabditis elegans* genome sequence and other Acedb databases. *Genome Res*;8:1308-15. 1999.
- Thermo Scientific Pierce Protein Interaction Technical Handbook Version 2. 2010.
- Thierry-Mieg J, Thierry-Mieg D, Stein L. ACEDB: The ACE database manager. In: S. Letovsky, editor. *Bioinformatics, Databases and Systems*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers; p.265-78. 1999.
- Thorn KS, Bogan AA. ASEdb: a database of alanine mutations and their effects on the free energy of binding in protein interactions. *Bioinformatics*; 17:284-5. 2001.
- Torre Russis V, Valles A, Gómez R, Chinae g, Pons T. Interacciones proteína-proteína: bases de datos y métodos teóricos de predicción. *Biotecnología Aplicada*; 20:201-208; 2003.
- Westermarck J., *et al.* Identification of Protein Interactions Involved in Cellular Signaling. *Mol Cell Proteomics*. 2013.
- Wojcik J, Schächter V. Protein-protein interaction map inference using interacting domain profile pairs. *Bioinformatics*;17 Suppl 1:296-305; 2001.
- Xenarios I, Fernández E, Salwinski L, Joyce-Duan X, Thompson MJ, Marcotte EM, Eisenberg D. DIP:The database of interacting proteins: 2001 update. *Nucleic Acids Res*;29:239-41; 2001.

Zanzoni A, Montecchi-Palazzi L, Quondam M, Ausiello G, Helmer-Citterich M, Cesareni G.
MINT: a molecular interaction database. FEBS Lett;513:135-40. 2002.

CAPÍTULO 12

CALORIMETRÍA DE TITULACIÓN ISOTÉRMICA

F. Luis González Flecha

Introducción

La unión reversible de un ligando a una proteína o ácido nucleico constituye, con la excepción de los procesos fotoquímicos, el modo universal de iniciación de los procesos biológicos que tienen lugar en los seres vivos (Gutfreund, 1995). El entendimiento de estos procesos de reconocimiento molecular es de fundamental importancia en la biología moderna. Su estudio consiste en determinar la estequiometría, la constante de equilibrio y la energética del proceso. La calorimetría de titulación isotérmica es la única técnica disponible capaz de evaluar a través de un solo experimento estos tres componentes sin ambigüedad.

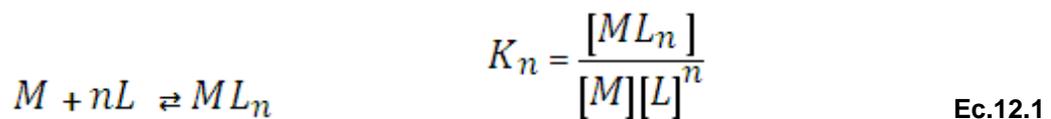
Casi cualquier reacción química o cambio físico producido en un sistema es acompañado por la liberación o absorción de calor. En este sentido los calorímetros pueden ser considerados como detectores universales y a la vez promiscuos, con las ventajas y desventajas que esto implica. A diferencia de los métodos ópticos, las medidas calorimétricas no requieren la incorporación de marcas específicas y se pueden realizar en sistemas opacos, turbios o heterogéneos (por ejemplo, células en suspensión), y bajo una amplia gama de condiciones biológicamente relevantes (temperatura, pH, fuerza iónica, etc.).

El primer calorímetro isotérmico fue construido por Lavoiser y Laplace en 1780 (memoria sobre el calor). Desde ese momento se ha desarrollado una amplia variedad de instrumentos, pero no fue hasta 1990 cuando aparecieron en el mercado calorímetros sencillos y con una sensibilidad muy alta, que permitieron estudiar reacciones bioquímicas de asociación. Este tipo de

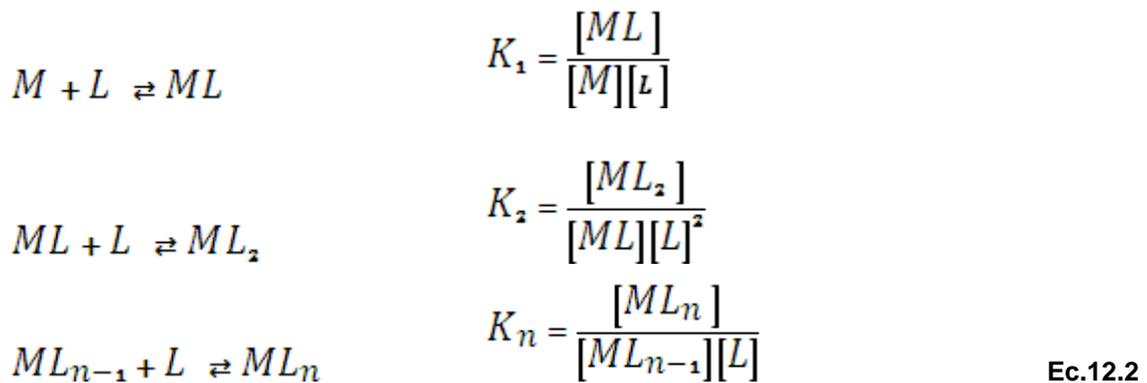
calorímetro, donde se añade un ligando paso a paso a una solución de macromoléculas a temperatura constante y bajo agitación continua, se conoce como calorimetría de titulación isotérmica o ITC por su sigla en inglés (*Isothermal Titration Calorimetry*).

12.1. Termodinámica de la Asociación entre Ligandos y Macromoléculas

Consideremos la interacción entre un ligando (L) y una macromolécula (M) que posee N sitios para el ligando. El proceso de adición de L a M puede considerarse consecuencia de un único equilibrio gobernado por una constante de asociación derivada de la ley de acción de masas:



Alternativamente el proceso de formación del complejo ML_n puede también considerarse consecuencia de "n" equilibrios sucesivos:



La formación secuencial de ML_i representada por las ecuaciones Ec. 12.2 es termodinámicamente equivalente a la reacción global de la ecuación Ec. 12.1 dado que para ambos procesos el estado inicial (M y L) y el final (ML_n) son los mismos. Esto se puede ver fácilmente al multiplicar las "n" constantes de asociación que aparecen en Ec. 12.2:

$$\prod_i K_i = K_1 \cdot K_2 \cdot K_3 \cdot K_4 \cdot \dots \cdot K_n$$

Ec. 12.3

Cada uno de los procesos descritos por las ecuaciones 12.1 y 12.2 puede ser alternativamente caracterizado empleando las funciones de estado derivadas del primer y segundo principio de la termodinámica, esto es indicando el cambio producido cuando se pasa del estado inicial (macromolécula y ligando libres en solución) al estado final (macromolécula en solución con i moléculas de ligando unido) en la energía interna (U), entalpía (H), entropía (S) y energía libre (G). A presión y temperatura constantes la descripción termodinámica completa se alcanza indicando las variaciones de entalpía ($H=U+pV$), entropía (S) y energía libre de Gibbs ($G=H-TS$).

De acuerdo al primer principio de la termodinámica la variación de entalpía se define como la cantidad de energía total intercambiada (tanto en forma de calor como de trabajo) entre el sistema y el medio ambiente durante el proceso considerado, más el cambio producido durante el mismo proceso en el producto de la presión por el volumen del sistema. En procesos que ocurren a presión y temperatura constantes y en ausencia de intercambios de trabajo distintos al de expansión ($W = -p\Delta V$) la variación de entalpía estará dada por:

$$\Delta H = \Delta U + \Delta(pV) = Q + W + p\Delta V = Q_p$$

Ec. 12.4

Esta relación implica que si el proceso en cuestión ocurre en estas condiciones, la variación de entalpía puede determinarse experimentalmente midiendo el calor intercambiado. Este es justamente el principio que permite lograr la caracterización termodinámica de un proceso a través de medidas calorimétricas.

Por otra parte la variación en la energía libre de Gibbs estará dada, a presión y temperatura constantes, por los potenciales químicos μ_i de los componentes presentes en los estados inicial y final del sistema. Por ejemplo para la reacción descrita por la ecuación 12.1 tendremos:

$$\Delta G = G_{final} - G_{inicial} = \mu_{ML_n} - \mu_M - n\mu_L$$

Ec. 12.5

A su vez, el potencial químico de un soluto en solución depende, también a presión y temperatura constantes, de la concentración de cada componente en el sistema.

$$\mu_i = \mu_i^\circ + RT \ln [i] \quad \text{Ec. 12.6}$$

donde los μ_i° representan el potencial químicos del componente i en su estado de referencia (solución ideal a una concentración 1M).

Por lo tanto la variación de energía de Gibbs durante la asociación de n moléculas de un ligando a una macromolécula estará dada por:

$$\Delta G = (\mu_{ML_n}^\circ - \mu_M^\circ - n\mu_L^\circ) + RT \cdot (\ln[ML_n] - \ln[M] - n \ln[L]) = \Delta G^\circ + RT \ln \frac{[ML_n]}{[M] \cdot [L]^n} \quad \text{Ec. 12.7}$$

El proceso de asociación ocurrirá espontáneamente mientras el ΔG sea negativo. Una vez que el proceso llega al equilibrio la energía libre de Gibbs será igual para los reactivos y los productos, por lo tanto:

$$\Delta G = G_{final} - G_{inicial} = 0 = \Delta G^\circ + RT \ln \frac{[ML_n]_{eq}}{[M]_{eq} \cdot [L]_{eq}^n} \quad \therefore \Delta G^\circ = -RT \ln K_n \quad \text{Ec. 12.8}$$

Esta relación vale para cualquiera de los equilibrios planteados en las ecuaciones 12.1 y 12.2, e implica que si se determina experimentalmente la constante de equilibrio de una reacción, la diferencia de energía libre entre los productos y los reactivos, estando cada uno de ellos en su estado de referencia, quedará perfectamente definida.

Una vez que tenemos los cambios de entalpía (obtenidos calorimétricamente) y de energía libre en el estado de referencia (calculados a partir de la constante de equilibrio), se puede obtener el cambio de entropía asociado al proceso como:

$$\Delta S^\circ = \frac{1}{T} (\Delta G^\circ - \Delta H) \quad \text{Ec. 12.9}$$

Otra propiedad importante en la caracterización de reacciones de asociación es el grado de avance. Para la reacción de asociación reversible del ligando L a la macromolécula M que posee n sitios para dicho ligando, el grado de avance se suele caracterizar a través del número promedio de moles (o de moléculas) de L unidos a un mol (o molécula) de M (Tanford, 1961),

$$\bar{\nu} = \frac{[ML] + 2 \cdot [ML_2] + 3 \cdot [ML_3] + 4 \cdot [ML_4] + \dots + n \cdot [ML_n]}{[M] + [ML] + [ML_2] + [ML_3] + [ML_4] + \dots + [ML_n]} \quad \text{Ec. 12.10}$$

La expresión (12.10) puede tomar valores que van desde cero, cuando no hay L unido a M, hasta n cuando la saturación es total y todos los sitios están ocupados en todas las moléculas y la única forma de M que existe es ML_n .

Nótese que el numerador de la ecuación (12.10) es el número total de moles de L unidos a M por unidad de volumen, mientras que el denominador es el número total de moles de M por unidad de volumen, o sea la concentración total de M.

Usando la ecuación (12.1), la ecuación (12.10) se puede escribir como:

$$\bar{\nu} = \frac{\mathbf{K}_1 \cdot [M] \cdot [L] + 2 \cdot \mathbf{K}_2 \cdot [M] \cdot [L]^2 + 3 \cdot \mathbf{K}_3 \cdot [M] \cdot [L]^3 + \dots + n \cdot \mathbf{K}_n \cdot [M] \cdot [L]^n}{[M] + \mathbf{K}_1 \cdot [M] \cdot [L] + \mathbf{K}_2 \cdot [M] \cdot [L]^2 + \mathbf{K}_3 \cdot [M] \cdot [L]^3 + \dots + \mathbf{K}_n \cdot [M] \cdot [L]^n} \quad \text{Ec. 12.11}$$

Como [M] figura en todos los términos se la puede eliminar. Si además se reemplazan las constantes de asociación globales \mathbf{K}_i , por las secuenciales K_i de acuerdo a la ecuación 12.3

$$\bar{\nu} = \frac{\sum_{i=1}^n i \cdot \mathbf{K}_i \cdot [L]^i}{1 + \sum_{i=1}^n \mathbf{K}_i \cdot [L]^i} = \frac{\sum_{i=1}^n i \cdot \prod_{j=1}^i K_j \cdot [L]^i}{1 + \sum_{i=1}^n \prod_{j=1}^i K_j \cdot [L]^i} \quad \text{Ec. 12.12}$$

La relación (12.12) es la ecuación fundamental en la teoría descriptiva del proceso de adición de ligandos a macromoléculas. Fue desarrollada en el año 1925 por G. S. Adair en Cambridge para explicar el proceso de saturación de la hemoglobina con el oxígeno.

A partir de ella es posible obtener relaciones más específicas que corresponderán a los distintos tipos de unión que se pueden presentar cuando una macromolécula posee dos sitios o más para un ligando (Tanford, 1961; Wyman, 1990; Cantor, 1980).

a. Sitios idénticos e independientes. En este caso todos los sitios estarán caracterizados por una única constante de asociación microscópica o intrínseca (k_0) que dará una idea de la afinidad del ligando por un sitio. Además la afinidad del ligando por un sitio es independiente de si los otros sitios están ocupados o no. En este caso la ecuación 12.12 toma la forma:

$$\bar{v} = \frac{n \cdot k_0 \cdot [L]}{1 + k_0 \cdot [L]} \quad \text{Ec. 12.13}$$

b. Sitios distintos e independientes. En este caso la macromolécula tendría sitios que podemos agrupar en conjuntos caracterizados cada uno de ellos por una constante de asociación microscópica o intrínseca (k_{0i}). También en este caso la afinidad del ligando por un sitio es independiente de si los otros sitios están ocupados o no. La ecuación 12.12 se podrá escribir como:

$$\bar{v} = \frac{\sum_{i=1}^n n_i \cdot k_{0i} \cdot [L]}{1 + k_{0i} \cdot [L]} \quad \text{Ec. 12.14}$$

c. Sitios idénticos con interacciones. Este caso es similar al primero, pero ahora la ocupación de un sitio modificará la afinidad del ligando por los sitios que permanecen vacíos. Si lo hace aumentando la afinidad se hablará de cooperatividad positiva, mientras que si la afinidad de los sitios que permanecen vacíos disminuye diremos que hay cooperatividad negativa o antagonismo. El modelo semi-empírico más empleado para describir la ocupación de sitios en estos sistemas es la ecuación propuesta por A.V. Hill en 1925:

$$\bar{v} = \frac{n \cdot k_0 \cdot [L]^{n_H}}{1 + k_0 \cdot [L]^{n_H}} \quad \text{Ec. 12.15}$$

donde el exponente n_H es el denominado coeficiente de Hill que tomará valores mayores que 1 para la cooperatividad positiva y entre 0 y 1 para cooperatividad negativa.

Todos estos modelos están formulados en términos de $[L]$, la concentración de ligando libre. Dado que las variables experimentales sujetas a control son la concentraciones totales de ligando y macromolécula ($[L]_T$ y $[M]_T$), debemos considerar además las ecuación de conservación correspondiente:

$$[L]_T = [L] + [M]_T \cdot \bar{\nu} \quad \text{Ec. 12.16}$$

12.2. Aspectos Experimentales

Instrumentación

El principal desarrollo tecnológico que llevó a la construcción de los calorímetros de titulación modernos, que posibilitan medir efectos térmicos tan pequeños como $0,4 \mu\text{J}$ permitiendo la determinación de constantes de unión de 10^8 - 10^9 M^{-1} , es el empleo de dos celdas “gemelas” introducido por Stanley Gill en 1980. Los efectos térmicos que se producen en cada una de las celdas se detectan a través de un par de sensores formados por elementos Peltier que generan una fuerza electromotriz proporcional a la diferencia de temperaturas. Por otra parte la evaluación del calor intercambiado se realiza mediante un procedimiento de compensación de potencia con elementos Peltier adicionales (Freire, 1990).

Una de las celdas del calorímetro contendrá la muestra a titular mientras que la otra se llenará con buffer o agua. El ligando se adicionará a la celda que contiene la muestra mediante una jeringa que también sirve como agitador. Ambas celdas se equilibran cuidadosamente a la temperatura de trabajo antes de comenzar el experimento. En esta etapa se aplica una potencia eléctrica constante a la celda de referencia y, mediante un sistema de retroalimentación, se compensa cualquier diferencia de temperatura entre las dos celdas. El

sistema de retroalimentación continua, a una potencia de referencia constante, asegura una respuesta rápida del equipo frente a cualquier cambio térmico producido en la celda que contiene la muestra. A su vez ambas celdas están rodeadas de una cámara térmica o escudo "adiabático" ajustado a la misma temperatura.

La adición del ligando se hace en pequeñas alícuotas, de manera lenta, y con intervalos prefijados entre una inyección y la siguiente. Para esto se utiliza un sistema automatizado que consiste en una jeringa de alta precisión que se acopla a la celda de la muestra. La aguja de la jeringa gira alrededor de su eje (típicamente a unas 400 rpm), y ya que su extremo se encuentra aplanado y torcido formando una hélice, se produce una agitación uniforme en la celda. La agitación genera un trabajo de fricción en la solución, que tiende a elevar su temperatura. Si bien este trabajo será compensado mediante energía eléctrica suministrada a la celda de referencia, el mismo debe ser pequeño para permitir mediciones precisas. La liberación o absorción de calor asociado con cada inyección se compensa mediante una potencia suministrada a la celda de la muestra o de referencia para mantener constante la temperatura. La potencia aplicada es directamente proporcional al flujo de calor, dQ / dt , asociado con la inyección y sirve como señal de salida. Los datos aparecerán entonces como una potencia constante antes de la inyección (que representa la potencia suministrada para mantener el sistema en equilibrio térmico con agitación uniforme), un cambio en la potencia al producirse la inyección del ligando y un regreso a la línea de base cuando todo el calor producido en la inyección se disipa hacia el blindaje adiabático. Esto se repite una y otra vez, hasta que se satura la macromolécula con el ligando. En estas condiciones la inyección de nuevas alícuotas de ligando producirán un cambio térmico residual que corresponderá al calor de dilución, el que deberá ser mucho menor que el calor de asociación para garantizar la calidad del experimento.

La Figura 12.1 muestra la salida de un típico experimento de titulación que alcanza la saturación.

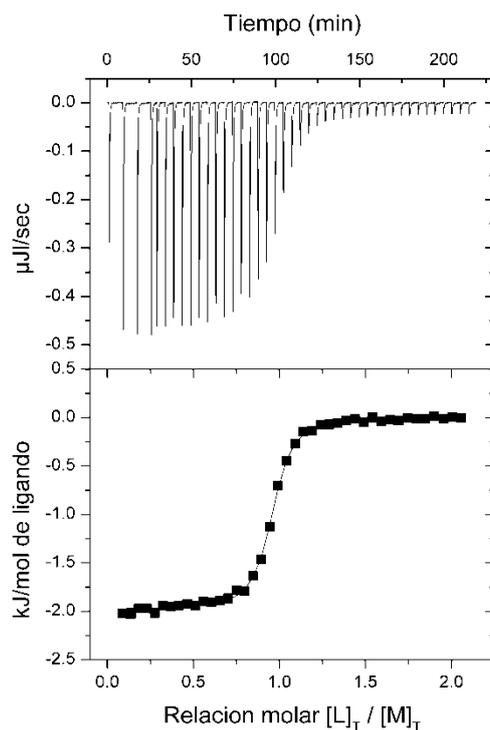


Figura 12.1. Curva de titulación calorimétrica. El panel superior muestra la señal de una titulación calorimétrica típica. La panel inferior muestra la representación gráfica del calor intercambiado en cada inyección por mol de ligando inyectado en función de la relación molar ligando / macromolécula en la celda. La línea continua representa el ajuste de las ecuaciones 12.18 12.13 y 12.16 a los datos del experimento.

Diseño experimental

Como se observa en la Figura 12.1 la curva de titulación calorimétrica posee tres partes (Freire, 2011): (i) En la primera, correspondiente a las inyecciones iniciales, casi todo el ligando inyectado se une a la macromolécula produciendo picos de aproximadamente igual área, (ii) alrededor del punto de equivalencia la fracción del ligando inyectado que se une a la macromolécula es cada vez menor y como consecuencia el área barrida por los picos se hace menor a medida que se agrega mas ligando y (iii) en las inyecciones finales la macromolécula se encuentra saturada de ligando observándose pequeños picos de área constante que representan el calor de dilución del ligando en el buffer. La última parte será entonces equivalente a un experimento donde se

inyecte ligando sobre el buffer. Este experimento control debe realizarse siempre y se debe optimizar la preparación de la muestra para que el calor intercambiado en este experimento sea sustancialmente menor que el correspondiente a la titulación de la macromolécula con el ligando. Por ejemplo si la macromolécula requiere aditivos especiales que aseguren su solubilidad o estabilidad, estos componentes deben también estar presentes y en la misma concentración en la solución del ligando. De hecho la solución de la macromolécula y la de ligando deben prepararse con exactamente el mismo buffer, empleando para ello procedimientos de diálisis o columnas de exclusión. Las muestras deberán además filtrarse si se sospecha la formación de agregados y las concentraciones deberán ser medidas en las soluciones finales que se colocarán en el calorímetro. También es muy importante controlar el pH de las soluciones y si existe una diferencia de más de 0,05 unidades entre ambas deberá realizarse el ajuste correspondiente para quedar dentro de este límite. Por otra parte deberán evitarse componentes en las soluciones que, por sus respuestas térmicas frente a los procesos que ocurran durante el experimento calorimétrico, puedan llegar a distorsionar las curvas calorimétricas. Por ejemplo, si la muestra requiere la presencia de reductores se evitará el uso de ditiotreitól que sufre una lenta oxidación aun en bajas concentraciones (0,5 mM) produciendo una distorsión en la línea de base, y se lo reemplazará por ejemplo por β -mercaptoetanol.

La concentración de la macromolécula en la celda es también un factor importante al momento de diseñar un experimento de ITC. Para entenderlo necesitamos analizar previamente de qué factores depende la cantidad de calor intercambiado durante cada inyección de ligando. Si suponemos que no existen otros procesos que generen o absorban calor tendremos que para una inyección,

$$Q_i = \Delta H_L \cdot \Delta(\text{moles de ligando unido}) \quad \text{Ec. 12.17}$$

donde ΔH_L es la variación de entalpía expresada por mol de ligando unido. Considerando la ecuación 12.10 y que la celda que contiene la muestra posee un volumen V , tendremos:

$$Q_i = \Delta H_L \cdot V \cdot (\bar{v}_i - \bar{v}_{i-1}) [M]_T \quad \text{Ec. 12.18}$$

Y el calor acumulado después de N inyecciones:

$$Q = \sum Q_i = \Delta H_L \cdot V \cdot [M]_T \cdot \bar{v} \quad \text{Ec. 12.19}$$

en estas ecuaciones \bar{v} se reemplazará por las expresiones 12.13 a 12.15 de acuerdo al modelo de interacción que se esté considerando.

La Figura 12.2 muestra los resultados simulados de 3 experimentos calorimétricos realizados a diferentes concentraciones de una macromolécula para la interacción con un ligando, para el que posee un único sitio, con una constante de asociación $K = 10^6 \text{ M}^{-1}$ y un $\Delta H = -3 \text{ kJ/mol}$.

