

204-FC
L12-F
3422
CA

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE FISICA

ASPECTOS ESTRUCTURALES DE LA INTERRELACION ENTRE
LIPIDOS Y PROTEINAS EN MEMBRANAS



RAMON J.F. ELIAS MUÑOZ

INFORME DE INVESTIGACION PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADO EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN FISICA

Director de Tesis: Dr. Carlos Doggenweiler F.

SANTIAGO-CHILE, 1978

AGRADECIMIENTOS

Mis sinceros agradecimientos a mi Director de Tesis Dr. Carlos Doggenweiler, por su constante estímulo y depositar su confianza en mi capacidad.

Al Profesor Víctor Monasterio, por enseñarme el uso del Microscopio Electrónico y por su valiosa ayuda en la confección de los diagramas de la Tesis.

Al Dr. Osvaldo Alvarez, por facilitarnos equipos y materiales además de sus oportunos consejos.

Al Dr. Luis Izquierdo por su apoyo e interesarme en el desarrollo de la técnica de Criograbado y en el uso del Microscopio Electrónico.

Al Dr. R. Steere, por su valiosa ayuda y enseñanza en el montaje y aplicación de la técnica de criograbado.

Un especial reconocimiento a mi esposa, que gracias a su sacrificio y ayuda hizo posible que alcanzara esta etapa de mi formación. A mi madre que con esto ve coronado un sueño.

A mis hijos

I N D I C E D E M A T E R I A S

	Pág.
ABSTRACT	0
INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	23
MATERIALES Y METODOS	24
1. Preparación de membranas artificiales y Registro de conductividad de las mem branas	24
Materiales	26
Procedimiento	27
Registro de conductividad	30
Registro de Capacidad	32
2. Criograbado y obtención de Microfotografías. Criograbado de las membranas	34 42
RESULTADOS	48
I Membranas artificiales	48
II Membranas fotorreceptoras	54
DISCUSION	57
I Membranas artificiales	58
II Membranas fotorreceptoras	67
CONCLUSIONES	78
APENDICE	83
REFERENCIAS	84
ILUSTRACIONES	88

SUMMARY

The interpretation of the processes that occur in relation with biological membranes or membrane-bound organelles, is intimately related with the organization of these membranes, thus, advances in the knowledge of the structure and molecular relationships are of foremost importance to the understanding of their biological properties.

We have applied the freeze-etching technique to a model membrane (a complex lipid bilayer), a novel method that produces no chemical alteration to the bilayers.

Observations of Platinum- or Chromium- shadowed replicas under the Electron Microscope show that Hemocyanin and/or their subunits penetrate in the depth of the bilayer and appear themselves covered on both sides by the lipids. The application of freeze-etching to photoreceptores demonstrates that the disc membrane have an asymmetrical protein distribution.

In conclusion: the current concept of biological membran structure cannot be applied fully to our membrane model and probably neither to any type of membrane; in fact, each active membrane has an peculiar organization to be understood in terms of its biological function.

INTRODUCCION

Las primeras evidencias sobre la existencia y propiedades de las membranas biológicas se remontan a los trabajos de OVERTON de mediados del siglo pasado, quien observó que ciertas membranas celulares eran penetradas más fácilmente por sustancias de alta solubilidad en lípidos en comparación con sustancias más polares o solubles en agua. Esto le permitió postular la existencia de lípidos entre los componentes de las membranas biológicas, los que determinarían la permeabilidad de éstas.

A principio de siglo la idea predominante era que la superficie celular constituía un sitio de almacenamiento de lípidos. En 1917 LANGMUIR publicó sus experimentos sobre películas monomoleculares de lípidos esparcidas en la interfase aire-agua, los que además de ser los primeros en esta línea contribuyeron en forma sustancial a la concepción actual sobre la estructura de las membranas. El demostró que las moléculas de lípidos anfífilos pueden esparcirse sobre una superficie de agua.

en la interfase aire-agua, con sus extremos polares orientados hacia la parte acuosa y la parte no polar, la cadena de hidrocarburos, en la fase aire. Observó además, que era posible comprimir estas películas de forma tal que las moléculas estuvieran muy juntas entre sí, como se muestra en el diagrama 1.

Mediante el uso de gráficos Fuerza vs Area, diagrama 2, pudo mostrar que había asociada a cada película de lípidos una presión máxima bien definida. En el punto de máxima presión, antes de romperse, las moléculas presentan una superficie mínima. Por sobre este punto la película se colapsa y se pierde la ordenación monomolecular.

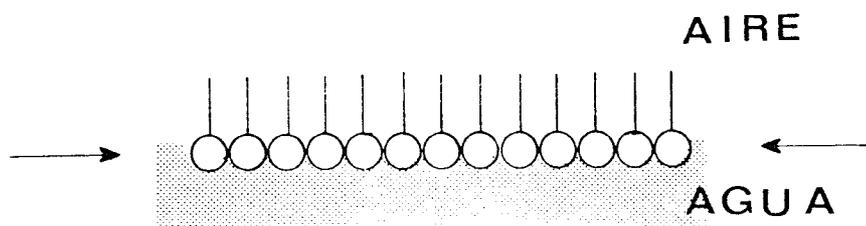


Diagrama 1. Las moléculas de lípidos están representadas por un círculo y una barra. La barra presenta las cadenas de hidrocarburos y el círculo, el extremo polar de las moléculas

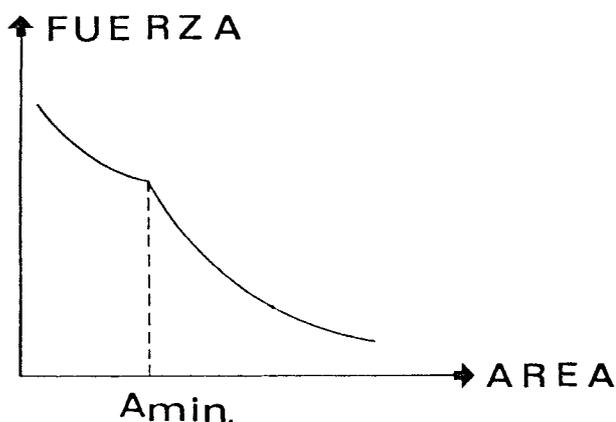


Diagrama 2. Al aumentar la fuerza aplicada la superficie que ocupa la película disminuye hasta romperse, como lo indica la curva. El punto de discontinuidad corresponde al área mínima ocupado por la película y de ésta se puede calcular el área ocupada por cada extremo polar de la molécula, cuyo número es conocido.

El siguiente paso en la evolución sobre el concepto de membrana fue dado en 1925 por GORTER y GREDEL cuando publicaron sus trabajos sobre la estructura de la membrana de glóbulos rojos humanos. Ellos usaron la técnica desarrollada por LANGMUIR y por HARKINS et al., para el estudio de capas moleculares de lípidos, para calcular el área mínima ocupada por una capa de lípidos extraída de un número conocido de glóbulos rojos, a los cuales se les había calculado previamente su superficie total, concluyendo que había suficiente

lípido en la superficie de los glóbulos rojos como para que se encontraran dispuestos en una lámina bimolecular, como se ve en el diagrama 3.

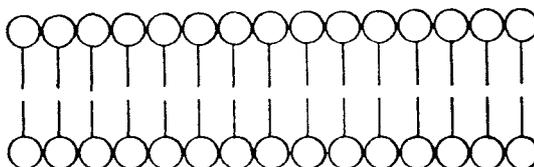


Diagrama 3. Muestra la concepción de GORTER y GRENDEL de la membrana de los glóbulos rojos.

Estos resultados fueron sujetos de fuertes críticas puesto que el método de calcular la superficie de los glóbulos no era correcto y además, el procedimiento para extraer los lípidos no aseguraba una extracción total. Sin embargo, por una afortunada compensación de estos errores, sus conclusiones, a la luz de los conocimientos actuales, son esencialmente correctos.

Posteriormente, hubo varios trabajos de importancia que condujeron a la teoría llamada PAUCI-MOLECULAR y que fue desarrollada en gran parte por DANIELLI, HARVEY y DAVSON en 1935. El primer aspecto de ésta lo constituyó el trabajo de

DANIELLI y HARVEY quienes realizaron experimentos en los que midieron tensión superficial en aceite de huevo de Caballa (pez) y propusieron que la baja tensión superficial podía deberse a la presencia de proteínas en la interface aceite - agua. Esto permitió a DANIELLI y DAVSON proponer, en el mismo año, el modelo que se muestra en el diagrama 4. De acuerdo con éste, la membrana celular se concebía con un núcleo de lípidos, cuyas partes polares estaban dirigidas hacia afuera y cubiertas por cada lado por una capa monomolecular de proteínas.

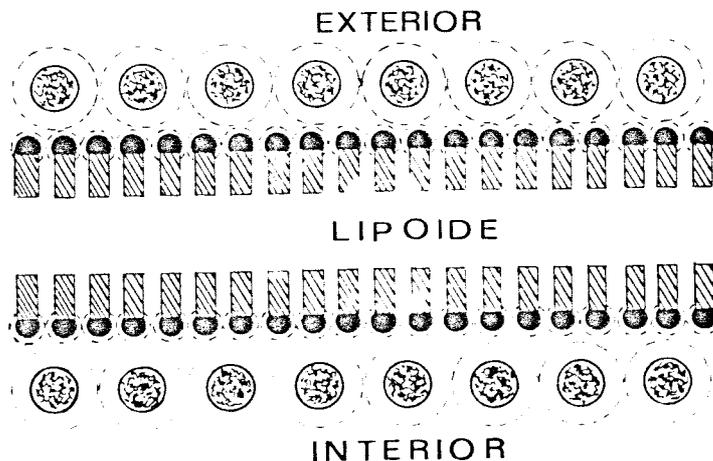


Diagrama 4. Modelo original de DANIELLI-DAVSON

Hasta la década del 50 la idea que predominó fue la del modelo propuesto por DANIELLI y DAVSON. A éste se sumaron numerosas evidencias recogidas de observaciones al microscopio electrónico. El nombre más importante asociado a estos trabajos es el de ROBERTSON, quien en 1959 describió la ultraestructura de membranas celulares. Estas membranas tratadas con KMnO_4 muestran, al ser observadas al microscopio electrónico, una estructura trilaminar de aproximadamente 75 \AA de espesor, consistente en dos líneas oscuras de aproximadamente 20 \AA de espesor que bordean una zona clara central. Junto con estas observaciones, fueron de gran importancia e influenciaron en gran parte la interpretación de ROBERTSON, los resultados obtenidos con técnicas cristalográficas. Al estudiar las propiedades de nervios mielinados en microscopio de luz polarizada se observa que la envoltura de mielina muestra una birrefringencia radial positiva (VALENTINE, 1961) y que el signo de la birrefringencia se invierte luego de un tratamiento de estos nervios con solventes lipídicos (AMBRONN, 1890; SHMIDT, 1936). SHMIDT además mostró que el signo de la birrefringencia también se invierte

luego de un tratamiento con KMnO_4 y OsO_4 . El pensó que la birrefringencia radial positiva se debía a la agrupación de lípidos en delgadas capas con los ejes principales de las moléculas lipídicas orientados radialmente y posiblemente algunas proteínas presentes en estas capas lipídicas con sus ejes mayores orientados en forma tangencial. Esta configuración explicaría el cambio de signo al ser extraídos los lípidos. CHINN y SCHMITT estudiaron la mielina antes de su extracción con solventes lipídicos y mostraron que la birrefringencia negativa remanente era birrefringencia de forma puesto que variaba de magnitud en medios con distintos índices de refracción y se anulaba en algunos, lo que permite presumir que las sustancias cuyo eje principal es tangencial son proteínas.

