

**UNIVERSIDAD VIÑA DEL MAR**  
**ESCUELA DE INGENIERÍA**  
**INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**



“Estudio de las propiedades fusogénicas de vesículas lipídicas sintéticas con potencial aplicación farmacológica mediante técnicas de fluorescencia”

**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO BIOTECNÓLOGO  
Y AL GRADO DE LICENCIADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA**

**ANDRÉS ELIÚ ARCE JIMÉNEZ**

**PROFESOR GUÍA: LUÍS FELIPE AGUILAR**

Viña del Mar

Julio 2011

**UNIVERSIDAD VIÑA DEL MAR**  
**ESCUELA DE INGENIERÍA**  
**INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

“Estudio de las propiedades fusogénicas de vesículas lipídicas sintéticas con potencial aplicación farmacológica mediante técnicas de fluorescencia”

ANDRÉS ELIÚ ARCE JIMÉNEZ

**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO BIOTECNÓLOGO**  
**Y AL GRADO DE LICENCIADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA**

---

Dr. Luis Felipe Aguilar C.  
Profesor Guía

---

Dr. Francisco González  
Jefe de Carrera

---

Dr. Mauricio Díaz  
Comisión

---

Daniel Undurraga  
Comisión

Viña del Mar, Julio 2011.

***A mi amada y adorada Madre María Inés,  
por su incondicional fe en mí.***

# AGRADECIMIENTOS

Al proyecto Fondecyt 11090443 por el financiamiento de este trabajo.

La vida de estudiante cuando se está lejos del hogar, no es fácil, pero sí que hace madurar y tomar conciencia de cuán importante es el amor de tu familia y luchar para poder recompensar tan grande muestra de afecto y amor.

Es por esto que primeramente doy gracias a Dios por darme tan linda familia y la fuerza para poder terminar mis estudios y poder de alguna forma agradecerles todo el amor y apoyo que han tenido conmigo por siempre y que se sientan orgullosos de mí.

Quiero agradecer a mi Madre, por todo el esfuerzo con el que me ha hecho salir adelante dándome educación, apoyo respaldo en todas las etapas de mi vida, y por sobre todas las cosas, por su entrega de amor incondicional. Me faltarían hojas para expresar mi eterna gratitud hacia ti madre mía, te amo por sobre mi vida y lo haré por siempre... Si no fuera por ti no estaría hoy aquí.

A toda mi familia que no siendo grande, es inmenso el apoyo y preocupación hacia conmigo. En forma especial agradecer a mis tíos Helena, Ana, Héctor y Juan, Primos hermanos Héctor y Mary, los quiero y llevo en mi corazón.

Quiero expresar también, mi más sincera admiración y profundo agradecimiento al Dr. Luis Felipe Aguilar por guiarme desinteresadamente en este trabajo, y durante toda mi vida universitaria. Debo agradecerle el haberme permitido realizar todas las actividades necesarias en el laboratorio y sobre todo, por su apoyo, amistad y respeto.

A los Profesores Francisco Cuevas, Daniel Undurraga, Mauricio Díaz y Francisco González por su siempre buena disposición y consejos.

A todos los amigos que me han acompañado en las buenas y las malas en La Serena y en Viña del Mar, que han hecho tan memorable mis años en la Universidad y que de una u otra manera me alientan a continuar. Agradezco especialmente a Ignacia por ser la persona que estuvo a mi lado en este proceso final confiando y apoyándome, superando la barrera de las grandes distancias. Me has acompañado en esta etapa tan importante en mi vida dándome tu cariño comprensión y amor, gracias por ser mi amiga y mi niña hermosa te amo.

A los integrantes del Laboratorio les estoy eternamente agradecido por su excelente disposición y gratos momentos al momento de realizar esta tesis, gracias nuevos amigos!

Gracias Papá, por tu siempre buena disposición a ayudarme frente a cualquier problema y por los buenos momentos que hemos pasado juntos. Gracias por tu apoyo y afecto te quiero mucho

# INDICE

CAPITULO I .....	7
MARCO TEORICO.....	7
1.- Asociación de Lípidos y Proteínas en membranas. ....	7
1.1- Lípidos.....	8
1.2- Proteínas.....	12
1.3- Bicapas lipídicas.....	13
1.4- Modelo Mosaico Fluido.....	17
2.- Liposomas y Vesículas.....	18
2.1- Organización Lipídica en la formación de membranas. ....	18
2.2- Formación de agregados Liposómicos. ....	20
2.3- Tipos de liposomas y vesículas. ....	21
2.4- Propiedades Físico Químicas y estructurales de las membranas biológicas. ....	23
2.5- Procesos fusogénicos de membranas lipídicas. ....	27
2.6- Usos y aplicaciones de Liposomas.....	29
3.- Espectroscopía de Fluorescencia.....	30
3.1- Determinación de propiedades físicas de la membrana ....	32
3.2- Tiempo de Vida de Fluorescencia Resuelta en el Tiempo .....	33
3.2.1- Tiempo de Vida de Fluorescencia .....	33
3.2.2- Método de Desplazamiento de Fase y Modulación.....	34
3.3- Polarización Generalizada de la sonda Laurdan.....	36
3.4- Anisotropía de fluorescencia .....	39
3.5- Formación de Excímero de Pireno .....	44
CAPITULO II .....	46
MATERIALES Y METODOS .....	46
1.- Materiales.....	46
1.1- Reactivos e insumos. ....	46
1.2- Equipos. ....	47
1.3 Soluciones.....	47
2.- Métodos para preparación de Muestras .....	48
2.1- Preparación de stock de Lípidos.....	48

2.2.- Preparación de stock de sondas.....	48
2.3- Preparación de Vesículas Multilamelares (MLV's).....	49
2.4- Preparación de Vesículas Unilamelares Largas (LUV's). ....	50
3.- Métodos para medición de muestras.....	52
3.1- Propiedades Físico-Químicas.....	52
3.1.1- Tiempo de vida de Fluorescencia. ....	52
3.1.2- Polarización Generalizada de Laurdan .....	53
3.1.3- Anisotropía de Fluorescencia. ....	53
3.2- Fusión de Vesículas .....	54
3.3- Análisis de datos de Fluorescencia .....	55
RESULTADOS. ....	56
Propiedades Físico Químicas. ....	56
Fusión de Vesículas .....	61
DISCUSIONES.....	65
CONCLUSIONES.....	74
REFERENCIAS.....	78

## GLOSARIO

Micelas: son estructuras esféricas que contienen entre unas pocas docenas y algunos miles de moléculas anfipáticas ordenadas con sus regiones hidrofóbicas hacia el interior, de donde queda excluida el agua, y sus grupos de cabezas hidrofílicas en la superficie, en contacto con el agua

Bicapas lipídicas: está formada por dos capas de lípidos, donde las colas hidrocarbonadas de los lípidos de cada capa individual interaccionan una con otra, formando un interior hidrofóbico que actúa como barrera de permeabilidad y los grupos de las cabezas polares interaccionan con los medios acuosos a cada lado de la bicapa. También recibe el nombre de lámina bimolecular.

Vesículas: son compartimientos acuosos rodeados por una bicapa lipídica que espontáneamente se repliega sobre sí misma formando una esfera hueca.

Liposomas: son microvesículas esféricas que contienen una o varias bicapas paralelas de fosfolípidos, los cuales tienen la propiedad de adoptar espontáneamente la configuración en bicapas cuando se encuentran en un medio acuoso.

Lamela: en el campo de estudio de las vesículas, hace referencia a una bicapa lipídica.

Hemicapa: hace referencia a una monocapa lipídica, es decir, a una sola lamina de la bicapa lipídica

Microdominios: también llamados dominios o raft, son asociaciones de lípidos en las membranas lipídicas, a los cuales no se le define aun una función específica, también se les llama balsas lipídicas.

## ABREVIATURAS Y SIGLAS

LUV's	Vesículas Unilamelares Grandes
MLV's.	Vesículas Multilamelares
Tm.	Temperatura media de Transición
Ex.	Excímero
Mon.	Monómero
Long.	Longitud
T°.	Temperatura
nm.	Nanómetros.
$I_{\text{long.onda.}}$	Intensidad de Fluorescencia a una longitud de onda determinada
$\mu\text{L.}$	Microlitros
PG	Polarización generalizada
Vol.	Volumen
$\omega.$	Frecuencia angular
$\phi$	Desplazamiento de la fase
$t$	Tiempo
$\tau$	Tiempo de Vida
$\tau_P$	Tiempo de Vida de la fase
$\tau_M$	Tiempo de Vida de la modulación
//	Paralelo
$\perp$	Perpendicular
$\theta_e$	Angulo entre momento dipolar de Emisión y dirección de la Polarización de la luz de excitación
$M$	Razón de Modulación
FRET	Transferencia de energía resonante de Fluorescencia
$r$	Anisotropía de Fluorescencia
$P$	Polarización de Fluorescencia

E	Excitación
F	Emisión de Fluorescencia
G	Factor de corrección instrumental
e	Valor de euler
S <sub>0,1,2...</sub>	Estados singletes
T <sub>1,2...</sub>	Estados Tripletas

## NOMENCLATURA

Ca <sup>+2</sup>	Calcio
CHO.	Colesterol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOPC.	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina
DPH.	1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno.
DPPC.	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3 Fosfocolina
HCl	Ácido Clorhídrico
Laurdan.	2-dimetilamino-6-lauroilnaftaleno
N <sub>2</sub>	Nitrógeno
NaCl	Cloruro de Sodio
O <sub>2</sub>	Oxígeno
PC.	Fosfatidilcolina
PDA.	Ácido 1-Pireno dodecanoico
PEG.	Polietilenglicol
PyPC	1-hexanodecanoil-2-(1- Pirenodecanoil)-sn glicero-3- Fosfocolina ( $\beta$ -py-C <sub>10</sub> -HPC)

## LISTA DE ILUSTRACIONES Y FIGURAS

Figura 1: Estructura química del Colesterol. ....	8
Figura 2: Estructura general de un fosfolípido. ....	9
Figura 3: Estructura química de DOPC.....	10
Figura 4: Estructura química de DPPC. ....	10
Figura 5: Asociación de proteínas a la bicapa lipídica. ....	12
Figura 6: Esquema de una parte de una bicapa formada por fosfolípidos.....	13
Figura 7: Composición y ubicación de moléculas en la membrana. ....	14
Figura 8: Esquema de una porción de una bicapa de fosfolípidos altamente fluida. ....	15
Figura 9: Rigidez de la bicapa lipídica por el colesterol.....	16
Figura 10: Transición de fase de los lípidos.....	16
Figura 11: Mosaico fluido.....	17
Figura 12: Lípidos anfipáticos en disolución acuosa. ....	19
Figura 13: Modelos de membranas o agregados de lípidos que se forman en agua. ....	21
Figura 14: Representación esquemática de clasificación para liposomas.....	22
Figura 15: Dos estados extremos de los lípidos de la bicapa.....	24
Figura 16: Moléculas de colesterol y su interacción con fosfolípidos de membrana.....	25
Figura 17: Pasos del proceso de Fusión.....	28
Figura 18: Diagrama de Jablonsky. ....	31
Figura 19: Estructura y disposición de distintas sondas en la bicapa.....	33
Figura 20: Diagrama de las funciones de excitación $E(t)$ y emisión $F(t)$ .....	35
Figura 21: Estructura molecular del Laurdan, y su ubicación en la membrana. ....	37
Figura 22: Pérdida de energía del estado excitado de Laurdan. ....	38
Figura 23: Desplazamiento espectroscópico del Laurdan.....	39
Figura 24: Representación de la polarización de la luz. ....	40
Figura 25: luz despolarizada emitida por fotoselección de sondas. ....	42
Figura 26: despolarización de la luz y movimiento rotacional de la sonda. ....	43
Figura 27: Mezcla de lípidos sobre la base de la formación del Exímero de Pireno.....	45
Figura 28: Representación de los espectros de emisión de la sonda Pireno. ....	45
Figura 29: Esquema de Modelo de Extrusor utilizado para sintetizar las LUV's.....	50
Figura 30: Tiempo de Vida de Fluorescencia (DPH) v/s % mol de CHO.....	57

Figura 31: Tiempo de Vida de Fluorescencia (Laurdan) v/s % mol de CHO .....	58
Figura 32: Polarización Generalizada de Laurdan v/s % mol de CHO .....	59
Figura 33: Anisotropía de Fluorescencia v/s mol de CHO.....	60
Figura 34: Ensayos de Emisión de Fluorescencia de sonda PDA.....	62
Figura 35: medición de la razón Excímero/Monómero de la sonda DPA .....	63
Figura 36: medición de la razón Excímero/Monómero de la sonda PyPC.....	64

## LISTA DE ECUACIONES

Ecuación 1: Función de la componente excitación en el tiempo .....	34
Ecuación 2: Radiación de emisión de Tiempo de Vida .....	34
Ecuación 3: Modulación de Excitación de Tiempo de Vida .....	35
Ecuación 4: Modulación de Emisión de Tiempo de Vida.....	35
Ecuación 5: Factor de Demodulación de Tiempo de Vida.....	35
Ecuación 6: Tiempo de Vida de la Fase .....	36
Ecuación 7: Tiempo de Vida de Modulación .....	36
Ecuación 8: Parámetro de la PG de Laurdan.....	39
Ecuación 9: Anisotropía de Emisión de Fluorescencia .....	41
Ecuación 10: Anisotropía y Polarización con factor G.....	43
Ecuación 11: Razón Excímero/Monómero.....	44

## ABSTRACT

Due to high progress in the biomedicine, pharmaceutical and cosmetology areas is necessary study the physical-chemical behavior of the processes applied to this industry. This is very important for development of the biotechnology field. Also, the use of liposomes as drug or gene carrier requires the development of knowledge about the lipid vesicle fusogenic properties. Actually, it is unknown the relationship between the presence of segregated microdomains in the lipid vesicles with fusogenic capacity. However, recent studies have shown that lipid composition plays an important role in cell-vesicle fusion. (zhang et al., 2009) showed that cholesterol plays an important role in the first step of the vesicles fusion process.

In this context, this thesis contrasts the hypothesis that small variations in the physicochemical properties of the lamella (packing order and hydration) can affect the fusogenic process. In this area, be intended study the phenomenon of fusion in vesicle-vesicle models, relating the presence of microdomains, mediated by slight variations in the bilayer composition affects the fusion process.

We performed a systematic study of large unilamellar vesicles physical-chemical properties of with different lipid composition. The properties evaluated were the hydration of the hydrophilic-hydrophobic region, packing order and molecules dynamic in the membrane. These properties are related to the fusion capacity of the vesicles in the systems studied.

These assays were performed using time-resolved and steady state fluorescence spectroscopy techniques.

Our results correlate with those reported by other researchers. Has been reported that cholesterol critical concentrations, in the bilayer, discontinuities occur in physic-chemical properties. For example fluidity (Lian and Ho 2000, Veatch and Keller 2002).

This non-monotonic behavior observed in the physicochemical properties of vesicles formed from DPPC / DOPC / 1:1:1 mol CHO may result from the presence of microdomains in the lipid bilayer. Cholesterol in these domains is grouped into well defined areas causing a displacement of water molecules. Therefore be formed areas of very low hydration at discrete cholesterol content. This correlates with the fact that this concentration of cholesterol is produced greater efficiency in the studied synthetic vesicles "fusion". Our results relate to the work of other authors, which show that cholesterol-rich domains (rafts) favor the fusion processes in different biological systems ([Pal et al., 1988](#); [Wahlberg et al., 1992](#); [Bron R et al., 1993](#); [Stegmann et al., 1993](#); [Bron et al., 1994](#)). In addition, Zhang et al. showed that cholesterol plays a major role in starting the process of vesicle fusion ([Zhang et al., 2009](#)). These results are very interesting for potential application of synthetic vesicles in the pharmaceutical industry. However, it is necessary to perform more basic research of the fusion process and relation with the lipid composition of these vesicles.

## RESUMEN

En el campo de la biotecnología, debido a grandes e importantes avances en las áreas de la biomedicina, farmacéutica y cosmetológica, se hace necesario el estudio básico del comportamiento químico-físico de los procesos aplicados a esta industria. En este sentido, el estudio de las propiedades fusogénicas de vesículas lipídicas, permite generar un conocimiento necesario, al momento de tomar las decisiones de utilizar liposomas como posibles vehículos o *carrier* para drogas o genes. En la actualidad se desconoce la relación entre la presencia de microdominios segregados de las vesículas lipídicas, con la capacidad fusogénica de estas. Sin embargo estudios recientes han demostrado que la composición lipídica juega un rol importante en la fusión célula-vesícula. Zhang y colaboradores evidenciaron que el colesterol cumple un rol importante en el inicio del proceso de fusión de vesículas (Zhang et al., 2009).

En este sentido la presente tesis pretende contrastar la hipótesis que indica que pequeñas variaciones en las propiedades fisicoquímicas de la lamela (como orden de empaquetamiento e hidratación) pueden afectar el proceso fusogénico. En este escenario se pretende estudiar el fenómeno de fusión en modelos vesícula-vesícula, tratando de relacionar si la presencia de microdominios, mediados por pequeñas variaciones en la composición de las bicapas afecta el proceso de fusión.

Se realizó un estudio sistemático de las variaciones en las propiedades fisicoquímicas de vesículas unilamelares grandes, con diferente composición lipídica. Las propiedades evaluadas fueron, la hidratación de la interfase hidrofílica-hidrofóbica, el orden de empaquetamiento y las propiedades dinámicas de las moléculas en la membrana. Estas propiedades se relacionaron con la capacidad de fusión de las vesículas en los sistemas estudiados.

Estos análisis fueron realizados mediante las técnicas de espectroscopía de fluorescencia resuelta en el tiempo y en estado estacionario.

En los resultados obtenidos se pudo comprobar lo ya reportado con respecto a el efecto de la presencia del colesterol, el cuál no es lineal con su concentración, habiéndose detectado discontinuidades en algunas propiedades fisicoquímicas de la bicapa. Por ejemplo la fluidez ([Lian and Ho 2000](#); [Veatch and Keller 2002](#)).

Estas irregularidades observadas en las propiedades físicoquímicas de las vesículas formadas con DPPC/DOPC/CHO 1:1:1 en mol, pueden ser consecuencia de la presencia de microdominios en las bicapas lipídicas. Estos dominios ricos en Colesterol, provocarían que esta molécula se agrupe en ciertas zonas bien determinadas y a concentraciones discretas provocando un desplazamiento de moléculas de agua, promoviendo zonas de muy baja hidratación en la membrana. Esto a la vez se correlaciona con el hecho que a esta concentración de colesterol se haya producido la mayor eficiencia en la “fusión” de las vesículas sintéticas aquí estudiadas. Nuestros resultados se relacionan con los trabajos de otros autores, que evidencian que dominios ricos en colesterol (rafts) favorecen los procesos de fusión en diferentes sistemas biológicos ([Pal et al., 1988](#); [Wahlberg et al., 1992](#); [Bron R et al., 1993](#); [Stegmann et al., 1993](#); [Bron et al., 1994](#)). Además, Zhang y col. demostraron que colesterol tiene un rol fundamental en el inicio del proceso de fusión de vesículas ([Zhang et al., 2009](#)). Estos resultados son de gran utilidad para una potencial aplicación de las vesículas sintéticas en la industria farmacológica y farmacéutica. Sin embargo, es necesario realizar una mayor investigación básica de los fundamentos científicos del proceso de fusión y su relación con la composición lipídica de estas vesículas.

# INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años se han desarrollado una serie de estudios del fenómeno de la fusión de vesículas, para comprender los fenómenos del transporte intracelular, la exocitosis, y especialmente para optimizar el proceso de fusión en vesículas utilizadas como transportadores de drogas o material genético. La composición lipídica y las propiedades fisicoquímicas de la lamela, jugarían un papel importante en este proceso fusogénico. Algunas de las propiedades que influyen en este proceso son el empaquetamiento lipídico, la curvatura y, cambios en la fluidez de membrana ([Wu et al., 1996](#); [Lee and Lentz, 1997](#); [Lentz et al., 1987](#); [Haque et al., 2001](#); [Litzinger and Huang, 1992b](#)).

En los estudios del proceso fusogénico, se ha reportado que microdominios en la hemicapa externa de la vesícula favorecen el proceso. Sin embargo no hay estudios en que se realicen pequeñas variaciones en la composición lipídica que altere la presencia-ausencia de posibles microdominios, ni como éstos puedan influenciar el proceso fusogénico. ([Papahadjopoulos et al., 1991](#))

En las últimas décadas los liposomas han sido considerados como posibles vehículos para drogas o genes ([Lee and Low, 1994](#); [Du et al., 2007](#); [De Jong and Borm 2008](#); [Shibata et al., 2004](#); [Caracciolo et al., 2009](#); [Jesorka and Orwar 2008](#)). Una de las características principales de estos liposomas es que pueden encapsular una enorme variedad de drogas en la fase interna acuosa o en la fase orgánica de la bicapa ([Garelli and Vierling, 1992](#); [Lanio et al., 2009](#)). Otra característica importante es que los liposomas pueden proteger su contenido de la filtración rápida en riñones y la degradación de proteasas, esterases, y otras enzimas, aumentando su tiempo de vida en el medio. Cuando a los liposomas se les une un anticuerpo, u otro tipo de ligando específico, estas vesículas pueden ser dirigidas a una célula huésped específica dependiendo de la habilidad del anticuerpo o ligando para facilitar la unión celular específica ([Litzinger and Huang, 1992a](#); [Litzinger and Huang, 1992b](#)).

Así como las vesículas lipídicas presentan ciertas ventajas como vehículos de drogas, también presentan algunas desventajas técnicas. Los liposomas no modificados tienen un tiempo de vida corto en circulación al ser removidos por macrófagos del sistema reticuloendotelial, a las pocas horas de administración. Para evitar este obstáculo los liposomas son formados con lípidos saturados y colesterol, incluyendo gangliósidos y lípidos derivatizados de polietilenglicol (PEG) (Papahadjopoulos et al., 1991; Allen et al., 1991). La mayoría de los estudios del proceso de fusión utilizan el PEG como componente primordial para producir la fusión. Ésta molécula es un efectivo polímero deshidratante, que fuerza el contacto cercano entre membranas sin una interacción directa entre ellas. La ventaja del PEG es que inhibe la unión no específica de proteínas séricas previniendo así el reconocimiento de los liposomas por macrófagos (Papahadjopoulos et al., 1991; Allen et al., 1991).

En cuanto a la fusión, al parecer no es suficiente el contacto entre dos membranas agregadas para producir la unión de vesículas unilamelares grandes (LUV). El proceso de fusión debería estar influenciado por los contenidos lipídicos de la membrana, el tamaño de la vesícula, y las propiedades fisicoquímicas de la lamela. La ruptura de la vesícula ocurre a la concentración necesaria de PEG para producir la fusión, pero la ruptura no necesariamente es para la fusión vesicular si no que podría tomarse como un evento asociado al estrés creado por la deshidratación severa de la lamela (Lee and Lentz, 1997).

El efecto de las propiedades fisicoquímicas sobre la fusión vesicular ha sido reportado, utilizado como modelo de estudio la fusión vesícula-vesícula. Algunos de los aspectos estudiados que han demostrado tener influencia en el proceso fusogénico son: la deshidratación de la bicapa (Wilschut et al., 1985), el orden imperfecto del empaquetamiento lipídico (Wu et al., 1996; Lee and Lentz, 1997), alteraciones en la curvatura (Lentz et al., 1987; Haque et al., 2001), diferencias de carga de la hemicapa externa (Papahadjopoulos et al., 1991), energía libre elástica (Leikin et al., 1996) y cambios en la fluidez de membrana (Litzinger and Huang, 1992b). La variación de la composición lipídica puede afectar a uno o a todas estas propiedades descritas. Generalmente las investigaciones se han llevado a cabo con mezclas binarias (PC/PE; PC/PS, etc), y en menor grado se ha investigado con mezclas más complejas, y con

contenido creciente y controlado de alguno de los componentes. En uno de los estudios realizados con mezclas más complejas se ha demostrado una mayor eficiencia en el proceso de fusión para este tipo de vesículas. Interesante es que al parecer cada lípido tiene un rol específico en la fusión. Por ejemplo, Fosfatidil etanolamina favorece la fusión inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  y mediada por PEG (Yang et al., 1997), y colesterol tiene una fuerte influencia en los procesos fusogénicos de modelos de membrana (Haque et al., 2001).