Como podemos observar la curva de titulación se ve profundamente afectada por la concentración de macromolécula. El panel central (B) muestra una curva de titulación típica en la cual se diferencian claramente las 3 regiones definidas al inicio de esta sección. A partir de un experimento de este tipo es posible determinar la estequiometría, la variación de entalpía y la constante de asociación ajustando las ecuaciones 12.18, 12.15 y 12.16 al conjunto de datos experimentales mediante procedimientos de regresión no lineal. A bajas concentraciones (panel A), las tres partes de la curva se desdibujan ya que sólo una muy pequeña fracción del ligando inyectado se une a la macromolécula aun en las primeras inyecciones, y no es posible llegar a la zona de saturación. A partir de un experimento de este tipo sólo se podría estimar la entalpía y la constante de asociación si se conoce la estequiometría a través de experimentos independientes. La situación vuelve a cambiar para el caso del experimento realizado a una elevada concentración de proteína (panel C). En este último caso todo el ligando que se inyecta se une a la macromolécula hasta el punto en que se alcanza la saturación y a partir de ese momento todo el ligando inyectado permanecerá como ligando libre. Dado que muy pocas inyecciones dejarán al sistema en la zona intermedia de transición, no podrá evaluarse en este caso la constante de asociación que gobierna al equilibrio. Eso sí, se obtendrá una muy buena determinación de la estequiometría y del ΔH .

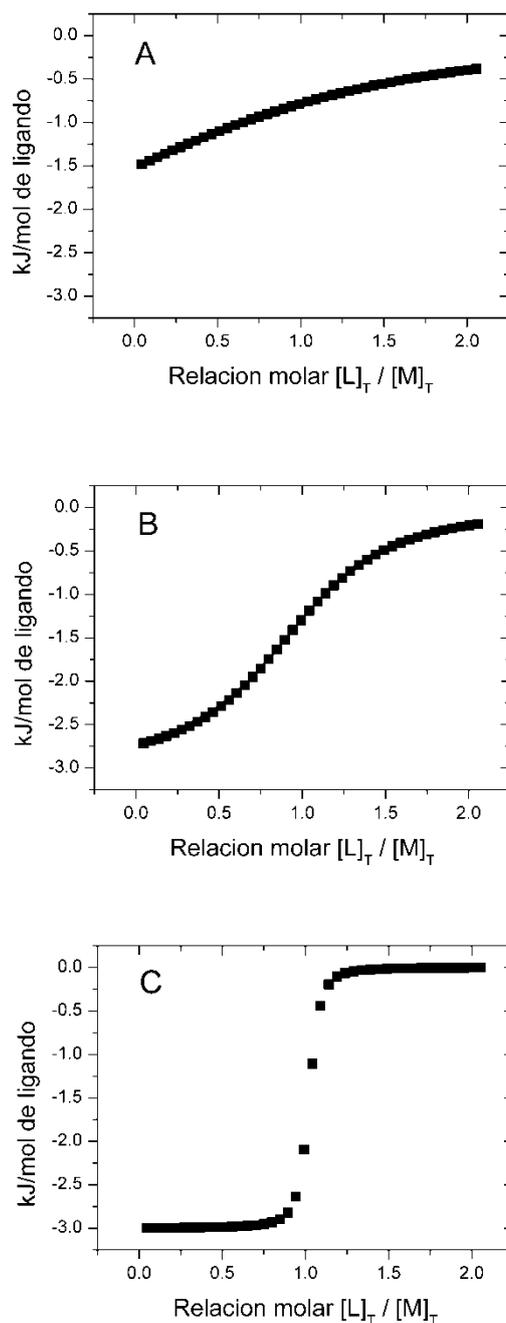


Figura 12.2. Simulación de un experimento de ITC para la titulación de una macromolécula ($[M]_T = 1 \mu\text{M}$ (A), $10 \mu\text{M}$ (B) y 1mM (C)) con un ligando que se une a un único sitio. Los valores de c correspondientes son 1, 10 y 1000, respectivamente. Los valores de K y ΔH se mantuvieron constantes en 10^6M^{-1} y un -3kJ/mol , respectivamente.

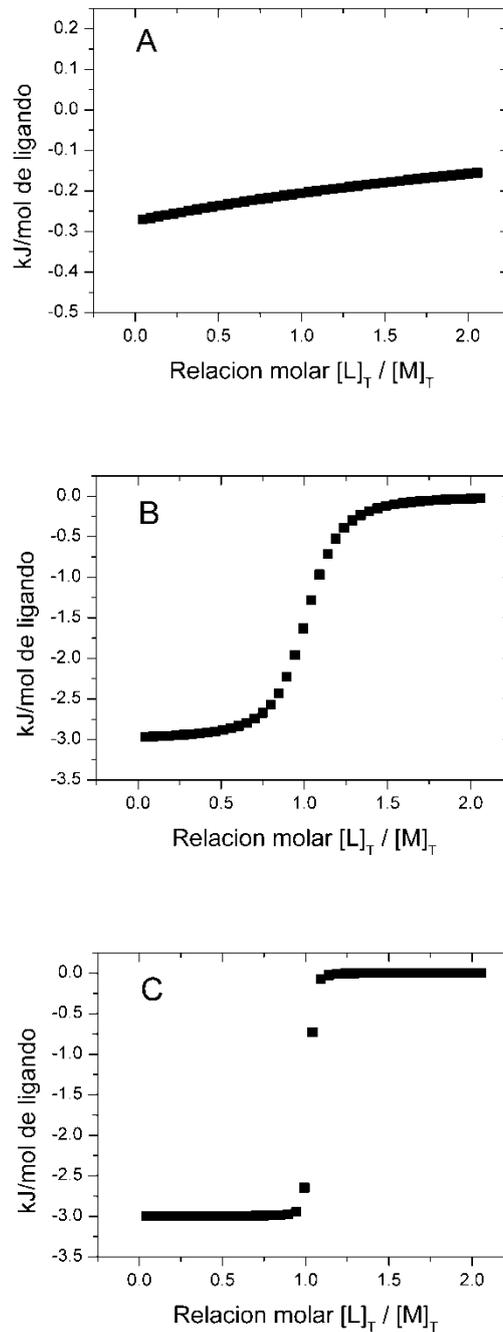


Figura 12.3. Simulación de un experimento de ITC para la titulación de una macromolécula con tres ligandos que se une a un único sitio con constantes de asociación $10^4 M^{-1}$ (A), $10^7 M^{-1}$ (B) y $10^9 M^{-1}$ (C).. Los valores de $[M]_T$ y ΔH se mantuvieron constantes en $10 \mu M$ y -3 kJ/mol , respectivamente.

Un comportamiento similar se observa si simulamos una serie de titulaciones calorimétricas realizadas a igual concentración de macromolécula pero titulando con ligandos que presentan distinta afinidad (Figura 12.3). Puede

observarse que a medida que disminuye la afinidad (panel A) se pierde la forma de la curva de manera equivalente a lo que ocurría a bajas concentraciones. Por el contrario los ligandos que presentan mayor afinidad (panel C) dan curvas sin información experimental en la zona de transición similares a las que teníamos para altas concentraciones de macromolécula. Resulta entonces claro que la concentración de macromolécula es la variable que nos permitirá llevar la curva de titulación a la forma óptima para realizar los experimentos calorimétricos. En este sentido resulta útil definir una cantidad “c” como:

$$c = n \cdot k \cdot [M]_T$$

Ec. 12.20

El valor de c sirve como una guía para el diseño del experimento. Como se puede observar en la figura las curvas de titulación calorimétrica mejor definidas corresponden a valores de c comprendidos entre 10 y 100.

Sin embargo una buena selección del valor de c no asegura que las concentraciones que dan la mejor curva también vayan a generar suficiente calor como para que se pueda medir con precisión por el calorímetro, y no sean tan altas como para salir del rango de detección. También puede ocurrir que la macromolécula no sea soluble a las concentraciones necesarias para realizar el experimento óptimo. En estos casos se deberá encontrar empíricamente la solución de compromiso que permita realizar el mejor experimento posible.

12.3. Características Termodinámicas de la Interacción entre Ligandos y Macromoléculas.

Marcas termodinámicas

Como ya mencionamos un experimento de ITC bien diseñado permitirá conocer la estequiometría, la o las constantes termodinámicas que gobiernan

los equilibrios y también las contribuciones energéticas que determinan la fuerza impulsora de la interacción.

Las constantes termodinámicas dan cuenta de la energía libre de Gibbs de interacción caracterizando lo que se conoce como afinidad del ligando por la macromolécula en cuestión. Sin embargo su valor por sí solo no da cuenta de la naturaleza de las interacciones, de hecho dos ligandos que interaccionan de manera completamente distinta con la macromolécula pueden presentar la misma afinidad. Los experimentos de ITC permiten la disección de la afinidad en sus contribuciones entálpicas y entrópicas. La entalpía y la entropía de unión reflejan diferentes interacciones interatómicas que subyacen a la reacción de unión, y por lo tanto proporcionan información adicional a la contenida en el cambio global en Energía de Gibbs de la unión. Este conjunto de información, (ΔG , ΔH y $T\Delta S$) constituye lo que se denomina marca termodinámica básica que caracteriza al proceso de interacción (Freire, 2011; Ladbury, 2004).

La calorimetría de titulación es la única técnica experimental que permite determinar en forma directa el cambio de entalpía asociado a la interacción. Para poder determinar el ΔH mediante una técnica espectroscópica, es necesario calcular la constante de equilibrio a distintas temperaturas y aplicar entonces el formalismo de Van't Hoff (Tanford, 1961; Weber, 1990) para la dependencia de los cambios en la energía libre de Gibbs con la temperatura. Sin embargo este procedimiento frecuentemente no permite estimar el ΔH con una exactitud razonable dado que la dependencia con la temperatura de muchas reacciones de interés bioquímico es pequeña y los intervalos de temperatura que se pueden explorar también son pequeños.

Las interacciones no-covalentes entre moléculas biológicas incluyen enlaces de hidrógeno, de van der Waals, interacciones polares y electrostáticas etc. La formación de enlaces se asocia con una disminución en la entalpía, lo que resulta favorable para la unión. Por otra parte las moléculas que están libres en solución pueden establecer enlaces con las moléculas de agua, y es posible que estos enlaces se tengan que romper para permitir la interacción ligando macromolécula, con lo cual aumentará la entalpía lo que es desfavorable para

la unión. En consecuencia el cambio entálpico será favorable para el proceso de unión si hay una formación neta de enlaces de hidrógeno u otras fuerzas atractivas.

De manera contraria un aumento en la entropía contribuirá favorablemente a la reacción de unión. La entropía en un sistema de moléculas interaccionando está constituida por diferentes componentes (Freire, 2011). Por un lado, la reducción en el número de conformaciones del ligando (si es que tiene más de una) y de la macromolécula como consecuencia de la unión producirá una disminución en la denominada entropía conformacional y contribuirá desfavorablemente al ΔG° de interacción. Por otra parte los cambios en la interacción del ligando y la macromolécula con el agua que se produzcan durante el proceso de unión determinará lo que se denomina entropía de solvatación. Las moléculas de agua que interactúan con el ligando o la macromolécula poseen una movilidad restringida respecto del agua solvente, de modo que si durante la unión del ligando a la macromolécula se liberan moléculas de agua de solvatación se producirá un aumento de entropía que favorecerá la unión. Los ligandos no-polares restringen en gran medida la movilidad de las moléculas de agua de solvatación generando regiones de agua altamente estructurada.

La Figura 12.4 muestra la marca termodinámica correspondiente a la unión de tres ligandos que tienen afinidades similares, pero modos de interacción completamente diferentes.

El caso A es típico de una reacción en la que la formación neta de enlaces entre el ligando y la macromolécula se refleja en una gran disminución en la entalpía, que supera a una disminución de entropía (el cambio en la entropía conformacional supera al de solvatación). Se dice que en este caso la unión está impulsada entálpicamente. El caso B corresponde a una reacción en la que la principal contribución a la energía libre de unión proviene del aumento de la entropía de solvatación asociada a la liberación de moléculas de agua estructurada (efecto hidrofóbico). El término entalpía es desfavorable y se debería a la supresión de las interacciones entre las moléculas de agua. En este caso se habla de reacción impulsada entrópicamente. Finalmente el caso

C corresponde a una reacción donde tanto el componente entálpico como el entrópico favorecen la unión y contribuyen al ΔG° aproximadamente en la misma magnitud.

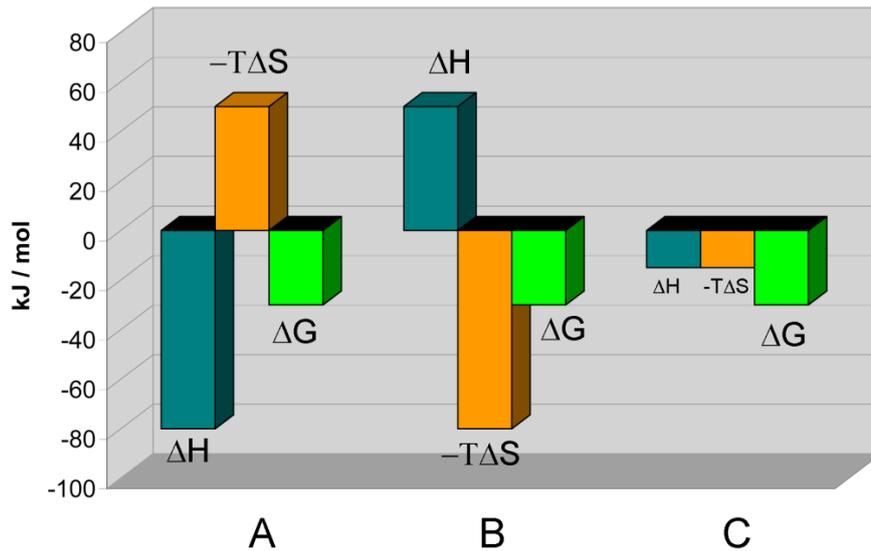


Figura 12.4 Marcas termodinámicas en la interacción entre ligandos y macromoléculas. A. La unión del ligando es impulsada entálpicamente compensando la disminución de entropía conformacional. B: La unión es endotérmica y en consecuencia es impulsada entrópicamente. C: El ligando se asocia con un cambio de entalpía favorable y cambios de entropía también favorables y que contribuyen casi por igual al cambio de la energía libre de Gibbs.

Cambios en la capacidad calorífica

Si se realizan titulaciones calorimétricas de un mismo proceso a diferentes temperaturas es posible obtener una caracterización termodinámica completa del proceso de unión de un ligando a una macromolécula. Como mencionamos en la sección anterior el efecto de la temperatura sobre el ΔG es generalmente pequeño, mientras que tanto la entalpía como la entropía muestran cambios mucho más marcados. Es por esta razón que nuevamente los calorímetros de titulación presentan ventajas sustanciales en relación con los métodos

espectroscópicos a los efectos de evaluar procesos de interacción intermoleculares.

La capacidad calorífica de un sistema se define como la cantidad de calor que necesita absorber un sistema para aumentar su temperatura en 1 °C. Si la determinación se realiza a presión constante, la cantidad de calor intercambiada será igual a la variación de entalpía (ΔH) de este proceso, y si los estados inicial y final del sistema tienen una respuesta térmica distinta ante el intercambio de calor, podremos definir un cambio en la capacidad calorífica a presión constante (ΔC_p) de manera tal que:

$$\Delta H_T = \Delta H_{T_{ref}} + \Delta C_p \cdot (T - T_{ref}) \quad \text{Ec. 12.21}$$

La diferencia entre la capacidad calorífica del ligando unido a una macromolécula y la correspondiente a ambas especies libres en solución, está determinada por el cambio en el área expuesta al solvente durante el proceso de unión (Freire, 2011). Las moléculas de agua altamente ordenada que rodean a una molécula hidrofóbica en solución tienen una elevada capacidad calorífica. En consecuencia, si estas moléculas se liberan al producirse la unión ocurrirá una disminución drástica en la capacidad calorífica del sistema. De hecho, un ΔC_p muy negativo es una de las características distintivas de una unión hidrofóbica y en principio se puede utilizar para distinguir este tipo de unión de otros que son también impulsados entrópicamente.

La Figura 12.5 muestra la variación de ΔG , ΔH y $T\Delta S$ función de la temperatura para dos reacciones de asociación con la misma marca termodinámica a temperatura ambiente y diferentes valores de ΔC_p . Se puede observar en ambos casos que los cambios en ΔC_p afectan marcadamente la dependencia con la temperatura de ΔH y $T\Delta S$, mientras que los cambios en ΔG son considerablemente menores. En el caso mostrado en el panel B podemos observar que la reacción va cambiando su marca termodinámica medida que cambia la temperatura. A bajas temperaturas la reacción es impulsada entrópicamente, pero alrededor de los 60 °C ambos componentes (el entálpico y el entrópico) contribuirán favorablemente al ΔG de unión. Finalmente, a temperaturas elevadas, la reacción pasa a ser impulsada entálpicamente.

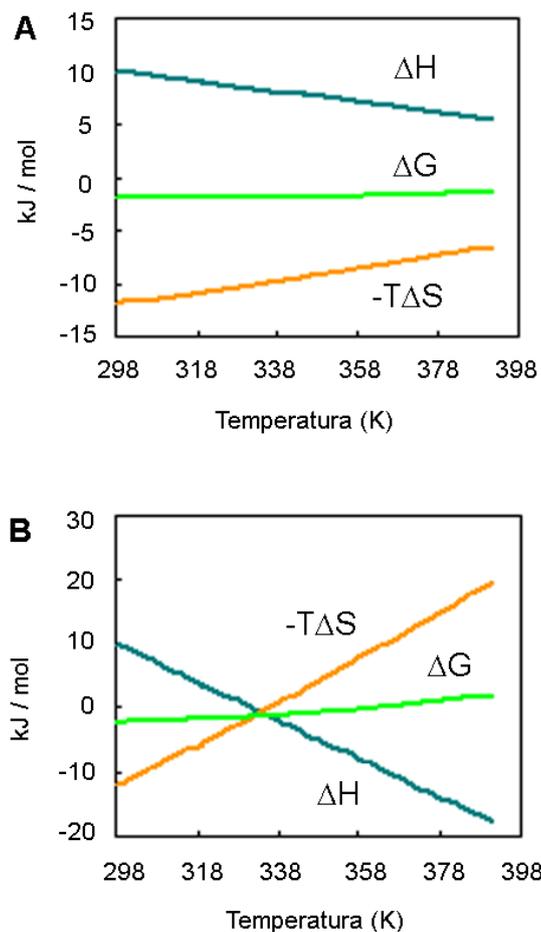


Figura 12.5. Dependencia con la temperatura de ΔG , ΔH y $T\Delta S$ para dos reacciones de asociación con la misma marca termodinámica a temperatura ambiente y diferentes valores de ΔC_p . Los valores de ΔG , ΔH y $T\Delta S$ son -2, 10 y -12 kJ/mol respectivamente, mientras que los valores de ΔC_p son -50 J/K mol (A) y -300 J/K mol (B).

Conclusión

La calorimetría de titulación isotérmica o ITC constituye una tecnología sencilla y no destructiva que permite la determinación simultánea de la estequiometría, la afinidad y las contribuciones energéticas (cambios en la entalpía y la entropía) correspondientes a la interacción de un ligando con una macromolécula. Las diferencias en las contribuciones entrópicas y entálpicas

determinan diferentes modos de unión, lo que hace posible distinguir y caracterizar ligandos que se unen con afinidades similares. Si la macromolécula en estudio posee más de un sitio para el ligando, la titulación calorimétrica permite determinar si la unión del primer ligando facilita la unión de ligandos posteriores. A través de experimentos de ITC realizados bajo diferentes condiciones es posible disponer de una descripción general de cómo un ligando interacciona con el sitio de unión. Todo esto hace de la calorimetría de titulación isotérmica una técnica de gran alcance, y que en la actualidad tiene un papel central en los campos de la biología estructural, la bioquímica y en el desarrollo de nuevos medicamentos.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado con subsidios de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 2010-1876) y de la Universidad de Buenos Aires (UBACyT 20020100100048)

Bibliografía

Cantor CR, Schimmel PR. Biophysical Chemistry, Freeman, New York, 1980.

Freire E, Mayorga O, Straume M. Isothermal Titration Calorimetry, *Anal Chem* 62 950-959, 1990.

Freire E, Kawasaki Y, Velazquez Campoy A, Schon A. Characterisation of Ligand Binding by Calorimetry, *RSC Biomolecular Sciences*, 275-299, 2011.

Gutfreund H. Kinetics for Life Sciences. Receptors, transmitters and catalysts. Cambridge University Press, Cambridge, 1995.

Ladbury JE, Doyle ML. Biocalorimetry 2, Wiley, New York, 2004.

Tanford C. Physical Chemistry of Macromolecules. Wiley, New York, 1961.

Weber G. Protein Interactions, Chapman, New York, 1992.

Wyman J, Gill SJ Binding and Linkage. Functional Chemistry of Biological Macromolecules.
University Science Books, Mill Valley, CA, 1990.

CAPÍTULO 13

MICROSCOPIA ÓPTICA

Lisandro Jorge Falomir Lockhart y Federico Fuentes

Introducción

La microscopía es un conjunto de técnicas que se ha desarrollado por más de 300 años, que incluyen distintas metodologías altamente especializadas. Se clasifican en 3 grandes grupos: La Microscopía Óptica, la Microscopía Electrónica y la Microscopía por Sondas. Este capítulo está centrado en presentar una serie de técnicas incluidas dentro de la Microscopía Óptica que permiten estudiar procesos bioquímicos y biofísicos hasta a nivel (sub-)micrométrico, es decir a nivel de tejidos, celular, subcelular, o incluso molecular. Una de las grandes ventajas de la microscopía es que se pueden emplear los mismos fenómenos físicos, descritos en capítulos anteriores para el análisis de biomacromoléculas *in vitro*, pero ahora incorporando también información espacial, en particular, en relación a las estructuras biológicas relevantes de cada sistema en estudio, como la estructura de un tejido, la célula, el núcleo, organelas, etc..

Desde sus inicios a mediados del siglo XVII, el microscopio ha sufrido grandes cambios. Inicialmente limitado al espectro electromagnético de la luz visible al ojo humano, en las últimas décadas se han desarrollado técnicas que emplean un espectro extendido, que hoy abarca desde los rayos-X hasta el infrarrojo lejano, gracias al desarrollo de detectores específicos que reemplazan al ojo del observador. Por practicidad, este capítulo se enfocará exclusivamente en las técnicas de Microscopía Óptica, es decir, nos limitaremos al espectro visible ligeramente extendido hacia el UV y el IR; mientras que dejaremos de lado la descripción del microscopio electrónico y otras variantes. Por otro lado, junto

con al desarrollo de detectores especializados, se incorporó también la digitalización de las imágenes, potenciando así las posibilidades de análisis. Hoy en día, comprender y prever el modo de análisis de las imágenes obtenidas es, al menos, igual de importante que el diseño del ensayo en sí a través del cual se registrarán las mismas. Por tal motivo, se urge a los interesados a explorar los distintos programas disponibles según su interés o necesidad.

No se desarrollarán en este texto las descripciones correspondientes a las técnicas de Microscopía Electrónica o por Sondas, quedando también pendientes sus comparaciones e integración con las técnicas de Microscopía Óptica pendientes para futuras ediciones.

13.1. Partes del Microscopio Compuesto de Campo Amplio

Ya que para un buen uso de las técnicas de microscopía es necesario comprender cómo funciona el microscopio, primero nos centraremos en describir las partes del mismo y sus funciones. Luego describiremos algunos conceptos básicos sobre los fundamentos y los límites de la técnica, para luego sí describir las posibilidades tecnológicas más comunes en la actualidad y las ventajas de cada una. Compararemos las propiedades del microscopio de campo amplio con las del microscopio confocal, e introduciremos algunos ejemplos de técnicas de “superresolución”. Para mostrar la utilidad de cada una de las variantes, trataremos de ir incorporando ejemplos prácticos que evidencien la utilidad de cada técnica.

El microscopio compuesto que se usa en la actualidad está formado por dos tipos de componentes. Por un lado se integran los distintos elementos del camino óptico por el cual se colecta y enfoca la luz, y por otro lado tenemos distintos componentes mecánicos que forman el armazón del equipo y permiten mover los componentes ópticos y la muestra de forma precisa y reproducible (Figura 13.1). Comenzaremos describiendo los elementos ópticos y sus funciones según el recorrido que realiza la luz.