Del estudio de la mielina con rayos X se concluyó que probablemente estaba constituida por capas alternadas de moléculas lipídicas orientadas radialmente y por capas de proteínas entre ellas orientadas tangencialmente, encontrándose que estas unidades se repetían cada 171 \AA en nervios periféricos de rana y 186 \AA en nervios periféricos de mamíferos. ELKES y FINEAN (1949, 1953) y FINEAN (1953), registraron los cambios producidos por modificaciones físicas en tales fibras como congelamiento, descongelamiento y secado a distintas temperaturas.

Tales modificaciones producen variaciones en el espaciamiento de las capas constituyentes de la mielina, los que están indicados en el diagrama 5A. De lo anterior FINEAN supuso que las unidades radiales repetitivas se debían a la presencia de estructuras moleculares representada en el diagrama 5B.

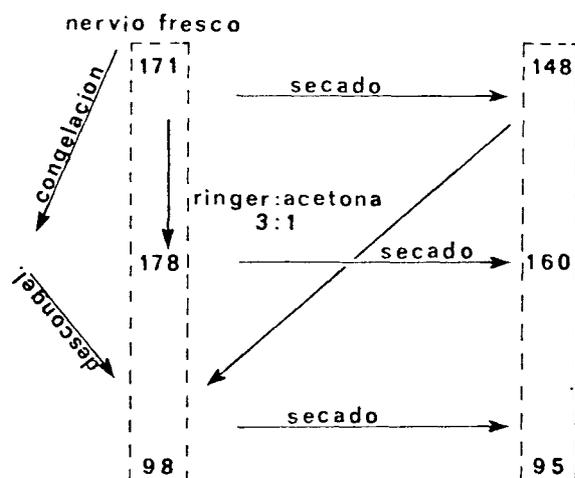


TABLA I

Diagrama 5A. El efecto de alteración física en el espaciamiento de los constituyentes de la mielina (FINEAN, 1953).

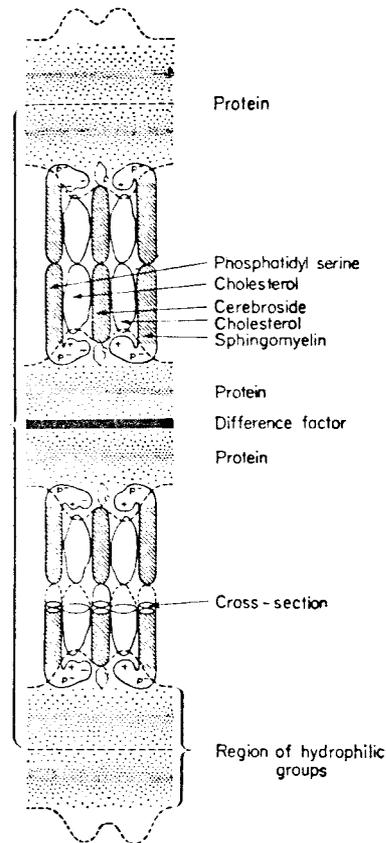


Diagrama 5B. Extraído de FINEAN, 1957; muestra la distribución de los elementos que él estimó que estaban presentes en las unidades repetitivas de 171 Å.

Puesto que la formación de la estructura mielínica en las fibras nerviosas, según las observaciones al microscopio electrónico, se produce por una invaginación de la membrana de la célula de Schwann como se muestra en la Foto 1. Por lo

tanto, los datos obtenidos por FINEAN corresponderían según la interpretación de ROBERTSON al espaciamiento de dobles membranas. Según esto, la estructura de 75 \AA de espesor observadas al microscopio electrónico correspondía a una lámina bimolecular de lípidos cuyas superficies polares estarían cubiertas por monocapas de proteínas. Lo que estaba de acuerdo con la teoría PAUCI-MOLECULAR. A pesar de ello, plantea una diferencia sustancial con el modelo sustentado por DANIELLI-DAVSON, en primer lugar no supone un núcleo de material lipóide y tampoco incorpora la presencia de proteínas globulares sobre la capa lipídica porque el espesor de las membranas observado no lo permitía. La idea más importante que aportó ROBERTSON fue que consideró la membrana como un sistema cristalino esméctico, es decir, los elementos que constituyen el cristal, en este caso los lípidos, solo pueden rotar en torno a un eje paralelo a su eje principal.

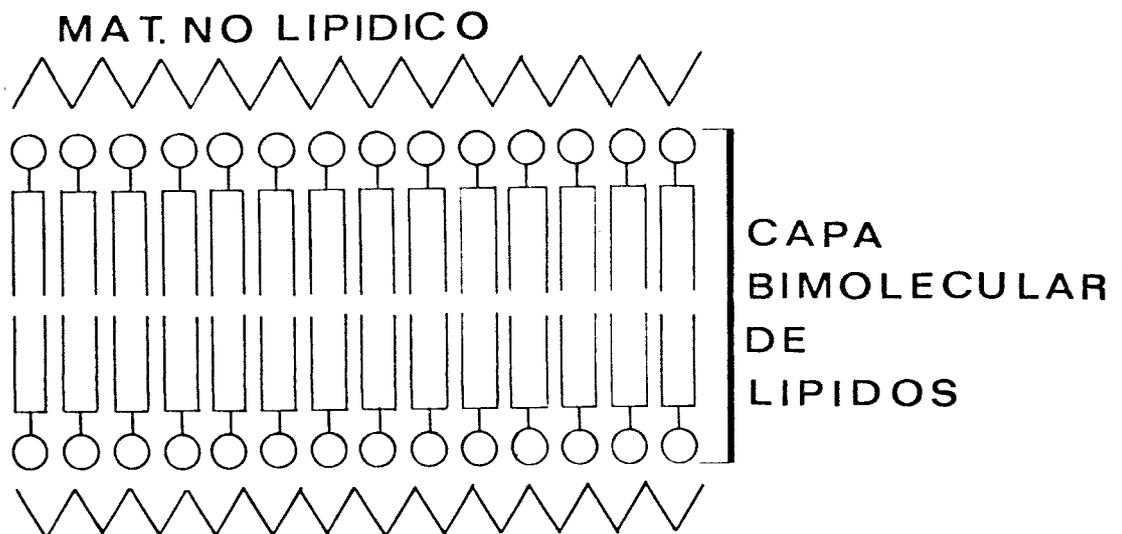


Diagrama 6. Modelo propuesto por ROBERTSON

Sin embargo, a fines de la década del 60 era claro que cabían otras interpretaciones a las observaciones al microscopio electrónico (KORN, 1966; BRANTON y PARK, 1968) y que éstas por sí mismas no probaban la validez de ningún modelo de membranas biológicas (STOEKENIUS y ENGELMAN, 1959). Con las evidencias químicas y estructurales obtenidas al utilizar técnicas bioquímicas y físicas, tales como calorimetría diferencial (STEIM et al., 1969), Difracción de rayos X (ENGELMAN 1969), Resonancia Magnética Nuclear (KAUFMAN, STEIM y GIBBS,

1970) y Resonancia Paramagnética Electrónica (HUBBEL y McCONNEL, 1969; TOURTELLOTTE, BRANTON y KEITH, 1970) fue necesario considerar otros tipos de arreglos moleculares. Algunos de estos modelos se sustentaban en la idea de láminas bimoleculares y otros en la repetición de alguna subunidad en particular (GREEN y FLEISCHER, 1963; SJOSTRAND, 1963; WEIR, ENGELBRECHT, HARRISON y RISLEY, 1965), con ello todos concidían en la posibilidad de interrelaciones entre los componentes de la membrana y explícitamente en la idea que las membranas biológicas son espacial y temporalmente uniformes. Las implicaciones estructurales de estos modelos, aún en la actualidad, son difíciles de estudiar, dado que existen pocas técnicas de alta resolución que permitan examinar cambios rápidos en la forma de los sistemas biológicos. Sin embargo, con el uso de la por entonces reciente técnica de criograbado (FREEZE-FRACTURE y FREEZE-ETCHING) fue posible observar directamente la estructura de algunas membranas (BRANTON, 1966). Las membranas congeladas al ser fracturadas exponen, según la descripción de BRANTON, sus caras interior - res. El exámen de estas caras sugiere que las membranas biológicas están formadas en parte por una extensa bicapa y en parte por unidades globulares.

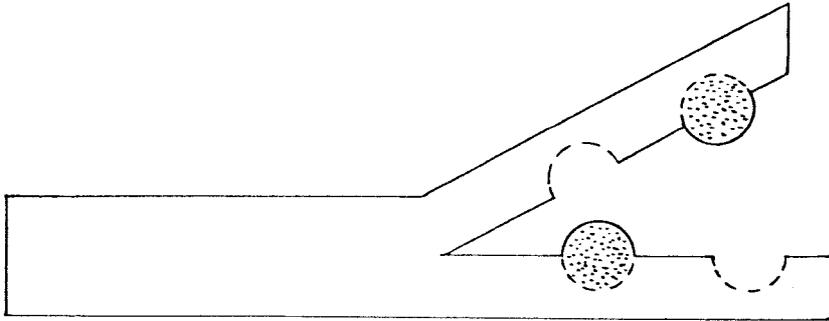


Diagrama 7. Interpretación del proceso de fractura
 La cara interior de la membrana queda expuesta en el proceso de fractura, de esta forma es posible observar protuberancias o depresiones en el interior de la membrana.

En 1972 S.J. SINGER y G.L. NICOLSON propusieron un modelo que denominaron "MOSAICO FLUIDO", de acuerdo con el cual las membranas plasmáticas son disoluciones bidimensionales de proteínas globulares y lípidos orientados. La matriz de la membrana la constituyen los lípidos ordenados en una bicapa ininterrumpida, con sus cabezas polares en contacto con el medio acuoso. De acuerdo con el modelo, las proteínas integradas de una membrana biológica son globulares y anfifílicas, es



decir, estructuralmente asimétricas. Con una parte polar y otra no polar en la molécula. La zona polar estará en contacto con el disolvente y la zona no polar sumergida en el interior de la bicapa lipídica.

Una proteína de tamaño adecuado (más de 6 nm en su eje mayor) podrá atravesar la membrana y entrar en contacto con el medio a ambos lados de la misma.

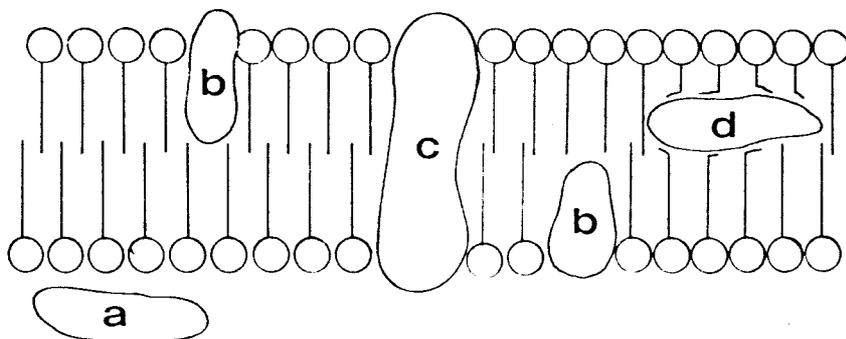


Diagrama 8. Distribución de lípidos y proteínas en una membrana biológica de acuerdo con el modelo del mosaico fluido. Todas las proteínas son globulares la a pertenece a la categoría de periféricas, en tanto que las b, c y d son integrales; las b y c están en parte sumergidas en la bicapa lipídica y en parte expuestas al medio acuoso. La proteína d no tiene acceso al medio acuoso que rodea la membrana.