Una hipótesis propuesta para el proceso de fusión de membrana implica la formación de un estado intermedio (Haque et al., 2001). La energía libre de este estado intermedio es altamente dependiente de la composición lipídica de la membrana opuesta. Esto es debido a que diferentes lípidos tienen distinta dinámica molecular. Por ejemplo está ampliamente documentado que fosfatidil etanolamina, tiene una forma cónica, entonces, la presencia de este lípido podría reducir el orden de empaquetamiento y promover la formación de este estado intermedio. Sin embargo también se ha reportado que un elevado contenido de este lípido genera una inestabilidad en la membrana que promueve más la ruptura que la fusión (Haque et al., 2001). Estos mismos autores han reportado que la presencia de este lípido en distintas mezclas aumenta la eficacia de la fusión sin alterar mayormente las propiedades fisicoquímicas de la hemicapa externa, indicando que estas propiedades son uno más de los distintos factores que afectan el proceso de fusión.

En este mismo sentido el colesterol parece tener también un rol importante. Se ha reportado, por ejemplo, que el colesterol es necesario para la fusión de vesículas unilamelares con *Mycobacterium capricolum* (Tarshis et al., 1993). Haque y colaboradores, indican que el colesterol desestabiliza las vesículas promoviendo más bien la ruptura que la fusión, especialmente en vesículas de fosfatidil colina/fosfatidil etanolamina y colesterol. Distinta es la situación en presencia de esfingomielina. Está ampliamente reportado que esfingomielina con colesterol forman complejos o dominios *rafts* en la membrana resistente a detergentes (Simons and Ikonen, 1997). Se sugiere que estos dominios son estables y con una estructura lamelar bien empaquetada. Haque y colaboradores indican que la estabilidad de estos dominios minimiza el efecto de

desestabilización que provoca el colesterol en las mezclas fosfatidil colina/fostatidil etanolamina, y maximiza el proceso de fusión (Haque et al., 2001).

En este escenario, y tomando en cuenta que las vesículas de mayor complejidad presentan una mayor eficiencia en la fusión, parece prudente postular que la presencia de dominios jugarían un rol importante en la fusión, por lo que un estudio sistemático con cantidades variables de uno o varios componentes lipídicos como el propuesto en el presente estudio podría realizar una aproximación acerca del posible efecto de la presencia de dominios en el proceso de fusión.

Otras investigaciones acerca de la fusión de vesículas están orientadas a la utilización de péptidos para favorecer el proceso fusogénico. Algunos ejemplos de estudios que han utilizado péptidos para la fusión son los trabajos de Fujii y colaboradores y Du y colaboradores (Fujii et al., 1992; Du et al., 2005; Du et al., 2007). En el trabajo de Fujii y colaboradores se estudió el efecto de el segmento C-terminal de la proteína gp41 del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y comparada con el efecto lítico y fusogénico del péptido de veneno de abeja, melitina. En este trabajo se presenta un elegante y simple modelo que describe la fusión mediada por éstos péptidos. De acuerdo a este modelo, las cargas y la parte hidrofóbica del péptido jugaría un rol primordial en el acercamiento y unión de las vesículas y facilitaría el proceso fusogénico. Sin embargo en este trabajo no fue estudiado la interfase lípido proteína y si estas proteínas se repartían preferencialmente en algún dominio en específico de la membrana.

Por otra parte Du y colaboradores (Du et al., 2007) estudian el proceso de fusión de vesículas (como vehículo de drogas) con células hepáticas, como terapia para la fibrosis hepática en ratas. En su trabajo ellos estudian el proceso fusogénico con PEG derivatizado con un péptido cíclico de Arg-Gly-Asp, para facilitar el proceso de fusión. Este péptido tiene una afinidad al receptor de colágeno tipo VI en este tipo de células. Ellos demostraron que las vesículas con este péptido tienen una eficiencia en la fusión 10 veces mayor que lo que obtienen con las vesículas sin el péptido. También muestran excelentes resultados *in vivo* con la aplicación de estas vesículas como tratamiento para esta patología en ratas. Debido a que no era motivo del estudio, ellos solamente

utilizaron una mezcla lipídica consistente en fosfatidilcolina colesterol, a una proporción de aproximadamente 50 mol %. Tomando como ejemplo este trabajo, y los antecedentes antes expuestos parece muy interesante formular un modelo, que permita construir unas vesículas *carrier* que tengan un óptimo proceso de fusión con la célula blanco.

Con estos antecedentes, en el presente proyecto se propuso realizar un estudio en forma integrada mediante la utilización de un conjunto de técnicas de espectroscopia de fluorescencia tanto en estado estacionario como los más poderosos métodos resueltos en el tiempo. Se utilizó sondas fluorescentes de membrana, tanto distribuidas en la bicapa como ubicadas en regiones específicas de ella, para medir la eficiencia del proceso de fusión.

Se realizó los siguientes tipos de medidas de fluorescencia: desplazamientos de espectros de fluorescencia inducidos por la relajación dipolar del medio, Tiempo de Vida y Anisotropía de fluorescencia de sondas de membrana y medidas de intensidad de fluorescencia de la formación de excímero de sondas derivadas de Pireno.

Con este enfoque sistemático se evaluó el orden de empaquetamiento molecular; la dinámica molecular en la región de interfase hidrofílica-hidrofóbica, y sus posibles efectos en la fusión de vesículas con composición variable de sus componentes.

## HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN

Variaciones discretas en el contenido de colesterol en vesículas sintéticas de fosfolípidos producen cambios en las propiedades físicas de la lamela, los cuales afectan el proceso de fusión vesícula-vesícula. Para lo cual el presente estudio pretende analizar el fenómeno de fusión, en modelos lipídicos ternarios con diferente contenido de colesterol.

## OBJETIVO GENERAL

En el presente proyecto se propone realizar un estudio de las variaciones en las propiedades de la lamela como el orden de empaquetamiento y la hidratación de la interfase hidrofílica-hidrofóbica, y su posible influencia en el proceso de fusión en modelos vesícula-vesícula.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar las propiedades fisicoquímicas de regiones específicas de la lamela de vesículas unilamelares de DPPC/DOPC/CHO con concentraciones crecientes de colesterol.
- Determinar la eficiencia de la fusión en los sistemas modelos antes descritos, a través de la formación de Excímeros en sondas derivadas de Pireno.

# CAPITULO I

## MARCO TEORICO.

### 1.- Asociación de Lípidos y Proteínas en membranas.

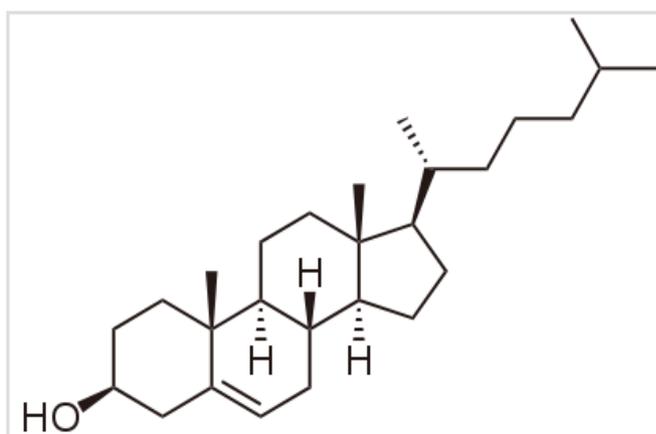
Toda célula tiene una membrana celular (también llamada membrana plasmática); además, las células eucarióticas tienen organelos delimitados por membranas, como el núcleo y las mitocondrias. La base molecular de la estructura de la membrana está en sus componentes lipídicos y proteínicos. En este ámbito la interacción de la bicapa lipídica y las proteínas de la membrana determinan la función de la membrana. Las membranas no sólo separan a las células del entorno exterior; también desempeñan papeles importantes en el transporte de sustancias específicas hacia el interior y el exterior de las células. Además, las membranas contienen varias enzimas importantes que dependen de este entorno para su función.

Los fosfolípidos son ejemplos destacados de moléculas anfipáticas y son los principales componentes lipídicos de las membranas. La existencia de bicapas lipídicas depende de interacciones hidrofóbicas. Dichas bicapas se usan a menudo como modelos de las membranas biológicas porque tienen muchas características en común, como un interior hidrofóbico y capacidad para controlar el transporte de moléculas pequeñas y iones, pero son más sencillas y más fáciles de manejar en el laboratorio. La diferencia más importante entre las bicapas lipídicas y las membranas celulares es que estas últimas contienen proteínas además de lípidos. El componente proteico de una membrana puede constituir del 20 al 80% de su peso total ([Campbell and Farrell 2009](#)).

## 1.1- Lípidos.

Los lípidos son compuestos comunes en la naturaleza. Se encuentran en sitios tan diversos como la yema de huevo y el sistema nervioso humano, y son un componente importante de las membranas vegetales, animales y microbianas. La definición de lípidos se basa en la solubilidad. Los lípidos son muy poco solubles (en el mejor de los casos) en agua y solubles en disolventes orgánicos como cloroformo o acetona. Las grasas y aceites son lípidos típicos en términos de solubilidad, pero eso no define realmente su naturaleza química. En términos de química, los lípidos son un grupo diverso de compuestos con algunas propiedades en común basadas en similitudes estructurales, sobre todo una preponderancia de grupos no polares

Si los clasificamos según su naturaleza química, los lípidos pertenecen a dos clases principales. Una, que consta de compuestos de cadenas abiertas con cabezas polares y largas colas no polares, incluye los ácidos grasos, triacilgliceroles, esfingolípidos, fosfolípidos y glucolípidos. La segunda clase importante consta de compuestos de anillo fusionado, los esteroides; un representante importante de este grupo es el colesterol (Fig. 1) (Campbell and Farrell 2009).

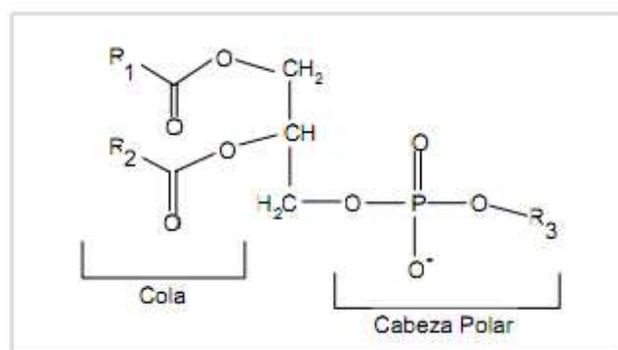


**Figura 1: Estructura química del Colesterol.**  
(Toro, C.A 2006)

La presencia de colesterol afecta las propiedades físicas de la bicapa y su ubicación en la membrana depende principalmente de las posibles interacciones con las distintas zonas de ella. Estudios y simulaciones moleculares postulan que el esqueleto hidrofóbico del colesterol se encuentra inserto en la región hidrocarbonada de la membrana, mientras que el grupo hidroxilo se ubica en la zona límite entre las cadenas y la región polar de la bicapa (Kesel et al., 2001).

Las características estructurales y funcionales de los liposomas se deben, fundamentalmente a las propiedades de las moléculas que los conforman, en este caso, los fosfolípidos. La topología general de un fosfolípido presenta dos regiones con características opuestas que le otorgan un carácter anfipático, responsable del comportamiento de estas especies en medio acuoso. La mayoría de los fosfolípidos presenta una geometría cilíndrica que induce la formación de estructuras del tipo bicapa (Carmona-Ribeiro. 2003).

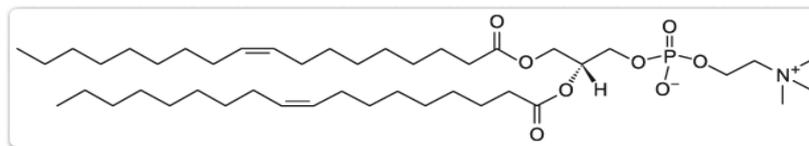
Las características químicas de los fosfolípidos son consecuencia de la estructura química de las cadenas hidrocarbonadas derivadas de ácidos grasos (R1 y R2) y del grupo fosfato sustituido (R3) unido covalentemente por un grupo glicerol (Fig.2). Las cadenas R1 y R2, en general, se caracterizan por su tamaño (número de unidades metilénicas) y el grado de insaturación (número, posición e isomería de los dobles enlaces). Cuando ambas cadenas son idénticas, se habla de fosfolípidos simétricos, y cuando son diferentes, asimétricos.



**Figura 2: Estructura general de un fosfolípido.**  
(Toro, C.A 2006).

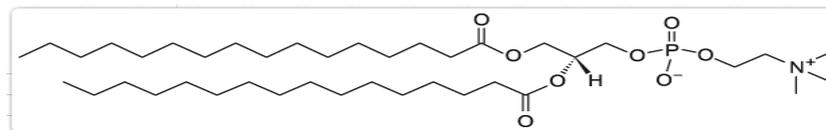
Considerando la densidad de carga negativa del grupo fosfato, será la naturaleza y carga del grupo sustituyente R3 la que definirá las propiedades de la cabeza polar del fosfolípido. En definitiva, las propiedades de la superficie del liposoma y, en consecuencia, el tipo de interacciones que se darán con el medio, quedarán definidas por las características de la cabeza del fosfolípido (Carmona-Ribeiro. 2003; Lian and Ho 2000).

En la presente tesis se utilizaron los lípidos DOPC: 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DPPC: 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine y Colesterol.



**Figura 3: Estructura química de DOPC.**

La imagen presenta los dobles enlaces en configuración cis. Los usados en este estudio tienen configuración trans. Imagen modificada de [www.avantilipids.com](http://www.avantilipids.com)



**Figura 4: Estructura química de DPPC.**

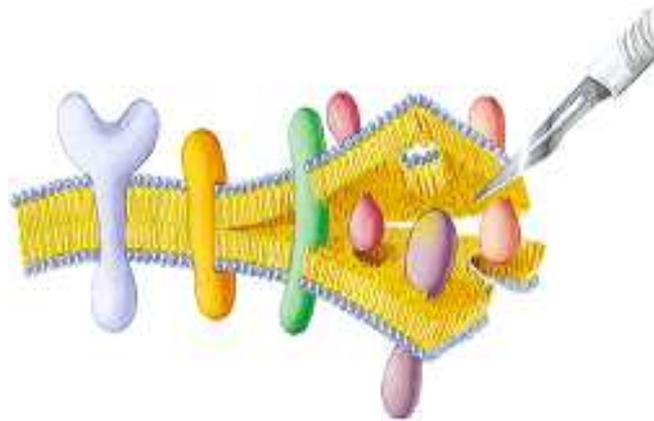
Imagen de [www.avantilipids.com](http://www.avantilipids.com)

De una amplia gama de lípidos que se utilizan en estudios con liposomas o membranas lipídicas se decidió trabajar con DOPC y DPPC representados en la figura 3 y 4 respectivamente, ya que, DOPC es un lípido que presenta una temperatura media

de transición de fase ( $T_m$ ) de  $-20^\circ\text{C}$ , y DPPC por otro lado presenta un valor de  $T_m$  de  $41^\circ\text{C}$ . Las mediciones realizadas en esta presente tesis fueron realizadas a temperatura fisiológica de  $37^\circ\text{C}$  la cual supera la  $T_m$  de DOPC pero está por debajo de la  $T_m$  de DPPC. En este sentido se consideró interesante analizar las variaciones en concentración de Colesterol en estos sistemas ternarios ya que se ha observado que el efecto de la presencia del colesterol no es lineal con su concentración, habiéndose detectado discontinuidades en algunas propiedades de la bicapa. Por ejemplo, bajas cantidades de colesterol incrementan la permeabilidad de la membrana y a concentraciones mayores puede llegar a suprimir la transición de fase o disminuir la permeabilidad por sobre  $T_m$ . (Lian and Ho 2000; Veatch and Keller 2002). También se ha establecido que el colesterol, es un importante componente en la estructura de la membrana, que fluidifica la fase Gel, y que tiene un efecto condensador de la fase Líquido-Cristalino de las bicapas lipídicas (Sankaram and Thompson 1990) es decir la fase Líquido-Cristalino se ordena mientras que la fase Gel se desordena debido a la presencia del colesterol (Parasassi et al., 1994b) Por otro lado a ciertas concentraciones, el colesterol es responsable de la formación de dominios o “rafts” en las membranas, pero cabe destacar que estos “rafts” no existen en el estado Gel (Brown and London 2000; Xu and London 2000). Sobre estos postulados y observaciones se proyectó analizar como la presencia de dominios afecta el fenómeno de fusión en sistemas vesícula-vesícula mediadas por pequeñas variaciones en el contenido de colesterol para lo cual DOPC y DPPC a la temperatura de  $37^\circ\text{C}$  son lípidos adecuados ya que DOPC a la temperatura fisiológica se encuentra en estado líquido cristalino y DPPC en estado Gel por lo que es atractivo realizar los ensayos y mediciones en un ambiente donde hay mezcla de estados de lípidos para poder ver la influencia del colesterol y por consiguiente el efecto de la presencia de dominios en los ensayos de fusión. La presencia de dominios en esta mezcla binaria y con colesterol ha sido bien descrita en la literatura. (Veatch and Keller 2003)

## 1.2- Proteínas.

Las proteínas de una membrana biológica pueden asociarse a la bicapa lipídica de dos maneras: como proteínas periféricas en la superficie de la membrana o como proteínas integrales dentro de la bicapa lipídica (Fig. 5). Las proteínas periféricas suelen estar unidas a los grupos cargados (cabezas) de la bicapa lipídica por interacciones polares, electrostáticas o de ambos tipos. Se les puede separar con tratamientos suaves, como elevar la fuerza iónica del medio. Las partículas cargadas que están presentes en cantidades relativamente altas en un medio de mayor fuerza iónica tienen más interacciones electrostáticas con los lípidos y las proteínas de modo que “abruma” las interacciones electrostáticas relativamente menos numerosas entre las proteínas y los lípidos (Campbell and Farrell 2009)



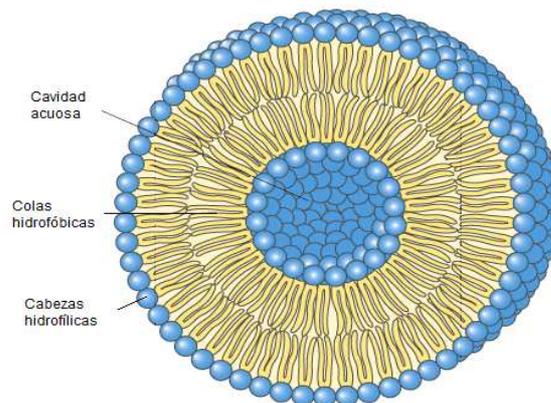
**Figura 5: Asociación de proteínas a la bicapa lipídica.**  
(Nelson and Cox. 2000)

Las proteínas de membrana tienen diversas funciones. Casi todas, aunque no todas, las funciones importantes de la membrana son las del componente proteínico. Las proteínas de transporte ayudan a pasar sustancias hacia el interior y el exterior de la célula, y las proteínas receptoras son importantes para la transferencia de señales extracelulares, como hormonas o neurotransmisores, hacia la célula. Además, algunas

enzimas están firmemente unidas a membranas. Como ejemplos se puede citar a muchas de las enzimas encargadas de reacciones de oxidación aeróbica, que se encuentran en partes específicas de las membranas mitocondricas, y otras, en la exterior. La distribución de proteínas de todo tipo entre las capas internas y externas de todas las membranas celulares es desigual, como lo es la de los lípidos (Nelson and Cox. 2009)

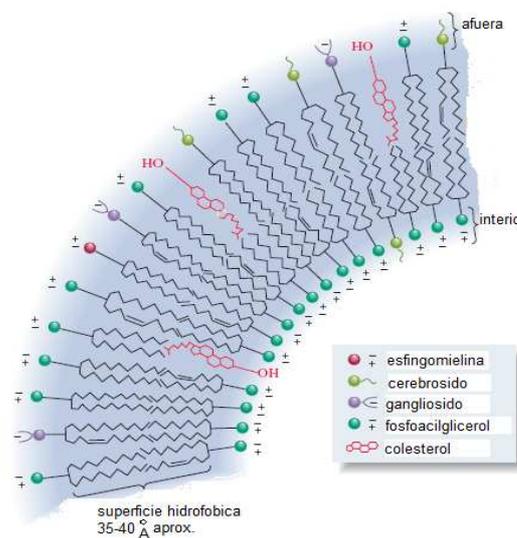
### 1.3- Bicapas lipídicas.

Las membranas biológicas contienen, además de fosfolípidos, glucolípidos como parte del componente lipídico. En los eucariontes también hay esteroides: colesterol en membranas animales y compuestos similares llamados fitoesteroides en las plantas. En la parte de bicapa lipídica de la membrana (Fig. 6), las cabezas polares están en contacto con el agua y las colas no polares están en el interior.



**Figura 6: Esquema de una parte de una bicapa formada por fosfolípidos.**  
La superficie polar de la bicapa contiene grupos cargados. Las colas se encuentran en el interior. Imagen modificada de Nelson and Cox. 2000.

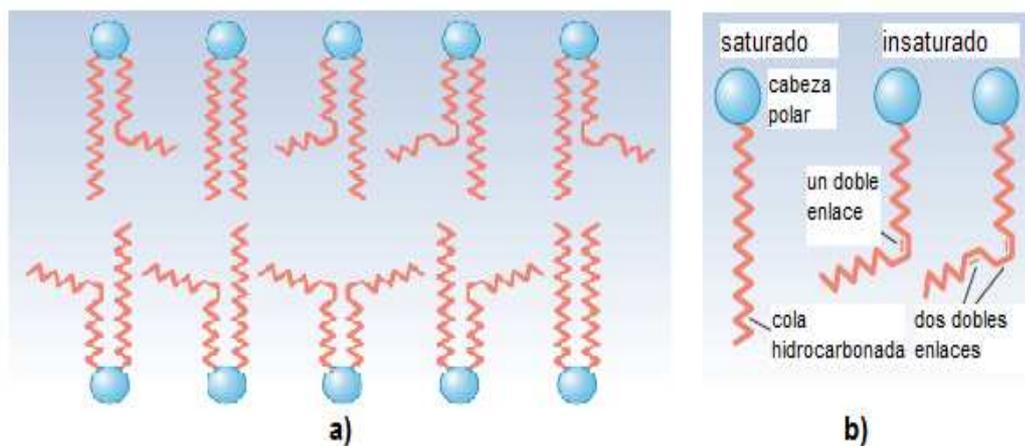
La bicapa se mantiene unida gracias a interacciones no covalentes, como fuerzas de van der Waals e interacciones hidrofóbicas. La superficie de la bicapa es polar y contiene grupos con carga. El interior no polar consta de las cadenas saturadas e insaturadas de los ácidos grasos y del sistema de anillos fusionados del colesterol. Tanto la capa interna como la externa de la bicapa contiene mezclas de lípidos, pero sus composiciones difieren y pueden servir para distinguir las dos capas (Fig. 7). La capa externa suele contener moléculas más voluminosas, mientras que la interna suele tener moléculas más pequeñas (Campbell and Farrell 2009).



**Figura 7: Composición y ubicación de moléculas en la membrana.**  
 Las composiciones de las capas externas e internas difieren, la concentración de moléculas voluminosas es mayor en la capa exterior que tiene más espacio.  
 Imagen modificada de Campbell and Farrell 2009.