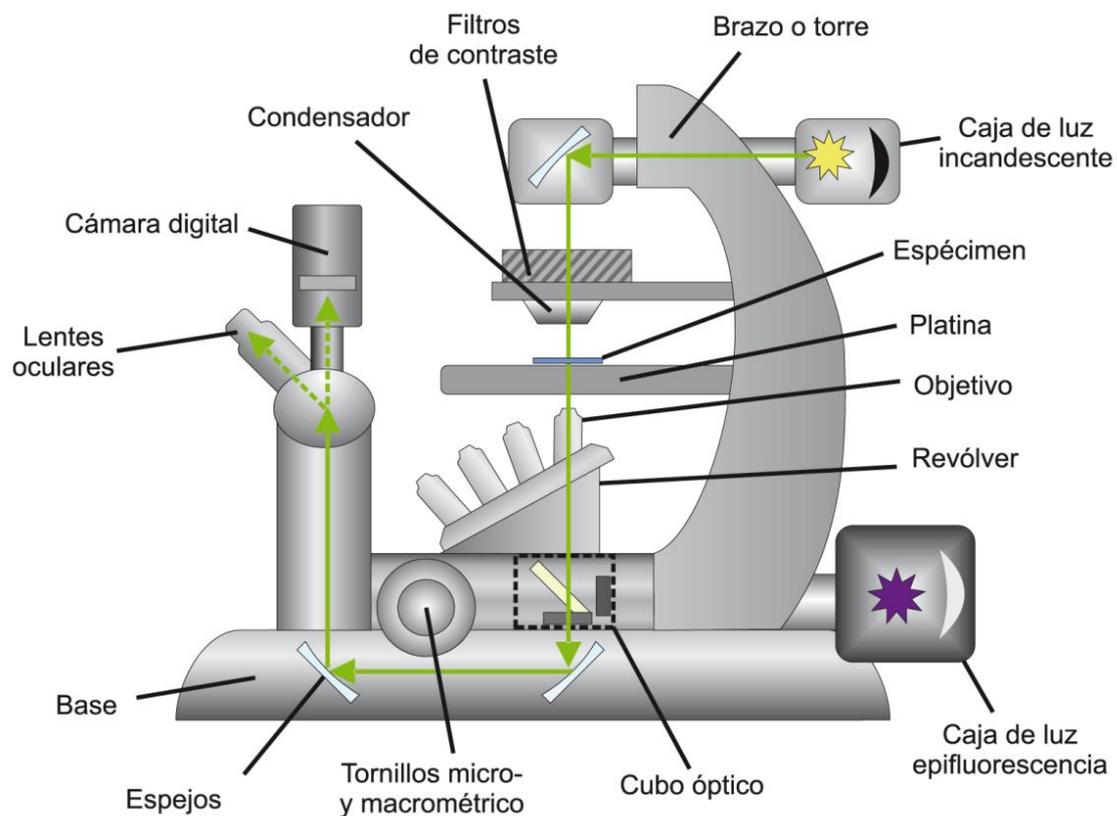


Figura 13.1. Estructura básica del Microscopio Compuesto. Este diagrama esquematiza las partes y las funciones de cada uno de los componentes de un microscopio compuesto. En particular se eligió un microscopio invertido de Epifluorescencia ya que es uno de los formatos más difundidos. El trayecto que recorre la luz desde la fuente de luz hasta el ocular se describe en líneas verdes.

- Fuente de Luz: Existen distintas fuentes de luz apropiadas para cada una de las distintas técnicas. Originalmente, un espejo se usaba para reflejar la luz solar o de una vela. Los equipos actuales están dotados, por ejemplo, de una lámpara halógena de filamento de intensidad variable para las técnicas de microscopía convencional. Sin embargo, a fin de ser empleados para microscopía de fluorescencia de campo amplio, es necesario que el microscopio cuente también con una lámpara de arco de Mercurio, que posee un espectro más amplio de emisión, en comparación a la de halógeno, y con intensidades mayores, en especial hacia el espectro UV. En ambos casos, una imagen de la fuente de luz debe ser proyectada sobre la muestra. Pero, debido a que la fuente de luz tiene una forma definida, la misma debe ser desenfocada completamente de forma tal de lograr una iluminación uniforme. Esto se conoce como "Iluminación de Köhler", en oposición a la "Iluminación Crítica" donde se

busca obtener una imagen nítida de la fuente de luz sobre la muestra (Figura 13.2). La iluminación de Köhler tiene la ventaja de lograr una densidad de luz completamente uniforme sobre toda la muestra, reduciendo la aparición de artefactos y sombras sobre la imagen y aumentando el contraste de la misma. La iluminación de Köhler además es indispensable para técnicas como Contraste de Fase o Contraste por Interferencia Diferencial (DIC) (ver más adelante).

- Filtros: En el caso de aplicar las técnicas de Contraste de Fase o de DIC, previo al condensador, se ubica por lo general una rueda que permite intercambiar distintos elementos ópticos necesarios para cada técnica. En el caso de los microscopios de fluorescencia por transmisión también se pueden ubicar a esta altura los filtros de excitación.

-Condensador: Este componente es el encargado de enfocar la luz proveniente de la fuente de luz sobre la muestra. Está formado por dos lentes y un iris mecánico (o diafragma). Este último se emplea para regular la intensidad de luz que llega a la muestra y para ajustar la profundidad del campo de la muestra modificando la apertura numérica (NA) efectiva y el contraste de la imagen.

- Espécimen: La muestra se prepara generalmente entre dos vidrios, el portaobjetos y el cubreobjetos para poder posicionarla entre el condensador y el objetivo. El grosor del cubreobjetos debe ajustarse a las características del conjunto de objetivos disponibles para lograr enfocar bien las muestras y obtener imágenes de la máxima nitidez posible.

- Objetivo: El objetivo está formado por un conjunto de lentes. Su función es la de colectar la luz (reflejada, refractada o emitida por la muestra) y es una de las piezas fundamentales del equipo en la formación de la imagen, ya que sus características definen la capacidad que tiene el microscopio para distinguir detalles (poder de resolución). Actualmente los objetivos están diseñados para proyectar una imagen en el infinito, en lugar de proyectar una imagen real dentro del tubo del microscopio. La luz que proviene de la muestra se proyecta en rayos paralelos hasta ser colectada por las lentes del Ocular en el otro extremo del tubo del microscopio, generando una imagen real y magnificada. De esta manera es posible el agregado de componentes ópticos, como los

filtros o espejos dicróicos, en el espacio intermedio sin que se ocasionen aberraciones ópticas o modificaciones focales.

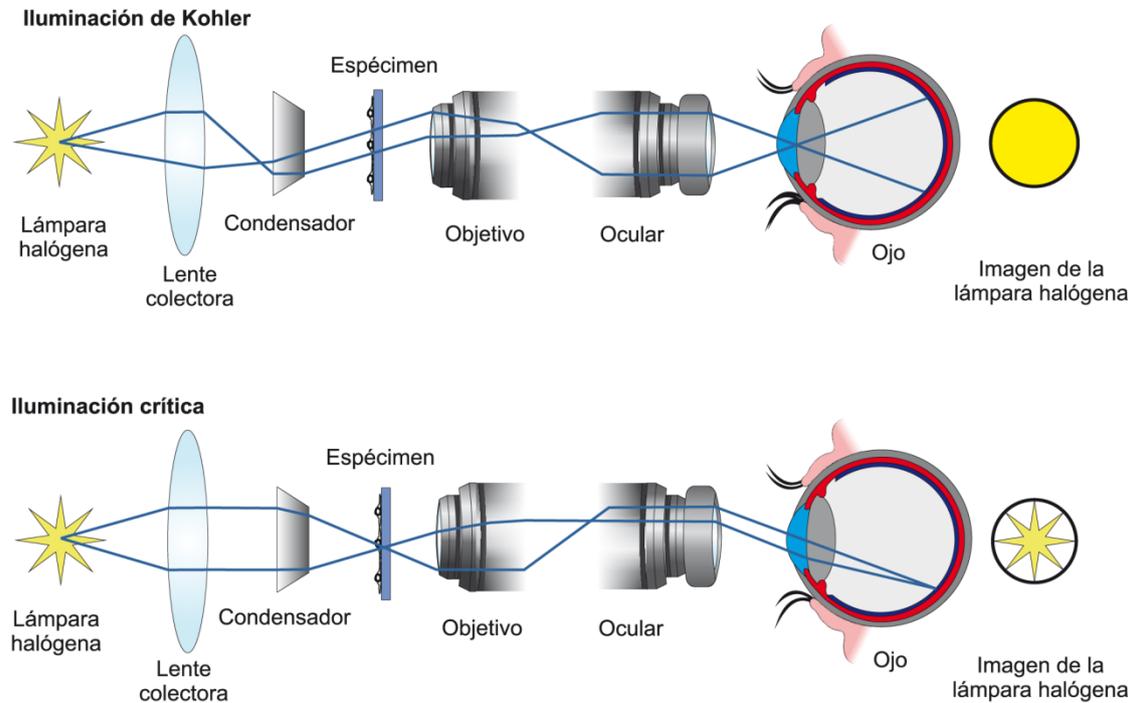


Figura 13.2. Iluminación Crítica versus Iluminación de Köhler. La iluminación crítica consiste en proyectar una imagen de la fuente de luz (filamento incandescente) sobre el plano focal del espécimen a analizar. Eso determina una iluminación no uniforme de la muestra por la forma irregular del filamento de la lámpara halógena. La iluminación de Köhler, en cambio, procura proyectar la imagen de la fuente de luz sobre el plano focal posterior del condensador de forma tal de que se encuentre completamente desenfocada sobre el plano focal de la muestra. De este modo se logra una iluminación uniforme que realza el contraste y disminuye los artefactos debidos a una iluminación despareja del espécimen.

Por lo general, se cuenta con un conjunto de objetivos intercambiables montados sobre el revólver de forma tal de poder registrar imágenes a distintos aumentos y campos de visión de distinto tamaño. Los objetivos se clasifican en “secos” o “de inmersión”, de acuerdo a si están preparados para observar la muestra a través de aire o de algún medio de mayor índice de refracción, como agua, glicerol o aceite. Se caracterizan por 4 códigos que representan la Apertura Numérica (NA, por sus siglas en inglés *Numeric Aperture*), las correcciones ópticas que realiza, si son de inmersión además indican el índice de refracción y el medio que debe usarse en combinación con el objetivo, y, por último, el factor de aumento seguido de una “X”. En la sección siguiente se explicará más en detalle la importancia de cada uno de estos parámetros. En el

caso de las técnicas de contraste de fase y DIC los objetivos deben incluir elementos extra y no pueden ser combinados libremente con los filtros.

- Filtros y Dicroicos: En el caso de la microscopía de fluorescencia se requiere filtrar la luz de excitación que atraviesa o es reflejada en el espécimen. Para ello se usan filtros dicroicos (en los equipos de Epifluorescencia) y filtros de emisión. Los filtros de emisión y de excitación deben ajustarse al/los fluoróforos que serán analizados en una misma muestra. El diseño más frecuente corresponde a los microscopios de Epifluorescencia, en los cuales los filtros de emisión, los espejos dicroicos y los filtros de emisión se pueden intercambiar de forma tal de poder adaptar así la configuración del microscopio a un rango amplio de fluoróforos. En algunos microscopios, los tres elementos se combinan en un único elemento óptico comúnmente referido como “cubo”, que se comercializan ya optimizados para distintos fluoróforos.

- Ocular: Las lentes del ocular permiten obtener un aumento que multiplica aquel realizado en primera instancia por las lentes del objetivo. Además generan una imagen de la muestra en un plano infinito de forma tal de no tener que forzar la vista. En algunos oculares se intercala en el camino óptico una pestaña o puntero que sirve como referencia. Los microscopios actuales suelen ser binoculares, es decir, cuentan con dos oculares permitiendo la observación estereoscópica. Además uno de los oculares suele permitir ajustes de foco para corregir posibles discrepancias entre los ojos del observador. La inspección ocular del preparado por el usuario es una parte fundamental de las buenas prácticas microscópicas, más allá que luego se emplee una cámara para digitalizar la imagen.

- Cámara: Los microscopios actuales suelen tener un puerto especial para adosar una cámara digital o una cámara de video. Un espejo refleja la luz que normalmente es guiada hacia los oculares por el puerto de la cámara de forma tal de poder grabar y/o digitalizar las micrografías. Existen distintos tipos de cámaras con sensores de distintas propiedades, y cada año aparecen en el mercado nuevas y mejores cámaras digitales, de mayor resolución y más rápidas. Por tal motivo es difícil hacer una descripción detallada en este capítulo introductorio sobre las características más sobresalientes de los

distintos tipos de cámaras de última generación. Aun así, es importante comprender cuál es el principio fundamental de las cámaras digitales. Brevemente, las cámaras tienen un sensor que es un arreglo de detectores puntuales capaces de registrar y cuantificar la luz que les llega, análogamente a la retina ocular. La imagen se genera a partir de los valores de intensidad registrados por cada detector puntual que se corresponde con cada pixel (unidad básica de una imagen) al que se le asigna un valor en escala de grises. Los sensores suelen ser monocromáticos, es decir, no distinguen fotones de distinta longitud de onda. Sin embargo, si no se cuenta con una cámara con propiedades espectrales, es posible separar la luz emitida o transmitida en dos o más canales empleando filtros dicróicos y de emisión, y así obtener imágenes alternativamente para cada rango de longitudes de onda. Esto genera una imagen “multicanal”, donde cada canal corresponde a una configuración particular de filtros en el microscopio.

Integrando los componentes ópticos, el microscopio compuesto se completa con una serie de elementos mecánicos que sostienen y permiten posicionar con precisión los distintos elementos ópticos y el espécimen para formar la imagen aumentada de la muestra, así como evitar que luz espuria degrade la calidad de la imagen. Los componentes mecánicos cambian ligeramente en las configuraciones “vertical” e “invertido” en sus funciones y disposición. Los más sobresalientes son los siguientes:

- Base o Carcasa del Microscopio: Funciona como soporte estable donde se apoyan o sostienen los otros componentes mecánicos y ópticos del microscopio. Además la base es responsable de proteger los elementos ópticos evitando a su vez que se muevan fuera de la calibración del equipo. Finalmente, la base es un importante elemento de protección del usuario ya que evita que la luz potente de la fuente sea reflejada accidentalmente hacia los ojos del observador, lo que podría causar severos daños y hasta ceguera. Muchos laboratorios construyen sus propios microscopios sobre una mesa óptica anti-vibratoria, y en estos casos la base está generalmente ausente, lo que requiere el uso casi obligatorio de gafas protectoras.

- Brazo o Torre: En el microscopio vertical sirve como soporte para el tubo óptico, los filtros de emisión, el revólver de objetivos y la platina. Mientras que en el microscopio invertido sostiene la caja de luz con la lámpara halógena, el condensador y los filtros de excitación o para Contraste de Fase y DIC. Los componentes restantes se ubican en la base. En ambos casos, el brazo permite sujetar y trasladar el microscopio.
- Platina: Funciona como soporte para ubicar el espécimen entre el objetivo y el condensador en forma perpendicular a la dirección del haz de luz incidente. La platina puede tener distintos adaptadores para sujetar distintos tipos de dispositivos de cultivo y preparados (placas multiwell, portaobjetos, placas de Petri, o cámaras de cultivo especializadas). Además, las platinas poseen dos tornillos o mandos de posicionamiento que permiten desplazar la muestra en el plano XY para su inspección. En el caso de las platinas motorizadas, se puede además variar en forma controlada la altura (posición en Z) de la muestra con precisión submicrométrica, de forma tal de obtener imágenes tridimensionales, o mejor dicho, una serie de imágenes bidimensionales con sus distancias focales separadas una distancia conocida.
- Caja de luz: Se conoce con este nombre a la estructura donde se encierra las lámparas que sirven como fuentes de luz. La misma contiene un espejo cóncavo que maximiza la intensidad de luz proyectada en dirección a los demás elementos ópticos. En el caso de la Iluminación de Köhler, el espejo se ubica de forma tal que las imágenes de la fuente de luz, directa y reflejada, que se forman en el camino óptico estén enfocadas (y desenfocadas) a las mismas distancias.
- Tubo óptico: Originalmente consistía de un cilindro metálico el cual estaba conectado en un extremo al ocular y en el otro al revolver de objetivos. Actualmente el diseño no es necesariamente cilíndrico, e incluyen otros elementos ópticos, como los filtros de análisis (de contraste de fase, DIC, emisión, etc.) o polarizadores.
- Revólver: Permite intercambiar los objetivos manteniendo su orientación perpendicular al espécimen. Los objetivos modernos vienen calibrados de forma tal que, al girar el revólver, se mantiene la distancia de foco sobre la

muestra. De todos modos, es recomendable alejar los objetivos de la muestra antes de cambiarlos, sobretodo en el caso de intercambiar objetivos secos por objetivos de inmersión.

- Rueda de Filtros: Sirve para intercambiar los filtros de análisis (Contraste de Fase y DIC) o de emisión, en el caso de microscopía de fluorescencia. De acuerdo al diseño, se ubican previo al condensador, o luego del revólver de objetivos. En algunos microscopios de fluorescencia se emplean ruedas de cubos de filtros, en los que se rotan como un único elemento un filtro de excitación, un dichroico y un filtro de emisión, optimizados para una única sonda fluorescente o un conjunto de sondas con propiedades muy similares.

- Tornillos Macrométrico y Micrométrico: Permiten ajustar el foco de la imagen variando la posición de los objetivos respecto del espécimen hasta alcanzar un enfoque óptimo. Existen distintos diseños según el fabricante. Pueden estar integrados en un único tornillo variable o ser independientes. El tornillo macrométrico controla movimientos rápidos y groseros de los objetivos (decenas de μm por vuelta), en cambio el tornillo micrométrico controla movimientos mucho más sutiles (fracciones de μm). Para evitar que los objetivos choquen con los especímenes y se dañen sus lentes, los microscopios actuales incorporan mecanismos de seguridad que impiden que éstos continúen acercándose indefinidamente y así se evitan roturas y daños a la muestra y a las lentes de los objetivos. Además, es recomendable respetar las técnicas básicas de microscopía para enfocar una muestra, en las cuales uno halla el foco siempre alejándose de la muestra empleando el tornillo macrométrico, y luego se realiza un ajuste fino empleando el tornillo micrométrico.

13.2. Aumento y Resolución

El microscopio es un arreglo de lentes que permite generar una imagen magnificada del objeto en estudio. Sin lentes, el ojo desnudo puede aumentar la imagen que se genera acercándose al objeto hasta una distancia mínima de

aproximadamente 25 cm. El modelo más simple de un instrumento de magnificación se conoce como lupa o lente magnificadora, y consiste en una única lente que se coloca frente al objeto. La lente produce un efecto de acercamiento del objeto logrando una imagen virtual de mayor tamaño. La magnificación (X) depende de la distancia focal (f) de la lente y de la distancia de trabajo (en el caso del ojo humano, 25 cm) (Figura 13.3A).

$$X = 25 \text{ cm} / f \quad \text{Ec. 13.1}$$

El arreglo más simple de un microscopio compuesto consta de dos lentes: la lente objetivo y la lente ocular (Figura 13.3B). La lente objetivo (X_{ob}) produce una imagen primaria real y magnificada a una distancia determinada (m) dentro del tubo óptico del microscopio. Del mismo modo, la imagen primaria es magnificada nuevamente por el ocular (X_{oc}) de la misma manera que una lupa. La magnificación total (X_t) es el producto de ambas magnificaciones:

$$X_t = X_{ob} \times X_{oc} = \frac{m}{f_{ob}} \times 25 \frac{\text{cm}}{f_{oc}} \quad \text{Ec. 13.2}$$

La capacidad de distinguir más detalles de la muestra en estudio está determinada principalmente por las características del objetivo empleado, por el tipo de luz empleada y por la técnica empleada para generar contraste. Además, los cambios de medio que debe atravesar la luz inducen una mayor pérdida de luz (información) cuanto mayor es la diferencia en los índices de refracción entre ellos. A continuación describiremos brevemente cada uno de los factores que definen el poder de aumento y de resolución de un microscopio.

- Aumento: El aumento observado es el producto de los aumentos originados a través de todos los elementos ópticos del microscopio. Así, por ejemplo, el uso de un objetivo de 10X y oculares de 10X producirían un aumento total de 100X en el tamaño de la imagen obtenida. El aumento se define como la relación lineal (largo, ancho, profundidad) entre el tamaño de la imagen y del objeto que ésta representa. Los objetivos de mayor aumento disponibles, aunque poco frecuentes, son de 150X. El uso de objetivos con aumentos mayores, está

limitado tecnológicamente por la capacidad de compensar por los distintos tipos de aberraciones ópticas generadas por las lentes de aumento, pero también por la incapacidad física de enfocar un haz de luz en un volumen menor al indicado por la ley de difracción de Abbe (ver más adelante).

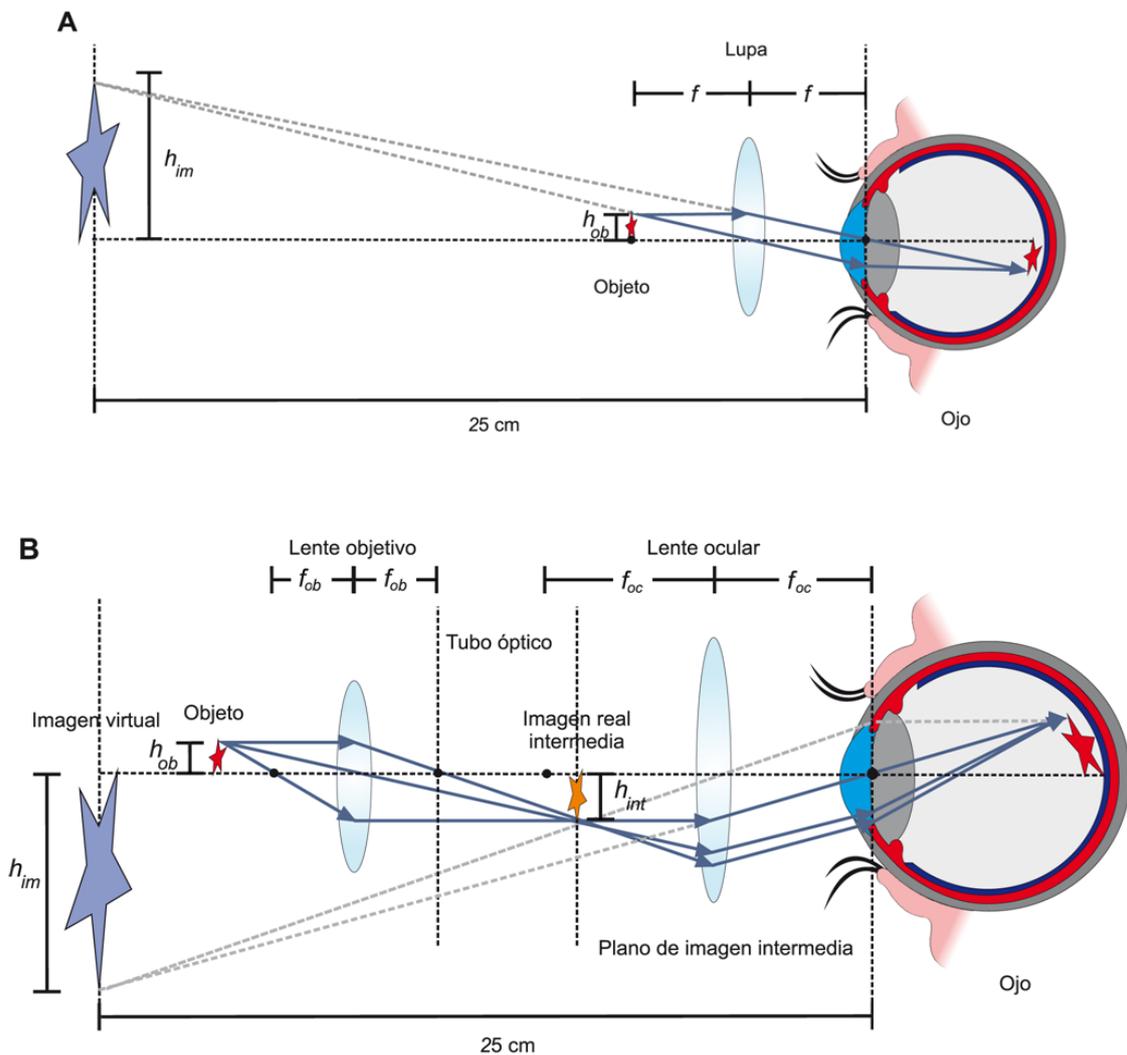


Figura 13.3. Diagramas de Rayos y Magnificación de una Imagen. Magnificación de una Lupa (A) y del microscopio Compuesto clásico (B). En cada ejemplo se observa la traza de rayos (azul) a partir de un objeto (rojo) a través de los distintos arreglos de lentes y hasta el ojo del observador. En el caso del Microscopio Compuesto, la imagen final está magnificada, invertida y es virtual (celestes). Notar además que la distancia entre el plano focal posterior de la lente objetivo y el plano de la imagen intermedia se corresponde con el largo del Tubo óptico. En el caso de objetivos corregidos al infinito, se intercala una lente adicional luego del objetivo que reenfoca la luz proveniente del plano focal (distancia de trabajo) de la lente objetivo. Esto permite intercalar lentes correctoras de aberraciones. Las distancias focales de cada lente se indican con un punto negro sobre el eje óptico (-----).