La disposición de los lípidos y proteínas en la membrana estará de acuerdo con sus características moleculares, de todas las disposiciones posibles la más probable será la energéticamente estable. El diagrama 9, que representa el modelo de SINGER y NICOLSON, acomoda los componentes de la membrana en condiciones de mínima energía para un medio acuoso. En consecuencia, el modelo es aceptable desde el punto de vista termodinámico.

En condiciones fisiológicas, la bicapa lipídica de la membrana celular se mantiene en estado semi líquido. Este estado es necesario para que no se interrumpa la función celular. La viscosidad de la bicapa es del orden de 100 centipoises, es decir, que posee una fluidez similar a la del aceite de oliva (GARRAHAN y REGA, 1977).

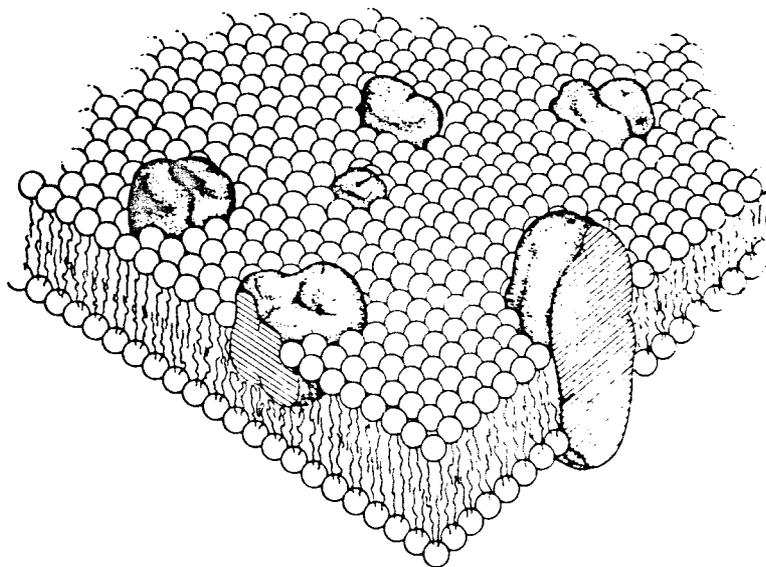


Diagrama 9. Esquema tridimensional del modelo de mosaico fluido

Esta característica de fluidez de las bicapas permite una concepción dinámica de éstas de acuerdo con la cual es admisible que una molécula de fosfolípido cambie de lugar dentro de su ámbito (STEIM, TOURTELLOTTE, TEINERT, McELHANEY y RADER, 1969; MELCHOIR, MOROWITZ, STURTEVANT y TSONG, 1970; ENGELMAN, 1970; WILKINS, BLAUROCK, ENGELMAN, 1971). En efecto, investigaciones recientes mediante técnicas de resonancia magnética permitieron comprobar en bicapas artificiales que las moléculas de fosfolípidos pueden intercambiar su

posición con una vecina más de 10^6 veces por segundo. Por el contrario, se comprueba que la transferencia de lípidos desde una monocapa a la otra (FLIP-FLOP) está severamente restringida, pues sólo se produce una vez cada 5 horas por término medio. En consecuencia, la concepción del componente lipídico de una membrana más cercana a la real es la de un líquido bidimensional en el que las moléculas que lo componen están confinadas en una monocapa, y es en este medio donde estarían dispersas las proteínas integrales.

A primera vista parecería lícito suponer que las proteínas pueden desplazarse en el plano de la membrana, movimiento éste sólo restringido por la viscosidad de la bicapa lipídica. Experimentos con células fotosensibles* mediante

* La retina es un tejido fotosensible ubicado en la parte posterior del ojo y compuesto por varios tipos de células. Entre ellas los bastones son células nerviosas que poseen prolongaciones cilíndricas hacia la parte posterior de la retina cubiertas por la membrana plasmática y están compuestas por una gran cantidad de sacos. La membrana de estos sacos, cuyo modelo se ve en el diagrama, está compuesto por un 60% de proteínas, de las cuales del 80 al 85% está constituido por rodopsina y un 40% de lípidos. Aunque la ubicación de las proteínas en las caras de la membrana y el grado de penetración de ésta no se conoce del todo, evidencias obtenidas por difracción de rayos X indican que la molécula de rodopsina de 4.2 nm se encuentra parcialmente sumergida, 14 nm, en el núcleo lipídico y el resto, 2.8 nm, en la fase acuosa (BLASIE, 1972). Por otra parte, se supone que la rodopsina está distribuida en tod

técnicas diversas muestran que las proteínas intrínsecas tienen libertad para: trasladarse en el plano de la membrana y girar en torno a un eje perpendicular a dicho plano. El carácter de las fuerzas de interacción lípido-proteína (de carácter hidrofóbico) hace muy improbable que una proteína que atraviesa la membrana pueda girar en torno a un eje perteneciente al plano de la membrana o que una que no lo atraviesa pueda desplazarse desde una monocapa lipídica a la otra. En consecuencia, si bien las proteínas giran y se desplazan, mantienen su orientación y el grado de intercalación en la capa lipídica (BROWN, 1972; CONE, 1972; LIEBMAN, ENTINE, 1974; POO, CONE, 1974).

el espesor de la membrana con una pequeña asimetría hacia la cara citoplasmática (CHABRE, 1974).

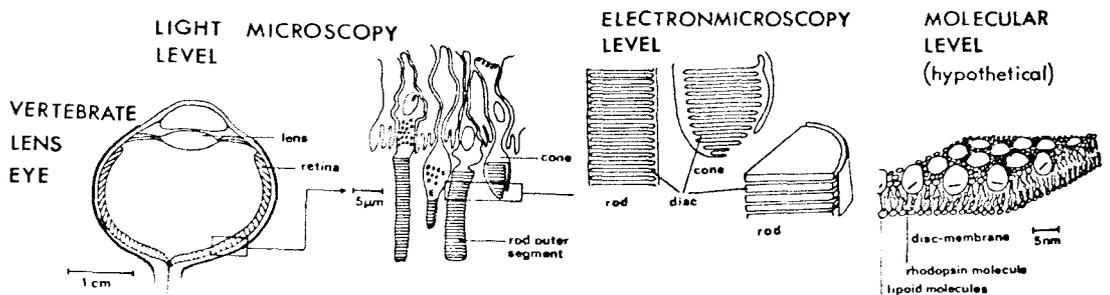


Diagrama que muestra a distintos niveles la ubicación y esquema de las células fotosensibles del ojo

Lo anterior indica que la membrana plasmática de la mayoría de las células debe considerarse como una estructura dinámica cuya conformación le permite desempeñar una serie de funciones como por ejemplo, recibir y transmitir señales químicas, transportar moléculas pequeñas o iones, englobar partículas por fagocitosis o pinocitosis, recibir y transmitir las indicaciones para el cese de la reproducción y del crecimiento, además de establecer los límites físicos de la célula y resguardar el contenido citoplasmático.

Esta diversidad de funciones de la membrana celular se explica en gran parte por la presencia de diversos tipos de proteínas en ella. Por esto sería altamente conveniente disponer de un sistema simplificado de membrana en el cual se puedan analizar componentes en forma individual. En general, una bicapa lipídica puede agregarse formando pequeñas vesículas (BANGHAM, 1968; VAIL, PAPAHAADJOPOULUS, MOSCARRELO, 1974; DUCKWITZ-PETERLEIN, EILENBERGER y OVERATH, 1977), o estructuras simples planas separando dos medios acuosos (membranas artificiales). Ambos modelos son complementarios entre sí poseyendo cada uno ventajas y defectos. Las bicapas

esféricas permiten medidas de flujo con relativa facilidad y la ausencia de solventes de hidrocarburos puede ser un factor que facilite la incorporación de proteínas, permitiendo así una reconstitución funcional de las membranas. Sin embargo, el compartimiento interior es pequeño e inaccesible para posibles manipulaciones químicas y mediciones eléctricas. El tamaño estandar de las vesículas es del orden de 50 a 100 nm. Por el contrario, en bicapas planas ambos compartimientos son de fácil acceso tanto como para permitir efectuar mediciones eléctricas o manipulaciones químicas.

Uno de los aspectos estructurales más importantes de las membranas lipídicas artificiales es la presencia, en su interior, de una zona hidrofóbica de aproximadamente 5 nm. En la Tabla I se comparan algunas propiedades entre membranas lipídicas artificiales y membranas de axón.

COMPARACION DE LAS PROPIEDADES DE BICAPAS LIPIDICAS
ARTIFICIALES Y MEMBRANAS DE AXON

<u>PROPIEDAD</u>	<u>MEMBRANA DE AXON</u>	<u>BICAPA LIPIDICA</u>
Capacidad eléctrica	1	0.3 a 0.8 uf/cm
Espesor	7.5	7.5 nm
Permeabilidad al agua	0.14 a 1.1×10^{-3}	1×10^{-3} cm/s
Resistencia eléctrica	10^3	10^8 ohm/cm

TABLA I. Tomada de HENK y THOMSON, 1969.

Como se ve en la Tabla I las bicapas presentan casi las mismas propiedades que las membranas de axon, la mayor diferencia entre éstas está en la resistencia eléctrica de las bicapas lipídicas.

La incorporación de proteínas en las bicapas lipídicas disminuye la resistencia eléctrica de éstas, como fue demos-

* La hemocianina es una molécula transportadora de oxígeno en muchos invertebrados que contiene de un 0.18 a 0.25% de cobre probablemente univalente, siendo su peso molecular mayor que 10^6 . van BRUGGEN (1962) mostró que esta molécula presenta diferentes formas de disociaciones según el pH en que se encuentra disuelta. A pH 6.0 la hemocianina de MELIX pomatia aparece al ser observada al microscopio electrónico como círculos con 5 ó 10 subunidades dispuestas simétricamente y también como cuadrados con 6 filas paralelas de subunidades. El diámetro de los círculos es del orden de 30 nm, en los cuadrados el lado perpendicular a las filas es de 33.5 nm, el otro varía de 30 a 34 nm. A pH 7.6 se observa lo mismo que a pH 6.0 pero al

trado por PAK y CONRAN (1972) y HUELLER y RUBIN (1963). La hemocianina, por ejemplo, puede incrementar en varios órdenes de magnitud la conductividad de bicapas de colesterol y de lípidos de cerebro, cuando se le agrega en uno de los dos lados. Este aumento de conductividad producido por la hemocianina posee la particularidad que ocurre a saltos de igual amplitud (G. ALVAREZ, E. DIAZ, R. LATORRE, 1975). Tal característica sugiere la idea que cada uno de esos saltos se debe a la presencia de una molécula o subunidad de hemocianina en la bicapa, lo que implica que la permeabilidad de estas membranas no se debe a una propiedad difusa sino más bien a sitios determinados de alta constante dieléctrica.