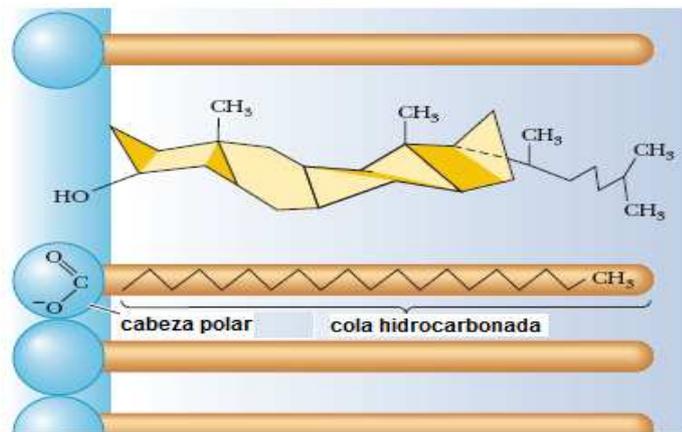
La organización del interior hidrocarbonado de la bicapa puede ser ordenado y rígido, o desordenado y fluido. La fluidez de la membrana depende de su composición. En los ácidos grasos saturados, la disposición lineal de las cadenas hidrocarbonadas permite que las moléculas de la bicapa queden estrechamente empaçadas, lo cual confiere rigidez. En los ácidos grasos insaturados, hay una flexión en la cadena hidrocarbonada (Fig. 8b) que introduce desorden en el empaçado de las cadenas. Así,

la capa tiene una estructura más abierta que no se presenta con las cadenas saturadas rectas (Fig. 8a). A su vez, la estructura desordenada debida a la presencia de ácidos grasos insaturados con dobles enlaces cis y por tanto flexiones en sus cadenas hidrocarbonadas hace que la bicapa tenga mayor fluidez. Los componentes lipídicos de una bicapa siempre están en movimiento, en mayor grado en las bicapas más fluidas y en menor grado en las más rígidas (Campbell and Farrell 2009).



**Figura 8: Esquema de una porción de una bicapa de fosfolípidos altamente fluida.**  
 (a) Las torceduras en las cadenas laterales insaturadas previenen el empaquetamiento de las porciones hidrocarbonadas de los fosfolípidos. (b) Efecto de los dobles enlaces en la conformación de las colas hidrocarbonadas de los ácidos grasos. Los ácidos grasos insaturados tienen torceduras en sus colas. *Imagen modificada de Campbell and Farrell 2009*

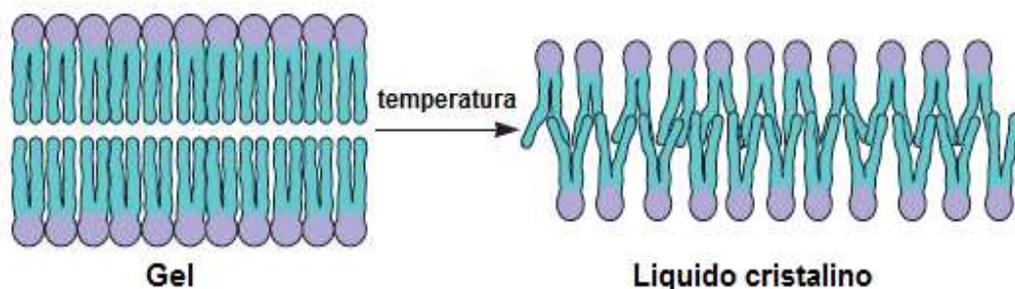
La presencia de colesterol también podría aumentar el orden y la rigidez. La estructura de anillos fusionados del colesterol en sí es muy rígida, por lo que la presencia de colesterol estabiliza el acomodo extendido de cadenas rectas de los ácidos grasos saturados mediante interacciones de Van der Waals (Fig. 9).



**Figura 9: Rigidez de la bicapa lipídica por el colesterol.**

La presencia de colesterol en la membrana reduce la fluidez con la estabilización de las conformaciones de la cadena extendida de las colas hidrocarbonadas de los ácidos grasos, como resultado de las interacciones de van der Waals. *Imagen modificada de Campbell and Farrell 2009*

Con el calor, las bicapas ordenadas se vuelven menos ordenadas, y las que son relativamente menos desordenadas se desordenan aún más. Esta transición cooperativa se da a una temperatura característica, como la fusión de un cristal, que también es una transición cooperativa (Fig. 10). La temperatura de transición es más alta para las membranas más rígidas y ordenadas que para las membranas relativamente fluidas y desordenadas (Campbell and Farrell 2009).

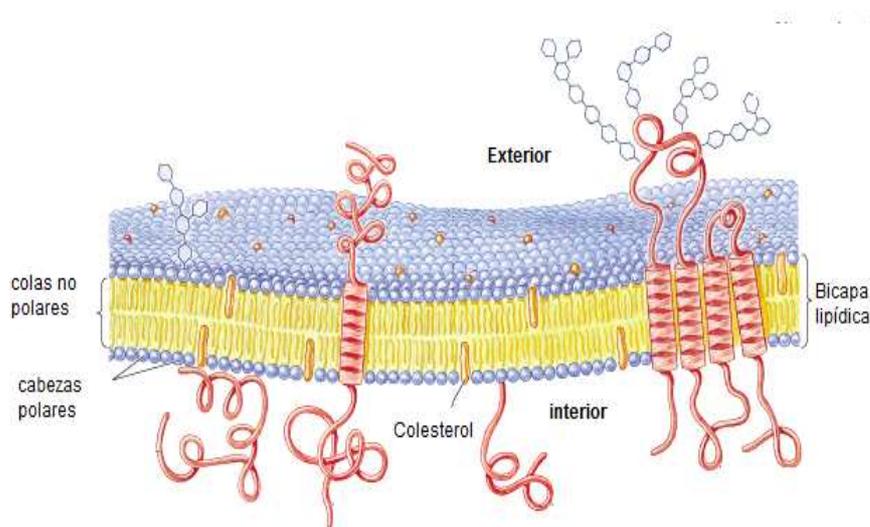


**Figura 10: Transición de fase de los lípidos.**

Un ejemplo de la transición de fase gel a líquido cristalino, que se produce cuando una membrana se calienta a través de la temperatura de transición  $T_m$ . La superficie debe aumentar y el espesor debe disminuir a medida que la membrana pasa por una fase de transición. La movilidad de las cadenas de lípidos se incrementa dramáticamente. *Imagen modificada de Campbell and Farrell 2009*

## 1.4- Modelo Mosaico Fluido.

Se sabe que las membranas biológicas tienen componentes tanto lipídicos como proteicos. En la actualidad, el modelo de mosaico fluido es la descripción más ampliamente aceptada de las membranas biológicas. El término “mosaico” implica que los dos componentes existen unos juntos a otros sin formar alguna otra sustancia de naturaleza intermedia. La estructura básica de las membranas biológicas es la de la bicapa lipídica, con las proteínas incrustadas o embebidas en la bicapa (Fig. 11). Estas proteínas suelen tener una orientación específica en la membrana. El término “mosaico fluido” implica que en las membranas se da el mismo tipo de movimiento lateral que se da en la bicapas lipídicas. Las proteínas “flotan” en la bicapa lipídica y se pueden mover a lo largo del plano de la membrana (Campbell and Farrell 2009)



**Figura 11: Mosaico fluido.**

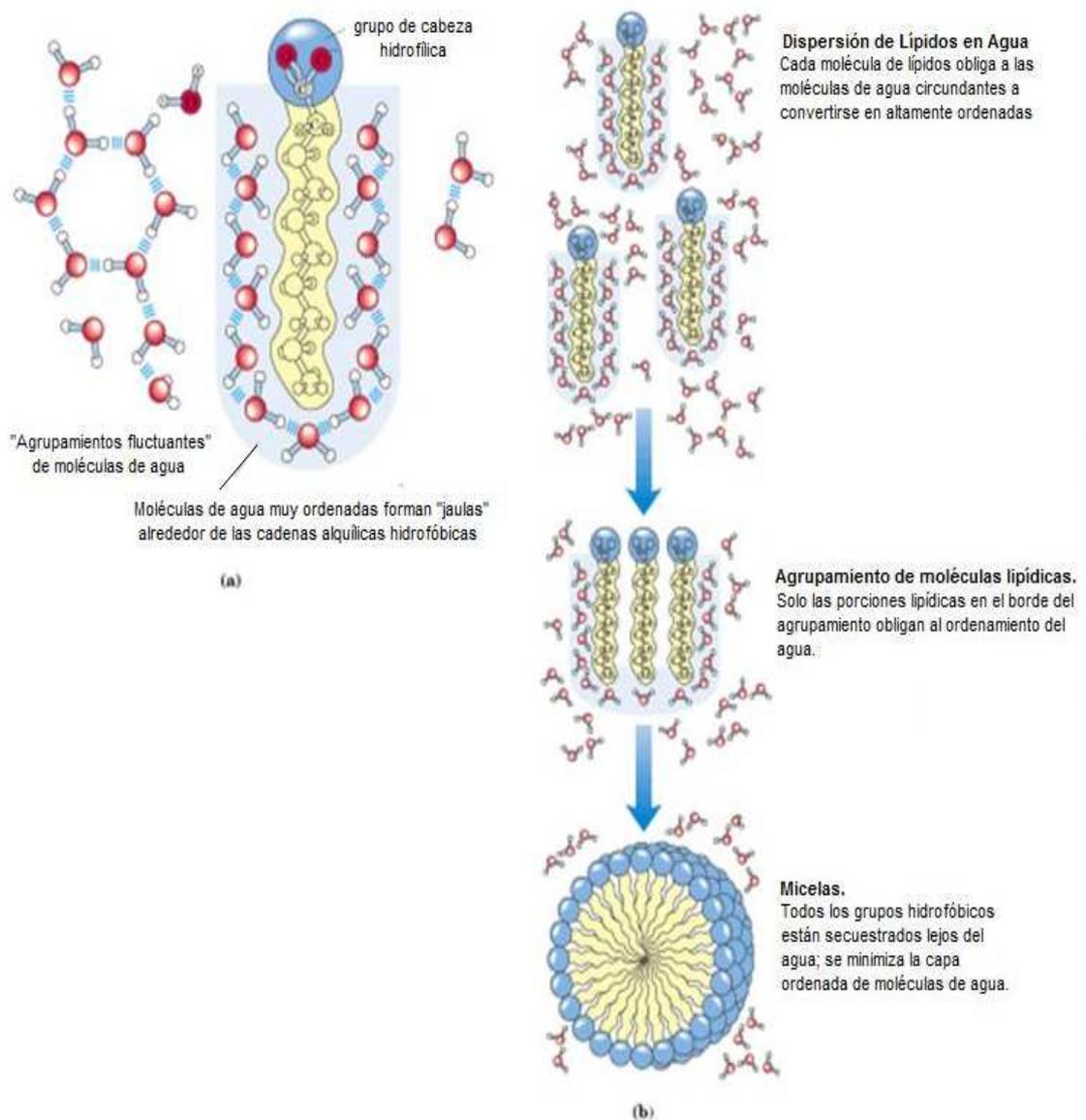
*Modelos de la estructura de la membrana, las proteínas pueden verse embebidas en la bicapa lipídica. Imagen modificada de Nelson and Cox 2000.*

## 2.- Liposomas y Vesículas.

Dado lo que impulsa la formación de la bicapas lipídicas es la exclusión de agua de la región hidrofóbica de los lípidos, y no algún proceso enzimático, es posible crear membranas artificiales en el laboratorio. Los liposomas son estructuras estables basadas en una bicapa lipídica que forman una vesícula esférica. Es posible preparar este tipo de vesículas con agentes terapéuticos en su interior y luego utilizarlas para hacer llegar el agente a un tejido meta ([Campbell and Farrell 2009](#)).

### 2.1- Organización Lipídica en la formación de membranas.

Los fosfolípidos, esfingolípidos y esteroides son prácticamente insolubles en agua. Cuando se mezclan con agua, forman espontáneamente agregados lipídicos microscópicos agrupándose con sus partes hidrofóbicas en contacto mientras que sus grupos hidrofílicos interactúan con el agua que los envuelve. Los agregados lipídicos disminuyen la superficie hidrofóbica expuesta al agua y así minimizan el número de moléculas en la capa de agua ordenada en la interfase lípido-agua. (Fig. 12a), dando lugar así a un incremento de energía de entropía. Las interacciones hidrofóbicas entre las moléculas de lípidos proporcionan la fuerza termodinámica que impulsa la formación y el mantenimiento de estos agregados. En función de las condiciones precisas y de la naturaleza de los lípidos, se forman tres tipos de agregados lipídicos cuando los lípidos anfipáticos se mezclan con agua (Fig. 12b) ([Nelson and Cox. 2009](#)).



**Figura 12: Lípidos anfipáticos en disolución acuosa.**

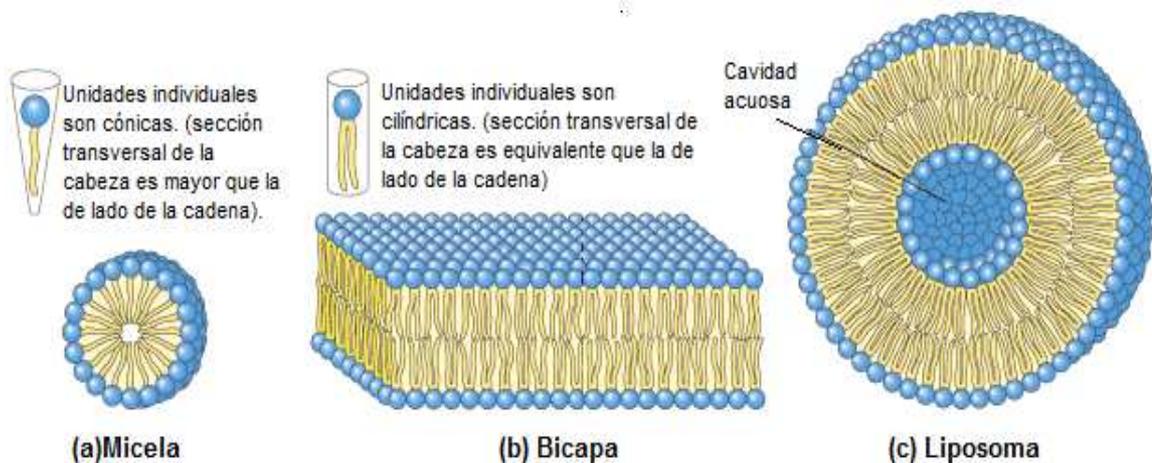
(a) Las cadenas largas de los ácidos grasos son muy hidrofóbicas, cada una de las cuales está rodeada por una capa de moléculas de agua altamente ordenada. (b) Agrupándose en micelas, las moléculas de ácidos grasos exponen al agua la mínima superficie hidrofóbica posible y se necesitan menos moléculas de agua en la capa de agua ordenada. La micela se estabiliza gracias a la energía perdida en la liberación de moléculas de agua inmovilizadas. (Nelson and Cox. 2000).

## 2.2- Formación de agregados Liposómicos.

Las micelas (Fig. 13a) son estructuras esféricas que contienen entre unas pocas docenas y algunos miles de moléculas anfipáticas ordenadas con sus regiones hidrofóbicas hacia el interior, de donde queda excluida el agua, y sus grupos de cabezas hidrofílicas en la superficie, en contacto con el agua

Un segundo tipo de agregado lipídico en agua es la bicapa lipídica, en la cual dos monocapas de lípidos forman una hoja bidimensional. Las porciones hidrofóbicas en cada monocapa están excluidas del agua e interaccionan entre sí. Los grupos de cabezas hidrofílicas interaccionan con el agua en cada superficie de la bicapa. Dado que las regiones hidrofóbicas en sus extremos (Fig. 13b) están en contacto con el agua, la hoja bidimensional bicapa es relativamente inestable y espontáneamente se repliega sobre sí misma formando una esfera hueca llamada Vesícula o Liposoma (Fig. 13c). La superficie continua de las vesículas elimina las regiones hidrofóbicas expuestas permitiendo que las bicapas alcancen máxima estabilidad dentro del entorno acuoso

La formación de vesículas también crea un ambiente acuoso separado. Es probable que los precursores de las primeras células se asemejaran a vesículas lipídicas, en lo que su contenido acuoso se mantendría separado del exterior gracias a una capa hidrofóbica (Nelson and Cox 2009).



**Figura 13: Modelos de membranas o agregados de lípidos que se forman en agua.**  
 (a) En las micelas, las cadenas hidrofóbicas de los ácidos grasos se hallan secuestrados en el núcleo de la esfera. No hay prácticamente agua en el interior hidrofóbico. (b) En una bicapa abierta, todas las cadenas laterales están protegidas de la interacción con el agua. (c) Cuando una bicapa bidimensional se pliega sobre sí misma, forma una bicapa cerrada, una vesícula hueca tridimensional (Liposoma) que encierra una cavidad acuosa. *Imagen modificada (Nelson and Cox. 2000).*

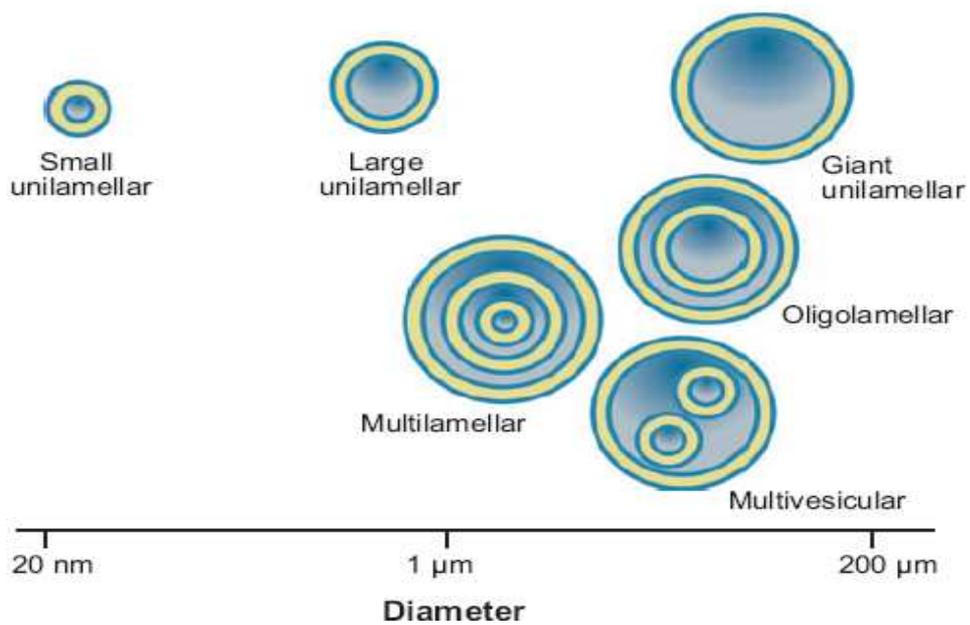
### 2.3- Tipos de liposomas y vesículas.

Los liposomas son, desde una perspectiva morfológica, más frecuentemente clasificados por su tamaño y número de bicapas membranales (lamelas) (Fig. 14).

Vesículas unilamelares son de especial interés en investigación, mayormente gracias a su buena caracterización de propiedades de membrana y fácil preparación. Ellas son divididas en tres tipos de tamaño: pequeñas (small), grandes (large) y gigantes (giant) (Jesorka and Orwar 2008). Existen también vesículas multilamelares o MLVs, a partir de las cuales es posible obtener a través del proceso de extrusión, vesículas unilamelares con una estrecha distribución de tamaños alrededor de un valor definido (Friskin et al., 2000).

Procesos controlados en la formación de vesículas oligolamelares (oligolamellar vesicles) es poco común, sin embargo un ejemplo de una transformación de una

vesícula lamelar a bilamelar a sido reportado. Se ha observado que las propiedades físicas y comportamiento entre vesículas multilamelares y vesículas unilamelares es muy diferente. Ambas son comunmente usadas en aplicaciones industriales como es el transporte de drogas (Jesorka and Orwar 2008).



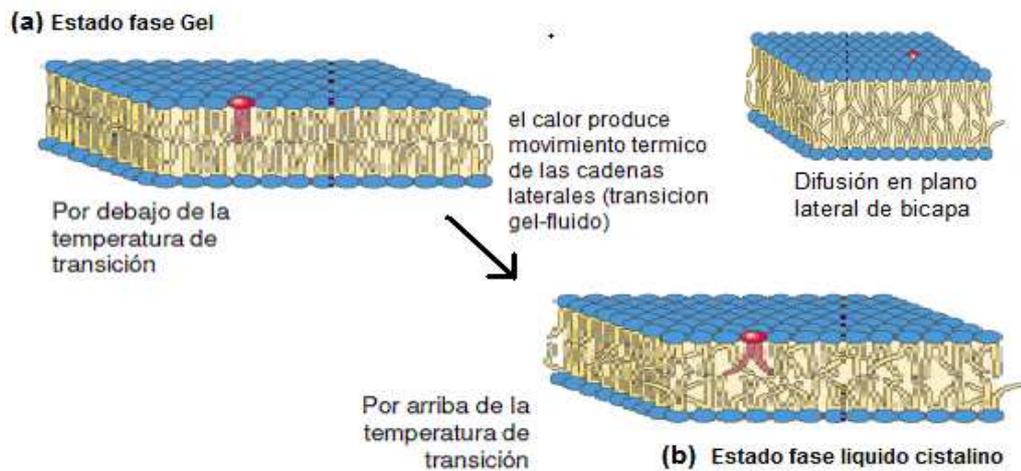
**Figura 14: Representación esquemática de clasificación para liposomas.** Small unilamellar vesicles ( $\sim 0.02 \mu\text{m}$  a  $\sim 0.2 \mu\text{m}$ ) SUV's, large unilamellar vesicles ( $\sim 0.2 \mu\text{m}$  a  $\sim 1 \mu\text{m}$ ) LUV's, y giant unilamellar vesicles ( $> 1 \mu\text{m}$ ) GUV's son los tres grupos más importantes para aplicaciones analíticas y son frecuentemente usadas en farmacéutica transporte de drogas y aplicaciones cosmetológicas. (Jesorka and Orwar 2008).

## 2.4- Propiedades Físico Químicas y estructurales de las membranas biológicas.

Una característica notable de todas las membranas biológicas es su flexibilidad, es decir su capacidad de cambiar de forma sin perder su integridad ni dejar salir sus contenidos. La base de esta propiedad se encuentra en las interacciones no covalentes entre lípidos de la bicapa y los movimientos permitidos a los lípidos individuales, ya que no están unidos entre sí de forma covalente.

Aunque la estructura de la bicapa lipídica es bastante estable, las moléculas individuales de fosfolípidos y esteroides tienen una gran libertad de movimiento. La estructura y flexibilidad de la bicapa lipídica depende de los tipos de lípidos presentes y varía con la temperatura. Por debajo de las temperaturas fisiológicas normales los lípidos de la bicapa forman una fase Gel en la que están constreñidos fuertemente todos los tipos de movimiento de las moléculas individuales de lípido (Fig. 15). Por encima de las temperaturas fisiológicas las cadenas hidrocarbonadas individuales de los ácidos grasos están en movimiento constante. En este estado Líquido Cristalino, el interior de la bicapa es más fluido que sólido y la bicapa es como un mar de lípidos en movimiento constante.

A temperaturas intermedias (fisiológica), los lípidos se encuentran en un estado Líquido Ordenado (Lo); hay menos acción de movimiento térmico de las cadenas acilo de la bicapa lipídica pero aun tiene lugar el movimiento lateral en el plano. Estas diferencias en el estado de la bicapa se observan fácilmente en los liposomas compuestos por un único lípido, pero las membranas biológicas contienen muchos lípidos con una gran variedad de cadenas acilo grasas por lo que no muestra cambios de fase abruptos con la temperatura.

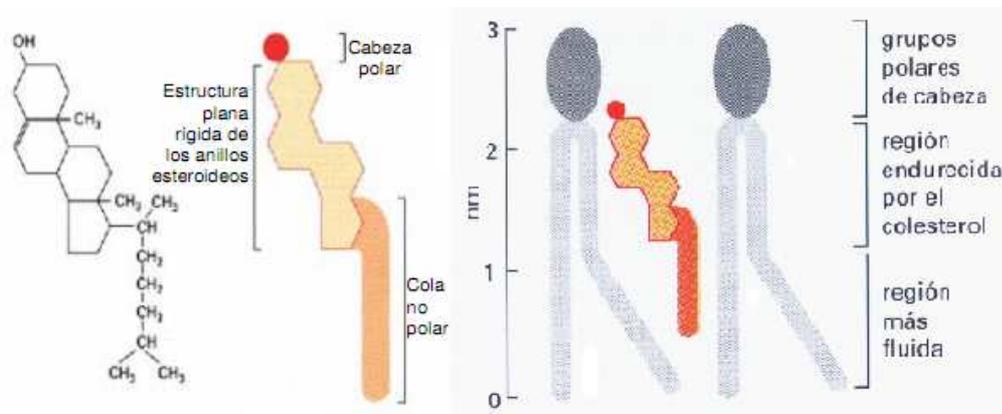


**Figura 15: Dos estados extremos de los lípidos de la bicapa.**

(a) En el estado fase gel, los grupos de cabeza polar están ordenados uniformemente en la superficie y las cadenas acilo están casi quietas y empaquetadas con una geometría regular, (b) en el estado líquido cristalino, las cadenas acilo experimentan mucha moción térmica y no tienen una organización regular. Intermedio entre estos dos extremos se encuentra el estado líquido ordenado, en el que las moléculas de fosfolípidos individuales pueden difundir lateralmente pero los grupos acilos permanecen extendidos y más o menos ordenados que puede ser causante también por el Colesterol. Imagen modificada de Nelson and Cox 2000.