Por otro lado, el uso de objetivos de mayor aumento, implica una reducción en la cantidad de fotones obtenidos por pixel de la micrografía. Bajo estas condiciones, es esencial recolectar la mayor cantidad de fotones provenientes de la muestra. En este contexto, cobra relevancia el índice de refracción del medio dispersante entre el cubreobjetos y la lente frontal del objetivo.

- Índice de Refracción (n): Esta característica de cada sustancia o compuesto traslúcido representa la relación que existe entre la velocidad de transmisión de la luz en el vacío (o, a fines prácticos, en el aire) y en dicho medio. Por lo tanto, los índices de refracción (n) son números mayores a 1. Algunos ejemplos relevantes para este capítulo son lentes (vidrio) ≈ 1.52 , aceite de inmersión ≈ 1.515 , fluorita 1.435, agua 1.330, o aire ≈ 1.000 .

$$n = \frac{\text{Velocidad de la luz en el aire}}{\text{Velocidad de la luz en el medio}} \quad \text{Ec. 13.3}$$

- Apertura Numérica (NA): representa la capacidad de un objetivo de captar la luz refractada o reflejada por la muestra. Numéricamente corresponde al producto entre el índice de refracción n y el seno de la mitad del ángulo de apertura (α). Cuanto menor sea la distancia focal y más grande sea la lente frontal del objetivo, mayor será este ángulo, y el objetivo captará una mayor proporción de luz proveniente de la muestra (Figura 13.4A).

$$NA = n \times \text{sen } \alpha \quad \text{Ec. 13.4}$$

Los haces de luz que atraviesan el cubreobjetos se refractan más al pasar del vidrio al aire y, por lo tanto, su desviación es mayor. Así, por ejemplo, en el caso de los objetivos de inmersión, el uso del correcto medio dispersante (agua, aceite o glicerol) evita que los haces de luz refracten significativamente y se pierdan, ya que no censan cambios demasiado significativos en el índice de refracción a lo largo de su camino óptico. Esto permite maximizar la proporción de fotones colectados provenientes de la muestra, significativamente mayor a si se emplea aire como medio dispersante entre el cubreobjetos y la lente del objetivo (Figuras 13.4B y 13.4C).

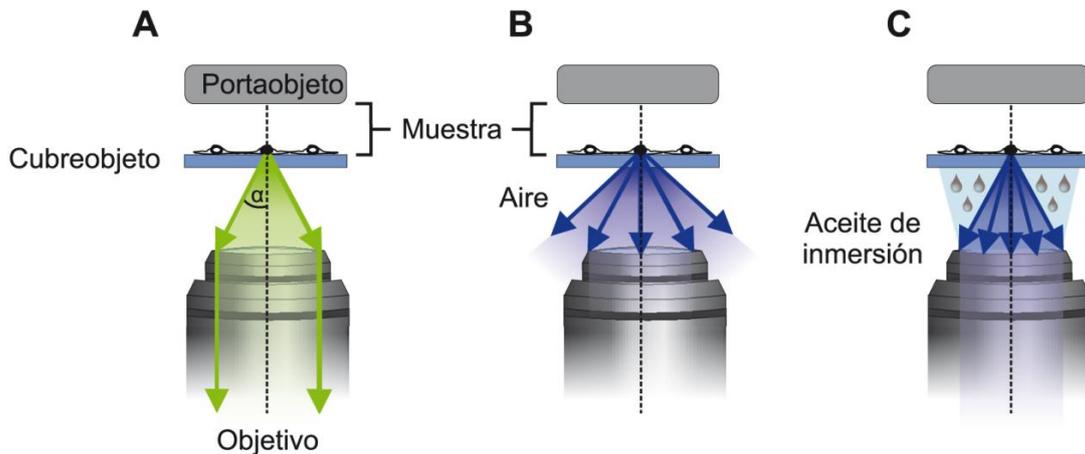


Figura 13.4 Apertura Numérica y Medio de Inmersión. La Apertura Numérica (NA) es uno de los parámetros más importantes de los objetivos, y corresponde al producto entre el índice de refracción (n) del medio dispersante y el seno de la mitad del ángulo del cono de luz que puede captar la lente objetivo (A). La cantidad de luz capturada por el objetivo depende fuertemente del medio entre el cubreobjetos y la lente. La luz se difracta al pasar de un medio de mayor a uno de menor n , tanto más cuanto mayor es la diferencia entre ambos. Por tal motivo, algunos objetivos están preparados para trabajar con distintos medios de inmersión que poseen n mayor al del aire ($n = 1$), como agua ($n = 1.33$), Glicerol ($n = 1.35 - 1.45$) o aceite de inmersión ($n = 1.515$). El n del vidrio es de 1.52.

Los parámetros de **NA** y **n** están directamente relacionados con el poder de resolución del microscopio y su capacidad de formar imágenes con detalles sub-micrométricos de la muestra en estudio. Así, cuanto mayor sea la **NA** de un objetivo y del condensador, mayor será la capacidad de distinguir detalles en la imagen que forman.

- Límite de resolución (d): Se define de este modo a la mínima distancia a la que deben ubicarse dos objetos puntuales de forma tal que sea posible distinguirlos como independientes o separados. La calidad de las micrografías en nitidez, claridad y riqueza de detalles depende en gran medida del d del objetivo. Según la Ley de Abbe, el d de un objetivo depende de la longitud de onda (λ) del haz luminoso y de la NA del objetivo y del condensador:

Microscopías de Transmisión:
$$d = \frac{1.22 \lambda}{(NA_{ob} + NA_{cond})} \quad \text{Ec. 13.5}$$

Microscopías de Epifluorescencia:
$$d = \frac{1.22 \lambda}{2 \times NA_{ob}} \quad \text{Ec. 13.6}$$

La Ecuación 13.6 corresponde al d del microscopio de epifluorescencia, donde el objetivo cumple las funciones de condensador y objetivo, por lo que $NA_{ob} = NA_{cond}$, y donde la constante $1.22/2$ (ó 0.61) se conoce como la constante de Abbe.

De la expresión de la Ley de Abbe se desprende que cuanto menor sea la longitud de onda, mayor será el poder de resolución del objetivo. Esto significa que si empleamos un objetivo de $NA = 1.40$ con luz de longitud de onda de 450 nm (como en el caso del fluoróforo DAPI), el límite de resolución será ligeramente menor a 200 nm . Este es el límite teórico pero, en la práctica, aberraciones e imperfecciones en las lentes sólo permitirán que el objetivo sea capaz de resolver la imagen de dos puntos que están separados entre sí poco más de 200 nm . De lo contrario, los dos objetos serán registrados como un único objeto.

13.3. Aberraciones

El uso de lentes esféricas en microscopía produce errores al tratar de formar una imagen plana de un objeto tridimensional de dimensiones o posiciones tales que se alejan del eje central de las lentes del objetivo. El efecto de estas se ha logrado corregir y minimizar mediante modificaciones en los diseños de los objetivos en los que se agregan distintas lentes que compensan una o más de las posibles aberraciones. Estos errores se llaman aberraciones. Los tres tipos más comunes de aberraciones son las siguientes:

- Aberración Cromática: ocurre por el diferente ángulo de difracción de la luz de distintas longitudes de onda, al igual que en la formación del Arco Iris. Esto produce un efecto tipo halo debido a que las imágenes difieren en tamaño y plano focal para cada longitud de onda proveniente del objeto en estudio. Las lentes *apocromáticas* fueron desarrolladas para corregir estas aberraciones, mediante una combinación de modificaciones en los materiales y las dimensiones de las lentes utilizadas en los objetivos.

- Aberración Esférica: la esfericidad de las lentes usadas causa que la luz que pasa por el centro de la lente se enfoque en un plano diferente al de la luz que pasa por los bordes. Esta aberración se ha corregido utilizando una combinación en serie de lentes cóncavas y convexas que tienen efectos de aberración esférica opuestos que se terminan cancelando. En estos casos los objetivos están diseñados para ser utilizados en condiciones específicas, como con cubreobjetos de un ancho determinado o junto al agregado de aceite de inmersión o algún otro medio dispersante, ya que las distorsiones de estos elementos han sido tenidas en cuenta al momento de diseñar las correcciones a la aberración esférica.

- Coma: este tipo de aberración ocurre especialmente cuando hay problemas de alineación del microscopio. Se produce por la entrada de luz lateralmente con lo que se forman distintas imágenes superpuestas de diferentes tamaños, dando la imagen de coma a partir de un objeto puntual. Esta aberración es dependiente de la forma de las lentes del objetivo. Las lentes corregidas para este defecto son denominadas *aplanares*.

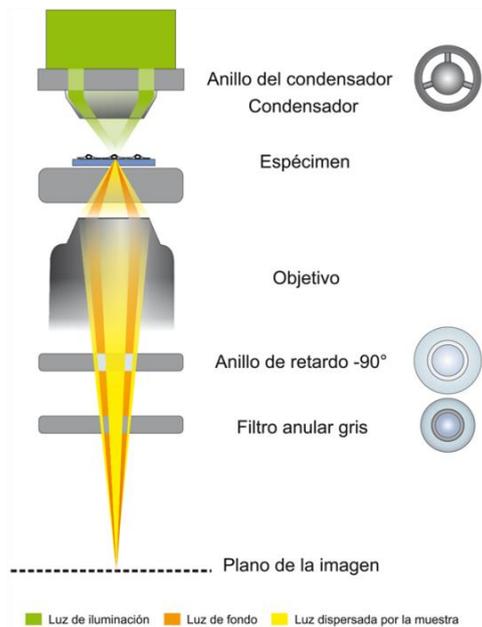
13.4. Generación de Contraste y Variantes de Microscopios de Luz Transmitida

La visualización de estructuras por microscopía depende de la capacidad de los objetos estudiados de producir contraste respecto al resto del espécimen. Las muestras celulares, por ejemplo, suelen poseer estructuras que no absorben ni generan luz con considerable eficiencia, por lo que son casi indetectables al microscopio de transmisión de luz blanca. Una alternativa para visualizar estas estructuras es mediante el uso de técnicas que generan contraste, como tinciones con colorantes o marcaciones con sondas fluorescentes. Otras técnicas de microscopía aprovechan propiedades ópticas diferentes en la muestra de estudio para generar contraste, como las técnicas de contraste de fase y de contraste por interferencia diferencial (DIC). A continuación describiremos los fundamentos de estas dos técnicas.

- Microscopio de Contraste de Fase: En los años '30, Fritz Zernicke introdujo la técnica de Contraste de Fase como método para obtener contraste de muestras no marcadas y que además permite trabajar con células vivas y estudiar procesos dinámicos. Este desarrollo le valió el premio Nobel de Física en el año 1953. La técnica se fundamenta en las pequeñas diferencias en el índice de refracción (n) que presentan las muestras (esencialmente transparentes) debido a su estructura interna. Los haces de luz resultan más retrasados y dispersos cuanto mayor es el n de las estructuras que atraviesa. Así, objetos delgados y transparentes, como las células que poseen una membrana plasmática, organelas y un sistema de endomembranas, tienen la capacidad de producir diferentes cambios en la fase de la luz transmitida y la que es dispersada. La luz transmitida y la luz refractada logran interferir entre ellas en el plano focal, lo que se registra como regiones oscuras y brillantes, y se registra en una imagen con mayor contraste (Figura 13.5A).

En la microscopía convencional los cambios de fase son leves y no generan un contraste apreciable; pero con el agregado de 3 elementos al camino óptico se logra convertir los cambios de n en cambios de intensidad apreciables. La clave está en la técnica de iluminación. En el condensador del microscopio se coloca un anillo delgado de material opaco que genera una iluminación en forma de cono hueco que se enfoca sobre la muestra. Luego de atravesar la muestra, la luz que no se refracta (luz transmitida o background) es captada por el objetivo y forma un anillo en el plano focal del objetivo, mientras que la luz difractada ocupa todo el plano focal. En éste se coloca una placa retardadora de fase construida de manera tal que la región coincidente con la del anillo de luz no desviada sea más ancha que el resto del material. Por lo tanto la luz no difractada viaja más rápidamente produciéndose un retraso extra (llegando a $1/2$ de cuarto de onda) para lograr en el plano de la imagen una interferencia y generar un contraste apreciable (Figura 13.5A).

A Microscopía de Contraste de Fase



B Microscopía de Contraste por Interferencia Diferencial

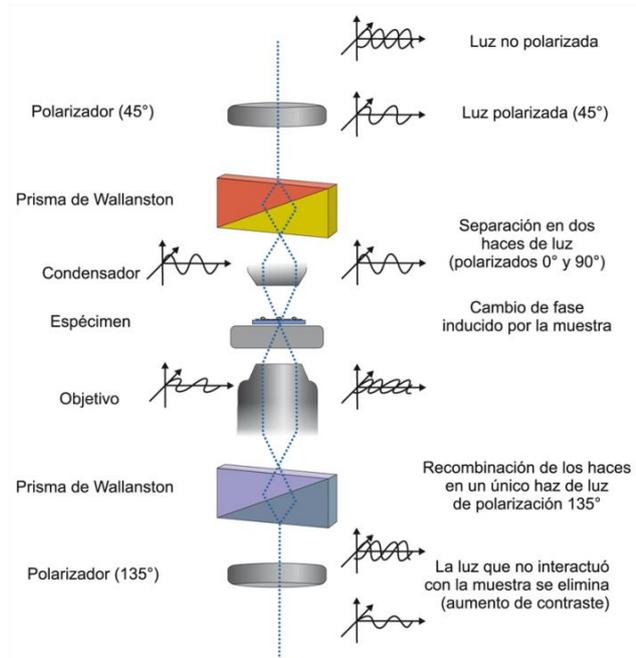


Figura 13.5 Elementos Ópticos Introducidos en el Microscopio Compuesto para Realzar el Contraste. Las técnicas de Contraste de Fase (A) y de Contraste por Interferencia Diferencial o DIC (B) son dos ejemplos de técnicas que realzan el contraste de la técnica clásica del Microscopio de Campo Claro. Ambas técnicas son ampliamente aplicadas para estudiar células vivas.

- Microscopio de Contraste por Interferencia Diferencial: El contraste por interferencia diferencial (o DIC, por *Differential Interference Contrast*) genera contraste en muestras no teñidas ni marcadas mediante el uso de luz polarizada. Esta técnica fue introducida en los años '50 por Georges Nomarsky, por lo que también se la conoce como contraste de Nomarsky. El fundamento se basa en el principio de interferometría para evidenciar información sobre el camino óptico que recorre la luz dentro del espécimen, volviendo visibles detalles de la estructura de la muestra que de lo contrario son indistinguibles. La técnica consiste en colocar un polarizador lineal y un prisma de Wollaston entre la fuente de iluminación y el condensador. El prisma de Wollaston es capaz de dividir al haz entrante de luz linealmente polarizada en dos haces paralelos y cercanos, pero que oscilan perpendicularmente uno respecto al otro. De este modo, los haces no pueden causar interferencia entre ellos en el

plano focal sobre la muestra, pero si son afectados y modifican sus propiedades de acuerdo al ancho, la densidad, la forma y el n de la muestra al atravesarla, afectando diferencialmente a cada haz. Luego de ser colectados por el objetivo, los haces paralelos son combinados por un segundo prisma de Wollaston, permitiendo el fenómeno de interferencia entre ambos haces de luz y generando así el contraste (Figura 13.5B).

Las imágenes de DIC dan una impresión de relieve no relacionado directamente con la altura del espécimen. En comparación con el uso de contraste de fase, las imágenes obtenidas por DIC tienen una mayor resolución al utilizarse completamente la apertura numérica del objetivo. Como principal limitación en esta técnica no se pueden utilizar plásticos como sostén de la muestra. Tampoco se pueden utilizar objetivos apocromáticos, que interfieren con los polarizadores.

13.5. Microscopio de Fluorescencia de Campo Amplio

El uso de compuestos fluorescentes ha sido aprovechado para la generación de contraste en distintas técnicas de microscopía. El fundamento de esta técnica se basa en la separación espectral entre la luz de excitación y la luz emitida por el o los fluoróforos. Estos se excitan con una longitud de onda específica para cada fluoróforo, y la luz emitida es detectada filtrando la luz de excitación empleando filtros específicos. Esto permite obtener imágenes de alto contraste, ya que la señal se detecta sobre un fondo oscuro. Una de las ventajas más importantes de la microscopía de fluorescencia es la posibilidad de utilizar múltiples fluoróforos para obtener señales de dos o más estructuras simultáneamente. Las señales de fluorescencia pueden ser altamente específicas de una o más moléculas de interés, o provenir de compuestos naturales presentes en las células que también son fluorescentes (autofluorescencia). Por este motivo, deben seleccionarse con cuidado los fluoróforos a emplear, priorizando aprovechar todo el rango disponible del espectro electromagnético con sondas que tengan un brillo mucho mayor a la

autofluorescencia de la muestra. Esto se puede lograr utilizando fluoróforos covalentemente unidos a anticuerpos, análogos de metabolitos o sondas de ácidos nucleicos que pueden unirse de forma específica a determinados componentes o estructuras subcelulares, o empleando fluoróforos que de por sí presentan una afinidad particular por alguna estructura subcelular. Por otro lado, el uso de proteínas fluorescentes ha revolucionado el estudio dinámico de distintos procesos celulares en células vivas, lo que fue reconocido recientemente con el premio Nobel en Química entregado a Osamu Shimomura, Martin Chalfie y Roger Y. Tsien en 2008 (ver Capítulo 2 para más detalles).

Como ya se mencionó anteriormente, existen dos formas de construir un microscopio de fluorescencia: Epifluorescencia (Figura 13.6A y 13.6B) y de Transmisión (Figura 13.6B). El microscopio de Fluorescencia de Transmisión corresponde al diseño clásico del microscopio compuesto y sigue siendo el más apto para muestras con fluorescencia débil observada a bajos aumentos (2.5X o 4X). Sin embargo, el microscopio de Epifluorescencia ha desplazado progresivamente al de Transmisión porque tiene la ventaja de que se minimiza la contaminación de la luz de excitación, que puede ser aumentada considerablemente sin afectar la calidad de la señal de fluorescencia, ya que los filtros no son perfectos. Además, en este caso, la luz de excitación es enfocada sobre la muestra a través del objetivo que funciona como condensador. La fluorescencia es emitida en todas las direcciones, y es el mismo objetivo el que finalmente colecta esta luz.

Las fuentes de iluminación más utilizadas son las lámparas de gases de alta presión de Mercurio (Hg) o Xenón (Xe) ya que emiten con suficiente intensidad, uniformidad y estabilidad como para excitar los fluoróforos de forma eficiente y repetitiva como para poder obtener imágenes comparables a fin de realizar un análisis cuantitativo y estadístico. La luz proveniente de este tipo de lámparas consta de un continuo, de intensidad relativamente baja, superpuesto a una serie de picos de muy alta intensidad a longitudes de onda definidas. Por ejemplo, la lámpara de Hg presenta picos intensos de 254, 313, 334, 365, 405,

436, 546 y 577 nm, que es a los que se recurre alternativamente para lograr excitar distintos fluoróforos.

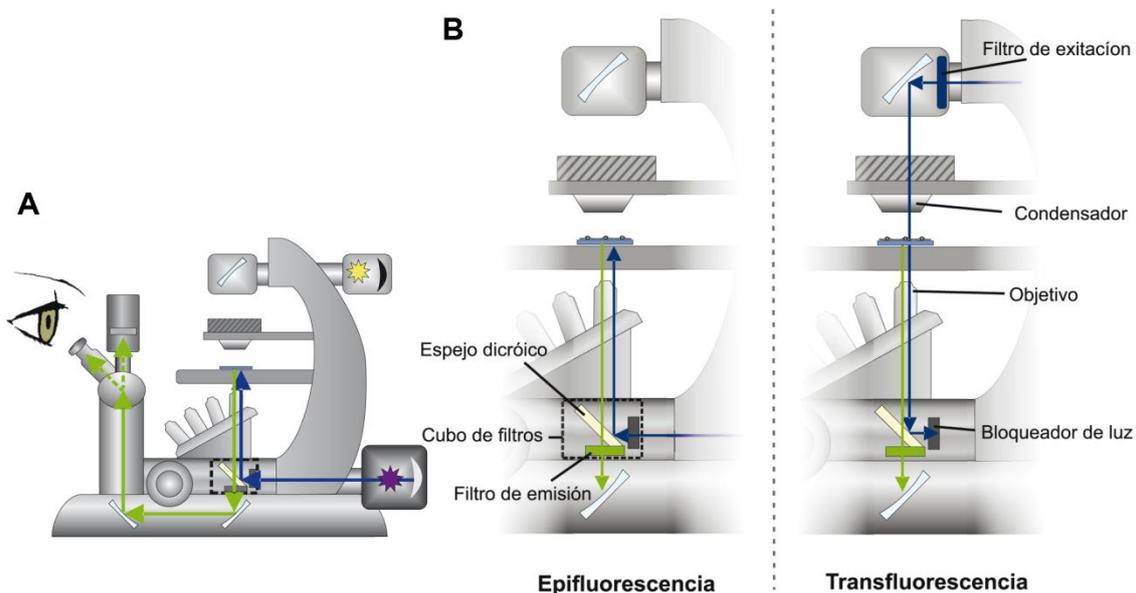


Figura 13.6. Esquema de Microscopios de Fluorescencia de Campo Amplio: Epifluorescencia vs Fluorescencia por Transmisión. Trazo de rayos en un microscopio de Epifluorescencia invertido (A). En comparación con el microscopio de campo claro, el microscopio de fluorescencia incluye una fuente de luz más potente y con un espectro extendido hacia el UV cercano, y una serie de filtros que permiten diferenciar la luz emitida de la luz de excitación (azul) de la emisión (verde). Además, debe notarse que la traza de rayos no atraviesa el condensador y, sin embargo, lo hace dos veces a través del objetivo que cumple además las funciones del primero. En el caso del microscopio de Epifluorescencia, los tres elementos ópticos nuevos (Filtro de excitación, Espejo Dicroico y Filtro de Emisión) se combinan en el Cubo de Filtros (B). En cambio, en el microscopio de Fluorescencia por Transmisión la luz de excitación se enfoca sobre la muestra a través del condensador luego de ser seleccionada por el filtro de excitación (B). La Luz no absorbida es reflejada por un espejo dicroico y/o filtrada por el filtro de emisión, mientras que la fluorescencia emitida atraviesa el filtro y es dirigida hacia el ocular o la cámara digital.