El objetivo de esta tesis es montar una técnica adecuada que permita observar estas membranas bicapas lipídicas a las que se les ha adicionado hemocianina. Mediante la técnica de microscopía de tinción no es posible observar la estructura de membranas. Como se observa en la foto 1A esta sólo gunos de los cuadrados aparecen disociados en dos rectángulos iguales con las subunidades dispuestas en tres filas. A pH 8.7 la mayoría de los círculos, cuadrados y rectángulos están disociados en pequeñas subunidades, fotos 2 a 4. Estas observaciones condujeron a van BRUGGEN a presentar un modelo tentativo de la estructura de la hemocianina, el que se observa en la foto 5.

destaca el sitio donde hay membranas. Sin embargo, la técnica de Criograbado, como lo mostró BRANFEN, destaca unidades globulares en membranas que han sido fracturadas. Al aplicar esta técnica a las membranas artificiales, debería ser posible observar las moléculas de hemocianina o sus subunidades adosadas a la membrana en alguna de las configuraciones como las que se muestran en el Diagrama 9.

Los aspectos que se desean desarrollar, por tanto, en este trabajo son:

1. Montar la técnica de criograbado con la finalidad de disponer de un método que permita observar la ultraestructura de sistemas biológicos.
2. Modificar la técnica para poder aplicarla a las membranas artificiales permeables.
3. Existen sistemas de membranas naturales como las membranas fotorreceptoras que poseen algún paralelo con las membranas artificiales, este es que la mayor cantidad de las proteínas intrínsecas (85%) son de un solo tipo. Interesa observar la distribución de las proteínas en las membranas fotosensibles de células fotorreceptoras utilizando la técnica de criograbado.

MATERIALES Y METODOS

1. PREPARACION DE MEMBRANAS ARTIFICIALES Y REGISTRO DE CONDUCTIVIDAD DE LAS MEMBRANAS

FORMACION DE BICAPAS: Las membranas artificiales constituidas por dos capas monomoleculares de lípidos, se forman a partir de monocapas extendidas en interface aire-agua, por aposición de sus cadenas de hidrocarburo. Esto se logra introduciendo una partición de teflón, con una apertura a través de la interface.

El método experimental es el descrito por MONTAL y MUELLER (1972), con algunas modificaciones y el dispositivo donde se forman se muestra en la foto 6.

Este consiste en: i) dos cámaras rectangulares de aproximadamente 1.9 x 1.9 x 1.2 cm, con tres orificios cada uno que conectan con la parte inferior del depósito. Estas cámaras poseen además en una de sus caras un orificio cónico de 3 mm \varnothing interior y 1.5 mm \varnothing exterior, a través de los cuales

pueden quedar comunicadas al ponerse en contacto.

ii) Una abrazadera metálica que permite mantenerlas en contacto con los orificios alineados y sin que se desplace una respecto a la otra.

iii) Una lámina de teflón de 1 x 1.5 cm y de 25 um de espesor con un orificio en su centro de 300 um \varnothing en el cual se forma la membrana. Esta lámina se adosa a la cara de contacto de una de las cámaras de tal forma que el orificio de la lámina quede centrado en el de la cámara. Previo a esto se impregnan las caras de las cámaras con lubricante de silicona (STOPCOCK GREASE DOW CORNING) o con grasa de silicona de alto vacío (THE BRITISH DRUG HOUSE LTD. N° 33135).

Al juntarse las cámaras fijarán en su interior la lámina de teflón y además la grasa aislará eléctricamente ambos compartimentos de las cámaras evitando cualquier contacto eléctrico que no sea a través de la membrana misma. El montaje de las cámaras se observa en el diagrama 10.

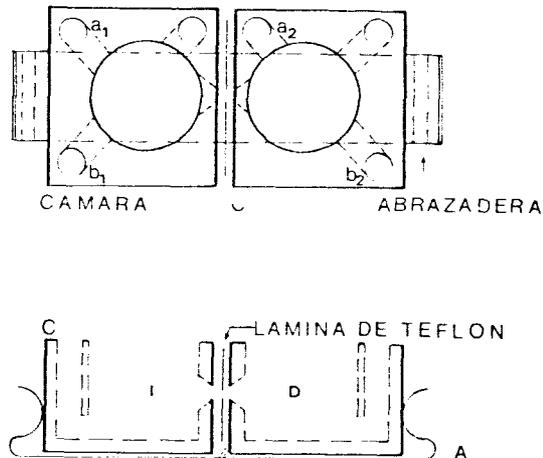


Diagrama 10. En los agujeros a 1, 2 se colocan electrodos que conectan la bicapa con el sistema de medición a través de la solución en los compartimentos izquierdo (I) y derecho (D). Los agujeros b 1, 2 se utilizan para llenar y vaciar las cámaras con la solución.

MATERIALES:

a) Soluciones stock guardadas a 4°C de

i) KCl 100 mM

ii) TRIS (HYDROXI METHYL-AMINO METANO) a pH 7.0, 5 mM

- b) Las membranas se formaban en una solución compuesta de 10 ml de stock i) y 5 ml de stock ii), llevados a 100 ml en agua bidestilada-desionizada. La que se renovaba para cada experimento.
- c) Solución de lípidos, i) GMO/Colesterol, 2/1 en Hexano con 5% decano; ii) Fosfatidil colina 5 mg/ml de buffer TRIS, pH 7.0
- d) Solución de hemocianina: stock 5 mg/1 ml de sol. b). Parte de este stock se diluía 10 veces y de ésta se ponían 20 en una de las cámaras.

PROCEDIMIENTO:

- a) Se inyecta por los agujeros b 1, 2, simultáneamente, de la solución b) hasta un nivel inferior al que se encuentra el orificio de la membrana de teflón.
- b) Se agrega 5 ul de la solución de fosfolípidos en la superficie de las solución en cada compartimento. Formándose así una monocapa de fosfolípidos en ambas superficies.
- c) Se elevan los niveles de la solución en ambas cámaras por sobre el orificio de la lámina de teflón, formándose en este una bicapa de lípidos (membrana artificial).

En los diagramas siguientes, se muestra la secuencia de la formación de una bicapa a partir de monocapas de lípidos.

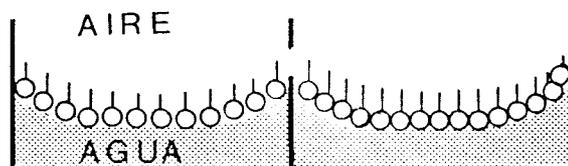


Diagrama 11. Se observa la formación de la monocapa de lípidos en cada compartimento, al agregar lípidos en cada interfase. Se ilustra también la orientación de los lípidos.

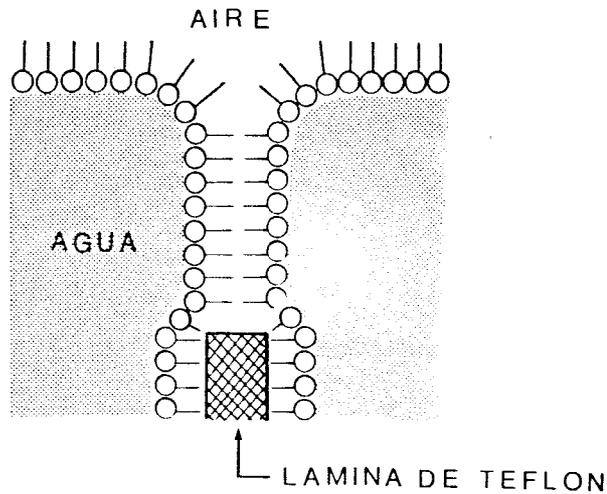


Diagrama 12. Aquí se muestra la formación de la bicapa al subir los niveles en cada compartimen-
to. Se puede ver también cómo las moléculas de
lípidos mantienen sus partes polares en la fase
acuosa.

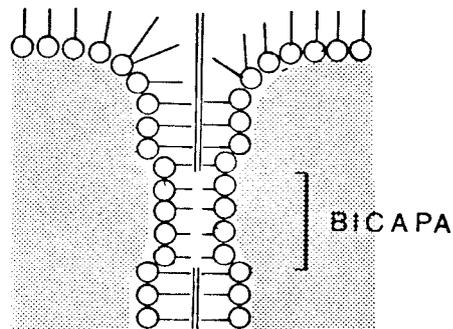


Diagrama 13. Este diagrama muestra la membrana ya
formada, para lo cual los lípidos han contrapuesto
sus cadenas de hidrocarburos (partes apolares). En
esta etapa la capacidad eléctrica alcanza su máximo
valor, el que debería permanecer constante.

REGISTRO DE CONDUCTIVIDAD

El sistema de medición consiste esencialmente en un dispositivo que permite medir la corriente a través de la membrana cuando se aplica una diferencia de potencial entre ambos lados. Su diagrama simplificado se da a continuación:

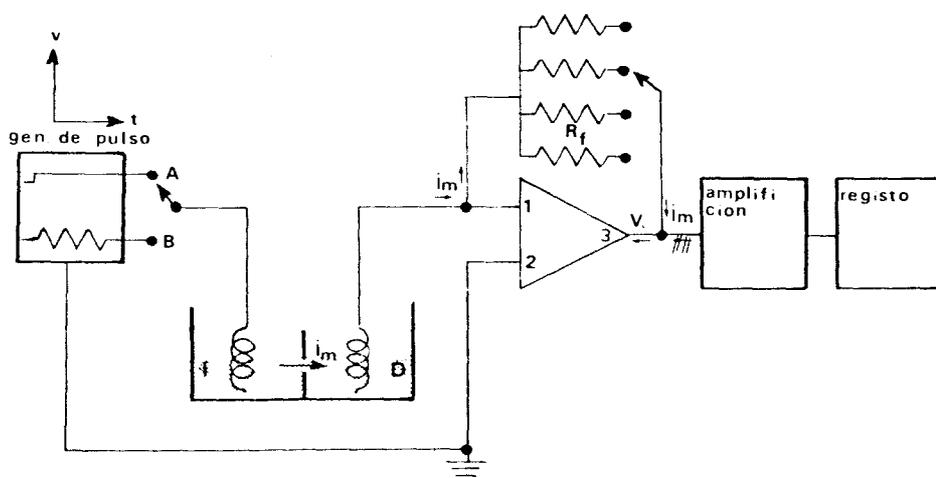


Diagrama 14

El amplificador genera entre los puntos 2 y 3 una diferencia de potencial V_o dada por

$$V_o = A (V_2 - V_1) \quad (1)$$

donde A es el factor de amplificación y dado que $V_2 = 0$, entonces:

$$V_o = -A V_1 \quad (2)$$

La caída de tensión a través de la resistencia R_f es $V_1 - V_o = i_{mf}$. Por lo tanto, $i_m R_f = -\frac{V_o}{A} - V_o = -V_o \left(1 + \frac{1}{A}\right)$, como $A = 10^5$ luego $\frac{1}{A} = 0$

$$i_m = -\frac{V_o}{R_f} \quad (3)$$

Por lo tanto, conocido V_o y R_f se puede calcular la corriente de la membrana i_m y su conductancia

$$G_m = i_m / \text{Pot. aplicado} \quad (4)$$

REGISTRO DE CAPACIDAD

La detección de la formación de la bicapa es posible dado a que el sistema resultante solución-bicapa-solución es equivalente a un condensador cuyo dieléctrico (membrana) separa dos placas conductoras que son las soluciones presentes en cada compartimento, resultando ser la capacidad inversamente proporcional al espesor del dieléctrico y proporcional con el área

$$C = \frac{A E_m}{4 d} E \quad (5)$$

donde E_m es la constante dieléctrica de membrana y su valor es de 2.1, d espesor del dieléctrico y A el área. Esto sirve para asegurar que se trata de una bicapa si el valor de la capacidad es del orden de 0.4 uF/cm^2 .