El contenido en esteroides de una membrana (que varía mucho con el organismo y el orgánulo) es otro determinante del estado lipídico (Nelson and Cox 2009).

El colesterol (Fig. 16) es un componente importante en la organización de la bicapa y es uno de los mayores modificadores de la estructura y dinámica de la membrana biológica (Parasassi et al., 1994a).



**Figura 16: Moléculas de colesterol y su interacción con fosfolípidos de membrana.**  
(Contreras, B.C. 2010)

La distribución del colesterol en la membrana depende principalmente de las posibles interacciones con las distintas zonas de ellas. Su único grupo OH se orienta hacia las cabezas polares de los lípidos, y sus anillos esteroideos (planos rígidos) interactúan, y en parte, inmovilizan al primer fragmento de las colas hidrofóbicas (Fig.16). De esta manera el colesterol hace que las partes más cercanas a las cabezas polares estén más rígidas. También el colesterol impide que las cadenas hidrocarbonadas se junten y cristalicen (Matthew and Levy 1999)

Su presencia afecta principalmente el orden y la estructuración de las cadenas hidrocarbonadas, generando una fase líquido ordenada donde las cadenas se encuentran relativamente rígidas, similar al estado gel, pero permitiendo una importante difusión en el plano de la membrana, como sucede en la fase Líquido-Cristalino (Fig. 15) (Ulrich A.S. 2002). Se ha observado que el efecto de la presencia del colesterol no es lineal con su concentración, habiéndose detectado discontinuidades en algunas propiedades de la bicapa. Por ejemplo, bajas cantidades de colesterol incrementan la permeabilidad de la membrana y a concentraciones mayores puede llegar a suprimir la transición de fase o disminuir la permeabilidad por sobre  $T_m$ . (Lian and Ho 2000; Veatch and Keller 2002).

De esta forma, las membranas celulares así como las bicapas lipídicas pueden presentar dominios separados, más conocidos como “*rafts*”, los cuales son considerados como pequeños microdominios, los cuales se encuentran enriquecidos en colesterol, esfingolípidos y ciertos lípidos saturados anclados a estas. Se ha sugerido que estos “*rafts*”, desempeñan un papel importante en la selección de moléculas de membranas y en la transducción de señales en las células animales. El colesterol cumple un rol importante en la formación de estos “*rafts*”, ya que estos se encuentran generalmente enriquecidos de colesterol y además la perturbación del colesterol asociado a membranas celulares puede inducir cambios importantes en la distribución y/o función de los componentes de los “*rafts*” (Silvius J. R. 2003).

A ciertas concentraciones, el colesterol es responsable de la formación de “*rafts*” en las membranas, pero cabe destacar que estos “*rafts*” no existen en el estado Gel. Además se sugiere que el estado Gel no puede coexistir con el estado Líquido Cristalino a ciertas concentraciones de colesterol. La separación de distintos tipos de estado de fase puede ocurrir en mezclas ternarias de fosfolípidos incluido el colesterol. En estas mezclas, el estado de fase Líquido Ordenado (Lo) las cadenas acílicas de los lípidos están extendidas y estrechamente apretadas, como en la fase Gel, pero tienen un alto grado de movilidad lateral. El colesterol puede promover la separación de dominios en donde coexisten estado Líquido Cristalino y líquido ordenado (Brown and London 2000; Xu and London 2000).

Sin embargo, el colesterol por sí mismo, no forma fases en la bicapa lipídica (Meer et al., 2008), pero se ha establecido que el colesterol, es un importante componente en la estructura de la membrana, que fluidifica las fase Gel, y que tiene un efecto condensador de la fase Líquido-Cristalino de las bicapas lipídicas, (Sankaram and Thompson 1990) es decir, la fase Líquido Cristalino se ordena mientras que la fase Gel se desordena debido a la presencia del colesterol (Parasassi et al., 1994b)

## 2.5- Procesos fusogénicos de membranas lipídicas.

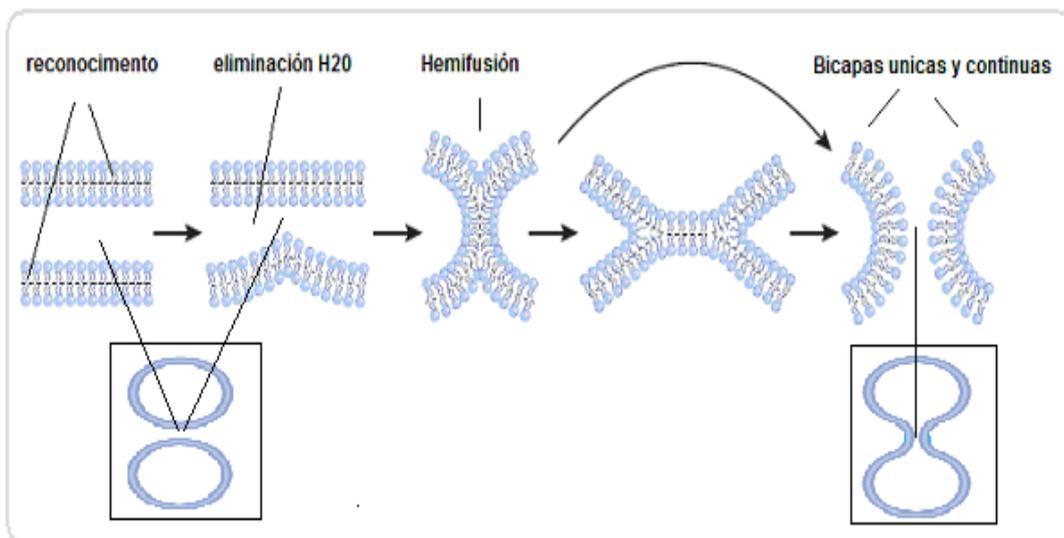
Las membranas biológicas han sido definidas como el límite externo de las células, que además regulan otras funciones tales como el tráfico molecular a través de éstas. En células eucarióticas, organizan secuencias complejas de reacciones y son de suma importancia por la conservación de la energía biológica y para la comunicación intracelular ([Horton et al., 2008](#); [Nelson and Cox. 2009](#))

Las membranas biológicas son flexibles, tienen una gran capacidad para cambiar su forma estructural la cual acompaña al crecimiento celular y su movimiento. También tienen la cualidad de romperse y sellarse lo que permite que se fusionen, tal como sucede en la exocitosis, o que dentro de una membrana se experimente una fisión. Dando lugar a la formación de dos compartimientos sellados tal como ocurre en la endocitosis o en la división celular. Además son impermeables a la mayoría de los solutos polares, sin embargo retienen a ciertos iones y compuestos dentro de las células y dentro de compartimientos celulares específicos al tener selectividad por ellos, al mismo tiempo que excluyen a otros ([Nelson and Cox 2009](#)).

Los cambios de curvatura son cruciales en una de las propiedades más notables de las membranas lipídicas: su capacidad para fusionarse con otras membranas sin perder su continuidad. Aunque las membranas son estables eso no quiere decir que sean estáticas.

En la exocitosis, endocitosis, división celular, fusión del ovocito y espermio, la entrada de un virus con envoltura membranosa dentro de la célula huésped y procesos de fusión célula-célula tiene lugar la reorganización de la membrana en la que la operación fundamental es la fusión de los segmentos membranosos sin pérdida de continuidad. La mayoría de estos procesos comienza con un incremento local de la curvatura de la membrana ([Nelson and Cox 2009](#); [Lentz et al., 1987](#); [Haque et al., 2001](#)).

La fusión específica de dos membranas requiere que (1) se reconozcan entre sí; (2) sus superficies estén muy cerca, lo que requiere la eliminación de las moléculas de agua normalmente asociadas con los grupos de cabezas polares de los lípidos; (3) sus estructura en bicapas se rompan localmente dando lugar a la fusión de la hoja externa de cada membrana (hemifusión), y (4) sus bicapas se fusionen formando una bicapa única continua (Fig. 17) (Nelson and Cox 2009).



**Figura 17: Pasos del proceso de Fusión.**  
*Imagen modificada de Chernomordik and Kozlov 2008.*

## 2.6- Usos y aplicaciones de Liposomas.

Los liposomas están siendo aplicadas con éxito en muchas áreas de la química, la medicina y la biotecnología, a menudo en lotes más grandes, como en la administración de fármacos o la aplicación transdérmica de drogas en los niveles de de baja toxicidad. Aplicaciones analíticas de los liposomas son predominantes en las áreas de la cromatografía Liposoma-afinidad, sensores, e inmunoensayos, que en gran medida se benefician de la mejora de la señal debido a la capacidad de los liposomas para mantener relativamente grandes cantidades de compuestos de marcadores en su interior ([Jesorka and Orwar 2008](#)).

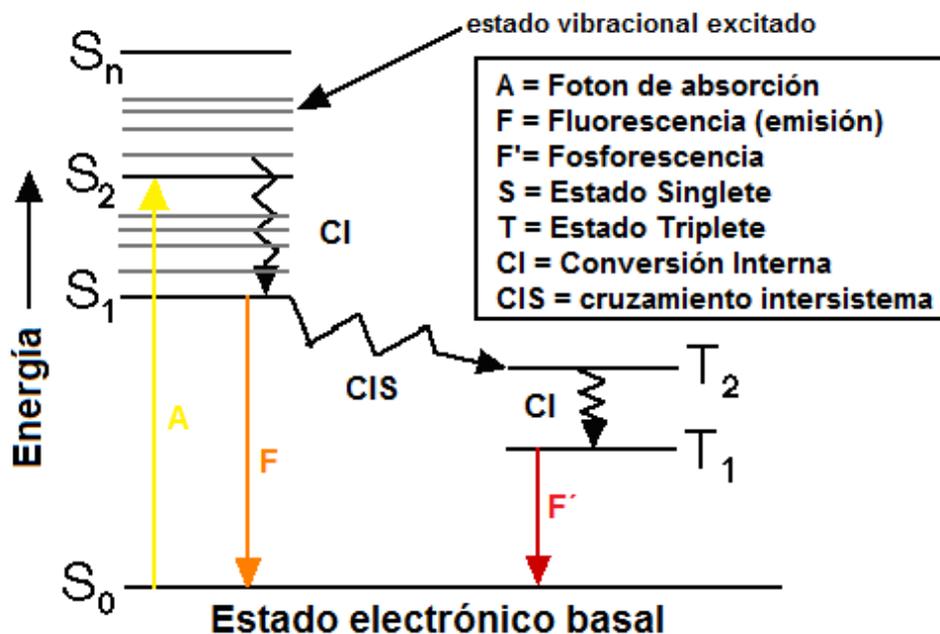
Sistemas liposomales se establecen como vehículos eficaces para incorporar principios activos en las estructuras compartimentadas, como las células vivas y los alimentos. Esta área tecnológica tiene una variedad de métodos analíticos para el control de calidad asociados para supervisar sus características y determinar sus componentes activos e ingredientes. Sin embargo, los procedimientos analíticos comúnmente miden solo la concentración total del fármaco y no distinguen entre el material libre y encapsulado. Las vesículas geles de fosfolípidos son, en alguna área, un recurso potencial para el problema, ya que la cantidad de material no interiorizado en el gel es excepcionalmente bajo ([Jesorka and Orwar 2008](#); [Lanio et al., 2009](#)).

### 3.- Espectroscopía de Fluorescencia.

La espectroscopía de fluorescencia es una herramienta ampliamente utilizada en biofísica. Esta técnica involucra el uso de moléculas capaces de emitir luz, conocidas como sondas fluorescentes. Para el estudio de membranas las sondas fluorescentes han sido diseñadas de manera tal, que su comportamiento se vea fuertemente influenciado por el ambiente en el que se encuentran ubicadas. La interacción de la sonda con su entorno depende fundamentalmente de su estructura, lo que permite que cada molécula se localice en lugares específicos de la membrana. Las medidas espectroscópicas son en general simples y directas, pero la interpretación correcta de la información obtenida requiere un conocimiento detallado de las propiedades fotofísicas de la sonda.

Las moléculas al interactuar con la luz, absorben energía alcanzando un estado electrónicamente excitado, descritos por  $S_0$ ,  $S_1$ ,  $S_2$ , etc., en el diagrama de Jablonsky (Fig. 18). En cada uno de estos estados la molécula puede existir en los niveles de energía vibracionales descritos por 0, 1, 2, etc.

El fenómeno de absorción de luz es un proceso instantáneo que ocurre de acuerdo al principio de Franck-Condon. Seguida a la absorción de la luz, ocurren eventos de pérdida de energía por procesos radiativos o no radiativos, por lo que la molécula vuelve a su estado basal  $S_0$ . Dentro de los eventos no radiativos están: la conversión interna, y el cruce entre sistemas, donde las moléculas en el estado  $S_1$  pueden experimentar una conversión al primer estado triplete  $T_1$ . Dentro de los radiativos están la fluorescencia, y la fosforescencia, con diferentes velocidades de decaimiento.



**Figura 18: Diagrama de Jablonsky.**

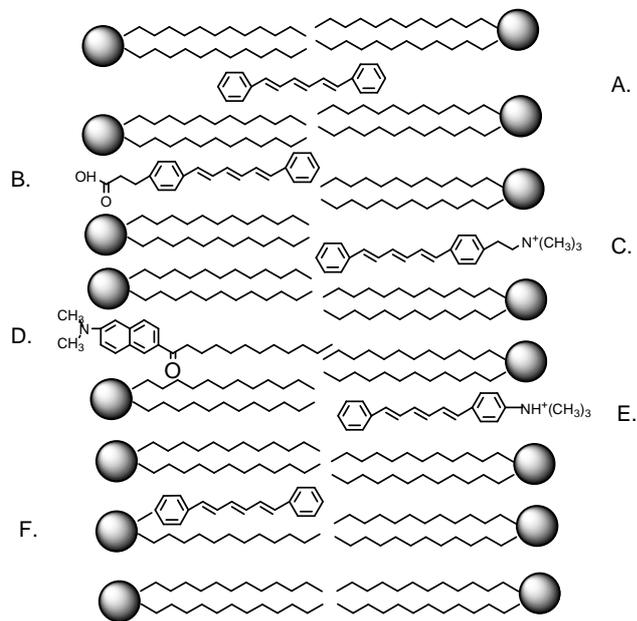
Describe los procesos de absorción de luz, y la pérdida de esta energía por procesos no radiativos (flechas segmentadas) y radiativos (flechas continuas).

Una de las características de la emisión de fluorescencia es que muestra un corrimiento a longitudes de onda mayores (de menor energía), respecto a la absorción, conocido como corrimiento de Stokes. Al excitar una molécula a estados vibracionales y electrónicos de alta energía el exceso de energía es rápidamente disipada, y la molécula decae al estado vibracional de menor energía en el estado excitado  $S_1$ . Debido a la rapidez de este proceso, el espectro de emisión es independiente de la longitud de onda de excitación. Ya que solamente desde el estado vibracional de menor energía ( $S_1$ ) la fluorescencia compite con la conversión interna.

### 3.1- Determinación de propiedades físicas de la membrana.

En la investigación de membranas biológicas y bicapas artificiales en las últimas décadas se han utilizado una serie de métodos espectroscópicos tales como resonancia magnética nuclear, resonancia de spin electrónico, espectroscopia raman y espectroscopia infrarroja. La espectroscopia de fluorescencia, ha sido una de la más extensamente ocupada, en particular con la utilización de sondas de fluorescencia que se sitúan preferentemente en la fase lipídica y otras que se unen covalentemente a proteínas. La utilización de técnicas resueltas en el tiempo permite cuantificar eventos que ocurren en escalas de tiempos de pico segundos a cientos de nano segundos, de acuerdo al tiempo de vida de la sonda. La utilización de láseres como fuente de iluminación permite por otra parte, al eliminar la luz dispersada parásita, medir en suspensiones de membranas o vesículas a concentraciones más altas que utilizando lámparas. Una de las limitaciones del uso de sondas extrínsecas, es la perturbación que puede causar su incorporación. Dado que la fracción molar de sonda utilizada es extremadamente baja se asume que este efecto es leve. Las técnicas de espectroscopia de fluorescencia han sido utilizadas para estudiar las características dinámicas y estructurales de la membrana, particularmente, por su alta sensibilidad, por la estrecha ventana de tiempo de observación, la respuesta de los parámetros de fluorescencia a las propiedades físicas del medio que lo rodea y la posibilidad de resolver propiedades espectroscópicas originadas de muestras heterogéneas.

A través de las características de la fluorescencia se pueden obtener distintos parámetros como: máximos de emisión, anisotropía de la fluorescencia, tiempos de vida de fluorescencia, apagamientos de la fluorescencia, formación de Excímeros, y transferencia de energía resonante, que se pueden relacionar con propiedades estructurales y dinámicas del entorno. La utilización de la técnica de espectroscopia de fluorescencia requiere de la incorporación de sondas extrínsecas en la bicapa lipídica, cuyos parámetros de fluorescencia son sensibles a las propiedades físicas del medio que la rodean. Estas moléculas fluorescentes pueden distribuirse en la matriz lipídica ubicándose a distintas profundidades o a una profundidad específica de la bicapa (Fig.19) (Lakowicz, J.R. 2006).



**Figura 19: Estructura y disposición de distintas sondas en la bicapa.**  
 A. DPH, B. DPH Propiónico, C. TMAP-DPH, D. Laurdan, E. TMA-DPH, y F. DPH-PC.  
 (Aguilar, L.F. 1999)

## 3.2- Tiempo de Vida de Fluorescencia Resuelta en el Tiempo.

### 3.2.1- Tiempo de Vida de Fluorescencia.

El decaimiento temporal de la fluorescencia de un fluoróforo se caracteriza por un tiempo de vida que corresponde al inverso de la constante cinética del proceso de decaimiento. Así, el tiempo de vida de fluorescencia de una sustancia corresponde al tiempo que demora la intensidad de fluorescencia en decaer a  $1/e$  de su valor inicial. La velocidad de este proceso de decaimiento de la fluorescencia puede ser afectada por las características del medio, por lo tanto su estudio puede proporcionar información acerca del entorno del fluoróforo.

Existen básicamente dos métodos para medir tiempos de vida de fluorescencia, estos son el método de pulso, que se relaciona con medidas realizadas en el dominio del tiempo, y el método de fase y modulación, relacionadas con el dominio de la frecuencia. En el presente trabajo se utilizó la fluorimetría de desplazamiento de fase y modulación que se describe a continuación. (Garda et al., 1997; Sotomayor et al., 2000; Zorrilla López S. 2002; Lakowicz, J.R. 2006.; Almeida et al., 2009)

### 3.2.2- Método de Desplazamiento de Fase y Modulación.

El tiempo de vida fluorescente está definido como el tiempo promedio en que una molécula se mantiene en estado de excitación antes de regresar a su estado basal. Los tiempos de vida fluorescentes se pueden medir en dos formas: Mediciones frecuencia-dominio o fase de modulación donde la modulación de la fuente de excitación causa un cambio de fase medible en la fluorescencia y reducción en su amplitud. Los tiempos de vida fluorescente tienen la ventaja de que ellos no son afectados por la concentración de fluoróforos, fluctuaciones de intensidad en excitación, absorción por la muestra, unión molecular, y FRET habilitando estudios en ambientes moleculares locales.

En este método la muestra es excitada con radiación, cuya intensidad es modulada sinusoidalmente, con frecuencia angular  $\omega$ . Un fluoróforo que posea un tiempo de vida de fluorescencia con un decaimiento exponencial simple  $\tau$ , emitirá luz sinusoidalmente modulada a la misma frecuencia, pero retardada en fase por un ángulo  $\phi$ , y demodulada con respecto a la luz de excitación en un factor  $M$ . La radiación de excitación ( $E$ ) y emisión ( $F$ ) están descritas por (Fig. 20):

$$E(t) = E_0 [1 + M_E \cdot \text{sen}(\omega t)]$$

**Ecuación 1: Función de la componente excitación en el tiempo**

$$F(t) = F_0 [1 + M_F \cdot \text{sen}(\omega t + \Phi)]$$

**Ecuación 2: Radiación de emisión de Tiempo de Vida**

donde:

$$M_E = \left( \frac{AC}{DC} \right)_E$$

**Ecuación 3: Modulación de Excitación de Tiempo de Vida**

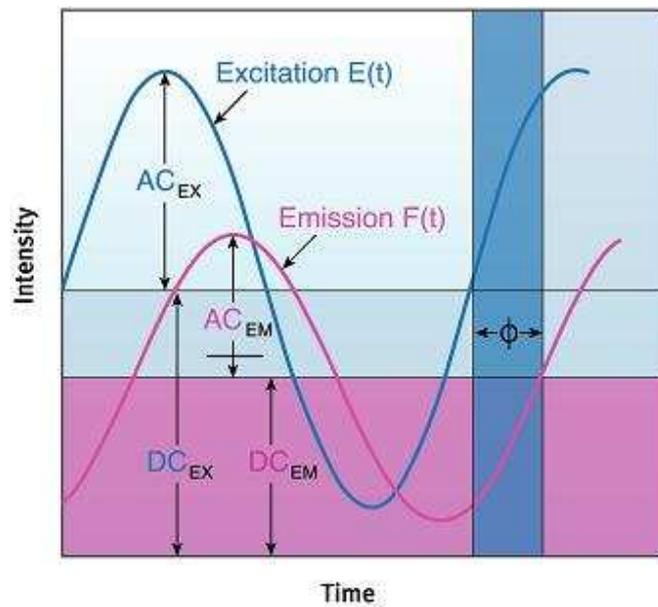
$$M_F = \left( \frac{AC}{DC} \right)_F$$

**Ecuación 4: Modulación de Emisión de Tiempo de Vida**

y se define el factor de demodulación relativo M:

$$M = \frac{M_F}{M_E}$$

**Ecuación 5: Factor de Demodulación de Tiempo de Vida**



**Figura 20: Diagrama de las funciones de excitación E(t) y emisión F(t).**  
Se ilustra el corrimiento de la onda de emisión respecto a la de excitación para la determinación de tiempos de vida de fluorescencia por el método de desplazamiento de fase y modulación. ([www.iss.com](http://www.iss.com))

Las relaciones entre el desplazamiento de fase ( $\Phi$ ), la razón de modulación ( $M$ ) y el tiempo de vida son:

$$\tan \Phi = \omega \tau_p$$

**Ecuación 6: Tiempo de Vida de la Fase**

$$M = \frac{1}{(1 + \omega^2 \tau_M^2)^{1/2}}$$

**Ecuación 7: Tiempo de Vida de Modulación**

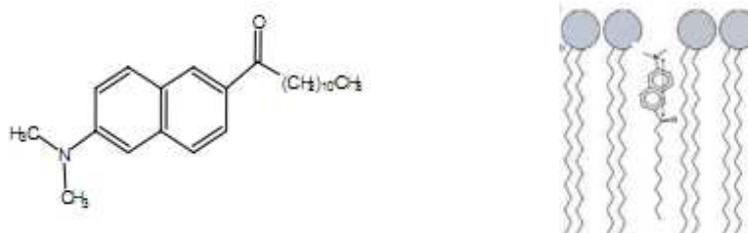
Es decir a una frecuencia angular  $\omega$ , se pueden obtener dos determinaciones independientes de tiempo de vida, un tiempo de vida considerando el desplazamiento de la fase ( $\tau_p$ ) y un tiempo de vida mediante la pérdida de modulación ( $\tau_M$ ). Si el tiempo de vida corresponde en realidad a un decaimiento exponencial simple, el tiempo de vida de fase debe ser igual al tiempo de vida de modulación. Por otra parte si la emisión es debida a dos o más decaimientos exponenciales el tiempo de vida de fase será menor que el tiempo de vida de modulación. (Garda et al., 1997; Sotomayor et al., 2000; Zorrilla López S. 2002; Lakowicz, J.R. 2006.; Almeida et al., 2009)

### 3.3- Polarización Generalizada de la sonda Laurdan.

En este trabajo se seleccionó como sonda fluorescente el 6-dodecanoil-2-dimetilaminonaftaleno o Laurdan. Esta molécula fue diseñada por Gregorio Weber en 1979 (Weber and Farris 1979) y su comportamiento en bicapas ha sido ampliamente estudiado.