Los tres componentes específicos de un microscopio de epifluorescencia son los filtros de excitación, los espejos dicroicos y los filtros de emisión. A continuación veremos en detalle el rol que cumple cada uno de ellos.

- **Filtros de Excitación:** La fuente de luz emite distintos picos de alta intensidad a distintas longitudes de onda, por lo que resulta conveniente seleccionar uno de ellos por vez y así lograr excitar uno (o unos pocos) fluoróforos de la muestra a la vez. Esto permite detectar con precisión un determinado fluoróforo y distinguirlo de los otros presentes que permanecen en su estado basal (no emiten). Si los espectros lo permiten, puede combinarse el uso de distintos fluoróforos que presenten el mismo rango de excitación, pero distinto rango de

emisión. Estos fluoróforos serán distinguidos (separados espectralmente) por el filtro de emisión seleccionado. Además, pueden realizarse múltiples marcaciones en una misma muestra con fluoróforos que tengan distintos espectros de excitación. Para ello se utilizan filtros de excitación distintos que seleccionarán el pico de la fuente de luz más adecuado para cada fluoróforo.

- Espejos Dicroicos: La luz de excitación previamente filtrada debe ser desviada hacia el objetivo para enfocarla sobre la muestra. Esto se logra utilizando un espejo dicroico que refleja la luz dentro de cierto rango de longitudes de onda, pero permite el paso de luz cuyas longitudes de onda pertenecen a otro rango. Así, la fluorescencia emitida por la muestra se captura en el objetivo y regresa por el mismo camino hasta el dicroico, pero esta vez lo atraviesa camino al filtro de emisión y el detector. Los dicroicos pueden ser de paso único, o multipaso, es decir, reflejan longitudes de onda de más de un rango (bandas), y dejan pasar otro tanto. Los dicroicos de paso simple se caracterizan por la longitud de onda a la cual la mitad de la luz incidente se refleja y la otra mitad se transmite. Por lo general, las longitudes menores a la λ característica del dicroico son reflejadas y las de mayor longitud son transmitidas.

- Filtros de Emisión: La luz emitida que atraviesa el espejo dicroico es seleccionada por un filtro de emisión que funciona de manera análoga a los filtros de excitación. Los ojos del observador pueden en este caso distinguir fluoróforos de distinto color; pero, por lo general, las cámaras digitales son monocromáticas, es decir, no distinguen la luz de acuerdo a su longitud de onda. Por esta razón, las imágenes registradas se las denomina monocromáticas y están definidas en una escala de grises (ver más adelante). La elección de distintos filtros de emisión no infiere ninguna diferencia para los sensores de las cámaras digitales, por lo que las imágenes registradas con distintas configuraciones deben ser coloreadas "manualmente". Así, es importante recordar que el rango de luz transmitida por el filtro de emisión no guarda ninguna relación con el pseudocolor seleccionado para su representación a color.

Comercialmente se encuentran disponibles arreglos de estos juegos de filtros y dicroicos en forma de cubos (Figura 13.6B), que pueden ser colocados e

intercambiados en las ruedas de filtros de los microscopios. Estos cubos están diseñados para coincidir con los espectros de los fluoróforos más comúnmente utilizados (Figura 13.7). Otra manera de combinarlos es a través de ruedas intercambiables, pudiendo combinar cada uno de estos filtros de manera más versátil y ajustar así el microscopio a un rango más amplio de fluoróforos de interés.

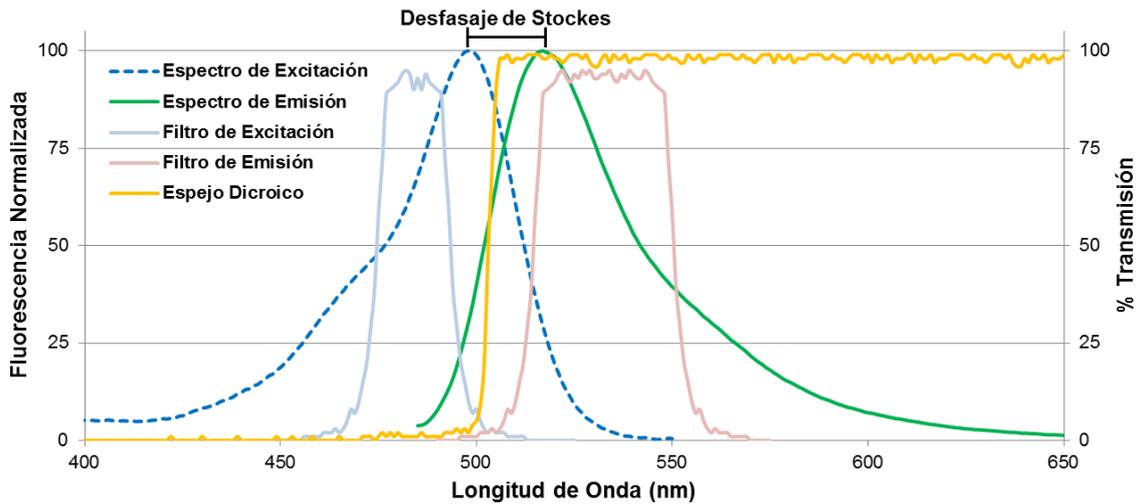


Figura 13.7. Filtros y Espejos Dicroicos para Microscopia de Fluorescencia. La selección de filtros y espejos dicroicos debe ajustarse a los espectros de excitación y emisión de cada fluoróforo. En el gráfico se muestra, a modo de ejemplo, una posible combinación de filtros para el cubo óptico correspondiente a la detección de Fluoresceína o sus derivados. Notar el solapamiento del espectro de transmisión del filtro de excitación con el espectro de excitación del fluoróforo, así como el solapamiento del filtro de emisión con el espectro de emisión de la Fluoresceína. El espejo dicroico separa la luz de excitación de la de emisión, por lo que su longitud de onda característica corresponde usualmente a algún punto dentro del desplazamiento de Stokes del fluoróforo.

Existen distintos tipos de filtros. De acuerdo a su modo de acción pueden clasificarse en filtros de absorción o de interferencia. Mientras que los primeros tienen excelentes características ópticas (bloqueo y transmisión) y son de bajo costo, suelen acarrear el problema de que toda la energía no transmitida se disipa como calor, no es fácil ajustar su selectividad y pueden presentar cierta fluorescencia ellos mismos. Por otro lado, los filtros de interferencia suelen carecer de fluorescencia y ser mucho más fácil de ajustar a (múltiples) longitudes de onda específicas, pero son más costosos y sus capacidades de bloqueo y transmisión no son tan buenas como en los primeros. A fines prácticos, los filtros también se clasifican en:

- a) Filtros de paso corto: Estos filtros dejan pasar luz por debajo de una longitud de onda característica, pero bloquean la luz de longitudes de onda mayores.
- b) Filtros de paso largo: Estos filtros dejan pasar luz por encima de una longitud de onda característica, pero bloquean la luz de longitudes de onda menores.
- c) Filtros de paso de banda: Estos filtros poseen dos longitudes de onda características, entre las cuales normalmente se permite la transmisión de la luz, mientras que se bloquean las de menor y mayor longitud de onda de dicho rango.

Los objetivos utilizados en microscopía de fluorescencia, como se mencionó previamente, tienen que cumplir una doble función, ya que se usa el mismo objetivo como condensador de la luz de excitación y como colector de la señal emitida (objetivo). Normalmente se utilizan objetivos de alta **NA**, que logran coleccionar una mayor cantidad de haces emitidos por la muestra. Otro aspecto importante es la corrección de las aberraciones cromáticas, lo que permite utilizar distintas combinaciones de moléculas fluorescentes con diferentes longitudes de onda de emisión y poder detectar más de una señal en la misma muestra. Finalmente la luz emitida es detectada a través de los oculares o mediante cámaras digitales o de video. Un tipo de cámara digital muy difundido actualmente y que tiene gran aplicación para la microscopía de fluorescencia son las cámaras con sensores CCD (por sus siglas en inglés *Charge Coupled Device* - dispositivo de carga acoplada) que generan una imagen digital. Estos sensores tienen un arreglo de detectores puntuales que almacenan la información de la cantidad de luz recibida durante la exposición como una acumulación de cargas. Luego se lee en forma ordenada dicha acumulación de cargas y se transforman a valores de grises en una escala de 8, 12 o 16 bits (con $2^8 = 256$; $2^{12} = 4096$; ó $2^{16} = 65536$ valores intermedios de grises, respectivamente) para generar la imagen.

13.6. Microscopio de Fluorescencia Confocal

En esta sección nos enfocaremos en la comparación del microscopio compuesto y el microscopio confocal, y resaltaremos las ventajas y desventajas

de cada uno de ellos. El desarrollo de la Microscopía de Fluorescencia fue revolucionada por el invento del Microscopio Confocal por Barrido Laser (o LSCM, de sus siglas en inglés Laser Scanning Confocal Microscopy), que elimina gran parte de la luz proveniente de planos fuera de focos (Figura 13.8A). La gran ventaja de esta técnica es la capacidad de reconstruir imágenes tridimensionales, que se ve potenciada además por las capacidades de análisis actual, brindando una vista más real de cómo funciona la vida. Información multidimensional puede registrarse considerando no sólo las 3 dimensiones espaciales (xyz), sino también tiempo (t) y las propiedades espectrales: longitud de onda (λ), anisotropía (r), y tiempo de vida de fluorescencia (o *fluorescence lifetime*, τ). La complejidad de los equipos ha crecido conforme aumenta las capacidades del microscopio. Sin embargo, todos los microscopios LSCM actuales normalmente tienen la capacidad de obtener imágenes de tipo $xyzt\lambda$.

La Microscopía Confocal introduce cuatro nuevos elementos en la configuración del microscopio compuesto:

- Fuente de Luz Laser: Una fuente de luz puntual reemplaza a las lámparas halógenas o mercurio. A diferencia de las últimas, que se posicionan de forma tal de dar una iluminación uniforme (iluminación de Köhler), la fuente de luz puntual es proyectada sobre el plano focal de las lentes del objetivo. Esto genera una imagen puntual sobre la muestra, es decir sólo se enfoca sobre un punto definido de la muestra. Normalmente esta función la cumple un arreglo de láseres que permiten excitar fluoróforos selectiva y alternadamente a lo largo del rango UV-Visible-IR del espectro electromagnético. Los láseres pueden contar con una única línea de emisión, como el HeNe (633 nm) o los láseres de estado sólido bombeado por diodo (DPSS Laser, Diode-Pumped Solid State Laser) (por ejemplo, el Nd:YVO₄ DPSS láser de 532 nm, comúnmente empleado en punteros láser); o varias, como el láser de ion de Ar (que presenta intensidades significativas para 456, 477, 488 y 514 nm).

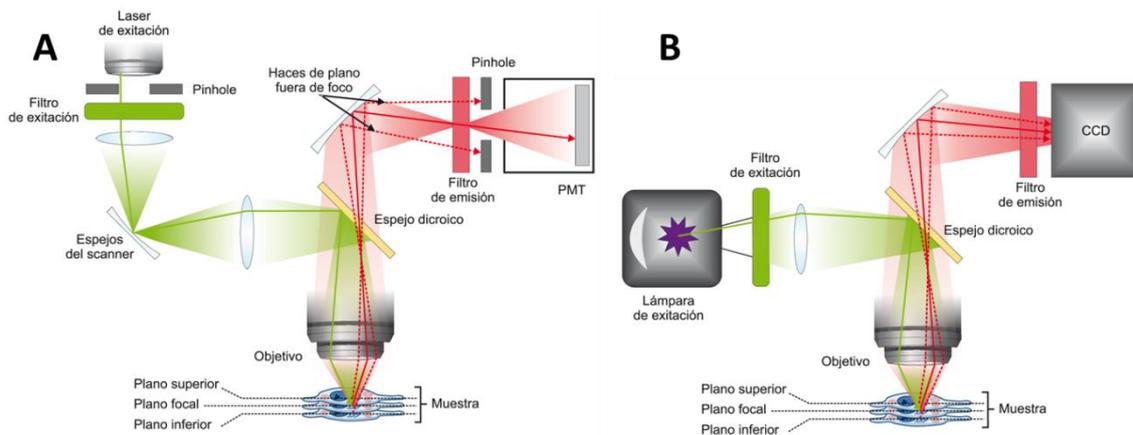


Figura 13.8. Comparación entre el Funcionamiento del Microscopio de Fluorescencia Confocal y el Microscopio de Fluorescencia de Campo Amplio. El uso de un pinhole en el Microscopio Confocal permite eliminar gran parte de la luz proveniente de planos distintos al plano focal (A), aumentando notablemente la nitidez de la imagen y aumenta la resolución de los detalles al disminuir el límite de resolución un 40% en cada dimensión de los ejes x e y. En cambio, en el Microscopio de Fluorescencia de Campo Amplio, la luz proveniente de la excitación de fluoróforos en planos distintos genera un halo no definido alrededor de las señales propias de la sección de la muestra en foco (B).

- Pinhole: La detección de la fluorescencia se limita sólo a la contribución focal de un agujero o *pinhole* en cada instante, a diferencia del plano observado en el caso de las cámaras digitales. El *pinhole*, colocado inmediatamente frente al detector, elimina la luz proveniente de planos adyacentes fuera de foco y permite un seccionamiento óptico limitado únicamente al plano focal. El *pinhole* es de apertura variable, lo que además permite ajustar el grado de seccionamiento óptico de la imagen y así asignar voxels (pixels tridimensionales) de dimensiones Δz variables. De este modo, a menor apertura del *pinhole*, menor contribución e interferencia se registra de planos fuera de foco. Por otro lado, abrir completamente el *pinhole* permite obtener una imagen con características similares a las de la microscopía convencional.

- Detector Puntual: La cámara digital se reemplaza por un detector puntual tipo Tubo Fotomultiplicador (o PMT, de sus siglas en inglés *Photo-Multiplier Tube*) o tipo Avalancha de Fotodiodos (o APD, *Avalanche Photo-Diode*), dependiendo de la sensibilidad y el rango dinámico necesario para las técnicas a emplear. Ambos detectores son dispositivos electrónicos altamente sensibles que responden con efecto fotoeléctrico transduciendo la luz recibida en una corriente de electrones. La intensidad de la corriente guarda relación con la

intensidad de luz capturada, permitiendo asignar intensidades a la fluorescencia emitida por cada pixel representado de la muestra en la imagen. Los APD suelen preferirse antes que los PMT cuando se planea llevar a cabo ensayos de partículas aisladas y únicas, ya que muestran mejores resultados con intensidades de fluorescencia muy bajas debido a que su rendimiento cuántico es significativamente superior al de los PMT. De todos modos, ambos tipos de detectores pueden operarse en el modo de conteo de fotones únicos (*Single Photon Counting*).

- Scanner: Debido a que la iluminación y la detección es puntual, la formación de la imagen requiere de un proceso de barrido sobre la muestra. Así el campo visual es recorrido físicamente mediante el movimiento de un par de espejos galvanométricos que controlan la posición del haz de luz de excitación. El movimiento de los espejos está controlado electrónicamente, lo que permite definir un número variable de pixels que formarán la imagen a ser registrada. De este modo, los valores típicos de la resolución digital de imágenes registradas por LSCM varían entre 64x64 hasta 8192x8192, permitiendo también imágenes de otros formatos, rectangulares, líneas e incluso circunferencias. Es importante ajustar apropiadamente el tiempo de residencia por pixel (también llamado tiempo de integración y es del orden del microsegundo, 10^{-6} s), ya que la alta potencia de los láseres puede promover el fotoblanqueo (degradación) de las sondas fluorescentes. Por otro lado, la necesidad de operar en el modo barrido aumenta considerablemente el tiempo necesario para obtener una misma imagen de canal único (segundos a minutos) respecto a una obtenida en un microscopio compuesto con una cámara digital (milisegundos a segundos), dependiendo del tamaño de la imagen. Por lo general resulta beneficioso reducir el tiempo de residencia por pixel y compensarlo con múltiples lecturas que se pueden promediar o sumar. Esto disminuye el fotoblanqueo de la mayoría de las sondas y mejora la calidad de la imagen al eliminar parte del ruido. Una descripción exhaustiva del funcionamiento del Microscopio Confocal puede hallarse en el libro Handbook of Biological Confocal Microscopy de James B. Pawley (Pawley, 2006).

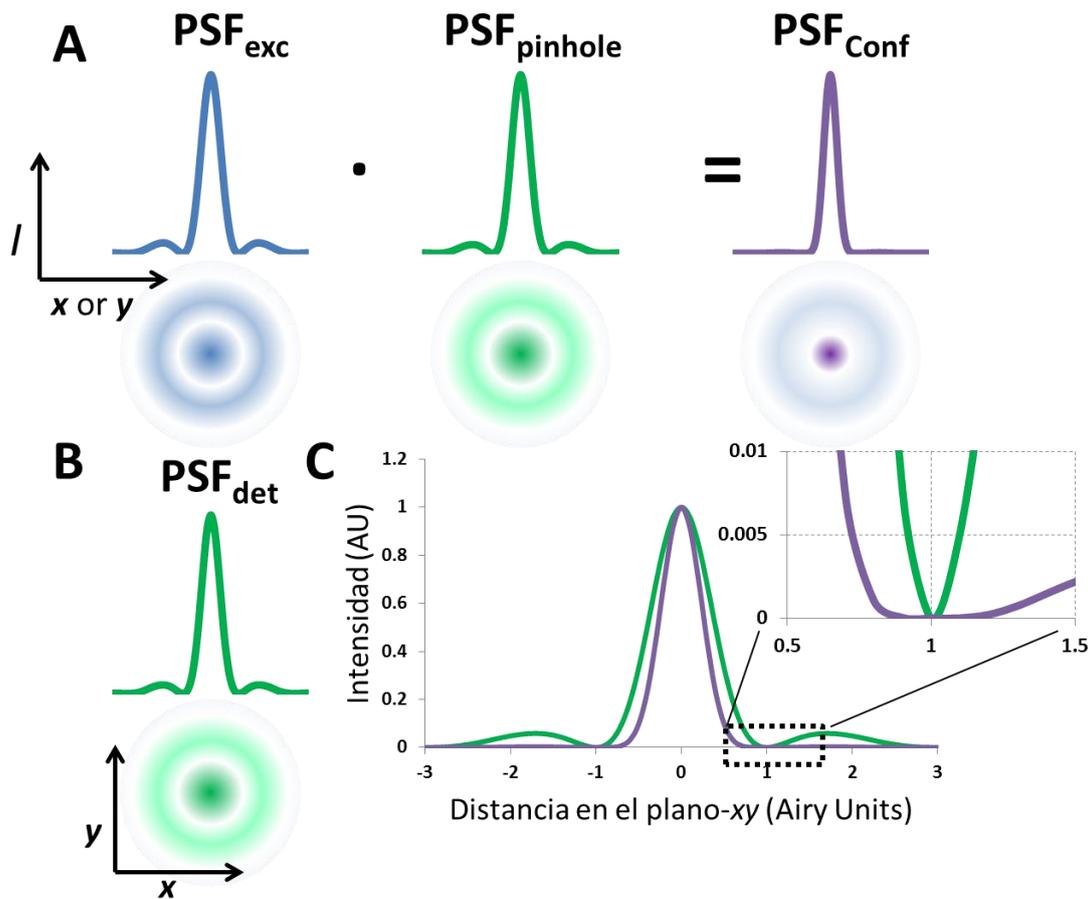


Figura 13.9. Funciones de Distribución Puntual. La Comparación de las PSF efectivas entre el Microscopio Confocal (A) y el Microscopio de Fluorescencia de Campo Amplio (B) se observa en el gráfico C. Cabe destacar que la posición de los mínimos de las PSF efectivas es la misma (ver aumento del gráfico C). El aumento en la resolución del Microscopio Confocal se debe a que su PSF efectiva decae más rápidamente, permitiendo que dos fuentes de fluorescencia puntuales estén más próximas y, aun así, poder seguir distinguiéndolas como independientes según el criterio de Rayleigh. En verde se muestran las PSF de detección de ambos microscopios, en azul se representa la PSF de excitación y en violeta la PSF confocal.

Como ya se mencionó, el aumento en el poder de resolución del LSCM se basa fundamentalmente en la detección confocal que elimina las señales difusas que provienen de los planos fuera de foco. Para comprender mejor este fenómeno debemos introducir aquí la Función de Distribución Puntual (o PSF, *Point Spread Function*) que describe la distribución de intensidad que es creada por un objeto de dimensiones menores al límite de resolución del microscopio. La PSF es en esencia un patrón de difracción que define un volumen tridimensional (Figura 13.9). En el plano-xy, la PSF tiene una forma isotrópica y recuerda a un punto o disco rodeado de aros concéntricos en los que disminuye

gradualmente el máximo de intensidad, también conocido como “Distribución de Airy”. Sin embargo, en el eje óptico la distribución es más alargada, evidenciando la anisotropía del sistema. La imagen se forma de acuerdo a la PSF global del microscopio, que es el producto de la PSF de iluminación (volumen iluminado: imagen proyectada sobre la muestra de la fuente de luz puntual) y la PSF de detección (volumen observado: proyección del *pinhole* sobre el plano focal de la muestra). La resolución espacial del LSCM se define como el ancho a mitad del máximo de intensidad (FWHM), y equivale a la mitad del diámetro del primer aro oscuro de la distribución de Airy. Este valor se conoce como “Unidad Airy”, y depende de la longitud de onda de la luz registrada y del NA del objetivo empleado. Se debe recordar que una unidad Airy en el plano-xy no tiene las mismas dimensiones físicas que en la dirección-z, que de hecho suele ser 2 o 3 veces mayor.

$$PSF_{conf} = PSF_{exc} \cdot PSF_{det} \quad \text{Ec. 13.7}$$

Ya que en el LSCM pueden combinarse los aumentos ópticos debido a las lentes y los aumentos electrónicos o digitales debido a los scanners, es importante comprender qué tanto se puede forzar un sistema, y hasta donde realmente tiene sentido hacerlo. Para ello se recurre al criterio de resolución de Nynquist. De acuerdo al teorema de Nynquist, la separación óptima entre voxels de una imagen debe ser la mitad del límite de resolución teórico. Una imagen registrada con una frecuencia menor pierde detalles respecto a la mejor imagen que puede obtenerse teóricamente (máximo nivel de detalles distinguibles). Del mismo modo, imágenes obtenidas con una frecuencia mayor de voxels contiene mucha información redundante y promueve el fotoblanqueo de los fluoróforos. El mismo razonamiento aplica al eje óptico, la mitad de la profundidad de la sección óptica corresponde a la mínima distancia aceptable entre planos para una reconstrucción 3D. Por ejemplo, para un fluoróforo que emita a 450 nm (DAPI) la resolución lateral sería 160 nm y la resolución axial 580 nm, para un objetivo de $NA = 1.4$ y empleando aceite como medio de inmersión ($n = 1.515$). Según el criterio de Nynquist, los voxels debería tener dimensiones no mayores a $80 \times 80 \times 290 \text{ nm}^3$ (xyz). Los scanners de los LSCM

permiten registrar voxels con separaciones mucho menores a estos valores, pero uno debe recordar que la sección óptica corresponde al volumen que emite, y que un volumen mucho mayor de la muestra está siendo excitada por cada voxel registrado, lo que promueve el fotoblanqueo extenso por fuera y dentro del plano focal de toda la muestra. Por tal motivo, no es recomendable disminuir demasiado las dimensiones del voxel y así evitar el *oversampling* que comprometa la relación señal-ruido y, últimamente, la resolución de la imagen. Este es un problema que debe tenerse muy presente al momento de realizar reconstrucciones de imágenes 3D, ya que suele haber una evidente pérdida de intensidad de fluorescencia conforme se repiten los sucesivos planos a lo largo del eje óptico. Por otro lado, si la estructura a ser analizada posee dimensiones cercanas al límite de difracción, como una mitocondria (500 nm), una representación de la misma de 7x7 pixels (*xy*) se verá claramente cuadriculada (o pixelada). Uno podría aumentar la resolución digital, es decir el número de pixels por unidad de área, como para que la imagen tenga una mejor apariencia (contornos más suaves) al ser impresa o proyectada; pero es importante recordar que no se logra un aumento real de la resolución de la imagen ni una ganancia en los detalles distinguibles, que siguen estando limitados por difracción de la luz.