Cuando el potencial aplicado al electrodo 1 es triangular (salida B), la corriente que circulará por la membrana será

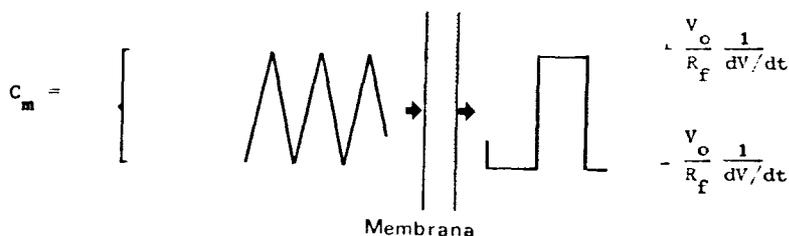
$i_m = C_m \frac{dV}{dt} + GV$; donde C_m es la capacidad eléctrica de la membrana. Si la pendiente de la onda triangular es lo suficientemente grande $C_m \frac{dV}{mdt} \gg GV$ la ecuación (3)

resulta ser para este caso $C_m \frac{dV}{dt} = - \frac{V_o}{R_f}$

Despejando:

$$C_m = - \frac{V_o}{R_f} \frac{1}{dV/dt} \quad (6)$$

Pero dado que la señal es triangular dV/dt es constante en cada semi-ciclo, luego



Para calibrar el sistema, es decir, para conocer el valor de C_m independientemente de las relaciones de transformación corriente-voltage y de las constantes del sistema, se conecta entre los electrodos un condensador de capacidad conocida y se mide la amplitud de la señal a la salida. De esta forma se obtiene una relación amplitud-capacidad.

Conocido el valor de la capacidad de la membrana, es posible conocer el espesor de ésta mediante la relación (5).

2. CRIOGRABADO Y OBTENCION DE MICROFOTOGRAFIAS

La técnica de criograbado fue aplicada inicialmente a materiales biológicos por STEERE (1957), y posteriormente desarrollada por MOOR, MUHLETHALER, WALDNER y FREY-WYSSLING (1961). Esencialmente el criograbado se efectúa en cuatro etapas: Congelación, Fractura, Grabado y Recubrimiento.

La congelación consiste en vitrificar el agua de la muestra en su estado natural con la finalidad que los cambios estructurales de ésta sean mínimos (MOOR, 1964). La temperatura usual de congelamiento es la de ebullición del Nitrógeno, aproximadamente -197°C . Observaciones experimentales muestran que un sistema que contiene una gran cantidad de agua puede ser vitrificada sólo si el intervalo de temperatura de 0° a -100°C se logra en tiempos inferiores a 1×10^{-2} seg (RIEHLE, 1968). Las limitaciones al proceso de vitrificación provienen del hecho que el calor sólo puede ser extraído de la muestra por conducción térmica. La baja conductividad térmica del agua reduce la zona de vitrificación de la muestra a una película superficial de 2 a

3 um de espesor. El tiempo crítico de congelación para lograr una vitrificación puede ser disminuido considerablemente embebiendo la muestra con agentes anticongelantes, tales como: etilén glicol, dimetil sulfoxido, piridina N-óxido, glicerol, etc., en concentraciones del 5 al 30%, en estas condiciones además se logra aumentar la zona de vitrificación de la muestra.

El proceso de fractura se realiza rompiendo mecánicamente la muestra vitrificada. Este proceso se realiza al vacío con el propósito de evitar la condensación de sustancias, particularmente agua. De esta manera se evita la introducción de artefactos que no son propios del material. Las presiones normales de trabajo en esta etapa son del orden de 10^{-5} a 10^{-7} Torr. La fractura se realiza en un rango de temperatura de -197°C a -100°C .

El grabado o sobrerelieve se logra sublimando desde la superficie fracturada de la muestra sustancias volátiles como el agua. Las sustancias no volátiles, tales como lípidos, proteínas y otras, permanecen por lo tanto en la superficie fracturada. Esto se realiza aumentando la temperatura

gradualmente de la muestra hasta -98°C . A esta temperatura la rapidez de sublimación del agua es del orden de $100 \text{ \AA}/\text{min}$. Esto permite un fácil control del proceso. Experimentalmente, se observa que a temperaturas inferiores a -98°C la sublimación es muy lenta y su efecto no es notorio (WILLIAM, R.). La finalidad del grabado es hacer más evidente aspectos ultraestructurales de la superficie fracturada. Este proceso es de uso frecuente pero no indispensable.

El recubrimiento se realiza en dos etapas: sombreado y réplica. La finalidad del sombreado es proveer un medio de contraste que haga posible la observación de la superficie fracturada en el microscopio electrónico. Este contraste se logra evaporando metal sobre la superficie de la muestra con un ángulo preferente de 45° . Con esto se obtiene sectores de la muestra en los que hay una mayor acumulación de metal acompañados de sectores donde la concentración es muy baja, lo que indicará la presencia de algún accidente.

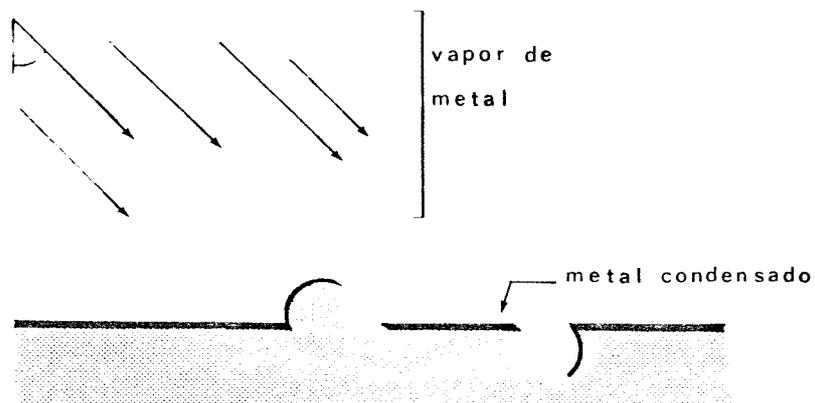


Diagrama 15

Posteriormente, al observar esta película metálica al microscopio electrónico, los electrones que inciden sobre ella serán fuertemente absorbidos y/o dispersados en las zonas donde se ha condensado metal y pasarán casi libremente por los otros sectores. Obteniendo en la pantalla zonas oscuras que corresponderán a sectores de la preparación cubiertos y zonas claras correspondientes a sectores donde no se ha depositado metal. Microfotografías 7 y 8.

Los metales usados fueron Platino y Cromo. De éstos se obtuvieron buenos resultados con platino utilizando el método Platino-Carbón de STEERE. Este método consiste en lo

siguiente. En el punto de contacto de dos carbones, uno de los cuales se encuentra aguzado, se enrolla un alambre de Platino de 0.05 mm ϕ , dos vueltas.

Estos carbones se montan en un par de columnas de cobre que forman parte del cañon de sombreado. Ver diagrama 16.

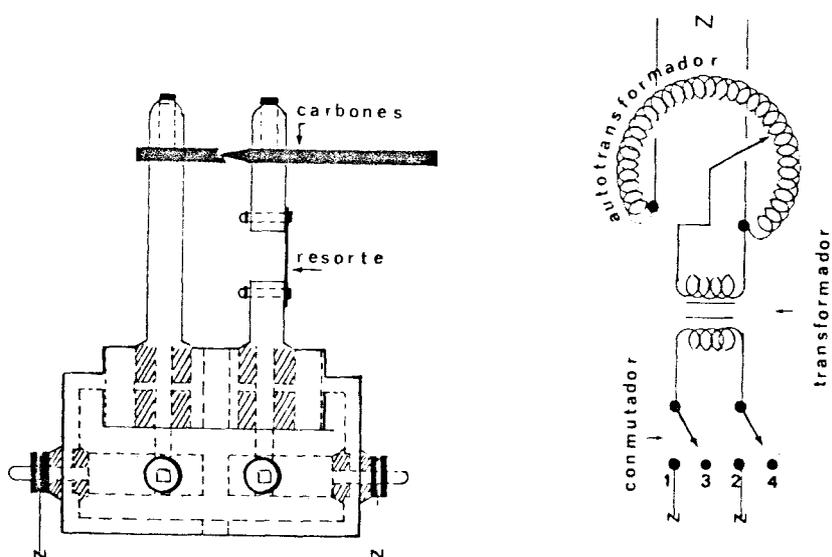


Diagrama 16

Luego se instala el cañon de sombreado en la cámara de vacío y se evacúa. Al alcanzar una presión inferior o

igual a 10^{-4} Torr se calientan los carbones. Para esto se hace pasar una corriente por ellos cuya intensidad se aumenta hasta el punto de fusión del Pt. Al fundirse el Pt, se forma un compuesto Pt-C en el cual la concentración del carbón es de aproximadamente un 5%. (Fotos 9 y 10). Para evitar daños de la muestra producidos por la emisión de gases generada durante el calentamiento del carbón hasta la temperatura de evaporación del compuesto Pt-C, se hace un ensayo previo para determinar la intensidad de corriente con la cual se alcanza el punto de evaporación. Este valor de intensidad de corriente se prefija de tal manera que al conectar el interruptor (ver foto 12), deben transcurrir aproximadamente 5 seg. hasta el inicio de la evaporación del compuesto. En estas condiciones se puede controlar el espesor de la película metálica depositada sobre la superficie de fractura mediante un monitor (Medidor de resistencia de películas metálicas), intercalado en el recorrido del vapor.

Para obtener una réplica se evapora carbón en dirección normal a la superficie ya metalizada de la muestra. Esta capa no sólo sirve de soporte a la película metálica sino además

le confiere al recubrimiento mayor resistencia, evitando daños en el proceso de extracción del material biológico una vez terminada esta etapa. Además, cumple la finalidad de conductor térmico, esto es muy necesario dado que al observar la preparación al microscopio electrónico, los electrones al incidir sobre el sector que se observa lo calienta, con lo que se corre el riesgo de dañar la preparación.

La forma de evaporar el carbón es similar a la empleada para evaporar el Pt. En este caso, se ubican dos carbones, uno de ellos como y el otro en forma de cono truncado, en contacto en un cañon del mismo tipo que el anterior, foto 11. Al hacer pasar una corriente eléctrica por ellos, se logra fundir el carbón en el punto de contacto.

Dado que el proceso de réplica y sombreado no es simultáneo, el sistema eléctrico se acopla primero al cañon de sombreado mediante el conmutador, que está indicado en el diagrama 16 y luego al cañon de replicado.

Todas las etapas anteriores se realizaron en un equipo convencional DENTON DF-3 y que fue innovado en alguna de sus

partes por STEERE (1978). Se utilizó un banco de vacío KINNEY KSE-2 modificado, dado que la velocidad de bombeo de éste no era la adecuada.

Se da a continuación la descripción de cada equipo y el detalle del procedimiento para realizar el criograbado de las membranas.

BANCO DE VACIO: Para armar esta unidad, se utilizó la estructura y parte de la instalación eléctrica de un equipo KINNEY KSE-2. Su esquema se observa en el diagrama 17.