La molécula de Laurdan, cuya estructura se muestra en la figura 21, presenta un alto coeficiente de reparto en agregados formados por lípidos y tiene una solubilidad muy baja en agua (Bagatoli et al., 1997), lo que asegura que casi la totalidad de su emisión proviene de zonas hidrofóbicas de la membrana. En efecto, diversos estudios han demostrado que el Laurdan se ubica principalmente en la interfase entre las cabezas polares y las colas hidrocarbonadas (Parasassi et al., 1995) como

consecuencia de la existencia de interacciones de tipo Van der Waals con las cadenas hidrofóbicas, presentando un anclaje lo suficientemente fuerte como para limitar su intercambio con el medio acuoso. (Fig. 21).



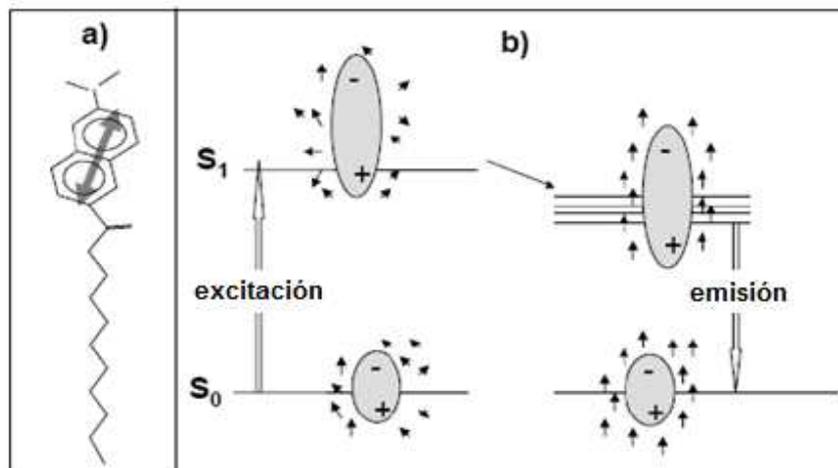
**Figura 21: Estructura molecular del Laurdan, y su ubicación en la membrana.**  
(Toro, C.A 2006).

La fotofísica del Laurdan se ve fuertemente influenciada por la polaridad del ambiente en el que se encuentra ubicada, lo que permite hacer una relación directa del perfil de su emisión con la fluidez de la membrana

En solventes de alta polaridad, el máximo de emisión del Laurdan presenta un considerable desplazamiento batocrómico, explicado fundamentalmente por la reorientación de los dipolos de las moléculas de solvente alrededor de la sonda durante el tiempo de vida de su estado excitado. El desplazamiento del espectro de emisión hacia mayores longitudes de onda al aumentar la polaridad del solvente se debe a una mayor disminución de la energía del estado excitado al ocurrir la reorientación, relajación, de los dipolos de las moléculas del solvente alrededor del dipolo del fluoróforo en estado excitado  $S_1$  (Fig. 22).

En bicapas, el origen de la relajación dipolar ha sido atribuido a las moléculas de agua presentes en la interfase donde se sitúa el Laurdan (Parasassi et al., 1995; Parasassi., et al. 1990) y por lo tanto, el espectro de emisión de la sonda depende fuertemente del grado de empaquetamiento de las cadenas hidrocarbonadas, pues la dinámica molecular y la concentración de moléculas de agua varía en los diferentes

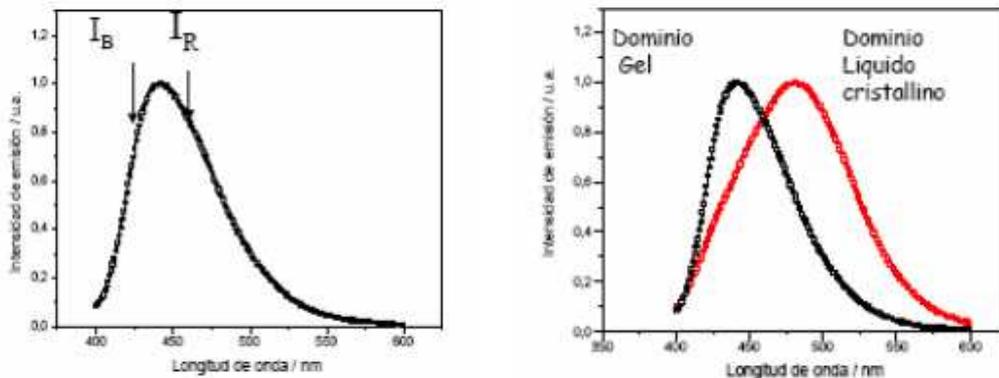
estados físicos de la membrana. En el estado líquido cristalino, la bicapa presenta un débil empaquetamiento que permite que ocurra la reorientación de las moléculas de agua con el dipolo de la sonda excitada, teniendo como consecuencia un desplazamiento continuo hacia el rojo.



**Figura 22: Pérdida de energía del estado excitado de Laurdan.**

Esquema que muestra la pérdida de energía del estado excitado por la reorientación de los dipolos del solvente en el entorno del fluoróforo. a), Momento dipolar de la molécula Laurdan (flecha gris) creado por la separación de cargas parciales entre los residuos 2-dimetilamino y 6-carbonilo. b) Diagrama de los cambios en el momento dipolar de Laurdan (en gris) después de la excitación del estado fundamental ( $S_0$ ) y la posterior relajación de  $S_1$ . El corrimiento hacia el rojo de los espectros se produce cuando las moléculas de agua (flechas) alrededor de las moléculas Laurdan se reorganizan para dar cuenta del aumento del dipolo de Laurdan después de la excitación. (Sánchez et al., 2007)

Como resultado, el máximo de emisión de la sonda en el estado gel se encuentra en la región del azul (centrada alrededor de los 440 nm) y en el estado líquido cristalino el máximo se desplaza hacia el verde (490 nm), como puede verse en la figura 23.



**Figura 23: Desplazamiento espectroscópico del Laurdan.**  
(Toro, C.A 2006).

Para cuantificar los cambios espectrales descritos, se ha definido el parámetro de Polarización Generalizada, (PG) definido por la siguiente fórmula:

$$PG = \frac{(I_{440} - I_{490})}{(I_{440} + I_{490})}$$

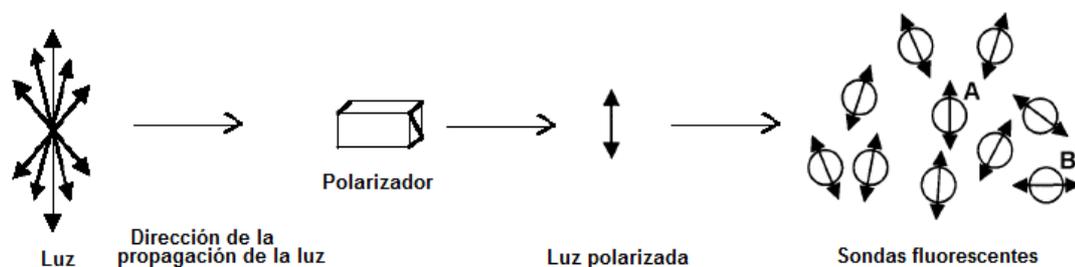
**Ecuación 8: Parámetro de la PG de Laurdan**

Donde  $I_{440}$  e  $I_{490}$  son las intensidades de emisión del Laurdan correspondientes a las longitudes de onda del máximo del espectro de la sonda en la fase gel y líquido cristalina de vesículas de DPPC respectivamente usadas como referencia. (Sanchez et al., 2007)

### 3.4- Anisotropía de fluorescencia.

Las medidas de anisotropía de fluorescencia se han utilizado ampliamente para la obtención de información sobre la forma, el tamaño, la rigidez o la flexibilidad de moléculas biológicas. La técnica constituye asimismo una herramienta de gran utilidad para el estudio de interacciones moleculares. (Zorrilla López S. 2002).

Las medidas de anisotropía de fluorescencia se basan en el principio de excitación fotoselectiva de fluoróforos mediante luz polarizada. Cuando una población de fluoróforos se excita con luz linealmente polarizada, la probabilidad de excitación de una molécula de fluoróforo depende de la orientación de su momento dipolar de absorción con respecto a la dirección del vector campo eléctrico de la luz de excitación. De este modo, se excitan preferentemente las moléculas de fluoróforo cuyo momento de transición está orientado en una dirección próxima a la del vector campo eléctrico de la luz de excitación, lo que se conoce como fotoselección (Lakowicz, J.R. 2006) (Fig. 24).



**Figura 24: Representación de la polarización de la luz.**

La sonda A representa las sondas con mayor probabilidad de excitación y las B con nula probabilidad.

La excitación selectiva da lugar a una población de fluoróforos parcialmente orientada y por tanto a una emisión de fluorescencia parcialmente polarizada. Cualquier cambio en la orientación del momento dipolar de absorción del fluoróforo durante el tiempo de vida media del estado excitado, provoca una disminución de la anisotropía de la fluorescencia emitida. Existen numerosos factores que producen una despolarización de la fluorescencia emitida, entre los que se pueden mencionar las vibraciones torsionales, la transferencia de energía de excitación a otra molécula con diferente orientación y la difusión rotacional de la molécula excitada.

En soluciones fluidas, las moléculas se desplazan angularmente al azar debido al movimiento browniano inducido térmicamente, de modo que la distribución angular inicial de moléculas creada tras la excitación se va destruyendo progresivamente con el tiempo. A partir de la extensión con que se produce la despolarización de la

fluorescencia, se puede obtener información sobre los movimientos moleculares, que dependen de la forma y tamaño de las moléculas, y sobre la fluidez del microentorno.

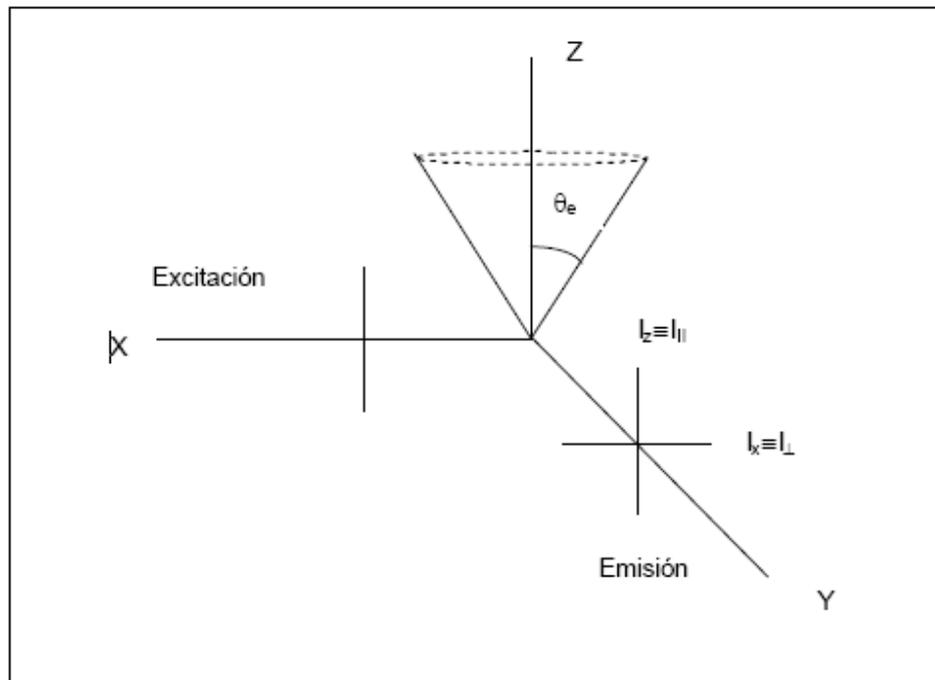
El curso temporal de la despolarización de fluorescencia depende de la relación existente entre el tiempo de vida media de fluorescencia y la velocidad de rotación de las moléculas fluorescentes. Cuando los tiempos de difusión rotacional son muy diferentes del tiempo de vida media de fluorescencia del fluoróforo, no se obtiene prácticamente información dinámica, ya que la rotación ocurre fuera de la ventana de tiempo del experimento. Cuando el tiempo de rotación de una molécula es mucho menor que el tiempo de vida media de fluorescencia de la sonda, se producen muchas rotaciones durante la duración del estado excitado y la intensidad de fluorescencia está totalmente despolarizada. En caso contrario, es decir, cuando la molécula rota muy despacio en comparación con el tiempo de vida media de fluorescencia del fluoróforo, la intensidad de fluorescencia decae antes de que se produzca una disminución significativa de la anisotropía.

La anisotropía de emisión de fluorescencia en estado estacionario de una solución excitada con luz polarizada linealmente se puede calcular mediante la siguiente expresión:

$$r = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + 2I_{\perp}}$$

***Ecuación 9: Anisotropía de Emisión de Fluorescencia***

Donde  $I_{||}$  y  $I_{\perp}$  son las componentes de la emisión de fluorescencia en las direcciones paralelas y perpendiculares respectivamente a la dirección del plano de polarización de la luz de excitación. En esta expresión  $I_{||} + 2I_{\perp}$  es proporcional a la intensidad total de fluorescencia (Fig. 25).



**Figura 25: luz despolarizada emitida por fotoselección de sondas.**  
 Fluorescencia polarizada emitida por una población fotoseleccionada de sondas.  $\theta_e$  es el ángulo que forman el momento de transición de la emisión y el eje Z del laboratorio

La anisotropía de fluorescencia es función del ángulo promedio formado por el momento dipolar de emisión y la dirección de la polarización de la luz de excitación  $\theta_e$

La anisotropía de fluorescencia, así como la polarización de la fluorescencia son dos parámetros directamente relacionados con la fluidez

La anisotropía se encuentra afectada por los cambios en la orientación de las moléculas fluorescentes debido al movimiento de tipo rotacional de las mismas (Fig 26). La anisotropía ( $r$ ) y la polarización ( $P$ ) de la fluorescencia, se definen por las siguientes ecuaciones.

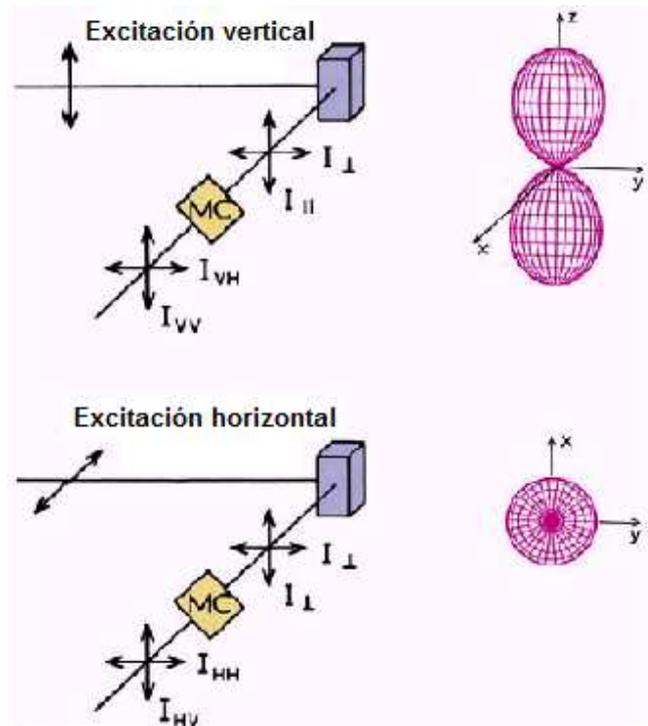


Figura 26: despolarización de la luz y movimiento rotacional de la sonda.

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}}$$

$$P = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + GI_{VH}}$$

**Ecuación 10: Anisotropía y Polarización con factor G**

$I_{VV}$  y  $I_{VH}$  corresponden a la intensidad de radiación polarizada vertical y horizontal, respectivamente, cuando la radiación de excitación es polarizada verticalmente. El parámetro  $G$  es un factor de corrección instrumental definido por la relación  $G = I_{HV}/I_{HH}$ , donde,  $I_{HV}$  y  $I_{HH}$  corresponden a la intensidad de radiación polarizada vertical y horizontal, respectivamente, cuando la radiación de excitación está polarizada horizontalmente. (Aguilar et al., 1996; Zorrilla López S. 2002; Lakowicz, J.R. 2006)

### 3.5- Formación de Excímero de Pireno.

Las sondas derivadas de Pireno pueden formar Excímeros fluorescentes que emiten luz con una longitud de onda desplazada alrededor de 100 nm aprox. más arriba que la del Monómero

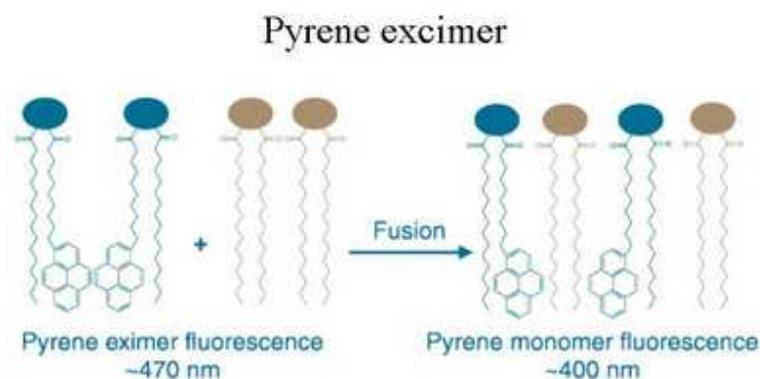
En las vesículas de fosfolípidos el espectro de fluorescencia del Pireno muestra picos característicos entre los 370 y 400 nm aprox. (fluorescencia Monómeros) y a 470 nm aprox. (fluorescencia Excímero), como se ve representado en la figura 28.

$$\frac{\text{Ex}}{\text{Mon}} = \frac{I_{470}}{I_{374}}$$

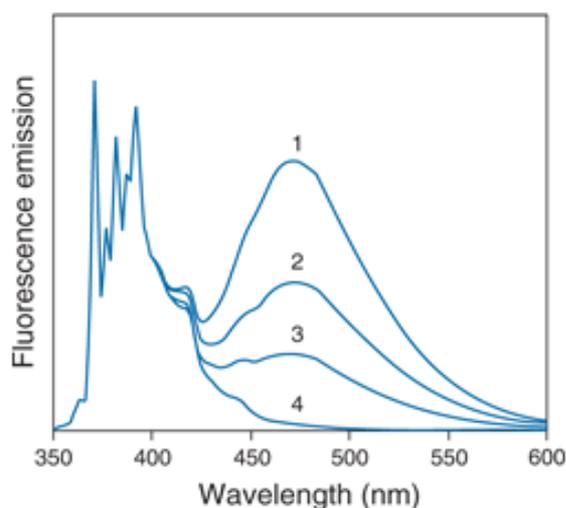
*Ecuación 11: Razón Excímero/Monómero*

El ensayo de fusión se basa en la medición de la razón de intensidades de Excímero y Monómero de sondas derivadas de Pireno. Para esto se deben formar LUV's con Pireno incorporado. El grado de incorporación de la sonda en las vesículas de fosfolípidos se refleja en que la sonda produce una significativa intensidad de fluorescencia del Excímero (dímeros de un monómero excitado y un monómero en el estado basal) en la superficie de las vesículas. Esto es debido a que la mayor densidad de monómero favorece la formación del Excímero

La formación del excímero depende de la difusión traslacional de la sonda en la bicapa lipídica. Por lo tanto, la relación de fluorescencia del Excímero y Monómero del Pireno es proporcional a la concentración de la sonda. En consecuencia, durante la fusión entre las LUV's marcadas con Pireno y sin Pireno, la dilución de la sonda en la membrana puede ser seguida por la disminución de intensidad de fluorescencia del Excímero. (Fig 27).



**Figura 27: Mezcla de lípidos sobre la base de la formación del Excímero de Pireno.**  
 Se observa sondas de Pireno concentrada unidas con lípidos las cuales emiten fluorescencia desplazada al rojo debido a la formación de excímeros (dímeros en estado excitado). La dilución de la sonda por los lípidos incorporados como resultado de la fusión de la membrana es registrada por la disminución de la emisión de fluorescencia del Excímero. ([www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com))



**Figura 28: Representación de los espectros de emisión de la sonda Pireno.**  
 (1) 2 mM Pireno, purgado con nitrógeno para eliminar el oxígeno, (2) 2 mM Pireno, aire equilibrado, (3) Pireno 0,5 mM (purgado nitrógeno), y (4) 2  $\mu$ M Pireno (purgado nitrógeno). La razón Excímero Monómero es dependiente de la concentración tanto de Pireno y el tiempo de vida en estado excitado, el cual es variable porque sufre apagamiento por oxígeno. ([www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com))

Es importante destacar que en los experimentos descritos anteriormente, la unión de sondas a LUV's y la fusión entre las vesículas son estrictamente dependientes de la presencia de colesterol en la membrana. (Pal et al., 1988; Wahlberg et al., 1992; Bron R et al., 1993; Stegmann et al., 1993; Bron et al., 1994)

## CAPITULO II

### MATERIALES Y METODOS

#### 1.- Materiales.

##### 1.1- Reactivos e insumos.

###### **Avanti<sup>®</sup>** Avanti Polar Lipids, inc

- Colesterol
- DPPC: 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina
- DOPC: 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina

###### **Merck**

- Uvasol<sup>®</sup> Etanol para espectroscopía
- NaCl pro análisis
- Cloroformo pro análisis

###### **SIGMA**

- TRIZMA<sup>®</sup> HCl

###### **Invitrogen, Molecular Probes**

- DPH: 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno
- Laurdan: 6-dodecanoil-2- dimetilaminonaftaleno
- PDA: ácido 1-Pireno dodecanoico
- PyPC: 1-hexanodecanoil-2-(1-pirenodecanoil)-sn-glicero-3-fosfocolina ( $\beta$ -py-C<sub>10</sub>-HPC)

### **ISOPORE®**

- Millipore: filtros de policarbonato 0,4 µm

### **STERLITECH Corporation**

- Poliéster Drain Disc, 25 mm, 100/pk

## 1.2- Equipos.

### **Cole Parmer®**

- PHmetro

### **Sartorius**

- Balanza analítica

### **Memmert**

- Baño Termostatizador
- Baño ultrasónico
- Extrusor

### **ISS inc.**

- Espectrofluorimetro de fase y modulación en el dominio de la frecuencia K2
- Espectrofluorimetro de fase y modulación en el dominio de la frecuencia GREG 200.

## 1.3 Soluciones.

Buffer Tris HCl NaCl:

Tris HCl 30 mM; NaCl 40 mM; Ph: 7,4

## 2.- Métodos para preparación de Muestras.

### 2.1- Preparación de stock de Lípidos.

Se pesó cantidad apropiada de lípidos ya sea DPPC, DOPC o COLESTEROL, para obtener una solución concentrada del lípido en solución. (Aproximadamente 10 mg/mL). El solvente utilizado fue cloroformo, el cual es previamente purgado con N<sub>2</sub> para eliminar el O<sub>2</sub> y evitar la oxidación de los lípidos. Se debe hacer la purga por aproximadamente 10 minutos. Las soluciones stock se mantienen a 4°C.

### 2.2.- Preparación de stock de sondas.

Pireno "PDA": Se decidió trabajar con 5 µM de sonda Pireno para una concentración final de lípidos de 0,4 mM. Se preparó un stock de 500 µM en 1 mL en DMSO. PM Pireno: 400.56 gr/mol.

Pireno "PyPC": Se decidió trabajar con 30 µM de sonda Pireno PC para una concentración final de lípidos de 0,4 mM. Esta sonda viene comercialmente en frascos de 1 mg, por lo que se agregó en el mismo tubo que viene 1,5 mL de cloroformo previamente purgado para eliminar el O<sub>2</sub>, obteniendo un stock de concentración 0,667 mg/mL. PM Pireno PC = 850,13 gr/mol.