El uso de un *pinhole* elimina una enorme cantidad de luz, que si está disponible en las imágenes de microscopía de fluorescencia convencional. El diámetro del *pinhole* deberá tratar de fijarse lo más abierto posible manteniendo el grado de seccionamiento óptico deseado, y nunca menor a una unidad Airy. Diámetros menores a una unidad Airy producirán una pérdida de luz que no es compensada por ganancia en los detalles observados y aumentará significativamente, en cambio, el ruido de la imagen; lo que últimamente deteriora el poder de resolución del microscopio y la calidad de la imagen. La configuración óptima dependerá del aumento del objetivo empleado, del medio dispersante entre la muestra y el objetivo, de la intensidad de la muestra, su morfología y el fin del ensayo a realizar. Así, por ejemplo, se pueden obtener imágenes nítidas (al mismo aumento y con los mismo fluoróforos) de estructuras bien definidas como centriolos o membranas con el *pinhole* más

abierto que para estructuras espacialmente extendidas, como proteínas con distribución pancelular, proteínas nucleares o del retículo endoplasmático.

Entonces, ¿cuál es la ganancia efectiva en el poder de resolución del LSCM en relación al Microscopio de Fluorescencia de Campo Amplio? Si consideramos el criterio de Rayleigh para distinguir dos objetos con dimensiones inferiores al límite de difracción como entidades distintas, es necesario identificar una caída de al menos el 20 % en la suma de sus PSF. Esto coincide con el máximo de la PSF del primer objeto solapándose con el primer mínimo de la PSF del segundo. El LSCM emplea la PSF global del microscopio (PSF_{cont}), que es mucho más acotada y pronunciada que la PSF de detección solamente, como en el caso de la microscopía convencional. Esto permite que los dos objetos se encuentren un 40% más cerca (linealmente) en una muestra observada en el LSCM para ser distinguidos respecto a un microscopio convencional. Si extendemos esta mejora a las 3 dimensiones espaciales, obtenemos que el aumento de resolución tridimensional del LSCM es casi 3 veces la del microscopio compuesto (Figura 13.10).

Una de las limitaciones más importantes del LSCM es el tiempo necesario para registrar secuencialmente cada voxel de una imagen. Por tal motivo, es importante definir, según los criterios anteriormente mencionados, la distancia entre voxels (en $xyzt$) para optimizar el tiempo de registro de una imagen. Cuando se desea obtener una imagen de más de un canal (λ), además del tiempo de lectura, es necesario invertir tiempo entre cada imagen para reconfigurar los filtros y dicroicos para cada fluoróforo. Esto puede limitar considerablemente la posibilidad de realizar estudios dinámicos, dependiendo de la velocidad del proceso en estudio y de la combinación y el número de fluoróforos necesarios. Para evitar estos inconvenientes, los LSCM cuentan por lo general con más de un detector, que a su vez pueden tener capacidades espectrales ajustables a distintos fluoróforos. Esto es posible gracias a la combinación de más de una línea de excitación láser en el haz de luz incidente mediante el uso de filtros dicroicos de forma inversa a la presentada anteriormente. En este caso, el láser de mayor λ atraviesa el dicroico sobre el que se hace reflejar el láser de menor λ de forma tal que queden alineados y se

enfoquen simultáneamente sobre la muestra. Si los fluoróforos y los láseres se eligen correctamente, quedará aún suficiente ancho en las ventanas libres como para registrar la fluorescencia independiente de hasta 4 fluoróforos simultáneamente.

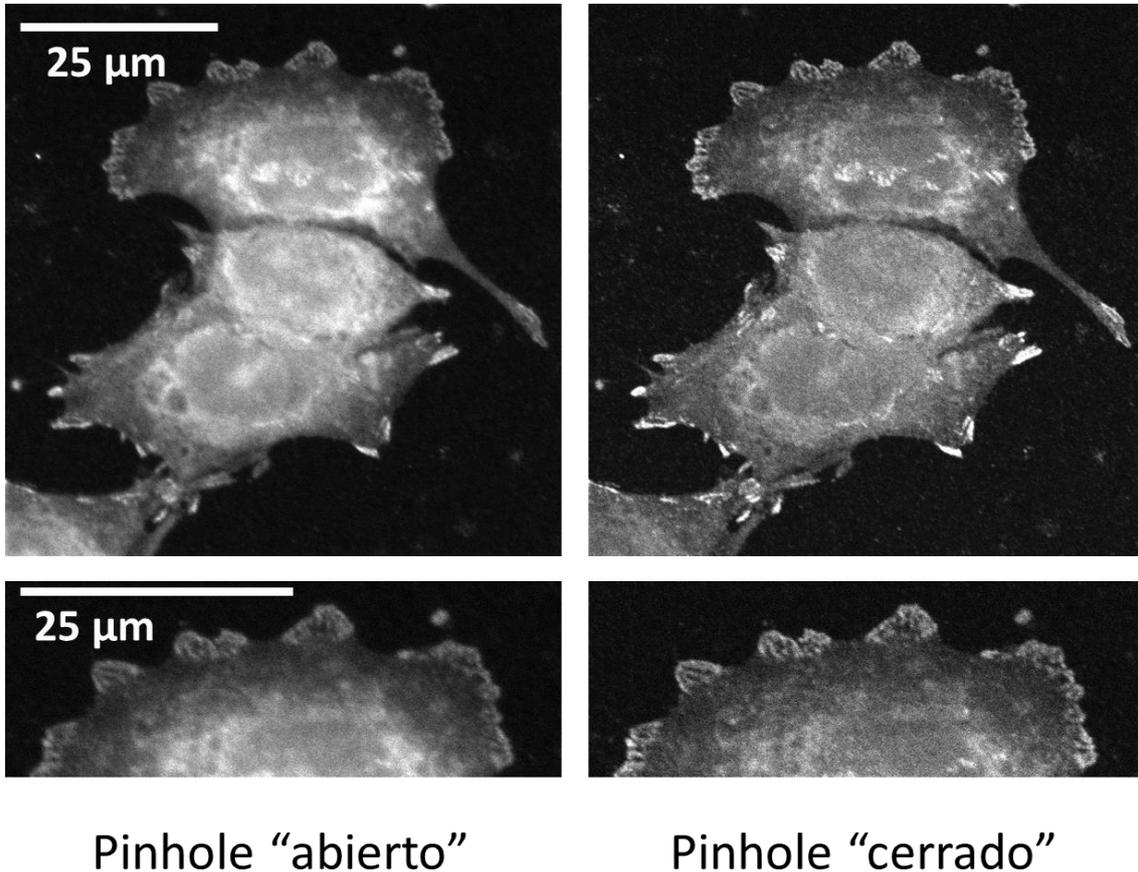


Figura 13.10. Comparación en la resolución del microscopio confocal con el Pinhole completamente abierto o bien ajustado ("cerrado"). Las imágenes corresponden a células MCF7 fijadas con paraformaldehído y reveladas por inmunohistoquímica con un anticuerpo anti-Integrina unido a Alexa-Fluor555. Las imágenes se obtuvieron empleando un objetivo 60X. En los paneles de la izquierda se distingue la luz proveniente de planos fuera de foco, en comparación con las imágenes de los paneles derechos, para los cuales el pinole se ajustó al mínimo valor para obtener la imagen confocal propiamente dicha.

Los últimos desarrollos en Acusto-Óptica se han transformado en Filtros Sintonizables Acusto-Ópticos o AOTF (de sus siglas en inglés, *Acousto-Optic Tunable Filter*) de gran utilidad en microscopía posibilitando el rápido cambio de λ seleccionadas al eliminar el tiempo necesario para hacer rodar una rueda de filtros. Los AOTF se basan en el cambio del índice de refracción (n) debido a ondas de presión que atraviesan el cristal de cuarzo en dirección perpendicular

a la dirección de incidencia del haz de luz entrante. Esto produce la deflexión de la luz a diferentes ángulos en función de su longitud de onda y de la frecuencia de oscilación al salir del cristal. Los AOTF se emplean comúnmente en microscopía en lugar de filtros, pero también resultan de gran utilidad en lugar de espejos dicróicos permitiendo separar o combinar haces de luz de distintas longitudes de onda. En este caso se los denomina AOBS (Acousto-Optic Beam Splitter).

Otra de las ventajas que aún no discutimos del LSCM es la capacidad de obtener una representación tridimensional de la célula o de sus componentes. Las imágenes tridimensionales (3D) de un objeto se reconstruyen registrando imágenes confocales a distintos planos focales moviendo la muestra con precisión a lo largo del eje óptico, y abarcando así la profundidad completa de la estructura a ser analizada. Para llevar adelante este proceso es necesario contar con una platina motorizada que cuenta con piezoeléctricos de alta precisión (menor a 0.25 μm). La obtención de las imágenes se realiza como se describió anteriormente, pero se repite en forma secuencial mientras se traslada el plano focal en relación a la muestra. De este modo, se obtiene una pila o *stack* de imágenes confocales, donde la distancia Δz entre imagen e imagen representa la distancia entre planos focales. Cabe recordar que el LSCM no registra imágenes de forma isotrópica. Es decir, el poder de resolución en la dirección-z es inferior al poder de resolución en el plano-xy. Objetos de dimensiones inferiores al límite de difracción (<200 nm) serán registrados como elipsoides con un eje 2.5 a 3 veces mayores en la dirección-z que en el plano-xy.

Como mensaje final relacionado a la reconstrucción de imágenes 3D vamos a hacer una corta introducción al análisis por deconvolución de señales, por el cual una señal compleja puede descomponerse en una combinación lineal de varias señales simples. Este procedimiento se emplea en la mayoría de las técnicas espectroscópicas para distinguir la contribución individual de distintos componentes. En el caso de imágenes de un LSCM, la deconvolución de las señales de intensidad de fluorescencia no es sólo necesaria sino esencial si uno se propone realizar cualquier tipo de análisis cuantitativo. Trabajando

según el criterio de Nyquist, las PSF de dos voxels continuos se solapan, encontrando en cada uno información (intensidad de fluorescencia) proveniente del voxel continuo. La deconvolución reconstruye las señales originales de cada voxel y elimina el ruido y las contaminaciones de los voxels continuos. Este proceso es fundamental en la reconstrucción de las imágenes 3D, ya que la contaminación por voxels fuera de foco es más importante.

13.7. Variantes de Microscopios

Teniendo en cuenta las limitaciones de LSCM y de la microscopía de fluorescencia convencional, se han desarrollado una serie de variantes con múltiples modificaciones en la forma de iluminar la muestra. Entre ellas se destaca el Microscopio de Fluorescencia por Reflexión Total Interna (TIRFM), el Microscopio de Iluminación Estructurada (SIM), Microscopio de Disco Rotativo (o Spinning-Disk Microscope) y el Microscopio Multifotónico Confocal (coloquialmente denominado: 2-Fotones).

- Microscopía por Reflexión Total Interna (TIRF): El principal inconveniente del microscopio de fluorescencia de campo amplio es la contaminación de fluorescencia emitida de planos fuera de foco que se mezclan. La Microscopía por Reflexión Total Interna (TIRF, *Total Internal Reflection Microscopy*) es una de las técnicas desarrolladas para evitar este inconveniente. La técnica se fundamenta en la generación de una onda evanescente en la interface entre el portaobjetos y la muestra, y que sólo penetra unas pocas decenas de nanómetros (usualmente menos de 200 nm) dentro de esta última. La onda evanescente se obtiene haciendo incidir un haz de luz sobre el espécimen con un ángulo equivalente o superior al ángulo crítico a partir del cual el haz es completamente reflejado en la interface entre el cubreobjetos y la muestra (Figura 13.11). De esta forma se logra un seccionamiento óptico al excitar únicamente los fluoróforos que están dentro del rango de alcance de la onda evanescente, la cual decrece en intensidad rápidamente. Del mismo modo, esta es también la limitación más importante de esta técnica, ya que sólo

permite estudiar moléculas y procesos cercanos a la membrana plasmática basal, como por ejemplo los focos de adhesión o la fusión de vesículas a la membrana basal.

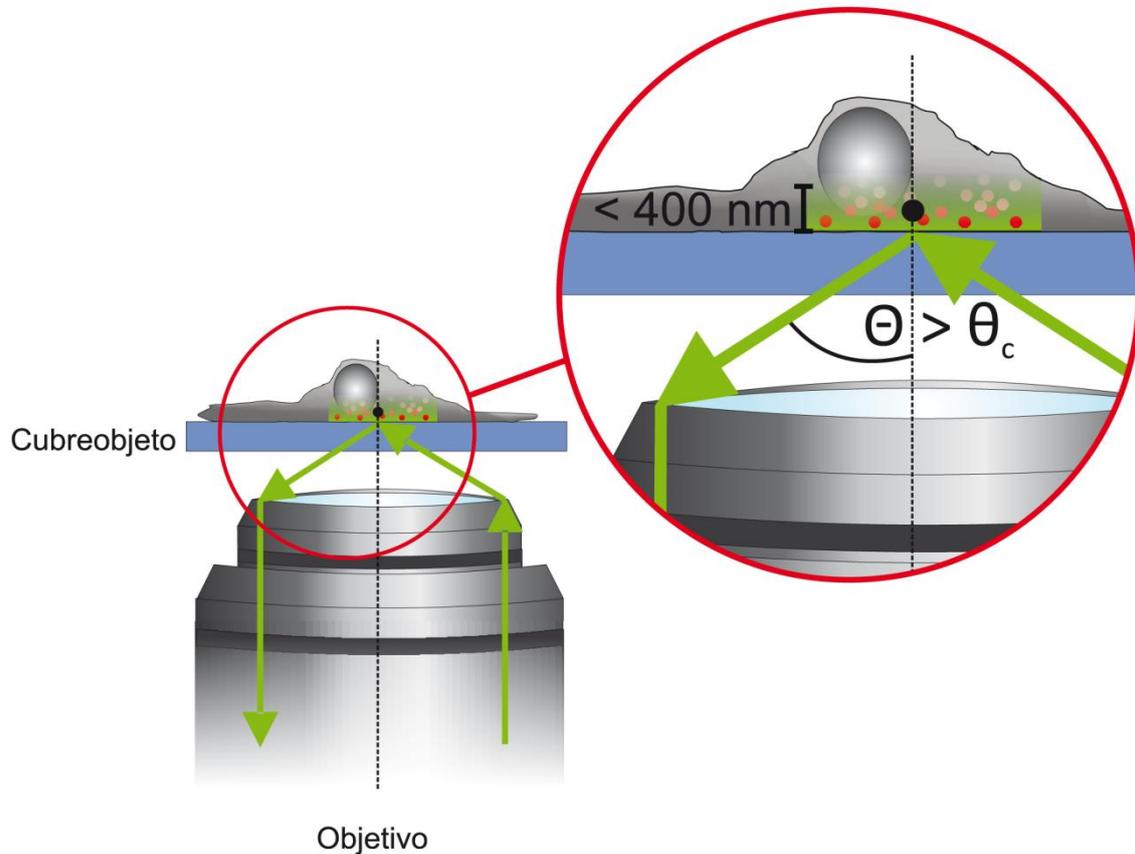


Figura 13.11. *Microscopía de Fluorescencia por Reflexión Total Interna (TIRFM).* Esta variante del Microscopio de Campo Amplio aprovecha la generación de una onda evanescente obtenida por reflexión total interna haciendo incidir la luz de excitación con un ángulo mayor al ángulo crítico (θ_c). De este modo, se logra un seccionamiento óptico de unos pocos cientos de nanómetros; suficiente como para estudiar procesos que se llevan a cabo en la cercanía de la membrana basal de células en cultivo, como la secreción de vesículas o la endocitosis de receptores de membrana.

- Microscopía por Iluminación Estructurada (SIM): Existen distintos equipos que se basan en el uso de la iluminación estructurada (Structured Illumination Microscopy) para obtener un aumento en la resolución espacial de un microscopio de fluorescencia de campo amplio. Uno de los primeros diseños empleaba la interferencia de dos haces coherentes para generar un patrón de interferencia sobre el plano focal. Rotando este patrón se registran varias imágenes que se recombinan teniendo en cuenta los patrones de iluminación para regenerar la imagen con la representación de la muestra con todos los detalles distinguidos. El aumento en la resolución se debe al uso de una

iluminación no uniforme, lo que genera una PSF de excitación más discreta, aunque no tan acotada como en el caso de la de LSCM. El patrón de iluminación empleado define el aumento en la resolución obtenido, pero esta técnica tiene el inconveniente de que se requieren obtener varias imágenes parciales que deben combinarse para obtener una imagen completa, sin acercarse demasiado a la resolución del microscopio confocal.

- Spinning-Disk Microscope: En este caso se recurre a múltiples puntos de iluminación para excitar los fluoróforos de forma discreta en el espacio. Esto se logra empleando una fuente de luz convencional para fluorescencia, pero interponiendo un disco con múltiples *pinholes*. Al hacer rotar el disco la PSF de excitación producida por cada *pinhole* recorrerá una parte de la muestra mientras se registra la fluorescencia en una cámara digital. A fines prácticos, el sistema funciona como si muchos LSCM funcionaran en paralelo sobre la misma muestra, aunque las PSF no resultan completamente independientes. El diseño del disco con orificios (Disco de Nipkow) debe ser optimizado para minimizar el solapamiento de las PSF de cada *pinhole*, ya que éste es el factor determinante del seccionamiento óptico del equipo.

- Microscopio Multifotónico Confocal: La técnica se basa en el fenómeno muy poco probable pero cuánticamente permitido de absorción conjunta de dos o más fotones. La energía aportada por todos los fotones absorbidos simultáneamente debe corresponder a la energía necesaria para producir el salto a estados excitados del fluoróforo, del mismo modo que en el fenómeno de fluorescencia clásico lo aporta un único fotón. De este modo, durante la absorción conjunta de dos fotones, la energía aportada por cada fotón debe ser la mitad de la necesaria o, lo que es lo mismo, su longitud de onda debe ser el doble de la que tendría un único fotón con la totalidad de la energía necesaria. Análogamente, en el caso de la absorción conjunta de 3 fotones, cada uno debe aportar un tercio y poseerían tres veces la λ del fotón único que produciría el mismo efecto. Sin embargo, aunque este fenómeno tiene una probabilidad no nula, esta es muy baja, y aún menor para el caso de la absorción simultánea de 3 fotones. Por lo tanto, debe recurrirse a un láser que emite en el IR en forma pulsátil y con muy alta intensidad. El hecho de que la

emisión del láser sea pulsátil, permite concentrar no sólo espacialmente sino también temporalmente los fotones en el volumen iluminado. La PSF efectiva para la excitación de un fluoróforo por la absorción de dos fotones está definida por la PSF de iluminación por un factor de probabilidad que depende de la PSF de iluminación. Esto limita naturalmente la excitación de los fluoróforos sólo a un volumen muy restringido en el plano focal. De este modo se logra un seccionamiento óptico, sin necesidad de intercalar un *pinhole* previo al detector. A fines prácticos, el Microscopio Multifotónico funciona en forma equivalente al LSCM, con la ventaja de que al emplear radiación IR presenta una capacidad de penetración de tejidos mucho mayor al LSCM convencional, unos milímetros vs. unos cientos de micrones. Por tal motivo, el Microscopio de 2-Fotones, aunque un poco más costosa, es la herramienta de elección preferida para estudios *in vivo*. Además se minimiza el daño por fototoxicidad, pero hay que tomar precauciones por el calentamiento de la muestra.

13.8. Rompiendo la Barrera de Difracción: Nanoscopías de Fluorescencia

En la última década se han desarrollado variantes de las técnicas microscópicas que brindan resoluciones espaciales del orden de unas pocas decenas de nanómetros (<70nm), llamativamente menores al límite de difracción mencionado anteriormente. Estas técnicas se conocen en su conjunto como Nanoscopías de Fluorescencia, para distinguirlas de otras Nanoscopías de sondas como el Microscopio de Fuerza Atómica (AFM) o el Microscopio Electrónico. Las Nanoscopías de fluorescencia se basan en la detección selectiva de unos pocos fluoróforos por vez. Se distinguen dos grandes grupos. Por un lado tenemos la Microscopía Confocal con Depleción Estimulada de la Emisión (STED), que es una técnica de barrido; y por el otro tenemos las técnicas estocásticas, como STORM o PALM. Todas estas técnicas pueden conciliarse bajo el concepto de Fluorescencia de Transiciones Reversibles Saturables o Intercambiables (RESOLFT, Reversible

Saturable/Switchable Optical Fluorescence Transitions) (Hofmann, 2005; Patterson, 2009). RESOLFT hace referencia a la capacidad de los fluoróforos de cambiar de estado entre uno en el que puede ser excitado y emitir fluorescencia, y otro en el que no es fluorescentemente activo o no puede excitarse. Esto permite mantener “apagados” a la gran mayoría de los fluoróforos mientras se “interroga” a unos pocos permitiendo distinguir detalles que de otro modo quedaría perdido en el solapamiento de las señales de fluorescencia simultánea. En el caso de STED esto se logra separando espacialmente a los fluoróforos analizados mediante un microscopio confocal; mientras que en STORM y PALM se los separa temporalmente mientras se registran múltiples imágenes completas en una cámara digital.

- STED: La técnica de STED es en esencia una microscopía confocal, con la salvedad de que se emplean dos láseres pulsátiles para la excitación que disparan desfasados una fracción de nanosegundo ($<10^{-9}$ seg). El segundo láser (láser STED o láser de depleción) es moldeado de forma tal que su PSF tiene forma de dona o anillo, y además tiene la función de estimular la emisión de los fluoróforos excitados con el primer láser a una longitud de onda que está fuera de la ventana registrada como fluorescencia (Figura 13.12) (Hell, 1996; Hell, 2007). La emisión estimulada es el mismo fenómeno presente en el origen de la emisión láser. La superposición de la PSF de depleción a la PSF confocal y la de PSF excitación generan una PSF global con dimensiones menores a la PSF_{conf} . Como este fenómeno depende de la intensidad del láser STED, las dimensiones de la PSF_{STED} también son ajustables variando la intensidad del segundo láser. La resolución del STED-LSCM puede variar desde la resolución del LSCM convencional (sin láser STED) y disminuir hasta alcanzar unos 30 nm en condiciones de saturación del láser STED. Sin embargo, el STED-LSCM tiene algunos inconvenientes que deben mencionarse más en detalle. Por un lado, el STED-LSCM presenta las mismas limitaciones que un LSCM convencional en cuanto al tiempo de lectura necesario para obtener una imagen.