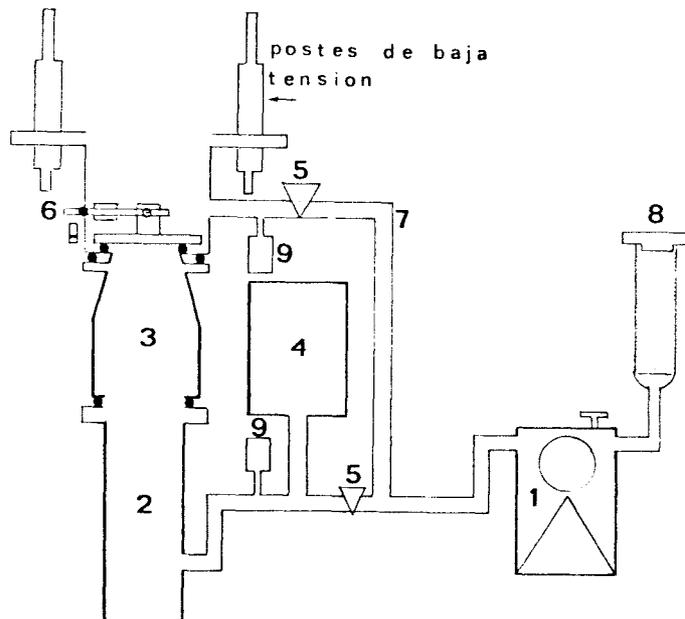


Diagrama 17

Diagrama 17. Las partes renovadas son:

1. Bomba rotatoria EDWARDS ES 200
2. Bomba difusora EDWARDS EO 4
3. Trampa criogénica EDWARDS, capacidad 5 lts
4. Tanque de reserva de prevacío, capacidad 5 lts.
5. Válvula de bajo vacío EDWARDS
6. Válvula de alto vacío EDWARDS
7. Fitting y cañerías de 1" \emptyset
8. Secador de aire de Sílica para la descontaminación de la bomba rotatoria (ballast)
9. Medidor de bajo vacío Pirani

En la foto 12 se observa el banco y las indicaciones de los controles.

CAMARA DENTON: Esta cámara va situada sobre la válvula principal del banco de vacío. En la foto 13 se observan sus partes y el detalle de éstas.

CRIOGRABADO DE LAS MEMBRANAS: Como ya se describió anteriormente, la membrana se forma en una lámina de teflón en el dispositivo del diagrama 10. Una vez formada la membrana y

observada sus propiedades eléctricas, se congela y se procede a hacer el criograbado.

A pesar que el tiempo de enfriamiento para lograr vitrificar una muestra es crítico, es nuestro caso este período alcanzaba varios segundos, 7 seg. Esto se debe a que, para congelar la membrana hay que congelar todo el sistema donde están montadas, es decir, cámara y solución.

El criterio usado para determinar que el proceso de enfriamiento no dañara la membrana era observar alguna propiedad eléctrica de ésta y sus fluctuaciones durante el enfriamiento. La respuesta capacitiva, cuya amplitud es proporcional al espesor de la membrana, se transformaba paulatinamente en una señal ruidosa manteniendo la forma de pulso cuadrado y su amplitud, salvo cuando la membrana se rompía, en cuyo caso la amplitud acusaba un corto circuito.

Eran, entonces, las membranas que conservaban sus propiedades eléctricas o al menos las que no mostraban grandes fluctuaciones en la etapa de congelamiento las que se procesaban. Una vez congelada la membrana, se re

tiraba la abrasadera de las cámaras, lo que permite exponer una de las caras de la membrana. En seguida, se montaban en dispositivos como el que se observa en la foto 14 (porta cámara). Todas estas manipulaciones se hacen bajo nitrógeno líquido. La finalidad del porta cámara es conectar térmicamente la muestra con el brazo de soporte (7). Foto 13.

La secuencia para el montaje es la siguiente.

Cuando la cámara Denton se encuentra a una presión de 10^{-5} Torr o inferior, se introduce LN2 en el termo 1a, simultáneamente se llena la trampa (3) (Diagrama 17), con LN2. Se mantiene la válvula 5a abierta para que el LN2 fluya hasta el brazo y lo enfríe, la temperatura que se alcanza en el pivote 7a debe ser de -150°C ó inferior. Cuando se ha alcanzado esta temperatura, se cierra la válvula principal (que conecta la cámara con la bomba difusora) y se introduce gas nitrógeno en la cámara hasta alcanzar la presión atmosférica. En ese momento se caza el porta cámara con las pinzas, ver foto 15, luego se levanta el tapón que está sobre el pivote y se enrosca el porta cámara en éste, la temperatura del pivote se mantiene a -150°C

aproximadamente. Esta manipulación dura del orden de 2 a 3 seg y mientras ocurre se mantiene un flujo de gas nitrógeno dentro de la cámara con la finalidad que no entre aire húmedo, evitando así la formación de hielo en el brazo y en la cámara. El tiempo de traspaso del porta cámara desde el recipiente, en el cual se congeló la membrana, hasta el interior de la cámara Denton es de fracción de segundo y no se observa formación de hielo.

Cuando el porta cámara ya está fijo se cierra la cámara Denton y se procede a hacer vacío. La etapa de prevacío dura 1 min aproximadamente, 760 a 5×10^{-2} Torr. Mientras se realiza la etapa de prevacío, se introduce aire líquido en el termo 1b con la finalidad de enfriar la camisa descontaminadora, la temperatura que alcanza ésta es la del aire líquido y se mantiene durante todo el proceso. Con esto, todos los vapores condensables circundantes a la muestra se depositan en esta camisa y también los posibles vapores provenientes de la bomba difusora. Dado que al introducir la cámara en la cámara Denton la membrana ya se encuentra expuesta por alguna de sus caras.

lo único que resta, si se desea, es hacer sublimación para lo cual se calienta la cámara hasta -98°C por el tiempo necesario y luego se enfría hasta -150°C . Como la posición del autotransformador que alimenta, a través del secundario del transformador, el cañon ya se ha fijado, se conecta el interruptor 5, foto 12, que cierra el circuito. Diagrama 16. Al circular corriente por los carbones se calientan y cuando la mezcla Pt-C ha alcanzado el punto de evaporación sale hacia adelante, en forma radial, alcanzado la muestra. Además de depositar el metal en la preparación, también lo hace en el sensor, foto 16.

Este sensor es parte de un circuito que mide la resistencia eléctrica del metal depositado en él, cortando automáticamente la alimentación del auto transformador cuando la resistencia ha alcanzado un valor pre-establecido. Debido a que el sensor no se encuentra a la misma distancia de la fuente de vapor metálica que la preparación, el espesor de la capa metálica en el sensor es distinta al que alcanza en el mismo tiempo en la preparación. Midiendo los espesores de capas metálicas depositados en el lugar de la

preparación para distintos valores de resistencia en el sensor, es posible programar el espesor de la capa metálica a depositarse en la preparación. El circuito está descrito en el Apéndice.

En seguida el conmutador, foto 12, se lleva a la posición 3-4, con lo que es posible alimentar el cañon para evaporar carbón. Para la evaporación del carbón no existe sensor alguno y se lleva un control aproximado del tiempo de evaporación (20 seg) en función de la calidad de la réplica.

Las observaciones se hicieron en un microscopio Phillips EM 300 A 80 KV y con una apertura de objetivo de 30 um.

RESULTADOS

I. MEMBRANAS ARTIFICIALES

Se fabricaron membranas con Fosfatidil colina (FC) y Glicerol monooleato (GMO), el registro de las capacidades fue del orden de 205 pF/cm^2 y de 250 pF/cm^2 respectivamente.

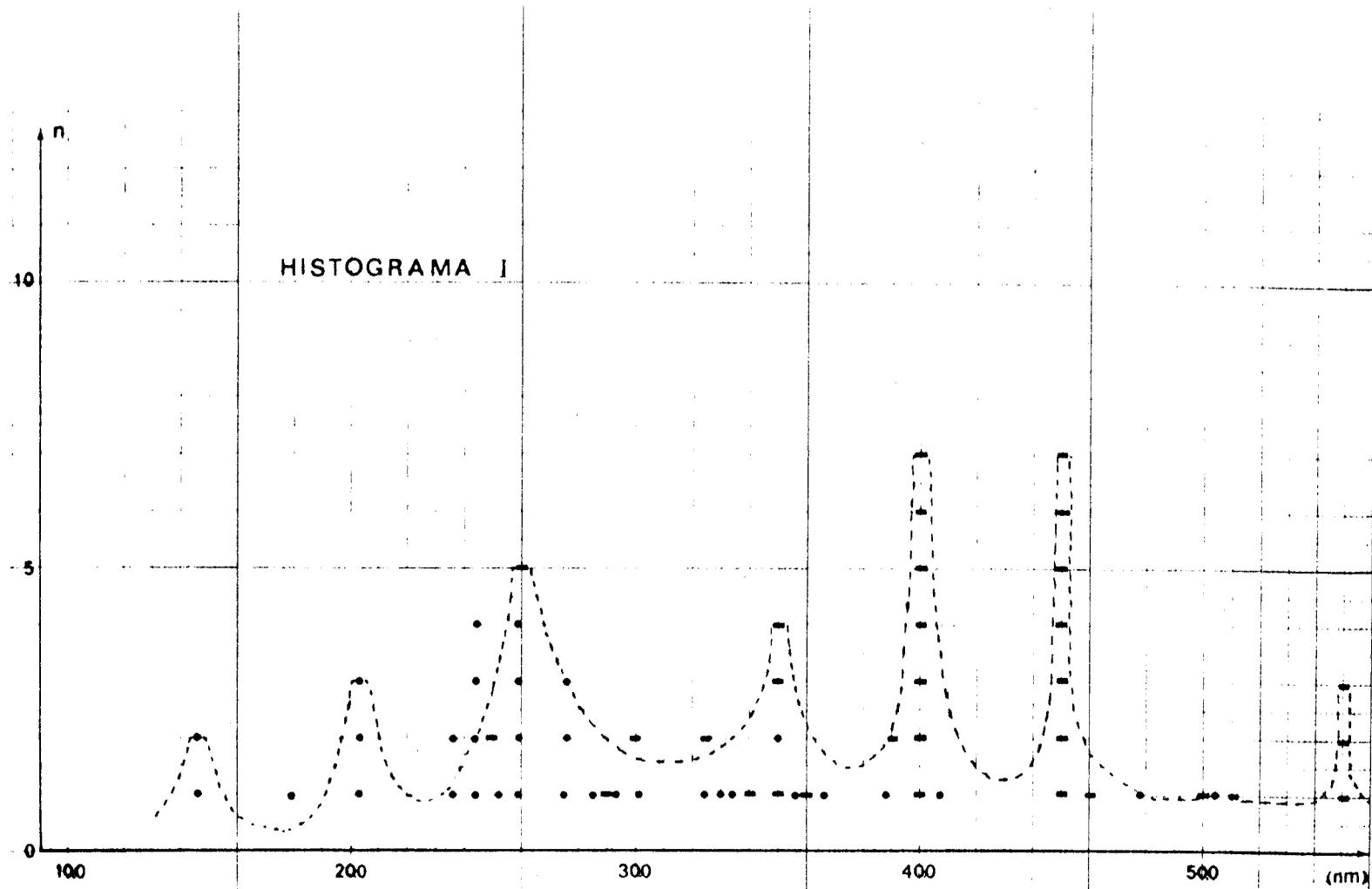
Después de formada la membrana se ponían 20λ de solución de hemocianina en la cámara izquierda. La corriente observada a los 7 min después de poner la hemocianina era aproximadamente de 3×10^{-9} A para membranas de GMO y de 7×10^{-9} A para membranas de Fosfatidilcolina. Al cabo de este tiempo, las membranas se congelaban y procesaban según la descripción anterior.

Al congelar membranas en cuya solución no se ha puesto hemocianina, sus réplicas muestran superficies con protuberancias de 15-20 nm como se ve en la M.F.* 17. La corriente en estas membranas era aproximadamente de 4×10^{-12} A.