Laurdan: la concentración final debe ser de una razón molar de 1:1000 sonda:lípido ([Sanchez et al., 2007](#)) Se decidió preparar stock de  $1 \times 10^{-5}$  M. La sonda es suspendida en etanol uvasol. PM Laurdan= 353 gr/mol.

DPH: La concentración final debe ser de una razón molar de 1:1000 sonda:lípido (Aguilar et al., 1996) Se decidió preparar stock de  $1 \times 10^{-4}$  M. La sonda es suspendida en DMSO. PM DPH = 232,3 gr/mol.

### 2.3- Preparación de Vesículas Multilamelares (MLV's).

Se preparó una solución en cloroformo de cada uno de los componentes lipídicos en frascos de stock para luego agregar en otro frasco las cantidades requeridas de acuerdo a la composición deseada. Luego se evaporó el solvente con una corriente de  $N_2$ , idealmente deben ir formándose múltiples capas en el fondo y en los costados inferiores del tubo de muestra (como un film adherido a las paredes del frasco). El flujo se debe aplicar lento ya que si es muy violento se puede perder muestra, además este es el paso clave para la posterior homogeneización de la muestra con el buffer. A continuación se suspendió la mezcla de lípidos agregando de 4 mL de buffer Tris HCl 30 mM; NaCl 40 mM; Ph: 7,4. Luego a la solución se le aplican ciclos de vortex y sonicado 7 veces alternadamente por 1 min. aprox. cada uno. El sonicado se realiza a una temperatura mayor a la  $T_m$  del lípido presente en la mezcla. Los film pegados en los costados de los tubos se despegan, la intención es que no queden lípidos adheridos en los frascos, y de esta forma también ir rompiendo de a poco las membranas, gracias a el ultrasonido que tiene la capacidad de romper estructuras lamelares, para llegar a las LUV's, que inicialmente están formadas como liposomas o MLV's. Posterior a esto se realizó ciclos de congelado y descongelado entre 7 a 10 veces, el congelado se efectúa por medio de aire líquido y el descongelado en baño termostatzado a temperatura superiores a la  $T_m$ . El objetivo de la homogeneización no es obtener una mezcla cristalina, sino que sin pequeños trozos sin disolver ni estructuras muy grandes. (Toro, C.A 2006)

## 2.4- Preparación de Vesículas Unilamelares Largas (LUV's).

La obtención de LUVs se realizó a través del método de extrusión. La extrusión es el proceso en el cual una solución de vesículas multilamelares es forzada a pasar a través de una membrana de policarbonato con pequeños poros usando gas a alta presión, normalmente nitrógeno. Este método permite obtener una distribución de tamaños más estrecha que las generadas por otros procedimientos, centrada en el tamaño del poro de la membrana utilizada. La distribución de tamaños también muestra dependencia con la presión de extrusión, con la velocidad de flujo de la solución de vesículas y con las características del lípido utilizado (Frisken et al., 2000)



**Figura 29: Esquema de Modelo de Extrusor utilizado para sintetizar las LUV's.**  
Imagen modificada de [www.northernlipids.com](http://www.northernlipids.com).

La solución de MLV's se hizo pasar a través de membranas de policarbonato de 400 nm utilizando el equipo de extrusión (Fig. 29) conectado a un baño termostático a 52° C. Se utilizó nitrógeno como gas presurizado y la presión empleada fue controlada de modo de mantener un flujo razonable de salida de las soluciones de vesículas LUV's.

Se decidió trabajar con una concentración total de lípidos en las mezclas de 0,4 mM, para evitar efecto de scattering de Rayleigh en las mediciones de la fluorescencia. Se Prepararon muestras a diferentes porcentajes de colesterol los cuales fueron: 0%; 15%; 22,2%; 33,3%; 40% mol., con una relación DPPC, DOPC 1:1 ya que a estas concentraciones se ha detectado presencia de microdominios en vesículas con presencia de colesterol. Las concentraciones de Colesterol usadas en este trabajo: 22.2%, 33.3% y 40% mol, fueron elegidas por ser concentraciones críticas de acuerdo con la teoría de la súper red (Chong, 1994) y 15% mol por ser una concentración donde ocurren abruptos cambios en la Polarización Generalizada de Laurdan según a sido reportado (Parasassi et al., 1995).

Para el sistema empleado (DOPC, DPPC Y CHO), se prepararon vesículas unilamelares larga (LUV's) preparadas a partir de la extrusión de vesículas multilamelares (MLV's). Para la medición de los ensayos con PDA, Laurdan y DPH, se prepararon LUV's de acuerdo a la metodología ya descrita (sección 2.3 y 2.4). Para los análisis de determinación de la razón Excímero/Monómero con PyPC, las LUV's fueron obtenidas de la siguiente manera: la sonda fue agregada al frasco de preparación de muestra en una relación 1:1:1 PyPC:DOPC:DPPC con las mismas concentraciones crecientes de CHO mencionadas anteriormente. De esta forma, se tuvieron dos tipos de vesículas, unas con sonda Pireno PC y otras sin ella, con las cuales posteriormente se realizaron los ensayos de fusión.

### 3.- Métodos para medición de muestras.

#### 3.1- Propiedades Físico-Químicas.

Todos los datos obtenidos para las sondas Laurdan y DPH se obtuvieron con un espectrofluorímetro de fase y modulación en el dominio de la frecuencia K2 (ISS, Champaign IL, USA) en interfaz con un computador para su recolección. La temperatura de la muestra fue controlada mediante un baño externo de circulación de agua y medida en la celda de la muestra antes y después de cada medición, usando un termómetro digital. Todas las medidas fueron realizadas en celdas de cuarzo y a 37°C.

Se midió las siguientes propiedades físico-químicas: Tiempo de vida, Polarización Generalizada de Laurdan y Anisotropía a las LUV's en estudio.

##### 3.1.1- Tiempo de vida de Fluorescencia.

Para las mediciones de tiempo de vida de las sondas DPH y Laurdan se utilizó un espectrofluorímetro de fase y modulación en el dominio de la frecuencia K2 (ISS, Champaign IL, USA). Se utilizó como fuente de excitación modulada un diodo láser de 375nm. La emisión se observó a través de un filtro de corte Schott KV-399 y WG-420 para filtrar el scattering de Raman y Raleigh. La luz de excitación fue polarizada paralelamente al eje vertical de laboratorio, y la emisión fue vista a través de un polarizador Glan-Thompson orientado a 55 grados (ángulo mágico). En este estudio, las frecuencias utilizadas variaron entre 3 a 110 MHz. Se utilizó como referencia una solución de Dimetil-POPOP en etanol ( $\tau = 1.45$  ns). Previo a la medición se incubaron muestras de LUV's 0,4 mM durante 30 minutos con la sondas Laurdan y DPH a 37°C, las cuales debe estar en una concentración final molar 1:1000 sonda lípido en las muestras.

### 3.1.2- Polarización Generalizada de Laurdan.

Para las mediciones de PG de Laurdan se utilizó un espectrofluorímetro de fase y modulación en el dominio de la frecuencia K2 (ISS, Champaign IL, USA) La polarización generalizada de Laurdan se midió como fue descrito por [Parassasi et al \(1995\)](#). En pocas palabras, la polarización generalizada (PG) se define como esta definido en la ecuación 8.

Previo a la medición se incubaron muestras de LUV's 0,4 mM durante 30 minutos con la sonda Laurdan a 37° C, la cual debe estar en una concentración final molar 1:1000 sonda lípido en las muestras.

### 3.1.3- Anisotropía de Fluorescencia.

Las mediciones de anisotropía de fluorescencia de DPH se llevaron a cabo utilizando un espectrofluorímetro de fase y modulación en el dominio de la frecuencia K2 (ISS, Champaign IL, USA) con una configuración en formato "L", conectado a un ordenador personal para la adquisición de los datos. Se utilizaron polarizadores Glan Thompson tanto para la excitación como para la emisión. La emisión se midió a través de filtros de corte Schott KV-399 y WG-420.

### 3.2- Fusión de Vesículas.

Los espectros de emisión de fluorescencia de sondas derivadas de Pireno (PDA y PyPC) se obtuvieron con un espectrofluorímetro de fase y modulación en el dominio de la frecuencia K2 (ISS, Champaign IL, USA) en interfaz con un computador para la recolección de datos. La temperatura de la muestra fue controlada mediante un baño externo de circulación de agua y medida en la celda de la muestra antes y después de cada medición, usando un termómetro digital. Se utilizó como fuente de luz una lámpara de arco de xenón. Todas las medidas fueron realizadas en celdas de cuarzo y a 37°C.

Para establecer la relación Excímero/Monómero, Las mediciones se realizaron en 2 espectrofluorímetros de fase y modulación en el dominio de la frecuencia uno denominado GREG 200 (ISS, Champaign IL, USA) y el otro K2 (ISS, Champaign IL, USA) a 37°C, ambos en interfaz con ordenadores

Para este ensayo se midió espectros de excitación y emisión. La longitud de onda de excitación de las sondas PDA y Pireno PC se determinó en 343 nm y el espectro de emisión se corrió desde 360 nm a 550 nm. Se midió espectros de emisión de intensidad de fluorescencia de las LUV's marcadas con ambas sondas, proceso que se denominó en los resultados como: "Antes de Fusión". Posteriormente se realizó el ensayo de fusión, que consiste en mezclar en una relación 1:1 LUV's con y sin sonda, cada una con su respectiva equivalente en cuanto a concentración de CHO (0%, 15%, 22,2%, 33,3% y 40% mol), proceso que se describe en los resultados como: "Después de Fusión". De esta forma se obtuvieron mezclas nuevas de LUV's, a las cuales también se les midió sus espectros de emisión de intensidad de fluorescencia. A las LUV's Antes y Después del ensayo de Fusión se les determinó los máximos de intensidad de fluorescencia registrados en los valores de 374 nm y 470 nm los cuales equivalen al Monómero y al Excímero respectivamente, con los cuales se determinó la relación Ex/Mon con la ecuación 11. Previo a la medición se incubaron LUV's 0,4 mM durante 30 minutos con las sondas de Pireno a 37° C las cuales deben estar en una concentración final de 5 µM y 30 µM, para PDA y PyPC respectivamente.

### 3.3- Análisis de datos de Fluorescencia.

Los datos de fluorescencia en estado estacionario fueron analizados con el software Vinci (ISS Inc., Champaign, IL), luego estos datos fueron trasladados al software gráfico y de análisis Origin Pro 8 (Microcal), en el cual se obtuvieron los gráficos finales.

Los datos de tiempo de vida fueron analizados utilizando el software Vinci (ISS Inc., Champaign, IL, USA), ya sea asumiendo una suma de exponenciales discretas o mediante modelos de distribución continua los cuales asumen distribuciones Lorentzianas o de Gaussianas (Sotomayor et al, 2000). El mejor ajuste de los datos a una modelo en particular fue determinado por el valor de Chi cuadrado ( $\chi^2$ ). Finalmente son transportados al software Origin Pro 8 (OriginLab Corporation, Wellesley Hills, MA, USA) en el cual se obtuvieron los gráficos finales.

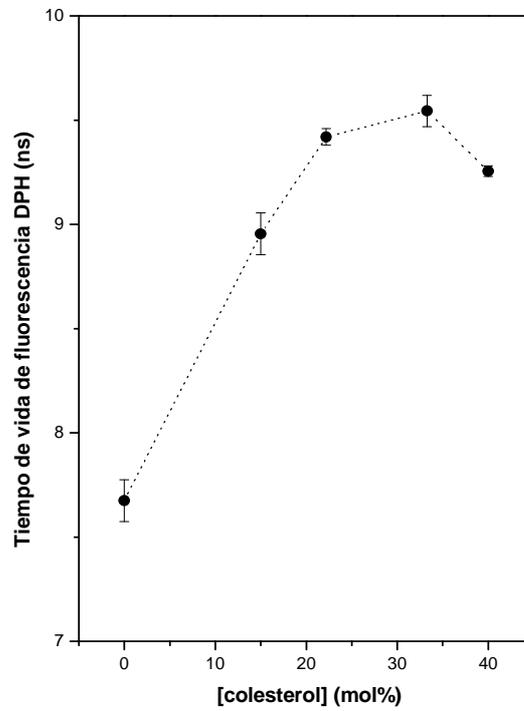
## RESULTADOS.

### Propiedades Físico Químicas.

Para comprender el mecanismo del efecto del Colesterol en las bicapas lipídicas, se usó espectroscopía de fluorescencia resuelta en el tiempo y en estado estacionario para estudiar la influencia del Colesterol sobre las diferentes propiedades Físico químicas de vesículas unilamelares largas. Se seleccionaron dos sondas fluorescentes que se localizan a dos diferentes posiciones en la bicapa lipídica y por lo tanto ellas pueden reportar el efecto del Colesterol desde estas dos locaciones: en la profundidad del núcleo hidrofóbico de las cadenas acílicas (DPH) y en la interfase hidrofóbica-hidrofílica entre las cabezas polares y las colas acílicas (Laurdan). El grado de hidratación en ambos lugares de la bicapa fue evaluado por los datos de tiempo de vida de fluorescencia de ambas sondas DPH y Laurdan y por el corrimiento de los espectros de emisión de Laurdan, evaluados por los parámetros de la polarización generalizada PG (Parasassi, et al. 1990). El orden de los fosfolípidos se estudió con las medidas de anisotropía de DPH.

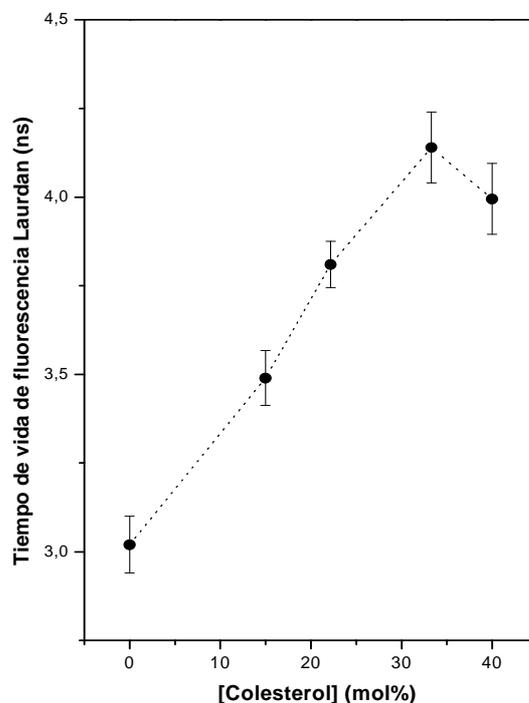
El Tiempo de Vida fluorescente está definido como el tiempo promedio en que una molécula se mantiene en estado de excitación antes de regresar a su estado basal, por lo tanto su estudio puede proporcionar información acerca del entorno de la sonda.

Por lo tanto, se midieron Los Tiempos de Vida de fluorescencia a las sondas Laurdan y DPH presente en las LUV's compuestas por los fosfolípidos DPPC DOPC y CHO 0%; 15%; 22,2%; 33,3% y 40% mol. Se observó que a medida que se aumenta el contenido de CHO en las LUV's, el Tiempo de Vida en los ensayos con la sonda DPH también crece, llegando a un máximo de crecimiento de 9,55 ns en la zona de los 33,3% mol de CHO en donde comienza un decrecimiento hasta 40% mol de CHO. (Fig. 30).



**Figura 30: Tiempo de Vida de Fluorescencia (DPH) v/s % mol de CHO**

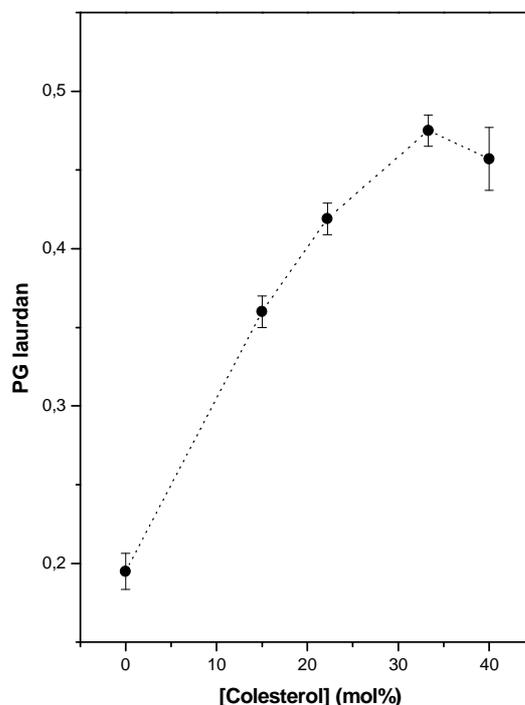
Similar tendencia se puede observar en los datos obtenidos en las mediciones de Tiempo de Vida de Fluorescencia en los ensayos con la sonda Laurdan, donde también se reflejó un aumento creciente en los tiempos de Vida de las LUV's. En esta ocasión se observó un valor máximo de 4,14 ns en la zona de los 33,3% mol de CHO, en donde la curva comienza a decrecer hasta los 40%mol de CHO. (Fig. 31)



**Figura 31: Tiempo de Vida de Fluorescencia (Laurdan) v/s % mol de CHO**

La fotofísica de la sonda Laurdan se ve fuertemente influenciada por la polaridad del ambiente en el que se encuentra ubicada, lo que permite hacer una relación directa del perfil de su emisión con la hidratación y fluidez de la membrana, en este caso particular con la cantidad de agua que la rodea.

En los datos de Polarización Generalizada de Laurdan se pudo observar en el gráfico, que la curva es creciente en los primeros 4 puntos, desde 0% mol de CHO hasta 33,3% mol de CHO. Al igual que en las mediciones de Tiempo de Vida. Pero a 40% mol de CHO se observa una disminución en el valor de PG de Laurdan. (Fig. 32).

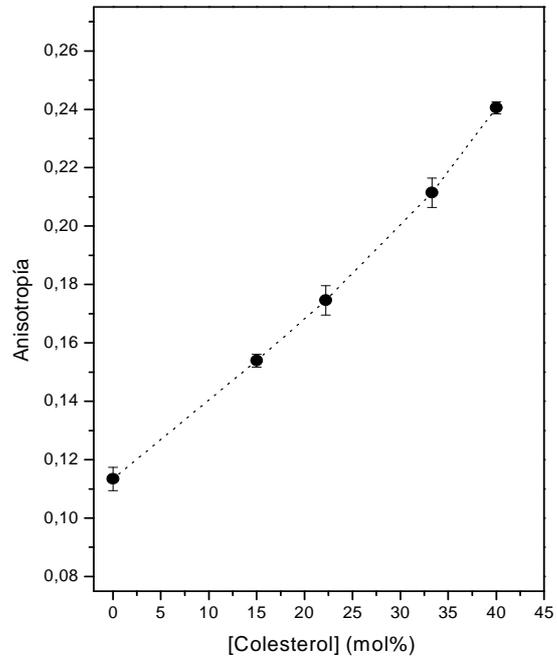


**Figura 32: Polarización Generalizada de Laurdan v/s % mol de CHO**

La Anisotropía de fluorescencia, así como la Polarización de la fluorescencia son dos parámetros directamente relacionados con la fluidez. La Anisotropía se encuentra afectada por los cambios en la orientación de las sondas fluorescentes debido al movimiento rotacional de las mismas. Estos valores son obtenidos en un intervalo de frecuencias similar al utilizado para las medidas de tiempos de vida.

La Anisotropía de fluorescencia de DPH en estado estacionario en función del contenido de Colesterol se muestra en la figura 33. En los datos espectroscópicos que se reflejan en los resultados gráficos para los ensayo de Anisotropía, se pudo observar que la sonda DPH no muestra mayores diferencias en su intensidad de emisión. El cambio de anisotropía de DPH sigue una tendencia creciente con la concentración de colesterol. El cambio observado es monótono, no evidencianado la presencia de máximos o mínimos, en el rango de concentración de colesterol estudiado (0-40% mol

CHO). Por lo tanto siempre hubo un aumento en la Anisotropía en todos los ensayos con LUV's de DPPC:DOPC (1:1).



**Figura 33: Anisotropía de Fluorescencia v/s mol de CHO**

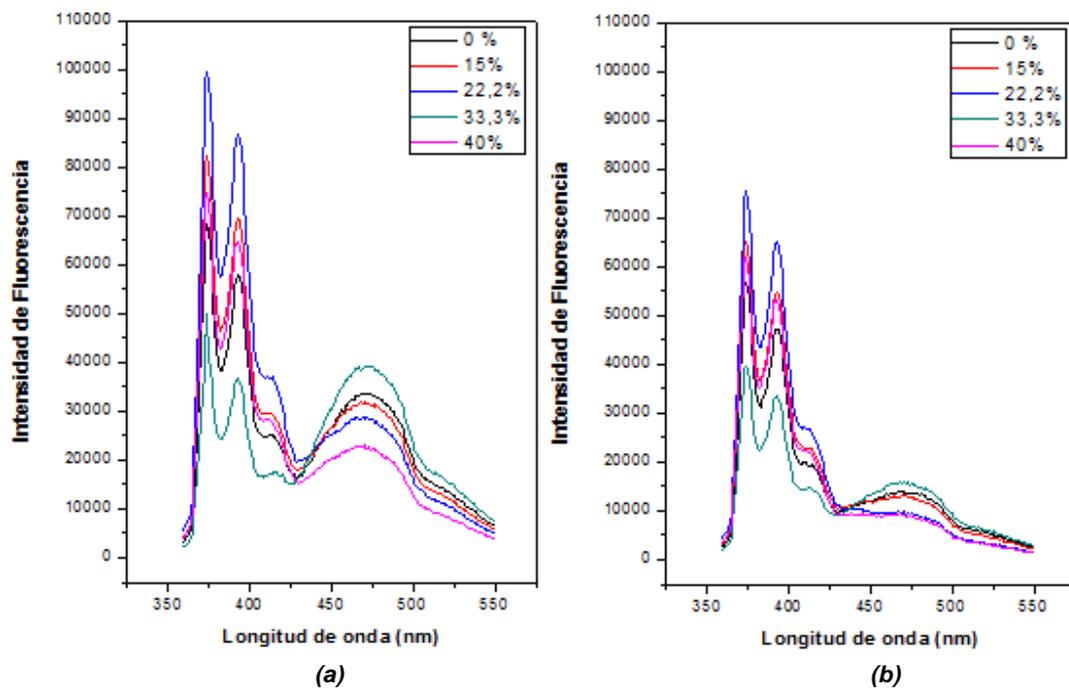
## Fusión de Vesículas.

El grado de formación de Excímero de Pireno depende de la difusión traslacional de la sonda, lo cual está correlacionado con la concentración de esta molécula. Por lo tanto, en los ensayos de fusión de vesículas con y sin Pireno, la intensidad de fluorescencia del Excímero disminuye como resultado de la dilución de esta sonda en la membrana. Por lo tanto, la fusión de las LUV's se determinó siguiendo la disminución de la fluorescencia del Excímero de Pireno.

Para esto se midieron espectros de emisión de fluorescencia para la sonda DPA, antes y después de los ensayos de fusión a LUV's compuestas por DPPC DOPC y CHO 0%; 15%; 22,2%; 33,3% y 40% mol. Se observó que las LUV's "antes del ensayo de fusión" presentaron mayores valores de intensidad de fluorescencia en el máximo de emisión del Excímero, que los observados en el ensayo "después de la fusión" (Fig. 34). De acuerdo a lo anterior, a 33,3% mol de CHO se observó una mayor intensidad de fluorescencia para el Excímero.