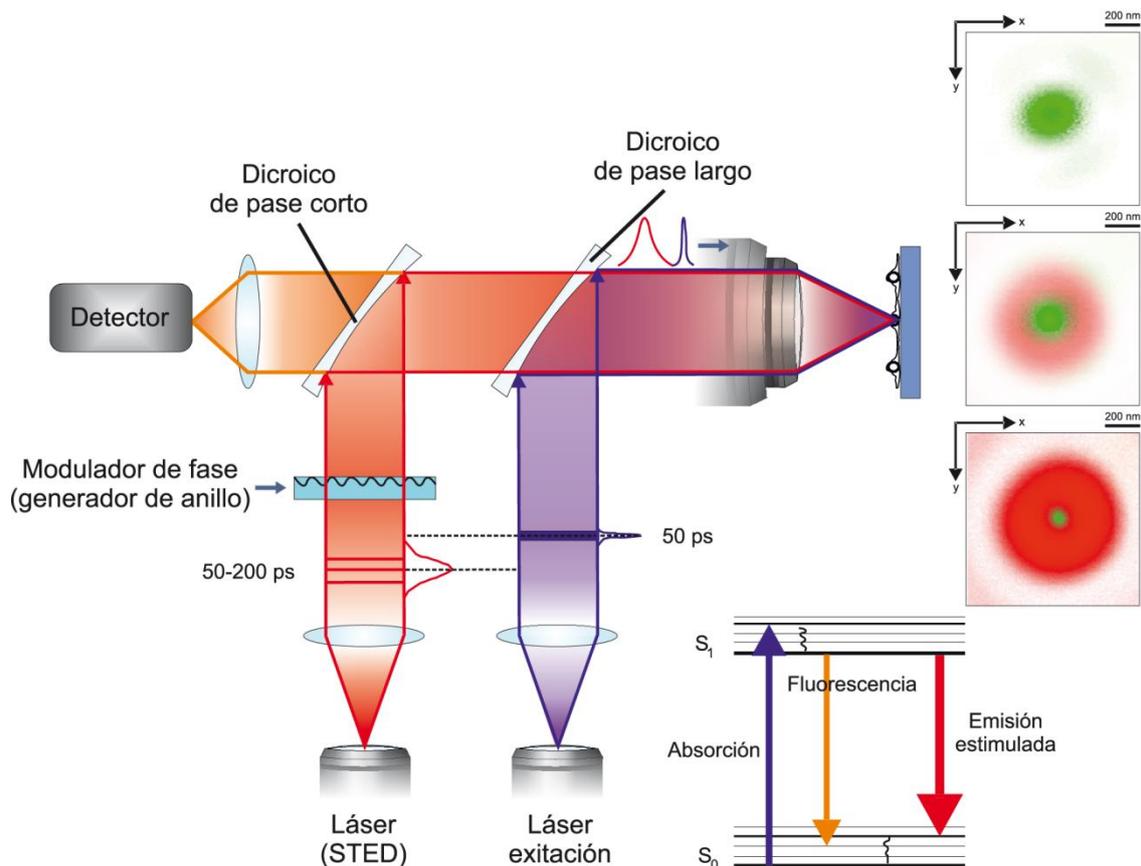


Figura 13.12. *Microscopía de Fluorescencia Confocal con Depleción Estimulada de la Emisión (STED).* Esta variante del Microscopio Confocal recurre a la emisión estimulada de los fluoróforos en un rango del espectro distinto al que se emplea para registrar la fluorescencia residual. El aumento en el poder de resolución de esta técnica reside en la forma de anillo que se le da al segundo láser (láser STED) que evita la emisión en gran parte del volumen confocal excitado, quedando únicamente la región central de la PSF_{conf} como volumen de observación efectivo. En el gráfico se muestra un esquema que ejemplifica el funcionamiento del Microscopio STED, y cómo el aumento de la intensidad del láser STED (anillo rojo) permite regular el poder de resolución (dimensiones de la PSF_{conf} efectiva (verde)).

Por otro lado, la necesidad de emplear una intensidad muy alta del láser STED sobre los fluoróforos en el estado excitado, cuando éstos son especialmente sensibles y tienen una gran tendencia a degradarse, implica que el fotoblanqueo sea demasiado grande, impidiendo a veces repetir la lectura e incluso obtener imágenes 3D o secuencias temporales. Por tal razón la técnica se restringe a un selecto grupo de fluoróforos que presentan una estabilidad inusual, como el Atto647N (Atto Tec, Alemania). Lamentablemente, no hay muchas proteínas fluorescentes aptas para STED, por lo que la técnica se emplea casi exclusivamente con muestras fijadas. Aun considerando estas

limitaciones, la técnica de STED-LSCM es relativamente joven y existen varios grupos trabajando activamente para expandir las posibilidades y aplicaciones.

- STORM: En la técnica de STED se logra aumentar la resolución al poder seleccionar espacialmente en forma más eficiente los fluoróforos idénticos que coexisten dentro en la muestra en un volumen menor al de la PSF de detección. Otra alternativa está representada por la técnica de Microscopía por Reconstrucción Óptica Estocástica (STORM, *Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*) (Bates, 2005), en la que los fluoróforos se diferencian temporalmente al ser “activados” aleatoriamente. La técnica se basa en la inducción de un estado “oscuro” en la mayoría de los fluoróforos, generalmente un estado triplete inducida por agentes reductores y que no emite fluorescencia, pero puede ser también una transición química cis-trans o similares. Los pocos fluoróforos activos durante cada imagen registrada (idealmente una única molécula a la vez) se excitan normalmente y se registra su fluorescencia en una cámara digital. Si bien la emisión de una molécula individual se difracta unos 200 a 400 nm en el plano-xy y de 500 a 800 nm en el eje óptico, la señal de fluorescencia será registrada en más de un pixel por el sensor CCD. Basada en la distribución de intensidades registradas por cada fluoróforo, la localización de la molécula emisora puede ser determinada con alta precisión si los fluoróforos utilizados emiten un número suficiente de fotones. Por cada molécula se determina un punto en la imagen que corresponde al pico central de la distribución de luz en la PSF del fluoróforo. Si estas moléculas no se superponen, se puede localizar la posición del emisor mediante un ajuste bigaussiano con una precisión de hasta 1 nm en el plano-xy. La localización sucesiva y con alta precisión de fluoróforos individuales se emplea para reconstruir imágenes de resolución muy por debajo del límite de difracción, llegando incluso a resoluciones de 10 nm (Figura 13.13). Para lograr una detección individual de emisores en STORM se utilizan fluoróforos que pueden ser prendidos y apagados estocásticamente por pasar de un estado fluorescente a un estado "oscuro", pero además tienen que emitir un número importante de fotones ya que de esto depende la precisión en su localización. Dentro de las moléculas que cumplen estas características y

que se utilizan en STORM, podemos nombrar a la proteína YFP, y a moléculas orgánicas comerciales como Cy5, Alexa-647, entre otros. Por ejemplo, el Cy5 puede ser llevado al estado "oscuro" con un láser de 633 nm (el mismo láser que produce su emisión fluorescente) y nuevamente al estado fluorescente con un láser de 532 nm. El grado de detalle de una imagen STORM depende del número de localizaciones determinadas. Con una cámara CCD se toman imágenes sucesivas en las que en cada una de ellas se detectan unas pocas moléculas individuales. El tiempo de exposición de cada foto de la serie y la duración del tiempo de exposición deben ser ajustados tratando de detectar, por imagen, el mayor número de moléculas posible sin superposición entre las PSF de cada fluoróforo. Esta técnica permite combinar varios fluoróforos para lograr la detección simultánea de diferentes marcaciones y puede lograrse mayor resolución en el eje-z combinándola con TIRFM. Sin embargo, la principal desventaja es el tiempo necesario para la adquisición serial de imágenes que permita lograr una reconstrucción representativa del campo estudiado. Por esta razón, la técnica de STORM es mucho más lenta que STED, LSCM o la microscopía de fluorescencia de campo amplio, pudiendo requerir hasta más de media hora para obtener una única imagen STORM. Por esta razón, generalmente, no resulta compatible con la observación dinámica de procesos en células vivas.

2 μm

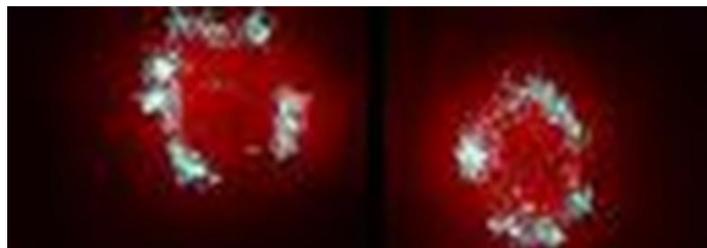


Figura 13.13. Imagen STORM de mitocondrias aisladas de células SH-SY5Y. Las mitocondrias aisladas fueron adsorbidas sobre un cubreobjetos con una cubierta de poly-L-Lisina y fijadas con paraformaldehído. La presencia del marcador de membrana externa TOM20 fue revelada por inmunofluorescencia basada en un anticuerpo específico contra esta proteína. En rojo se observan dos imágenes de fluorescencia de campo amplio, y en blanco las imágenes STORM de localización superpuestas a las de campo claro.

- PALM: Este es el acrónimo de Microscopía por Localización Foto-Activada (*Photo-Activable Localization Microscopy*) (Hess, 2006; Betzig, 2006). Esta técnica es análoga a la antes descrita, pero se basa en la fotoactivación secuencial de moléculas aisladas que pueden ser reconocidas y localizadas con gran precisión ajustando una distribución de intensidad que estime su posición. Una vez activado un fluoróforo se trata de obtener toda la información (fotones) que éste pueda emitir, hasta que se degrade y quede en un estado ópticamente inerte para la detección por fluorescencia antes de “encender” el siguiente fluoróforo. Todos los fotones registrados por ciclo se suponen inicialmente que provienen de un único fluoróforo (o unos pocos) y se ajusta una distribución bigaussiana (en xy) a la imagen de dicho fluoróforo para determinar su posición (máximo de la distribución). Al igual que en STORM, es necesario una gran cantidad de iteraciones a fin de poder reconstruir una imagen con suficientes detalles, por lo que nuevamente estamos limitados casi exclusivamente a muestras fijadas.

Los algoritmos para STORM y PALM actuales pueden lidiar con unos pocos fluoróforos activos al mismo tiempo, ajustando múltiples distribuciones bigaussianas en paralelo, lo que acelera notablemente el proceso de adquisición de datos y reconstrucción de la imagen (Huang, 2011). Existen varios ejemplos de aplicaciones en células en cultivo, pero el problema fundamental es lograr introducir los quenchers (STORM) o los fluoróforos (PALM) selectivamente dentro de las células. En este sentido, se han desarrollado varias proteínas fluorescentes fotoconvertibles que posibilitan el uso de PALM *in vivo* y en células en cultivo. Pero algunos autores también han logrado emplear la técnica de STORM dentro de las células recurriendo a sondas fluorescentes y a agentes reductores naturales o permeables. Al igual que en el caso de STED, estas técnicas son muy recientes y siguen desarrollándose año a año; así como otras técnicas que no hemos tenido tiempo de desarrollar en este capítulo, pero que cada vez son más populares, como 3D-SIM, Microscopía-4Pi o PAM (*Programmable Array Microscopy*).

13.9 Aplicaciones: Biofísica en el Microscopio

Las técnicas microscópicas se han convertido en una herramienta fundamental de los laboratorios de diagnóstico y de investigación. Además, la posibilidad de adaptar un gran número de las técnicas espectroscópicas al formato del microscopio permite evaluar una gran variedad de propiedades moleculares junto con su variación y su distribución dentro de la célula. Información a nivel molecular, macromolecular, de organelas y membranas, células y tejidos, volcada sobre representaciones tridimensionales de células y tejidos, e incluso su dinámica y evolución temporal, todos ellos combinados y escalables en la misma herramienta. Todo un sinfín de posibilidades para estudiar distintos procesos biológicos es lo que ofrece la microscopía. Mencionaremos a continuación sólo unos pocos ejemplos.

- Observación Directa de Células Fotosintéticas: En la observación directa de un preparado vegetal de hojas verdes al microscopio óptico (transmisión de luz blanca) pueden distinguirse sencillamente las células fotosintéticas de aquellas que cumple funciones de sostén o transporte de sustancias, ya que las primeras poseen una coloración natural por la clorofila y demás pigmentos de los fotosistemas. Además, estas muestras también presentan un alto nivel de autofluorescencia, sobretodo en el rango de 450 a 750 nm, por la emisión de los distintos pigmentos de las antenas (clorofilas, xantenos y carotenos). Este es un ejemplo sencillo que no necesita mayores preparativos para poder analizar a grandes rasgos la estructura del tejido e incluso permite reconocer los cloroplastos. Más aún, simulando distintas condiciones de iluminación, uno podría observar y registrar el movimiento de los cloroplastos dentro de las células fotosintéticas, un proceso dependiente de energía (ATP) conocido como ciclosis. Sin embargo, es complicado realizar ensayos de fluorescencia en tejidos verdes de plantas debido a la contaminación por la autofluorescencia, ya que uno debe poder diferenciarla (espectralmente, por el tiempo de vida de fluorescencia, etc.) de la señal específica buscada.
- Células Vivas o Células Muertas: Uno de los procesos celulares más estudiados es el metabolismo celular. Existen varias sondas que permiten

diferenciar una célula viva de una muerta, o cuantificar la capacidad metabólica de las células. Por ejemplo, podemos reconocer células vivas por la exclusión de colorantes vitales como el Azul de Trypán. Sin embargo, cuando la vitalidad de una célula está comprometida, su capacidad de bombear activamente el colorante fuera de la célula se ve afectada y la célula comienza a teñirse de azul (Figura 13.14A). Este ensayo es de uso frecuente en los laboratorios de biología celular y permite estimar la proporción de células vivas y muertas que uno recupera al subcultivar un cultivo de células animales. Del mismo modo, la actividad metabólica de las células puede estimarse por la acción de enzimas estererasas citoplasmáticas. Incubando las células con el fluoróforo permeable a membranas Diacetato de Fluoresceína, las estererasas podrán actuar sobre los enlaces éster y removerán los grupos acetato dotando a la fluoresceína de dos cargas negativas que no permitirán que escape fácilmente del citoplasma y vuelva a diluirse en el medio. Este ensayo es análogo al anterior, pero ahora las células vivas serán las teñidas con fluorescencia verde ($\lambda_{Exc} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{Em} = 530 \pm 20 \text{ nm}$), y las células muertas serán las que no presenten señal.

- Sondas con Afinidades Específicas por Tipos de Células u Organelas:

Algunos colorantes y sondas fluorescentes presentan una afinidad particular por determinados componentes o compartimentos celulares. Podemos mencionar, por ejemplo, los colorantes como Giemsa, Hematoxilina y Eosina que son colorantes con propiedades ácido-base y reconocen selectivamente estructuras o componentes catiónicos o aniónicos, siendo de gran utilidad en histología de tejidos y ensayos citogenéticos como el bandeo G de cromosomas. Las sondas fluorescentes Bromuro de Etidio, Hoechst o DAPI presentan gran afinidad por el ADN y tiñen fuertemente la matriz del núcleo celular. Por otro lado, sondas como Rodamina 123, tetrametilrosamina o sondas de la familia de las carbocianinas (MitoTrackers, Life Technologies/Molecular Probes) presentan una gran afinidad por mitocondrias funcionales. Algunas carbocianinas además quedan unidas covalentemente luego de la fijación con aldehídos gracias a grupos clorometilos que reaccionan moderadamente con tioles reactivos logrando una tinción muy específica y resistente de las mitocondrias en células vivas, tanto para ensayos dinámicos

como para aquellos preparados que serán fijados para ser combinados con inmunofluorescencia. En la Figura 13.14B se muestra un ejemplo de una imagen de dos canales fluorescentes correspondiente a una célula animal tenida con dos sondas fluorescentes con afinidades específicas por el núcleo (DRAQ5: rojo) o vesículas sináptica dopaminérgicas (FFN511: verde). En la misma figura se muestra como referencia de fondo un tercer canal correspondiente a la imagen de DIC de las mismas células.

- Inmunofluorescencia: La introducción de la inmunomarcación, uno de los ejemplos más notables de aplicaciones prácticas más versátiles, amplió considerablemente las capacidades de generar contraste específicamente de los objetos de estudio, como por ejemplo detectar proteínas, estructuras subcelulares, marcadores de membrana o patógenos, solo para nombrar algunas posibilidades. La marcación es basada en el uso de anticuerpos que reconocen solo epitopes específicos, pudiendo incluso diferenciar entre isoformas muy similares o incluso dos estados de fosforilación distintos de una misma proteína, análogamente a su uso en la técnica de western blot. Sin embargo, uno debe tener en cuenta que los anticuerpos que funcionan correctamente en membranas, no siempre son los mejores para su uso en Inmunofluorescencia (IF). Estas diferencias se deben normalmente a que en un western blot las proteínas se encuentran desplegadas y aisladas de otros componentes con los que interactúan. En IF, sin embargo, las células deben permeabilizarse previa fijación para lograr que los anticuerpos atraviesen distintas barreras membranosas; a menos que se detecten marcadores de membrana plasmática, como en la separación de células activada por fluorescencia (FACS) en citometría de flujo. La fijación se logra con agentes entrecruzantes (o *crosslinkers*), como formaldehído o glutaraldehído, o mediante la deshidratación con metanol. La fijación resulta del entrecruzamiento químico de las proteínas, lo que las mantiene en su ubicación original y más próxima a su conformación nativa, aunque con modificaciones químicas. Esto condiciona su reconocimiento por anticuerpos que solo tienen acceso a los epitopes superficiales. Pero, si los anticuerpos están bien seleccionados, uno puede distinguir una única proteína en un entorno muy

complejo con miles de proteínas distintas, aunque la abundancia de la proteína de interés sea muy baja. Así, por ejemplo, podemos identificar proteínas específicas de fracciones subcelulares en células neuronales en cultivo fijadas con formaldehído y permeabilizadas con detergentes no iónicos (Triton X-100). En la Figura 13.14C se muestran células SH-SY5Y reveladas con un anticuerpo anti-Lamp1 (marcador de lisosomas) y anti-alfa-Sinucleína (proteína soluble citosólica y asociada a membrana). En la misma figura se muestra, como referencia, la señal de una sonda afín por el ADN nuclear (DRAQ5).

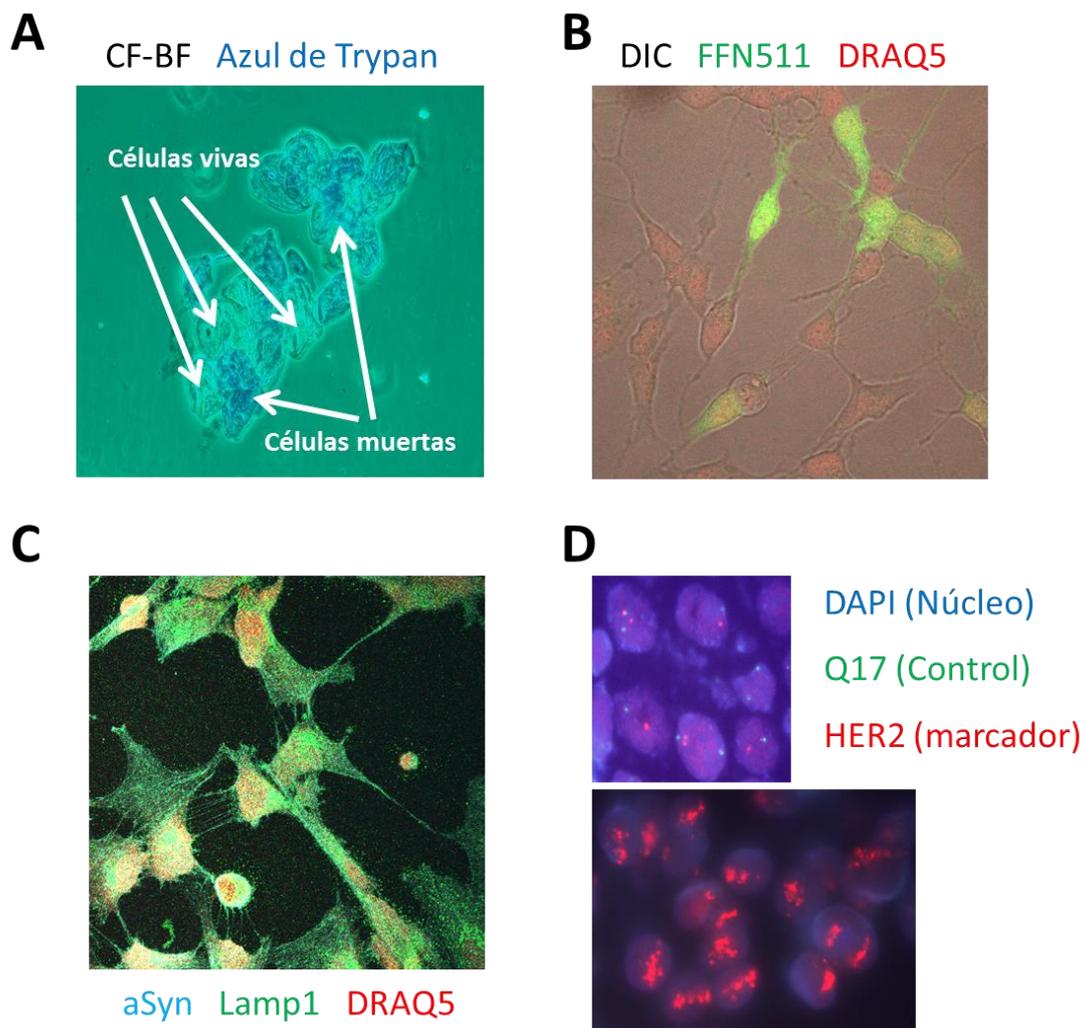


Figura 13.14. Ejemplos de aplicaciones de las técnicas de Microscopía Óptica. (A) Exclusión de Azul de Trypan como marcador vital. (B) Tinción de células vivas con colorantes con afinidades por estructuras subcelulares. (C) Inmunofluorescencia de proteínas específicas. (D) Detección de aberraciones cromosómicas por FISH. Ver detalles sobre cada imagen en el texto.

- Sondas de Ácidos Nucleicos (FISH): La especificidad lograda por los anticuerpos al reconocer proteínas es equivalente a la lograda por sondas de ácidos nucleicos para reconocer secuencias de nucleótidos o estructuras moleculares. La técnica de Fluorescencia por Hibridación *In Situ* (FISH, *Fluorescence In Situ Hybridization*) es una herramienta común de diagnóstico citogenético ya que tiene varias ventajas respecto al bandeo cromosómico. Por ejemplo, la identificación de secuencias específicas permite determinar polisomías o traslocaciones cromosómicas identificando el origen de los cromosomas extras o modificados. Mucho más notable es su capacidad de identificar modificaciones de menor tamaño, como la amplificación de una región pequeña de un cromosoma por duplicaciones en tándem (Figura 13.14D). Estas aberraciones cromosómicas suelen estar asociadas a distintos trastornos hereditarios y al desarrollo de Cáncer, por lo que su identificación reviste relevancia diagnóstica y pronóstica irremplazable para algunas formas de esta enfermedad, ya sea para definir la sensibilidad a distintos tratamientos y/o para el seguimiento de la enfermedad y la respuesta al tratamiento.

- Interacción entre proteínas por FRET: En el Capítulo 2 se describió la técnica de FRET en detalle, así como el desarrollo de las Proteínas Fluorescentes (FPs, *Fluorescent Proteins*) con distintas propiedades foto-físicas y espectrales. Asimismo, en el Capítulo 11 se describió el uso de esta técnica para estudiar específicamente interacciones entre proteínas. En esta oportunidad aprovecharemos las propiedades del fenómeno FRET para caracterizar la interacción funcional o cambios conformacionales de un bioindicador FRET en relación a la estructura de la célula. Estos ensayos están basados en el uso de proteínas marcadas genéticamente con FPs, como por ejemplo el par CFP-YFP o GFP-RFP (Goedhart, 2011). Esta técnica permite evidenciar cambios conformacionales o de distancia cuando las FPs se encuentran en un rango de 1 a 10 nm. En el caso de dos proteínas interactuantes (con dimensiones entre 1 y 5 nm), podemos evidenciar su interacción dentro del rango de sensibilidad del par FRET, que es mucho más real que la simple colocalización confocal, en la que no es posible distinguir

entre 1 a 250 nm de distancia (límite de difracción). En el caso de biosensores FRET, como el conocido sensor codificado genéticamente de calcio *Cameleon* en sus diferentes versiones (Yamada, 2011), los cambios de concentración de un ligando (ion, metabolito intermedio o fosforilación de proteínas) inducen cambios conformacionales del biosensor que modifican la distancia relativa y/o la orientación de ambas PFs modificando su r y κ^2 . Los cambios relativos pueden cuantificarse y calibrarse con una curva de concentración del ligando para poder luego estimar la disponibilidad del ligando intracelular. De forma análoga se estudia la interacción entre dos proteínas, fusionándolas independientemente a cada una de las FPs del par FRET (Adjobo-Hermans, 2011; Goedhart, 2011). Si ambas se sobreexpresan en la misma célula, es posible evidenciar la interacción entre ambas registrando la Fluorescencia del donador FRET en ausencia y presencia del aceptor FRET (Jares-Erijman, 2003; Jares-Erijman, 2006), o mediante la disminución del tiempo de vida del donador en presencia del aceptor FRET (Klarenbeek, 2011).