* M.F. = microfotografía

Las microfotografías de las réplicas de las membranas de GNO con hemocianina, se muestran en las fotos 18 a 20, éstas fueron sombreadas con platino. El tamaño de las protuberancias observadas fluctúa entre 14.6 y 47.8 nm. Las microfotografías 21 a 23 corresponden a membranas de Fosfatidilcolina sombreadas con cromo, el tamaño de las protuberancias en este caso fluctúan entre 25 y 45 nm.

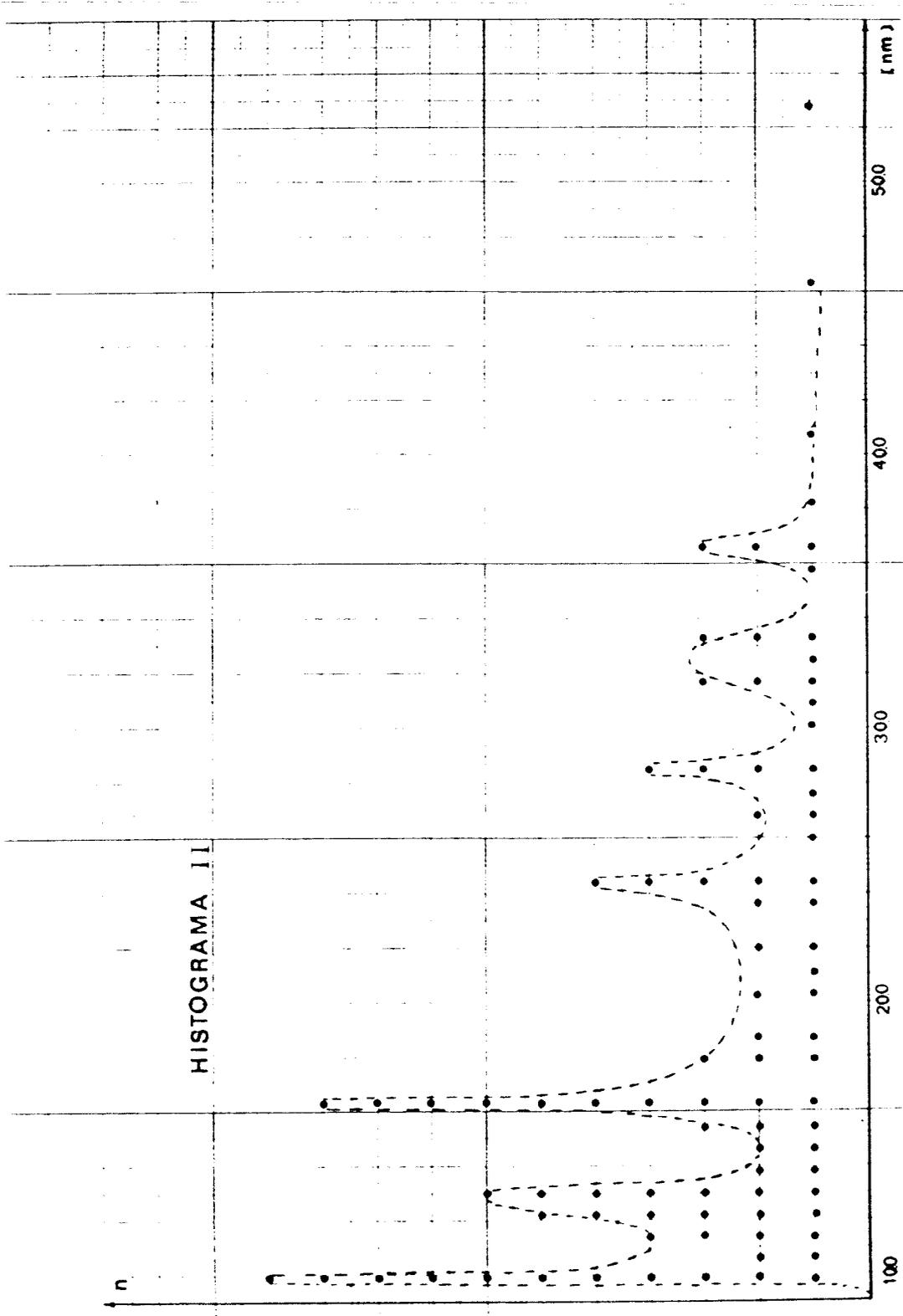
El histograma I muestra la distribución de tamaño de las protuberancias observadas en las membranas, los puntos corresponden a datos extraídos de membranas sombreadas con Pt y los rectángulos a datos de membranas sombreadas con Cr. Se observa una distribución del tamaño de las protuberancias en por lo menos tres grupos perfectamente distinguibles centrados en 26 nm, 40 nm y 45 nm respectivamente. También se observan tres grupos menores que a pesar de la baja frecuencia de estos casos, es difícil considerarlos parte del ruido de los picos más significativos debido a que se encuentran bastante separados de ellos 5.7, 5.7, 9.0, 5.0, 5.0 y 10 nm respectivamente.



Soluciones de hemocianina (preparadas para introducirla en la cámara luego de formada la membrana) fueron en varias ocasiones vitrificadas y fracturadas para obtener réplicas de ellas. Estos resultados se muestran en las microfotografías 24 y 29, la distribución del tamaño de las protuberancias observadas se muestran en el histograma II. Se pueden distinguir 7 grupos en base a la separación de los picos.

Indudablemente la cantidad de datos disponibles es insuficiente como para establecer la existencia de sólo estas formas de disociación de la molécula, ya sea en solución o incorporadas en la membrana o que algunas de ellas correspondan a la presencia de una sola subunidad con distintos grados de penetración. La distancia entre los picos correspondientes en membrana y solución es de 4.8, 7.3, 9.7, 10.6, 11.5, 12.0 y 18.4 nm respectivamente.

Al separar las cámaras con su contenido congelado se puede suponer que en una de ellas queda expuesta la membrana. Esta suposición no es arbitraria porque al someter las cámaras a una sublimación prolongada antes de hacer la réplica



se observaba que el nivel de la superficie en el orificio de la lámina de teflón no descendía, sin embargo, en la cara complementaria, sin teflón, se observaba un notorio descenso de la superficie. Esto indica que la fractura se produce por una de las caras de la membrana y además, marca el lugar donde ésta permanece. Por lo anterior y la separación observada entre los picos, es poco probable que los resultados obtenidos con las membranas pudieran deberse a la creación de algún artefacto. Con ello se ha ce muy difícil justificar la separación de 10.6 nm en pro medio de los picos. La molécula de hemocianina o alguna subunidad de ésta al introducirse en la membrana debe que dar total o parcialmente cubierta, por lo que el diámetro de las protuberancias observadas en las membranas debería ser mayor al de la hemocianina en solución en aproximadamente el espesor de dos monocapas, lo que implicaría sepa raciones entre los picos de 5 ó 5.7 nm. Creo que esta ex cesiva diferencia podría deberse a la condensación de hielo en la superficie de la membrana, condensación que podría ocurrir en la etapa de montaje de las cámaras en el equipo

Denton. La foto 30 muestra la producción de artefactos al condensarse hielo en la superficie de un tejido antes de sombrear, a pesar que el aspecto granuloso que se observa es similar al de la M.F. 18 el tamaño promedio es 5 veces mayor. Los resultados mostrados en la M.F. 18 a 23 corresponden a la superficie de la membrana del mismo lado que se puso la solución de hemocianina.

II. MEMBRANAS FOTORRECEPTORAS

La rugosidad que se observa en las réplicas de las membranas biológicas al ser estas fracturadas según la descripción de BRANTON corresponderían a la presencia de proteínas en la membrana. Esto ha sido demostrado en fantasmas de glóbulos rojos por ENGSTRON (1970). Estas membranas al ser tratadas con alguna enzima como pronasa, muestran una disminución de las protuberancias hasta la desaparición total de ellas según el tiempo que hayan sido expuestos a la acción de la enzima.

Retinas de sapos fijadas en glutaraldehído fueron vitrificadas en aire líquido y grabadas por 5 min. Las réplicas muestran, como se ve en la M.F. 31, superficies lisas (L)

y rugosas (R), las protuberancias de las membranas rugosas son de 10 nm aproximadamente. Tanto en las M.F. 31 y 32 se observan trazos muy finos que separan en dos las superficies lisas, el espesor de estos trazos es de 7.5 y 10 nm respectivamente. En las M.F. 33 a 35 se observa la doble capa de la membrana con un espesor promedio mínimo de 10.2 nm. También se observa en estas M.F. una alternancia de líneas con una gran cantidad de protuberancias de 10 nm y líneas bastante suaves, menos contrastadas, con pocas protuberancias. El espesor promedio de los sacos en las M.F. 33 y 34 es de 34.5 nm, en la M.F. 36 es de 28.6 nm, esta diferencia posiblemente se debe a una distinta inclinación del bastón respecto del plano de fractura.

Parte de este material fue tratado con Tritón X-100 al 1% (Detergente) después de su fijación. Las retinas extraídas muestran protuberancias de 10 nm separadas por distancias del mismo orden de magnitud. También se observa como en las M.F. 36 y 37 líneas gruesas y finas alternadas. En estas mismas M.F. se observa la formación de micelas (M) que emigran desde la membrana de los sacos al exterior, no se observa la

membrana plasmática.

Ha sido propuesto (Doggenweiler, 1976) que los lípidos pero no las proteínas, son extraídos por el detergente en las condiciones anteriores, a pesar que con las técnicas de microscopía electrónica tradicionales no es posible hacer destacar las proteínas de la membrana ni aún después de la extracción de los lípidos. Las M.F. 38 y 39 sugieren que la fijación con glutaraldehído actúa sobre las proteínas porque aún después de extraídos los lípidos permanecen estructuras de 10 nm ordenadas manteniendo la disposición que tenían en la membrana.

DISCUSION

Las limitaciones de las técnicas usadas en análisis de ultraestructura está dado por la resolución de éstas. La técnica más usada en microscopía electrónica para alta resolución es la de corte fino, 5 nm, de tejidos incluidos y teñidos con materiales electrónicamente densos, esta provee una resolución del orden de 1.5 a 2.0 nm. La resolución de la técnica de criograbado desarrollada en este trabajo, está limitada por el diámetro de los núcleos de metal condensado en la superficie de la preparación. El diámetro de estos granos varía según el metal. Para Cr el tamaño promedio de éstos es de 1.7 nm y para el Pt es de 0.8 nm. Otro aspecto que influye en la resolución de la técnica es la inclinación del plano de fractura con respecto a la dirección del vapor de metal incidente. La sombra obtenida de una protuberancia cuando el ángulo de incidencia del vapor de metal es mayor, i.e. se aleja de la normal a la superficie

clivada, estará formado por una mayor cantidad de granos de metal alineados. Esto permite por una parte obtener medidas más precisas del diámetro del obstáculo y por otra, hacer resaltar obstáculos cuyo tamaño sea comparable al de los granos de metal. La resolución obtenida en las réplicas, a pesar de todas las limitaciones en equipo que no se pudieron superar, como lo muestra la M.F. 40 es de 1.3 nm y corresponde al espesor mínimo del espacio interior de la membrana de un saco.