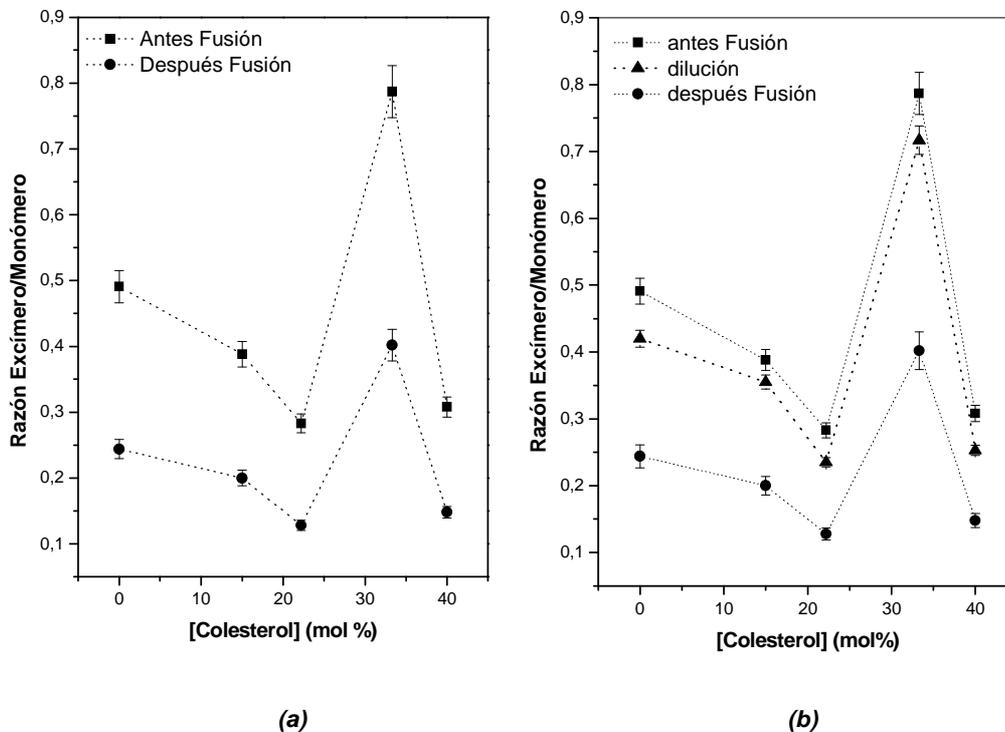
Con los valores de intensidad de fluorescencia para el Monómero y Excímero, se determinó la relación Excímero/Monómero de las vesículas, antes y después de los ensayos de fusión. Los datos revelaron que Las LUV's con 33,3% mol de CHO presentaron el valor más alto de la razón en ambas mediciones. (Figura 35a)

Los datos también demuestran que en todos los ensayos hubo fusión de las LUV's reflejando una mayor eficiencia en la fusión las vesículas con 33,3 % mol de CHO.



**Figura 34: Ensayos de Emisión de Fluorescencia de sonda PDA**  
**(a)** Espectro de Emisión. Excitación 343 nm, PDA 5  $\mu$ M en LUV's (DPPC / DOPC / CHO % variable) 0,4 mM "antes de ensayo de fusión". **(b)** Espectro de Emisión. Excitación 343 nm, PDA 5  $\mu$ M en LUV's (DPPC / DOPC / CHO % variable) 0,4 mM "después de ensayo de fusión".

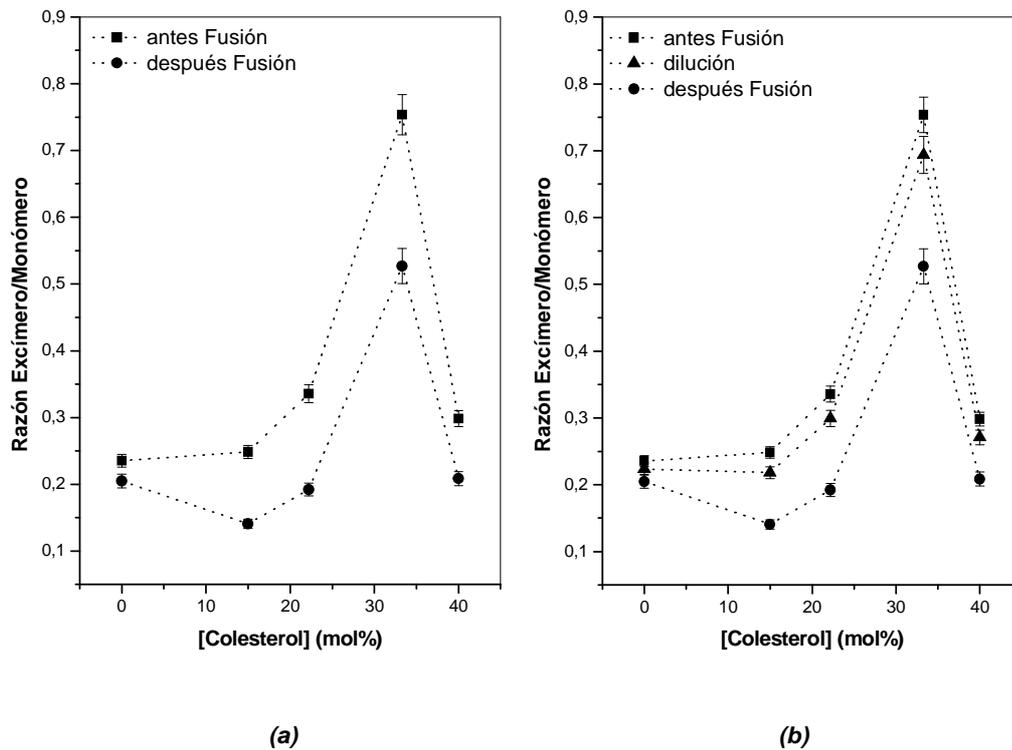
Posteriormente se realizó un control con buffer para descartar el efecto de dilución sobre la razón Excímero/Monómero. Para esto se utilizó muestras de vesículas a las correspondientes concentraciones de colesterol, mezclándolas con igual volumen de buffer. Se observó que la dilución no afecta significativamente las intensidades, y por lo tanto no influye en la razón Excímero/Monómero como se puede apreciar en la figura 35b. (Ensayos realizados con sonda PDA).



**Figura 35: medición de la razón Excímero/Monómero de la sonda DPA**  
**(a)** Ex/Mon v/s % mol de CHO. La curva superior indica las LUV's "antes del ensayo de fusión" y la curva inferior las LUV's "después de ensayo de fusión". **(b)** Ex/Mon v/s % mol de CHO. La curva superior indica las LUV's "antes del ensayo de fusión", la curva de en medio indica la dilución 1:2 de las LUV's en tampón y la curva inferior las LUV's "después del ensayo del ensayo de fusión".

Los ensayos realizados con Pireno PC fueron analizados de la misma forma que los ensayos realizados con la sonda PDA. Con los valores de intensidad de fluorescencia para el Monómero y Excímero, se determinó la relación Excímero/Monómero de las LUV's, "antes" y "después de los ensayos de fusión". Se observó al igual que en el ensayo anterior que las vesículas con 33,3% mol de CHO presentaron el valor más alto de la razón en ambas mediciones. (Fig. 36a) y que los ensayos control para descartar el efecto dilución tampoco influyen en la razón Ex/Mon (Fig. 36b).

Los datos reflejan también que todos los ensayos de fusión de las membranas lipídicas resultaron exitosos demostrando una mayor eficiencia en la fusión de las vesículas con 33,3 % mol de CHO.



:

**Figura 36: medición de la razón Excímero/Monómero de la sonda PyPC**  
**(a)** Ex/Mon v/s % mol de CHO. La curva superior indica las LUV's "antes del ensayo de fusión" y la curva inferior las LUV's "después de ensayo de fusión". **(b)** Ex/Mon v/s % mol de CHO. La curva superior indica las LUV's "antes del ensayo de fusión", la curva de en medio indica la dilución 1:2 de las LUV's en tampón y la curva inferior las LUV's "después del ensayo del ensayo de fusión".

## DISCUSIONES

En este trabajo se estudió los efectos del contenido de Colesterol sobre las propiedades estructurales y dinámicas de la bicapa lipídica en vesículas unilamelares largas como modelos de membranas. Para este propósito se usó sondas Fluorescentes las cuales fueron Laurdan Y DPH, para obtener información en diferentes profundidades de la lamela en función de su contenido de Colesterol.

Una característica notable de todas las membranas biológicas, válido mencionar, es su flexibilidad, es decir su capacidad de cambiar de estructura sin perder su integridad. La base de esta propiedad se encuentra en las interacciones no covalentes entre lípidos de la bicapa y los movimientos permitidos a los lípidos individuales, ya que no están unidos entre sí de forma covalente.

Aunque la estructura de la bicapa lipídica es bastante estable, las moléculas individuales de fosfolípidos y esteroides, en este caso el Colesterol, tienen una gran libertad de movimiento. La estructura y flexibilidad de la bicapa lipídica depende de los tipos de lípidos presentes y varía con la temperatura. Por debajo de las temperaturas fisiológicas normales los lípidos de la bicapa forman una fase Gel en la que están constreñidos fuertemente todos los tipos de movimiento de las moléculas individuales de lípido. Por encima de las temperaturas fisiológicas las cadenas hidrocarbonadas individuales de los ácidos grasos están en movimiento constante. En este estado Líquido Cristalino, el interior de la bicapa es más fluido que sólido y la bicapa es como un mar de lípidos en movimiento constante.

Estudios reflejan que en vesículas con DPPC a temperaturas correspondientes al estado Líquido Cristalino (41°C) la tendencia de l Tiempo de Vida en ambas sondas indica que la incorporación de Colesterol provoca una deshidratación total en ambas profundidades de la lamela, siendo leve en la profundidad superficial de la bicapa. Sin embargo en el estado Gel la incorporación de Colesterol induce un incremento total en la hidratación en ambas profundidades. Lo mismo se observa para vesículas de DOPC.

En el caso de sistemas ternarios con mezclas de lípidos que tienen  $T_m$  menores y mayores a los  $37^\circ\text{C}$  como lo es DOPC ( $-20^\circ\text{C}$ ) y DOPC ( $41^\circ\text{C}$ ) respectivamente, a temperaturas intermedias (fisiológica), los lípidos se encuentran en un estado Líquido Ordenado (Lo).

En este estado (Lo) hay menos acción de movimiento térmico de las cadenas acilo de la bicapa lipídica pero aun tiene lugar el movimiento lateral en el plano. Estas diferencias en el estado de la bicapa se observan fácilmente en los liposomas compuestos por un único lípido, como lo señala el estudio antes mencionado, pero las membranas biológicas contienen muchos lípidos con una gran variedad de cadenas acilo grasas por lo que no muestra cambios de fase abruptos con la temperatura.

Como este estudio es en función del contenido de Colesterol en las Vesícula, nos centraremos en esta molécula.

El colesterol es un componente importante en la organización de la bicapa y es uno de los mayores modificadores de la estructura y dinámica de la membrana biológica ([Parasassi et al., 1994a](#)).

Para comprender el mecanismo del efecto del Colesterol en las bicapas lipídicas, se uso espectroscopía de fluorescencia resuelta en el tiempo (Tiempo de Vida) y en estado estacionario (Anisotropía y PG) para estudiar la influencia del Colesterol sobre las diferentes propiedades Físico químicas de vesículas unilamelares largas.

Cambios en el Tiempo de Vida de DPH y Laurdan (Figs. 30 y 31) indican que incrementos del Colesterol en la bicapa, provocan cambios significativos en la penetración del agua en la lamela. Un “*Quenching*” dinámico de la sonda fluorescente debido a las interacciones sonda-agua ha sido propuesto para reducir los Tiempos de Vida de Fluorescencia ([Zannoni et al., 1983](#)). La tendencia en general del incremento del Tiempo de Vida de DPH y Laurdan en las vesículas es interpretada como el efecto del Colesterol en el decrecimiento de la hidratación de la bicapa, es decir, al aumentar la concentración de Colesterol, disminuye la cantidad de agua en la membrana, lo que provoca que no ocurra un apagamiento o “*quenching*” dinámico de las sondas

fluorescentes, lo que aumenta el Tiempo de Vida de DPH y Laurdan el cual es el tiempo promedio en que estas moléculas se mantienen en estado de excitación antes de regresar a su estado basal, por lo tanto, como su estudio proporciona información acerca del entorno de la sonda, esto se traduce que al aumentar el Colesterol disminuye la cantidad de agua lo que aumenta el Tiempo de Vida.

En la tendencia creciente de los datos de Tiempo de Vida con DPH, un particular resultado se pudo apreciar en la zona de 33,3% mol de CHO, donde hay un máximo de Tiempo de Vida de 9,55 ns aproximadamente, donde ocurre también, un decaimiento marcado. Similar tendencia se puede observar con los datos obtenidos en las mediciones de Tiempo de Vida de Fluorescencia en los ensayos con la sonda Laurdan, donde también se reflejó un aumento en los tiempos de Vida de las LUV's. En esta ocasión también se presentó un máximo valor de Tiempo de Vida a los 4,14 nanosegundos en la zona de los 33,3% mol de CHO, donde ocurre una variación en la tendencia de la curva habiendo un decaimiento del Tiempo de Vida.

El corrimiento espectral de Laurdan relacionado con el proceso de relajación de las moléculas polares en la interfaz hidrofílico-hidrofóbico de la lamela, es muy sensible a la concentración y/o la dinámica de la penetración de moléculas de agua, lo que permite hacer una relación directa del perfil de su emisión con la fluidez de la membrana, en este caso con la cantidad de agua que la rodea ([Parasassi et al., 1994a](#)). Utilizando el parámetro de la polarización generalizada GP para cuantificar el corrimiento espectral de la fluorescencia del Laurdan que se sitúa entre las cabezas polares y las colas hidrocarbonadas, se encontró que los cambios de hidratación son coincidentes con los cambios de hidratación en general, así como también con los máximos locales deducidos de los datos de Tiempo de Vida anteriormente mencionados. De hecho el colesterol ha sido reconocido por disminuir la penetración del agua en lamelas de lípidos ([Parasassi et al., 1994a](#); [Marsh 2002](#)). Sin embargo, en los resultados se pudo observar que la curva es creciente en los primeros 4 puntos, desde 0% mol de CHO hasta 33,3% mol de CHO. En este cuarto valor ocurre una disminución de la PG de Laurdan (Fig. 32).

La presencia de Colesterol afecta principalmente el orden y la estructuración de las cadenas hidrocarbonadas, generando una fase líquido ordenada donde las cadenas se encuentran relativamente rígidas, similar al estado gel, pero permitiendo una importante difusión en el plano de la membrana, como sucede en la fase Líquida-Cristalina. ([Ulrich A.S. 2002](#)).

La anisotropía de fluorescencia de DPH está directamente relacionada con el orden y la fluidez de los fosfolípidos en las bicapas, ya que se encuentra afectada por los cambios en la orientación de las sondas fluorescentes debido al movimiento de tipo rotacional de las mismas.

Los cambios en la Anisotropía de DPH con el incremento del contenido de Colesterol en la bicapa siguen una tendencia general con los cambios ya publicados en la literatura ([Lentz et al., 1980](#)).

En los resultados obtenidos para los ensayo de Anisotropía de DPH, se pudo observar que sus valores siguen una tendencia creciente a medida que se fue aumentando la concentración de Colesterol, lo cual provocó un aumento en la anisotropía en todos los ensayos con las LUV's (Fig. 33). Con estos resultados se puede confirmar el efecto del colesterol en las membranas, de provocar mayor orden de empaquetamiento en las lamelas. Esto de acuerdo a los fundamentos de la Anisotropía de fluorescencia los cuales indican que las medidas de anisotropía de fluorescencia se basan en el principio de excitación fotoselectiva de las sondas mediante luz polarizada ([Lakowicz, J.R. 2006](#)). La excitación selectiva da lugar a una población de sondas parcialmente orientada de similar manera que la orientación de la luz de excitación y por tanto a una emisión de fluorescencia parcialmente polarizada. Cualquier cambio en la orientación del momento dipolar de absorción de la sonda durante el tiempo de vida media del estado excitado, provoca una disminución de la anisotropía de la fluorescencia emitida. Existen numerosos factores que producen una despolarización de la fluorescencia emitida, en este caso la libertad de movimiento rotacional de la molécula excitada. A partir de la extensión con que se produce la despolarización de la fluorescencia, se puede obtener información sobre los movimientos moleculares, que dependen del orden y la fluidez del microentorno

de la sonda molecular. En este ensayo al hacer incidir luz polarizada a la sonda DPH esta se excita, pero la emisión no es polarizada completamente ya que los movimientos rotacionales que realiza la sonda durante el tiempo de vida media de fluorescencia provocan que la luz se despolarice. En consecuencia una mayor despolarización es causada por un mayor movimiento rotacional de la sonda, lo que es producto a la vez, de que tiene más espacio para poder rotar. Este aumento en el espacio para rotación es debido a que la sonda se encuentra más libre en la membrana, lo que disminuye la anisotropía. Por lo tanto a medida que se incrementa la cantidad de Colesterol se produce un aumento en la Anisotropía lo cual se asocia a un mayor orden de las moléculas en las membranas causado por la pérdida de fluidez en estas bicapas lipídicas.

Con el objetivo de evaluar el proceso de fusión y correlacionarlo con las propiedades fisicoquímicas de la membrana se realizaron ensayos de formación de excímero con sondas derivadas de Pireno. Los ensayos realizados con las sondas derivadas de Pireno, se basaron en la capacidad de estas sondas para formar Excímeros que emiten luz fluorescente.

Los resultados fueron obtenidos en base a la razón de intensidades de los Excímeros y los Monómeros de Pireno. El grado de incorporación de la sonda en las vesículas de fosfolípidos se refleja en que la sonda produce una significativa intensidad de fluorescencia del Excímero (dímeros de un monómero excitado y un monómero en el estado basal) en la superficie de las vesículas. En consecuencia, durante la “fusión” entre las LUV’s marcadas con Pireno y sin Pireno, la dilución de la sonda en la membrana fue seguida por la disminución de la intensidad de fluorescencia del Excímero.

Es importante destacar que en los experimentos descritos anteriormente, la unión de sondas a LUV’s y la fusión entre las vesículas es estrictamente dependiente de la presencia de colesterol en la membrana, lo que concuerda con lo observado por diferentes investigadores. (Pal et al., 1988; Wahlberg et al., 1992; Bron R et al., 1993; Stegmann et al., 1993; Bron et al., 1994)

Para esto se midieron espectros de emisión de fluorescencia antes y después de los ensayos de fusión a LUV's con DPPC DOPC y CHO 0%; 15%; 22,2%; 33,3% y 40% mol.

En los resultados con la sonda PDA se observó que las LUV's "antes del ensayo de fusión" presentaron mayores valores de intensidad de fluorescencia en el máximo de emisión del Excímero, que los observados en el ensayo "después de la fusión" (Fig. 34). Esto es lógicamente correcto ya que el Pireno en las LUV's, "antes de la fusión", está en mayor concentración en las membranas lipídicas, por ende mayor emisión de intensidad de fluorescencia, pero cuando se mezclan estas LUV's con las vesículas que no contienen la sonda en sus lamelas, la emisión de fluorescencia de los Excímeros disminuye, ya que al momento de mezclarse los lípidos de las membranas en la "fusión de vesículas", también lo hacen las sondas de Pireno, por lo tanto se diluye su concentración en la nueva membrana formada lo cual permite una menor probabilidad de encontrarse dos monómeros de Pireno para formar dichos Excímeros que emiten fluorescencia al estar excitados. Esto explica, en los gráficos, la diferencia que se presenta entre las curvas de emisión de fluorescencia de las LUV's "antes y después de la fusión".

Los gráficos de la sonda PyPC con respecto a la emisión de fluorescencia, no son mostrados en este estudio, ya que son muy similares a los de la sonda DPA y su presentación grafica no entrega más información que los gráficos de determinación de la razón Excímero/Monómero, por lo que sus presentaciones fueron omitidas al ser más bien demostrativa que concluyente.

Es válido mencionar que en los ensayos con PDA y PyPC, a 33,3% mol de CHO se observó una mayor intensidad de emisión de fluorescencia para el Excímero. En los gráficos de emisión de fluorescencia.

En los ensayos con PDA, los gráficos donde se presentan las curvas de determinación de la razón Ex/Mon., reflejan que en todos los ensayos hubo "fusión" de las LUV's reflejando una mayor eficiencia de fusión las vesículas con 33,3 % mol de

CHO. Esto puede ser interpretado en los gráficos mediante la distancia que se forma entre las curvas que representan los ensayos antes y después de la “fusión”, como se puede observar en las LUV’s con 33,3% mol de CHO, en donde se ve la mayor distancia, lo cual se interpreta como una mayor eficiencia de “Fusión” (Fig. 35a).

Para descartar la idea de un posible efecto de dilución sobre la razón Ex/Mon., se utilizó muestras de LUV’s a las correspondientes concentraciones de colesterol, mezclándolas con igual volumen de buffer. Esto se realizó porque podría ocurrir un posible efecto de dilución de las sondas que están insertas en las membranas ya que en el ensayo de “fusión” de las LUV’s se mezclan dos cantidades de volúmenes uno con sonda y otro sin sonda, por lo tanto se pensó que al haber más cantidad de agua en el medio las sondas tenderían a salir de las membranas y esto provocar que no se pudieran formar los Excímeros. Se observó que la dilución no afecta significativamente las intensidades, y por lo tanto no influye en la razón Excímero/Monómero (Fig. 35b)

Los ensayos realizados con Pireno PC fueron analizados de la misma forma que los ensayos realizados con la sonda PDA. Con los valores de intensidad de fluorescencia para el Monómero y Excímero, se determinó la relación Ex/Mon de las LUV’s, antes y después de los ensayos de fusión. Se observó también que las vesículas con 33,3% mol de CHO presentaron el valor más alto de la razón en ambas mediciones. (Fig. 36a) y que los ensayos control para descartar el efecto dilución tampoco influyen en la razón Ex/Mon (Fig.36b).

Los datos reflejan también que todos los ensayos de fusión de las membranas resultaron exitosos demostrando una mayor eficiencia de fusión en las vesículas con 33,3 % mol de CHO.

Cabe destacar que en estos ensayos se puede confirmar la fusión de membranas en las vesículas unilamelares pero no se puede garantizar el intercambio de contenido interno en las LUV’s

En los resultados obtenidos se comprueba lo que se ha observado con respecto a que el efecto de la presencia del colesterol no es lineal con su concentración,

habiéndose detectado discontinuidades en algunas propiedades de la bicapa. Por ejemplo la fluidez ([Lian and Ho 2000](#); [Veatch and Keller 2002](#)).

De esta manera, las bicapas lipídicas pueden presentar dominios, más conocidos como “*rafts*”, los cuales se encuentran enriquecidos en colesterol. Se ha sugerido que estos “*rafts*”, desempeñan un papel importante en la selección de moléculas de membranas y en la transducción de señales en las células animales. El colesterol cumple un rol importante en la formación de estos “*rafts*”, ya que estos se encuentran, como se mencionó, generalmente enriquecidos de colesterol y además la perturbación del colesterol asociado a membranas celulares puede inducir cambios importantes en la distribución y/o función de los componentes de los “*rafts*” ([Silvius J. R. 2003](#)).

A ciertas concentraciones, el colesterol es responsable de la formación de “*rafts*” en las membranas lo que podría dar explicación a los resultados obtenidos en este estudio para las LUV´s con 33,3% de CHO, pero cabe destacar que estos “*rafts*” no existen en el estado Gel, por lo que su presencia si podría estar en estas LUV´s ya que se utilizó mezcla de lípidos con diferentes  $T_m$  como lo es DOPC y DPPC y se midió a una temperatura intermedia (37°C). La separación de distintos tipos de estado de fase puede ocurrir en mezclas ternarias de fosfolípidos incluido el colesterol en donde puede haber presencia de estos “*rafts*”. En estas mezclas ternarias, en el estado de fase Líquido Ordenado (Lo), las cadenas acílicas de los lípidos están extendidas y estrechamente apretadas, como en la fase Gel, pero tienen un alto grado de movilidad lateral. El colesterol puede promover la formación de dominios en donde coexisten estado Líquido desordenado y líquido ordenado ([Brown and London 2000](#); [Xu and London 2000](#)). Esta formación de dominios podría explicar las irregularidades en las curvas de las mediciones de las propiedades físico-químicas en la zona de los 33,3% mol de CHO, ya que, como estas balsas de lípidos en las membranas denominadas en inglés como “*rafts*” son agregados lipídicos ricos en Colesterol, esto provocaría que: como el colesterol se está agrupando en ciertas locaciones y solo a determinadas concentraciones para formar estos dominios, se están produciendo zonas ricas en CHO, en las cuales existe una menor dinámica de agua. Esta menor hidratación local que se produce en la membrana, sería la causa de la discontinuidad en las curvas de las

mediciones de las propiedades de la lamela en la zona de los 33,3% mol de CHO. Esto a la vez explicaría el hecho que en esta zona de los 33,3%mol de CHO se haya producido una mayor eficiencia en los ensayos de “fusión” de las lamelas, ya que al haber en esta zona agrupaciones de colesterol como lo son los “rafts”, esto favorecería los procesos fusogénicos, fundamentado en la base que: en experimentos descritos anteriormente, se ha demostrado que la fusión entre las vesículas es estrictamente dependiente de la presencia de colesterol en la membrana. (Pal et al., 1988; Wahlberg et al., 1992; Bron R et al., 1993; Stegmann et al., 1993; Bron et al., 1994) y por otro lado también, estudios recientes de Zhang et al., (2009). evidenciaron que el colesterol cumple un rol importante en el inicio del proceso de fusión de vesículas.