- FLIM-FRET: Los ensayos en los que se modifica el tiempo de vida media de un fluoróforo (τ) no así como sus otras propiedades espectrales, como FRET u homo-FRET, pueden estudiarse monitoreando los cambios en el tiempo de desexcitación del fluoróforo (*lifetime*, τ). En el caso de ensayos tipo FRET, donde la presencia del fluoróforo aceptor o un *quencher* disminuye el τ del fluoróforo dador, la técnica se conoce como FRET-FLIM (Gadella, 1995; Klarenbeek, 2011; Padilla-Parra, 2012), ya que se recurre a un microscopio en el que puede medirse el fenómeno de FRET mediante tiempos de vida de fluorescencia. Existen dos tipos de microscopios FLIM (*Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*), los que trabajan en el dominio de tiempos y los que lo hacen en el dominio de frecuencia. En el primer caso se recurre a una fuente de luz pulsátil (20-80 MHz) que emite pulsos de luz que duran menos de un nanosegundo ($1 \text{ ns} = 10^{-9} \text{ s}$). La detección de la intensidad de fluorescencia se desfasa y clasifica en una serie de ventanas temporales (o canales) posteriores al pulso, que luego se emplean para estimar el τ del fluoróforo. En el caso del dominio de frecuencias, se emplea una fuente de luz con intensidad oscilante. La emisión de la fluorescencia se registra y se compara con el patrón temporal

de excitación y se calcula la diferencia en módulo y el desfase en la oscilación (relacionados al tiempo de vida). En ambas variantes de la técnica se pueden estimar más de un τ , así como las contribuciones de cada uno, lo que da cuenta de distintas poblaciones del fluoróforo (que se encuentran en distintos ambientes y/o que sufren distintos procesos de desexcitación).

- Ensayos dinámicos: La técnica de Recuperación de la Fluorescencia Luego del Foto-blanqueo (FRAP, *Fluorescence Recovery After Photobleaching*) permite el análisis de la movilidad de los fluoróforos en células vivas. Así, por ejemplo, proteínas fusionadas genéticamente a proteínas fluorescentes pueden monitorearse en células intactas sin la necesidad de permeabilizarlas para ingresar anticuerpos que las reconozcan. La técnica consiste en el fotoblanqueo instantáneo de un fluoróforo en una región relativamente pequeña de la célula, y entre la adquisición de una serie temporal de imágenes ($xy\lambda t$). El foto-blanqueo se logra por la sobreexcitación del fluoróforo con un haz de luz láser de alta potencia. Esta técnica, aunque no está restringida, se aplica generalmente en el LSCM, por lo que el haz láser puede posicionarse con gran precisión y describir figuras de distintas geometrías y tamaños. Al analizar la fluorescencia emitida desde la región de interés, se observa una señal estable previa al fotoblanqueo, luego una caída abrupta y finalmente una recomposición parcial de la señal original. De esta información se puede estimar la velocidad de difusión del fluoróforo y la existencia de una fracción inmóvil.

Estas técnicas han sido expandidas a aproximaciones de partículas únicas, como por ejemplo la Espectroscopía de Correlación de Fluorescencia (FCS, *Fluorescence Correlation Spectroscopy*), que permiten estimar el coeficiente de difusión de los fluoróforos de forma mucho más precisa. Esta técnica ya fue descrita en el capítulo 11, por lo que ahora sólo nos reduciremos a mencionar que la misma se aplica normalmente en formato de microscopio similar al confocal y puede adaptarse sencillamente para obtener imágenes confocales en el mismo equipo (Moens, 2011). La extrapolación del fundamento de FCS a los 3 rangos de tiempos codificados en las imágenes confocales xyt , permiten adaptar esta técnica a la evaluación procesos u objetos que presentan distintos

tiempos de difusión, desde unos pocos microsegundos ($1 \mu\text{s} = 10^{-6} \text{ s}$) a varios minutos. Esta modificación se conoce como RICS (Raster-scan Image Correlation Spectroscopy) (Rossow, 2010). Asimismo, el análisis puede expandirse al estudio de correlación cruzada (*Cross-Correlation*) de distintos fluoróforos o de moléculas del mismo fluoróforo pero en localizaciones distintas de la muestra (Choi, 2011). Desarrollos más recientes de esta técnica han devenido en una nueva técnica de microscopía llamada SOFI (*Super-resolution Optical Fluctuation Imaging*), en la que se generan imágenes en las que en cada pixel están representados los parámetros de la función de autocorrelación local (Dertinger, 2009). Esta técnica tiene particularidad de que las contribuciones por la fluorescencia de fondo o ruido son eliminadas durante el análisis de correlación.

13.10. Bibliografía sobre Microscopía Óptica

Esta fue sólo una pequeña reseña de las posibles técnicas basadas en Microscopía de Fluorescencia, por lo que les sugerimos que, de estar interesados, busquen bibliografía actualizada. A tal fin, detallamos a continuación bibliografía específica sobre cada tema detallado en este capítulo donde podrán profundizar más en sus conocimientos.

- *Fluorescencia*

- Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3ra Edición, Joseph R. Lakowicz. Springer, 2006.
- Molecular Fluorescence: Principles and Application. 2da Edición. Bernard Valeur, Mário Nuno Berberan-Santos. Wiley-VCH, 2013.

- *Microscopía de Fluorescencia*

- Imaging: A Laboratory Manual. Rafael Yuste. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2010.

- Introduction to Optical Microscopy. Jerome Mertz. Roberts and Company Publishers, 2009.
- Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging. Douglas B. Murphy, Wiley-Liss, 2001.
- Live Cell Imaging: A Laboratory Manual. 2da Edición. Robert D. Goldman, David L. Spector, Jason R. Swedlow. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009.

- *Microscopía Confocal*

- Handbook of Biological Confocal Microscopy. 3ra Edición. James Pawley. Springer, 2006.
- Confocal Microscopy. Methods and Protocols. Stephen W. Paddock. Series en Method in Molecular Biology, Volume 122. Springer, 1999
- Basic Confocal Microscopy. Robert L. Price, W. Gray (Jay) Jerome, Springer, 2011.

- *Superresolución*

- Nanoscopy and Multidimensional Optical Fluorescence Microscopy. Alberto Diaspro Chapman and Hall/CRC Press, 2010.

Del mismo modo, se insta a los lectores a revisar las páginas en internet de las compañías más importantes de microscopios y asociaciones de microscopistas, donde podrán encontrar material complementario, videos y demostraciones sobre fundamentos, aplicaciones y ejemplos de las distintas técnicas.

- <http://www.micro.magnet.fsu.edu/>
- <http://www.olympusmicro.com/>
- <http://www.leica-microsystems.com/>
- <http://microscopy.zeiss.com/>
- <http://www.microscopyu.com/>

Bibliografía

Adjobo-Hermans MJ, Goedhart J, van Weeren L, Nijmeijer S, Manders EM, Offermanns S, Gadella TW Jr. Real-time visualization of heterotrimeric G protein Gq activation in living cells. *BMC Biol.* 2011 9:32, 2011.

Adjobo-Hermans MJ, Goedhart J, van Weeren L, Nijmeijer S, Manders EM, Offermanns S, Gadella TW Jr. Real-time visualization of heterotrimeric G protein Gq activation in living cells. *BMC Biol.* 2011 9:32, 2011.

Bates M, Blosser TR, Zhuang X. Short-range spectroscopic ruler based on a single-molecule optical switch. *Phys Rev Lett.* 94:108-101, 2005.

Betzig E, Patterson GH, Sougrat R, Lindwasser OW, Olenych S, Bonifacino JS, Davidson MW, Lippincott-Schwartz J, Hess HF. Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution. *Science* 313: 1642–1645, 2006.

Choi CK, Zareno J, Digman MA, Gratton E, Horwitz AR. Cross-correlated fluctuation analysis reveals phosphorylation-regulated paxillin-FAK complexes in nascent adhesions. *Biophys J.* 100:583-92, 2011.

Dertinger T, Colyer R, Iyer G, Weiss S, Enderlein J. Fast, background-free, 3D super-resolution optical fluctuation imaging (SOFI). *Proc Natl Acad Sci USA.* 106:22287-22292, 2009.

Gadella TW Jr, Jovin TM. Oligomerization of epidermal growth factor receptors on A431 cells studied by time-resolved fluorescence imaging microscopy. A stereochemical model for tyrosine kinase receptor activation. *J Cell Biol.* 129:1543-1558, 1995.

Goedhart J, van Weeren L, Adjobo-Hermans MJ, Elzenaar I, Hink MA, Gadella TW Jr. Quantitative co-expression of proteins at the single cell level--application to a multimeric FRET sensor. *PLoS One.* 2011;6(11):e27321, 2011.

Hell SW, Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt Lett.* 19:780-782, 1994.

Hell SW. Far-Field Optical Nanoscopy. *Science* 316: 1153-1158, 2007

Hess S, Giririjan T, Mason M. Ultra-High Resolution Imaging by Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy. *Biophysical Journal* 91 (11): 4258–4272, 2006.

Hofmann M, Eggeling C, Jakobs S, Hell SW. Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy at low light intensities by using reversibly photoswitchable proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102:17565-17569, 2005.

Huang F, Schwartz SL, Byars JM, Lidke KA. Simultaneous multiple-emitter fitting for single molecule super-resolution imaging. *Biomed Opt Express.* 2:1377-1393, 2011.

Jares-Erijman EA, Jovin TM. FRET imaging. *Nat Biotechnol.* 21:1387-1395, 2003.

Jares-Erijman EA, Jovin TM. Imaging molecular interactions in living cells by FRET microscopy. *Curr Opin Chem Biol.* 10:409-416, 2006.

Klarenbeek JB, Goedhart J, Hink MA, Gadella TW, Jalink K. A mTurquoise-based cAMP sensor for both FLIM and ratiometric read-out has improved dynamic range. *PLoS One.* 6:e19170, 2011.

Moens PD, Gratton E, Salvemini IL. Fluorescence correlation spectroscopy, raster image correlation spectroscopy, and number and brightness on a commercial confocal laser scanning microscope with analog detectors (Nikon C1). *Microsc Res Tech.* 74:377-88, 2011.

Padilla-Parra S, Tramier M. FRET microscopy in the living cell: different approaches, strengths and weaknesses. *Bioessays.* 34:369-376, 2012.

Patterson GH. Fluorescence microscopy below the diffraction limit *Semin Cell Dev Biol* 20: 886–893, 2009.

Rossow MJ, Sasaki JM, Digman MA, Gratton E. Raster image correlation spectroscopy in live cells. *Nat Protoc.* 5:1761-74, 2010.

Yamada Y, Michikawa T, Hashimoto M, Horikawa K, Nagai T, Miyawaki A, Häusser M, Mikoshiba K. Quantitative comparison of genetically encoded Ca indicators in cortical pyramidal cells and cerebellar Purkinje cells. *Front Cell Neurosci.* 5:18, 2011.

LOS AUTORES

Carolina Bagnato (Autor)

Jefe de trabajos de Química Orgánica (I y II) y Química y Contaminación Ambiental en la Escuela de Tecnología, producción y medioambiente, Sede Andina, Universidad Nacional de Río Negro. Investigador Asistente CONICET con lugar de trabajo en la Universidad Nacional de Río Negro. Licenciada en Biología, Universidad Nacional de La Plata. Doctora de la Universidad Nacional de Quilmes mención en Ciencias Básicas y Aplicadas. Postdoctorado en la Universidad de Connecticut Centro de Salud (University of Connecticut Health Center), Departamento de Biología Vasculat, Laboratorio de Proteoma, (2004-2007) y en el Departamento de Medicina Molecular (2007-2009).
Áreas de investigación: Biología celular, bioquímica de lípidos, producción de biodiesel y bioenergía.

Natalia M. Bottasso Arias (Autor)

Licenciada en Bioquímica (2012, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP). Pasante (2006-2012) en el INIBIOLP (Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP-CONICET).
Becaria de Entrenamiento (2012-2013) de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC).
Becaria de Estudio (2013-2014) de la CIC. Becaria de Posgrado Tipo I (2014-2017) de CONICET con lugar de trabajo en el INIBIOLP.
Áreas de investigación: Biología celular y molecular, biofísica y bioquímica de proteínas.

Betina Córscico (Autor/Editor)

Profesora Adjunta de Bioquímica en la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata. Investigador Independiente CONICET con lugar de trabajo en el INIBIOLP (Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata, UNLP-CONICET).
Lic. En Bioquímica y Doctora en Cs. Bioquímicas de la UNLP (1994, FCE-UNLP).
Postdoctorado en Rutgers, The State University of New Jersey, USA, 1996-1998.
Áreas de investigación: Bioquímica y biofísica de proteínas que unen lípidos. Biología estructural.

Marcelo D. Costabel (Autor)

Profesor-Investigador Departamento de Física, Universidad Nacional del Sur (UNS), desde 2000 y Director Grupo de Biofísica – UNS., desde 2006.

Licenciado en Física (UNS -1991). Dr. de la Fac. de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata.(UNLP. 1998). Estadía Postdoctoral Laboratoire Biochimie Structurale, Institut Pasteur, Paris, Francia (1999-2000).

Áreas de investigación: Cristalografía de Proteínas, Biofísica estructural computacional de macromoléculas.

Lucrecia María Curto (Autor)

Jefe de Trabajos Prácticos de Química Biológica Superior en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires. Investigador Asistente CONICET con lugar de trabajo en el IQUIFIB (Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas, UBA-CONICET).

Docente Autorizado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

Bioquímica y Doctora de la UBA, área biofísica (2008, FFyB-UBA).

Áreas de investigación: Biología estructural, biofísica y bioquímica de péptidos y proteínas.

Eduardo De Gerónimo (Autor)

Jefe de Trabajos Prácticos en la Cátedra de Introducción a la Química y Química General, en la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata.

Bioquímico (2006, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP). Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas (UNLP), Área Ciencias Biológicas (año 2011), con lugar de trabajo en el INIBIOLP (Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP-CONICET). Becario de Posgrado Tipo I (2006-2009) y Tipo II (2009-2011) CONICET. Áreas de investigación: Biología estructural, biofísica y bioquímica de proteínas.

Investigador/Profesional de Gestión Externa (desde el año 2012), Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria EEA INTA-Balcarce.

Áreas de investigación: Ciencias de la Tierra, del Agua y de la Atmósfera.

José María Delfino (Autor)

Profesor Titular Regular de Química Biológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires (FFyB-UBA, desde 2008) e Investigador Principal, CONICET (desde 2005).

Licenciado en Análisis Clínicos 1977, Bioquímico (Summa cum laude) 1978 y Doctor en Bioquímica (Premio Facultad) 1985, FFyB-UBA.

NIH-Fogarty Fellow, Postdoctoral Associate y Associate Research Scientist, Department of Molecular Biophysics and Biochemistry, Yale University 1985-1990. Investigador visitante, Eidgenössische Technische Hochschule, Laboratorium für Biochemie, Zürich 1989-1990 y

Department of Biochemistry, University of Illinois, Urbana-Champaign 1992.

Áreas de investigación: Biología estructural, biofísica y bioquímica de péptidos y proteínas.

Lisandro Jorge Falomir Lockhart (Autor/Editor)

Jefe de Trabajos Prácticos de Biotecnología y Biología Molecular, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, desde Septiembre 2006. Bioquímico (2004) y Doctor (2009) de la Fac. de Cs. Exactas (UNLP). Premio Mejor Promedio en Bioquímica 2004 de la UNLP. Becario Doctoral de la ANPCyT 2004-2005 y del CONICET 2005-2009, Becario Postdoctoral del CONICET 2009, del Max Planck Institut für Biophysikalischer Chemie (Alemania) 2009-2011, Research Fellow de la Alexander von Humboldt Foundation (MPI-bpc, Alemania) 2011-2013.

Áreas de investigación: Nutrición (metabolismo intestinal de lípidos), Neuroquímica (Alfa-Sinucleína y Enfermedad de Parkinson). Especialidades: Biología Celular. Biofísicoquímica y relación Estructura-Función de Proteínas y sus interacciones con lípidos.

Federico Fuentes (Autor)

Actualmente es docente de la Universidad Nacional de La Matanza.

Licenciado en Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires y Doctor en Biología Molecular y Biotecnología en la Universidad Nacional de General de San Martín.

Realizó posdoctorados en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA y en el Instituto Max Planck de Biofísica Química en Göttingen, Alemania.

En sus trabajos ha utilizado técnicas de microscopía de fluorescencia de campo amplio y confocal; microscopía de "time lapse" sobre células vivas, y microscopías de superresolución (STED y STORM).

Gisela Raquel Franchini (Autor/Editor)

Jefe de Trabajos Prácticos de Bioquímica en la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata. Investigador Asistente CONICET con lugar de trabajo en el INIBIOLP (Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata, UNLP-CONICET).

Bióloga y Doctora de la UNLP (2006, FCNyM-UNLP).

Postdoctorado en la Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA 2007-2009.

Áreas de investigación: Biología estructural, biofísica y bioquímica de proteínas que unen lípidos.

Gabriela Elena Gómez (Autor)

Ayudante de Primera de Química Biológica Superior, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires (FFYB-UBA).

Investigador Asistente, CONICET (Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas: IQUIFIB, UBA-CONICET).

Bioquímica (2001, FFYB-UBA), Doctora de la Universidad de Buenos Aires (Summa cum laude), área Biofísica (2010, FFYB-UBA) y Docente Autorizado (2010, FFYB-UBA). Becario Postdoctoral, CONICET (2010-2012, Fundación Instituto Leloir). Beca Posdoctoral Premio Fundación Bunge y Born (2013, Fundación Bunge y Born).

Áreas de investigación: Biología estructural, biofísica y bioquímica de péptidos y proteínas.

Francisco Luis Gonzalez Flecha (Autor)

Profesor Adjunto, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. Investigador Independiente CONICET, Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas, FFyB, UBA

Bioquímico y Doctor en Bioquímica, FFyB-UBA.

Áreas de investigación: Biofísica de proteínas de membrana y espectroscopias.

Marina Ibáñez Shimabukuro (Autor)

Ayudante Diplomado en las Cátedras de Química General y Anatomía e Histología, en la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata.

Licenciada en Bioquímica (2008, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP).

Estudiante de doctorado de la Facultad de Ciencias Exactas (UNLP), Área Ciencias Biológicas (desde el año 2008), con lugar de trabajo en el INIBIOLP (Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP-CONICET).

Becaria de Posgrado Wellcome Trust (2008-2011) y CONICET (2011-2013).

Áreas de investigación: Biología estructural, parasitología molecular, biofísica y bioquímica de proteínas.

Guillermo G. Montich (Autor)

Profesor Asociado en el Dpto. De Química Biológica-CIQUIBIC, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Investigador Principal, CONICET.

Licenciado en Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas, UNC.

Doctor en Ciencias Químicas, Facultad de Ciencias Químicas, UNC.

Áreas de Investigación: Interacciones membrana lipídica-proteína. Conformación y estabilidad de proteínas en la interfase lipídica. Herramientas de estudio: espectroscopia infrarroja, de dicroísmo circular y de fluorescencia; calorimetría diferencial de barrido y de titulación isotérmica.

Jorge Luis Pórfido (Autor)

Ayudante Diplomado del área Biotecnología y Biología Molecular del Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP).

Licenciado en Biotecnología y Biología Molecular (2009, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP).

Estudiante de doctorado de la Facultad de Ciencias Exactas (UNLP), Área Ciencias Biológicas (desde el año 2009), con lugar de trabajo en el INIBIOLP (Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP-CONICET).

Becario de Posgrado Tipo I (2009-2012) y Tipo II (2012-2014), CONICET.

Áreas de investigación: Parasitología molecular, biofísica y bioquímica de proteínas.

Mario Raúl Ramos (Diseñador Gráfico)

Diseñador en Comunicación Visual (DCV), Facultad de Bellas Artes, Universidad Nacional de La Plata (2009), con lugar de trabajo en el INIBIOLP (Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP-CONICET).

María Florencia Rey Burusco (Autor)

Ayudante Diplomado en la Cátedra de Introducción a la Química y Química General, en la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata.

Licenciada en Biotecnología y Biología Molecular (2008, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP).

Estudiante de doctorado de la Facultad de Ciencias Exactas (UNLP), Área Ciencias Biológicas (desde el año 2008), con lugar de trabajo en el INIBIOLP (Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP-CONICET).

Becaria de Posgrado Wellcome Trust (2008-2011) y CONICET (2011-2013).

Áreas de investigación: Biología estructural, parasitología molecular, biofísica y bioquímica de proteínas.

Luciana Rodriguez Sawicki (Autor)

Ayudante Diplomado del área Biotecnología y Biología Molecular del Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP).

Licenciada en Bioquímica (2009, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP).

Estudiante de doctorado de la Facultad de Ciencias Exactas (UNLP), Área Ciencias Biológicas (desde el año 2010), con lugar de trabajo en el INIBIOLP (Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP-CONICET).

Becario de Posgrado Tipo I (2010-2013) y Tipo II (2013-2015), CONICET.

Áreas de investigación: Biología celular y molecular, biofísica y bioquímica de proteínas.

Natalia Scaglia (Editor)

Ayudante de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Investigador Asistente CONICET con lugar de trabajo en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP, UNLP-CONICET).

Licenciada en Biología 2002, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, UNLP y Doctora en Ciencias Básicas y Aplicadas 2005, Universidad Nacional de Quilmes (UNQ), Argentina.

Postdoctoral Fellow 2005-2008, Department of Nutritional Sciences, Rutgers, The State University of New Jersey, NJ, USA. Postdoctoral Associate 2009-2013, Department of Medical Oncology, Dana-Farber Cancer Institute / Harvard Medical School, MA, USA.

Áreas de investigación: Biología celular y bioquímica de lípidos en cáncer.

Valeria Silva (Autor)

Licenciada en Bioquímica (2008, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay).

Estudiante de doctorado de la Facultad de Ciencias Exactas (Universidad Nacional de La Plata), Área Ciencias Biológicas (desde el año 2009), con lugar de trabajo en el INIBIOLP (Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP-CONICET).

Becaria de Posgrado Tipo I con países Latinoamericanos (2009-2012) y Tipo II con países Latinoamericanos (2012-2014), CONICET.

Áreas de investigación: Parasitología molecular, biofísica y bioquímica de proteínas.

Fernando Zamarreño (Autor)

Ayudante De Docencia A, con dedicación Simple del área I (Química General e Inorgánica) del Departamento de Química de La Universidad Nacional del Sur (UNS).

Bioquímico (2009, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, UNS).

Estudiante de Doctorado en Bioquímica del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia (UNS), desde el año 2009, con lugar de trabajo en el Grupo de Biofísica del Departamento de Física de la UNS.

Becario de Nivel Inicial de la Agencia Nacional de Promoción Científica y tecnológica (ANPCyT) (2009-2012). Becario de Posgrado Tipo II (2013-2015), CONICET.

Áreas de investigación: Biofísica y bioquímica de proteínas. Modelado Computacional y Bioinformática.