Los resultados de este trabajo, en particular los relacionados con las propiedades de la lamela, se han explicado anteriormente en el contexto de la de la teoría de la súper red o modelo de distribución regular (Chong, P.L.G. 1994). También de acuerdo con este modelo, la composición lipídica de la membrana, espontáneamente tiende a la formación de la súper red, ya que cada súper red se cree que representan un mínimo local de energía libre. La consecuencia de que el volumen libre varía con el contenido de colesterol de forma alternada tiene importantes implicaciones biológicas, como el volumen libre de la membrana se sabe que afecta a un gran número de actividades de la membrana, incluyendo la difusión lateral, la fusión de membranas, la partición de drogas, la transferencia de lípidos espontánea entre membranas, y la acción de las proteínas de membrana (Chong et al., 2009).

Desde entonces los estudios de modelos de membrana han puesto de manifiesto que el colesterol tiene una tendencia a formar súper redes en el plano fluido de las membranas, se ha propuesto también que este principio físico debe ser verdad al menos en cierta medida en las membranas celulares, lo que sugiere que súper redes pueden ocurrir en ciertas áreas de algunas membranas biológicas que pueden incluir las balsas lipídicas o “rafts” (Chong et al., 2009).

## CONCLUSIONES

Cambios en el contenido de Colesterol de las membranas biológicas, es sabido que alteran las propiedades físico-químicas de las membranas lipídicas influyendo en la fusión de membranas. Para comprender mejor el mecanismo del efecto del colesterol en las bicapas lipídicas, se utilizó espectroscopía de fluorescencia resuelta en el tiempo y en estado estacionario para estudiar la influencia del Colesterol sobre las propiedades dinámicas, estructurales y orden de los lípidos en vesículas unilamelares largas compuestas por la mezcla de dos fosfolípidos: DOPC y DPPC que producen, como se sabe bien, formación de dominios. Se seleccionaron dos sondas fluorescentes las cuales se insertan en diferentes regiones al interior de la bicapa. La sonda DPH que se sitúa en las profundidades de las cadenas acílicas en el núcleo de las regiones hidrofóbicas y Laurdan con su fracción fluorescente situada en la interface hidrofílica-hidrofóbica de la membrana. El grado de hidratación en ambos lugares de la bicapa fue evaluado por los datos de tiempo de vida de fluorescencia de ambas sondas DPH y Laurdan y por los datos de Polarización Generalizada de Laurdan en la interface de la membrana. El orden y la dinámica orientacional de los fosfolípidos se estudiaron con las medidas de la anisotropía de DPH

Para comprobar si estas alteraciones en las propiedades físico-químicas afectaron el proceso fusogénico, se utilizó, para los ensayos de fusión, las sondas PDA y PyPC las cuales se sitúan entre las cadenas de los lípidos de las membranas. La información acerca de las ensayos de fusiones de las vesículas se obtuvo mediante los resultados de la razón Excímero/Monómero determinada antes y después de los ensayos de fusión. Todas las medidas fueron realizadas a 37°C.

En este trabajo, por lo tanto se estudió la influencia del colesterol sobre las propiedades dinámicas y estructurales de la bicapa de vesículas unilamelares largas.

El efecto global de la incorporación de colesterol en la disminución de la hidratación de la bicapa es similar en las tres medidas de las propiedades físico químicas de la lamela.

En el aspecto de los datos relacionados con la fluidez de las membranas, obtenidos de las mediciones de Tiempo de Vida se pudo razonar que con el aumento del colesterol disminuye la hidratación en las bicapas en ambas profundidades, ya sea cerca de las cabezas polares, como también en las profundidades de las colas acílicas. Se pudo observar un aumento en la deshidratación de las lamelas, teniendo un claro cambio en la tendencia en los 33.3%mol de CHO en donde comienza a descender.

La fluidez como también el grado de hidratación entre los lípidos de las membranas, fueron medidas por la Polarización generalizada de Laurdan, con la cual se determinó que la pérdida de volumen de agua en la interfase de las membranas se ve influenciada por el aumento del contenido de Colesterol. En este caso también se pudo observar una tendencia creciente en la curva de la PG, pero llegando a los 33,3% mol CHO disminuye, por lo cual se pudo determinar un máximo en las zona de los 33,3%mol de CHO.

El orden y el empaquetamiento de los fosfolípidos se estudiaron con las medidas de anisotropía de DPH. Con estos datos se pudo concluir, al igual que las medidas de tiempo de vida y de la polarización generalizada de Laurdan, que hay un aumento en la deshidratación de las bicapas de las vesículas debido al aumento del contenido de Colesterol. En esta medición los resultados se pueden razonar de modo que, con el incremento de la Anisotropía disminuye la fluidez de las lamelas, lo cual, le permite a los fosfolípidos mantener un mayor orden en sus membranas, ya que se encuentran a la vez con menos libertad de movimiento y con un mayor empaquetamiento.

Los experimentos de fusión de las LUV's demostraron que todos los ensayos fueron exitosos, ya que, en todas la vesículas, independiente de su contenido de CHO, hubo "fusión"

En los ensayos con la sonda fluorescente DPA no se puede apreciar una tendencia creciente en las razones Excímero/Monómero ni antes ni después de los ensayos de "fusión" debido al incremento de la concentración de Colesterol en las

bicapas, pero si se pudo observar que en la zona de los 33,3% mol de CHO es donde se presenta una mayor eficiencia de “fusión” de las vesículas.

Por otro lado cuando se utilizó la sonda fluorescente PyPC, la curva en los ensayos de fusión en la determinación de la razón Excímero/Monómero, si refleja una tendencia creciente en la curva, notándose un máximo local en las zona de los 33,3% mol de CHO seguido de una disminución de la razón, en ambas curvas: antes y después de la “fusión”. En esta ocasión también se demuestra en los resultados, que hubo una mayor eficiencia de fusión de las membranas en las zona de los 33,3% mol de CHO.

En base a estos estudios se puede concluir que el incremento de Colesterol en las membranas compuestas por la mezcla DOPC y DPPC a 37°C provoca una deshidratación en las bicapas lipídicas. Estos cambios no son lineales, tal como lo respaldan estudios anteriores. Se pudo determinar un máximo local a la concentración de 33,3%mol de CHO en las LUV's, siendo esta concentración determinante en los ensayos de fusión realizados, ya que esta concentración demostró ser la más óptima para que ocurran los eventos de fusión en las membranas.

Esto puede ser explicado de modo que en esta concentración de Colesterol se ha encontrado presencia de microdominios en las bicapas. Además con estos resultados se puede confirmar la hipótesis de que “variaciones discretas en el contenido de colesterol en vesículas sintéticas de fosfolípidos producen cambios en las propiedades físicas de la lamela, los cuales afectan el proceso de fusión vesícula-vesícula

Finalmente se puede decir que en el campo de la biotecnología, debido a grandes e importantes avance en, farmacéutica, biomedicina y cosmetológica, se hace necesario el estudio básico del comportamiento químico-físico de los procesos aplicados a esta industria y a la vez el estudio de las propiedades fusogénicas de vesículas lipídicas, lo que permite un conocimiento necesario, al momento de tomar las decisiones de utilizar liposomas como posibles vehículos o *carrier* para drogas vitaminas o genes. En la actualidad se desconoce la relación entre la presencia de microdominios de las

vesículas lipídicas, con la capacidad fusogénica de estas. Sin embargo estudios recientes han demostrado que la composición lipídica juega un rol importante en la fusión célula-vesícula. ([Zhang et al., 2009](#)) evidencian que el colesterol cumple un rol importante en el inicio del proceso de fusión de vesículas y con esta tesis se evidencia a la vez y aun más, la influencia de la presencia del colesterol en las variaciones de las propiedades físico químicas.

## REFERENCIAS

1. Aguilar, L. F., C.P. Sotomayor and E.A. Lissi. 1996. *Main Phase Transition Depression by Incorporation of Alkanols in DPPC Vesicles in the Gel State. Influence of the Solute Topology. Colloids and Surfaces A* 108(2/3),287-293.
2. Aguilar L.F. 1999. Influencia de las Propiedades Físico-Químicas de la Fase Lipídica en la actividad de Na, K-ATPasa. Tesis para optar al Grado de Doctor en Ciencias con Mención Química. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso (PUCV). 105 p. Valparaíso Chile.
3. Allen, T.M., C.Hansen, F.Martin, C.Redemann, and A.Yau-Young. 1991. *Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo. Biochim. Biophys. Acta* 1066:29-36.
4. Almeida, R. L.Loura, M.Prieto. 2009. *Membrane lipid domains and rafts: current applications of fluorescence lifetime spectroscopy and imaging. Chemistry and Physics of Lipids* 157 61–77.
5. Bagatolli, L.A.; B.Maggio, F.Aguilar, C.P.Sotomayor and G.D.Fidelio. 1997. *“Laurdan properties in glycosphingolipid-phospholipid mixtures: a comparative fluorescence and calorimetric study.” Biochimica et Biophysica Acta*, 1325, 80-90.
6. Bron R., J.M.Wahlberg, H.Garoff and J.Wilschut. 1993. *Membrane fusion of Semliki Forest virus in a model system: correlation between fusion kinetics and structural changes in the envelope glycoprotein. The EMBO Journal* vol.12 no.2 pp.693-701, 1993.
7. Bron, R., A.Ortiz and J.Wilschut. 1994. *Cellular Cytoplasmic Delivery of a Polypeptide Toxin by Reconstituted Influenza Virus Envelopes (Virosomes). Biochemistry* 1994, 33, 9 1 10-9 1 17
8. Brown, D. A., and E. London. 2000. *Structure and function of Sphingolipid-and-Cholesterol-rich Rafts, The Journal of Biological Chemistry*, 275 (23) pp 17221-17224
9. Caracciolo, G., R.Caminiti, M.A.Digman, E.Gratton, and S.Sanchez. 2009. *Efficient escape from endosomes determines the superior efficiency of multicomponent lipoplexes. J. Phys. Chem. B* 113:4995-4997.
10. Campbell, M.K. and S.O.Farrell. 2009. *Biochemistry* 6<sup>ta</sup> edición cap 8.
11. Carmona-Ribeiro, A.M. 2003. *Bilayer-forming synthetic lipids: Drugs or carriers? Current Medicinal Chemistry.* **10**(22): p. 2425-2446.

12. Chernomordik, L.V., and M.M. Kozlov. 2008. *Mechanics of membrane fusion. Nature structural & molecular biology volume 15 number 7 review.*
13. Chong, P.L.G. 1994. *Evidence for regular distribution of sterols in liquid crystalline phosphatidylcholine bilayers. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91:10069-10073.*
14. Chong, P.L.G., W. Zhu, and B. Venegas. 2009. *On the lateral structure of model membranes containing cholesterol. Biochim. Biophys. Acta 1788:2-11*
15. Contreras, B.C. 2010. *Influencia del estado de fase de lípidos y su comportamiento con colesterol en la permeabilidad de naproxeno y verapamilo. Tesis para optar al Grado Académico de Licenciado en Química y Farmacia y al Título de Químico Farmacéutico. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago de Chile.*
16. De Jong, W.H., and P.J.Borm. 2008. *Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. Int. J. Nanomedicine. 3:133-149.*
17. Du, H., M. Wu, W. Yang, G. Yuan, Y. Sun, Y. Lu, S. Zhao, Q. Du, J. Wang, S. Yang, M. Pan Y. Lu, S. Wang, and J. Cheng. 2005. *Development of miniaturized competitive immunoassays on a protein chip as a screening tool for drugs. Clin. Chem. 51:368-375.*
18. Du, S.L., H. Pan, W.Y. Lu, J. Wang, J. Wu, and J.Y. Wang. 2007. *Cyclic Arg-Gly-Asp peptide-labeled liposomes for targeting drug therapy of hepatic fibrosis in rats. J. Pharmacol. Exp. Ther. 322:560-568.*
19. Frisken, B.J., C. Asman, and P.J. Patty. 2000. *Studies of vesicle extrusion. Langmuir. 16(3): p. 928-933*
20. Fujii, G., S.Horvath, S.Woodward, F.Eiserling, and D.Eisenberg. 1992. *A molecular model for membrane fusion based on solution studies of an amphiphilic peptide from HIV gp41. Protein Sci. 1:1454-1464.*
21. Garda, H.A., A.M. Bernasconi, M.A. Tricerri, R. R. Brenner, F. Aguilar, M.A. Soto and C.P. Sotomayor. 1997. *Polyunsaturated fatty acid deficiency. Their effect on the lipid bilayer dynamics of rat liver microsomes. Chemistry and Physics of Lipids. 88 (2), 137-138.*
22. Garelli, N., and P.Vierling. 1992. *Incorporation of new amphiphilic perfluoroalkylated bipyridine platinum and palladium complexes into liposomes: stability and structure-incorporation relationships. Biochim. Biophys. Acta 1127:41-48.*
23. Haque, M.E., T.J.McIntosh, and B.R.Lentz. 2001. *Influence of lipid composition on physical properties and peg-mediated fusion of curved and uncurved model membrane vesicles: "nature's own" fusogenic lipid bilayer. Biochemistry 40:4340-4348.*

24. Horton, H.R., L.A.Moran, K.G.Scrimgeour, M.D.perry and J.D.Rawn. 2008. Principios de Bioquímica 4<sup>ta</sup> edición. Pearson educación, México Cáp 9
25. Jesorka, A., and O. Orwar. 2008. *Annual Review of Analytical Chemistry. Liposomes: Technologies and Analytical Applications*. 1:801–832.
26. Kessel, A., N. Ben-Tal, and S. May. 2001. *Interactions of cholesterol with lipid bilayers: The preferred configuration and fluctuations. Biophysical Journal*. 81(2): p. 643-658.
27. Lakowicz, J.R. 2006. *Principles of Fluorescence Spectroscopy* 3<sup>era</sup> edición.
28. Lanio. M.E., M.C. Luzardo, R. Laborde, O. Sánchez, Y. Cruz-Leal, F. Pazos, M. Tejuca, A. Valle, M.E. Alonso, L.E. Fernández, C. Alvarez. 2009. Las vesículas liposomales: obtención, propiedades y aplicaciones potenciales en la biomedicina Revista. Cubana de Física vol .26, No. 1 p 23-30 ISSN: 0253-6268. Review
29. Lee, R.J. and P.S.Low. 1994. *Delivery of liposomes into cultured KB cells via folate receptor-mediated endocytosis. J. Biol. Chem.* 269:3198-3204.
30. Lee, J. and B.R.Lentz. 1997. *Outer leaflet-packing defects promote poly(ethylene glycol)-mediated fusion of large unilamellar vesicles. Biochemistry* 36:421-431.
31. Leikin, S., M.M.Kozlov, N.L.Fuller, and R.P.Rand. 1996. *Measured effects of diacylglycerol on structural and elastic properties of phospholipid membranes. Biophys. J.* 71:2623-2632.
32. Lentz,B.R., D.A.Barrow and M.Hoenchi. 1980. *Cholesterol-phosphatidyl choline Interations in multilamellar vesicles. Biochemistry* 19: 1943-1954
33. Lentz, B.R., T.J.Carpenter, and D.R.Alford. 1987. *Spontaneous fusion of phosphatidyl- choline small unilamellar vesicles in the fluid phase. Biochemistry* 26:5389-5397.
34. Lian, T. and R.J.Y. Ho, *Trends and development in liposome drug delivery systems. 2000. J. Pharm. Sci.* 90(6): p. 667-680.
35. Litzinger, D.C. and L.Huang. 1992a. *Amphipathic poly(ethylene glycol) 5000-stabilized dioleoylphosphatidylethanolamine liposomes accumulate in spleen. Biochim. Biophys. Acta* 1127:249-254.
36. Litzinger, D.C. and L.Huang. 1992b. *Phosphatidylethanolamine liposomes: drug delivery, gene transfer and immunodiagnostic applications. Biochim. Biophys. Acta* 1113:201-227.

37. Marsh, D. 2002. Membrane water penetration profiles from spin labels. *Eur. Biophys J.*31:559-562.
38. Matthew, N. and M.D.Levy. 1999. Fisiología; 2da Edición, Harcourt Brace, Santiago Chile. Cáp 1.
39. Meer G. V., Voelker D. R., Feigenson G. W., 2008. *Membrane lipids: where they are and how they behave, Nature published group* 9 pp 112-124
40. Nelson, D.L. and M.M.Cox. 2000. Lehninger Principios de Bioquímica 3<sup>era</sup> edición. Cáp 4 y 12.
41. Nelson, D.L. and M.M.Cox. 2009. Lehninger Principios de Bioquímica 5<sup>ta</sup> edición. Cáp 10 y 11.
42. Pal, R., Y.Barenholz and R.R.Wagner. 1988. *Pyrene Phospholipid as a Biological Fluorescent Probe for Studying Fusion of Virus Membrane with Liposomes. Biochemistry* 1988, 27, 30-36
43. Papahadjopoulos, D., T.M.Allen, A.Gabizon, E.Mayhew, K.Matthay, S.K.Huang, K.D.Lee, M.C.Woodle, D.D.Lasic, C.Redemann, F.J.Martin. 1991. *Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88:11460-11464.
44. Parasassi T., Di Stefano M., Loiero M., Ravagnan G., Gratton E., 1994. *Cholesterol modifies water concentration and dynamics in phospholipid bilayers: A fluorescence study using laurdan probe, Biophysical Journal*, 56 pp 763-768.
45. Parasassi T., Di Stefano M., Loiero M., Ravagnan G., Gratton E., 1994. *Influence of Cholesterol on phospholipid Bilayers Phase Domains as detected by laurdan Fluorescence, Biophysical Journal*, 66 pp 120-128.
46. Parasassi, T., A.M.Giusti, M.Raimondi, and E.Gratton. 1995. *Abrupt modifications of phospholipid bilayer properties at critical cholesterol concentrations. Biophys. J.* 68:1895-1902
47. Parasassi, T., et al. 1990. *Phase fluctuation in phospholipid membranes revealed by Laurdan fluorescence. Biophysical Journal*,. **57**: p. 1179-1186.
48. Sanchez, S.A., M.A.Tricerri, G. Gunther and E. Gratton. 2007. *Laurdan Generalized Polarization: from cuvette to microscope. Modern Research and Educational Topics in Microscopy.* A. Méndez-Vilas and J. Díaz (Eds.) ©FORMATEX.
49. Sankaram M. B., Thompson T.E., 1990. *Interaction of Cholesterol with Various Glycerophospholipids and Sphingomyelin, Biochemistry* 29 pp 10670-10675

50. Shibata, H., S.Nakagawa, T.Mayumi, and Y.Tsutsumi. 2004. *Development of novel drug delivery system (DDS) technologies for proteomic-based drug development. Biol. Pharm. Bull.* 27:1483-1488.
51. Silvius J. R., 2003. *Role of cholesterol in lipid raft formation: lessons from lipid model systems, Biochimica et Biophysica Acta*, 1610(2003) pp 174-183.
52. Simons, K. and E.Ikonen. 1997. *Functional rafts in cell membranes. Nature* 387:569-572.
53. Sotomayor, C.P., L.F. Aguilar, F.J. Cuevas, M.K. Helms and D. Jameson "Modulation of pig kidney (Na,K)-ATPase activity by cholesterol: Role of hydration". *Biochemistry* 39 (35), 10928 (2000).
54. Stegmann, T., P.Schoen, R.Bron, J.Wey, I.Bartoldus, A.Ortiz, J.L.Nieva and J.Wilschuts. 1993. *Evaluation of Viral Membrane Fusion Assays. Comparison of the Octadecylrhodamine Dequenching Assay with the Pyrene Excimer Assay. Biochemistry* 1993,32, 11 330-1 1337
55. Tarshis, M., M.Salman, and S.Rottem. 1993. *Cholesterol is required for the fusion of single unilamellar vesicles with Mycoplasma capricolum. Biophys. J.* 64:709-715.
56. Toro, C.A. 2006. Efecto de la adición de 6-O-Miristil Sacarosa sobre la bicapa de liposomas de POPC y vesículas de DODAC. Memoria para optar al Título de Químico. Universidad de Chile. Santiago de Chile.
57. Ulrich, A.S., 2002. *Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles. Bioscience Reports*, . 22(2): p. 129-150.
58. Veatch, S.L. and S.L.Keller. 2002. *Organization in lipid membranes containing cholesterol. Physical Review Letters*,. 89(26): Art. No. 268101.
59. Veatch, S.L. and S.L.Keller. 2003. *Separation of Liquid Phases in Giant Vesicles of Ternary Mixtures of phospholipids and Cholesterol. Biophysical Journal*. 85. 3074.
60. Wahlberg, J.M., R Bron, J.Wilshut and H.Garoff. 1992. *Membrane Fusion of Semliki Forest Virus Involves Homotrimers of the Fusion Protein. Journal of Virology*, Vol. 66, No. 12, p. 7309-7318
61. Weber,G. and F.J.Farris, 1979. *Synthesis and Spectral Properties of a Hydrophobic Fluorescent Probe: 6-Propionyl-2-(dimethylamino)naphthalene. Biochemistry*, **18**(14): p. 3075-3078.
62. Wilschut, J., N.Duzgunes, D.Hoekstra, and D.Papahadjopoulos. 1985. *Modulation of membrane fusion by membrane fluidity: temperature dependence of divalent cation induced fusion of phosphatidylserine vesicles. Biochemistry* 24:8-14.

63. Wu, H., L.Zheng and B.R.Lentz. 1996. *A slight asymmetry in the transbilayer distribution of lysophosphatidylcholine alters the surface properties and poly(ethylene glycol)-mediated fusion of dipalmitoylphosphatidylcholine large unilamellar vesicles. Biochemistry* 35:12602-12611.
64. Xu, X., E. London. 2000. *The effect of Sterol Structure on Membrane Lipid Domains Reveals How Cholesterol Can Induce Lipid Domain Formation. Biochemistry*, 39 (5) pp 843-849
65. Yang, Q., Y.Guo, L.Li and S.W.Hui. 1997. *Effects of lipid headgroup and packing stress on poly(ethylene glycol)-induced phospholipid vesicle aggregation and fusion. Biophys. J.* 73:277-282.
66. Zannoni. C., A.Argioni and P.Cavatorta. 1983. *Fluorescence depolarization In liquid crystals and membrane bilayers. Chem. Phys. Lipids* 32: 179-250.
67. Zhang J, Xue R, Ong WY, Chen P. 2009 *Roles of cholesterol in vesicle fusion and motion. Biophys J.* Sep 2; 97(5):1371-80.
68. Zorrilla López S. 2002. Estructura y dinámica de proteínas en condiciones de aglomeración macromolecular. Desarrollo de métodos avanzados de espectroscopia láser de fluorescencia con resolución temporal de picosegundos. ISBN: 84-669-1850-7
69. © Avanti Polar Lipids, Inc.  
[http://www.avantilipids.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=231&Itemid=207&catnumber=850375](http://www.avantilipids.com/index.php?option=com_content&view=article&id=231&Itemid=207&catnumber=850375)
70. © Avanti Polar Lipids, Inc.  
[http://www.avantilipids.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=216&Itemid=206&catnumber=850355](http://www.avantilipids.com/index.php?option=com_content&view=article&id=216&Itemid=206&catnumber=850355)
71. © 2011 ISS, Inc.  
[http://www.iss.com/resources/research/technical\\_notes/K2CH\\_FLT.html](http://www.iss.com/resources/research/technical_notes/K2CH_FLT.html)
72. © 2008 Northern Lipids Inc.  
<http://www.northernlipids.com/products/documents/Extruder%20Assembly%20and%20Operating%20Manual.pdf>
73. © 2011 Life Technologies  
<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Technical-Notes-and-Product-Highlights/Lipid-Mixing-Assays-of-Membrane-Fusion.html>