I. MEMBRANAS ARTIFICIALES

Entre los posibles tipos de artefacto que se forman en la etapa de congelamiento de las membranas artificiales hasta la obtención de las réplicas habría que mencionar dos más de ellos. El primero se debe a que al hacer el sombreado de la membrana no sólo se deposita metal sobre ésta, sino también sobre gran parte de la lámina de teflón y es posible que por alguna mala manipulación podría tomarse algún trozo de réplica de la lámina o de la superficie de la grasa selladora. Al observar una réplica de este tipo,

(M.F. 41), el aspecto de estas superficies es bastante característico y el tamaño de las irregularidades es varios órdenes de magnitud mayor que el de las protuberancias observadas en las membranas. El segundo tipo de artefacto se produce al romperse la membrana por la formación de cristales de hielo, los que se reconocen por su forma característica. La M.F. 42 muestra tales cristales y su tamaño tampoco es comparable al de las protuberancias de las membranas.

A pesar que el argumento de sublimación, dado en la parte Resultados, es suficiente para demostrar que el material que hay en la superficie del orificio de la lámina de teflón son lípidos, no es suficiente para deducir de él que las protuberancias son producidas por el abultamiento de la molécula de hemocianina o sus subunidades en el espesor de la membrana.

Las posibilidades de ubicarse la hemocianina en la membrana son tres, sobre esta (en la cara que estaba en contacto con la solución donde se puso la hemocianina) en el

espesor de la membrana o en la otra cara. La primera posibilidad es rápidamente descartable porque el corrimiento en el tamaño de las protuberancias en las membranas, en comparación con lo que se observó en solución contradice esta posibilidad. En caso de situarse la molécula de hemocianina o alguna subunidad de ésta adosada a la superficie o que se deposite en ella al sublimarse parte de la solución congelada que pudiera haber quedado sobre la membrana, se obtendrían protuberancias cuyos tamaños serían similares al que se observa en solución.

La tercera posibilidad también es descartable porque la réplica de una superficie de membrana no podría dar información de la cara opuesta, salvo que las proteínas estuvieran ejerciendo alguna presión en la membrana, deformándola en los sectores donde se ubica la hemocianina. Esta situación es difícil de explicar porque es necesario suponer un punto de apoyo de la molécula con la solución. De todas formas, de existir este mecanismo las protuberancias que se observarían en el lado opuesto al que se encuentra la hemocianina tendrían un tamaño equivalente al de la

molécula o subunidad más el espesor de dos membranas. Es to explicaría el gran corrimiento del tamaño de alguna de las protuberancias observadas en membranas respecto al que se observa en solución. Por otro lado, una interacción de este tipo implicaría un corrimiento uniforme en la distribu ción de tamaños de las protuberancias, pero no es el caso.

La segunda posibilidad es la que está más de acuerdo con el modelo actual de la membrana. En este caso existen varias alternativas respecto al grado de penetración de la proteína en la membrana. En primer lugar, está la posi bilidad que la molécula, debido a su gran tamaño, esté en parte sumergida como la molécula b y c del diagrama (8) , esta situación produciría protuberancias con tamaños similares a los observados en solución y podría explicar el 4° pico del histograma I y su equivalente en solución, 7° pico del histograma II. Este mecanismo presenta el grave inconveniente que no habría forma de explicar el resto de los picos del histograma I, porque no estarían sus equivalentes en el histograma II. Una segunda posibilidad de ubicarse la hemocianina en el espesor de la membrana es que esta que de totalmente sumergida como la molécula d del diagrama (8).

Esta situación acarrea un compromiso grave con respecto a la configuración de la membrana porque implicaría una gran deformación de ésta, dado que debería quedar totalmente cubierta con las caras de la membrana. Una configuración de este tipo es muy conveniente para explicar el corrimiento de los picos del diagrama I, porque mientras más grande sea la subunidad produciría un abultamiento mayor en la superficie de la membrana. De todas formas, con la configuración actual del modelo de la molécula de hemocianina, en forma de cilindro, dificulta la configuración que adquiere la membrana para moléculas grandes, porque significa que esta en las vecindades de la molécula de hemocianina debe separar sus caras en 5.5 u 8 veces su espesor. Esto sería posible sólo si la estructura de la molécula de hemocianina no fuera cilíndrica sino laminar y que su espesor fuera el de una subunidad, como se discute más adelante, lo que explicaría la presencia de moléculas completas en el seno de la bicapa en la misma forma que para las subunidades menores. Esta configuración está más de acuerdo con los datos obtenidos.

Un último argumento que descarta totalmente la posibilidad de asociar los resultados con la formación de algún artefacto, es que éstos siempre presentan tamaños uniformes con muy pequeñas variaciones como se observa en las fotos 30 y 42.

Indudablemente que la pérdida de calidad de los resultados en membranas artificiales, a pesar de la existencia de dos trampas descontaminadoras, se debe a que la membrana queda expuesta durante mucho tiempo en el termo de aire líquido y después en el evaporador Denton. Para resolver este problema se diseñó una cámara, la que se encuentra en etapa de construcción, que permite llevar la membrana congelada y sin ser expuesta al equipo Denton, pudiendo fracturar en el momento de hacer el sombreado metálico. La foto 44 muestra parte de la cámara innovada. El sistema consiste en una cámara rectangular con un canal en su centro que permite el paso ajustado de una bisagra. La bisagra tiene un orificio cónico centrado en ambas hojas y permite aprisionar en su interior la lámina de teflón. Al formarse la membrana, luego de congelada, se extrae la

bisagra con la membrana y el hielo que rodea a ésta por ambos lados montándola en el porta bisagra para su ubicación posterior en el pivote 7A. Este sistema permite, además, el montaje de una camisa descontaminadora rodeando la bisagra, evitando la condensación de sustancias, especialmente agua, sobre la membrana. Esto se facilita manteniendo la temperatura de la membrana un poco superior (-150°C) que la de la camisa descontaminadora (-197°C).

En los resultados obtenidos por van BRUGGEN llama la atención la gran cantidad de estructuras cuadradas que se observan a pH 6.0 ó 7.6. Curiosamente, en las réplicas de solución de hemocianina no se observan estructuras cuadradas, por lo general tienden a corresponder a estructuras circulares. Este hecho sugiere la idea que la hemocianina es una molécula plana con un espesor similar al diámetro de las subunidades, o sea, compuesta por la agregación en un mismo plano de subunidades, formando una estructura cerrada. Los argumentos que considera van BRUGGEN para sustentar su modelo se basa principalmente en la diferencia de contraste de algunas estructuras circulares, foto 3,

suponiendo de ello que corresponden a cilindros divididos en dos y dispuestos con la base sobre el film de soporte. Esta situación efectivamente produciría un menor contraste porque representa un obstáculo más delgado al paso de los electrones en comparación con una molécula completa y dispuesta de la misma forma sobre el film de soporte. El argumento anterior es bastante discutible, porque en esa misma M.F. se observan estructuras rectangulares que corresponden a medios cilindros pero dispuestos en forma tal que representan el mismo obstáculo al paso de los electrones que las estructuras cuadradas, cilindros completos. Sin embargo, estas estructuras rectangulares también muestran menos contraste que las cuadradas. Por otra parte SCHRAMM y BERGER (1952), observaron moléculas de hemocianina fijadas con vapores de ácido ósmico y posteriormente, sombreadas con Pd, ellos observaron estructuras con forma de paralelepípedo con un surco en el centro, las dimensiones de estos "ladrillos" son de 12 x 12 x 40 nm, foto 43. La interpretación de van BRUGGEN de estos resultados, es que el eje del cilindro correspondería a uno de los lados

de los cuadrados observados por él. El otro lado del cuadrado, en la mayoría de los casos es del orden de un 13% mayor que el diámetro del cilindro, lo que indicaría que cuando el eje del cilindro es paralelo al film de soporte, el cilindro colapsa. Este colapsamiento produciría la hendidura central observada por SCHARAMM.

A pesar de estos argumentos, no se excluye la posibilidad de que estas distintas disposiciones de la molécula se deban a moléculas distintas. Esto, debido a que pequeñas variaciones en la técnica de preparación de la hemocianina producen cambios considerables en la proporción entre cilindros y cuadrados.

Un posible método para dilucidar si la hemocianina tiene una estructura cilíndrica como lo propone van BRUGGEN o se trata de moléculas planas, sería hacer inclusiones de solución de hemocianina. Al observar cortes finos de estas inclusiones debería observarse rectángulos de 30 x 42 nm que corresponde a la proyección de hemocianina cuando la diagonal del cilindro es perpendicular a la dirección de los electrones incidentes sobre la preparación. En caso

que se trate de moléculas laminales, deberían obtenerse proyecciones máximas de círculos de 30 nm de diámetro para las moléculas circulares, o proyecciones de 30 x 34 nm para moléculas cuadradas.

La movilidad de las proteínas en el espesor de la membrana, dada por el carácter de líquido bidimensional de ésta, quizás se podría verificar para estas proteínas poniendo en la cámara solución de hemocianina totalmente disociada y después de verificar la incorporación de las subunidades en la membrana, mediante recambio de la solución en las cámaras bajar el pH de la solución (conteniendo Ca^{++}). En caso de ocurrir asociación de las subunidades en la membrana, debería observarse en las réplicas protuberancias cuyos tamaños correspondan a unidades completas de moléculas.

II. MEMBRANAS FOTORECEPTORAS

Posiblemente se podría pensar que la aparición de protuberancias sólo en algunas caras de las membranas podría deberse a algún efecto del sombreado. Debido a que la fractura no siempre es perpendicular al plano de los

sacos, un plano ligeramente oblicuo dejaría más expuestas una de las caras de la membrana y por tanto, en esta se condensaría más metal quedando la cara siguiente un poco oculta recibiendo menos metal; sin embargo, como lo muestran las dobles flechas en las membranas donde se observa una gran cantidad de protuberancias en una de sus caras, siempre hay algunos sectores de la otra cara que también muestran protuberancias.

Otro hecho interesante que se puede observar, es que entre las membranas que muestran bastantes protuberancias siempre se intercala una membrana de poco contraste, i.e. con pocas protuberancias. En la M.F. 33 se destaca este aspecto ubicando al margen trazos gruesos que indican una membrana muy poblada y un trazo fino para membranas poco pobladas. Esta alternancia hace improbable la posibilidad que la aparición de protuberancias se deba a un efecto del sombreado.

Las M.F. 36 y 37, muestran la misma alternancia de las M.F. anteriores. Se destaca con 2 flechas ambas caras de las membranas más pobladas. Las membranas poco pobladas, marcadas con una flecha, están señaladas por

algunas protuberancias de 10 nm que mantienen su distancia a las membranas pobladas.

De las M.F. 36 o 37, se pueden establecer los siguientes hechos:

- i) La alternancia entre membranas con protuberancias y membranas de poco contraste, sin protuberancias, en las M.F. 33 a 35 solo puede justificarse si se suponen membranas con bastantes proteínas alternadas con membranas con pocas proteínas. Este hecho se corrobora en las M.F. 36 y 37, al quedar expuestas las proteínas de la membrana al extraer los lípidos.
- ii) La distancia entre las líneas de pocas protuberancias y las líneas gruesas con muchas protuberancias en las M.F. 36 y 37, no corresponde al espesor de la membrana.
- iii) En algunos sectores de las de líneas gruesas en las M.F. 36 y 37, se observa la presencia de proteínas en ambas caras, esto coincide con las M.F. 33 ó 35, donde se indica esto mismo con (o) y (c) en una misma membrana.

iv) Es sabido que la distancia entre las membranas de sacos consecutivos es de 15 nm y el espacio interior de los sacos de 30 nm aproximadamente, lo que indica que un saco estaría formado por una de las membranas pobladas de las M.F. 33 -ó 37 y la siguiente más distante a ésta.

El modelo de membrana que se desprende de los puntos anteriores se muestra en el Diagrama 18.

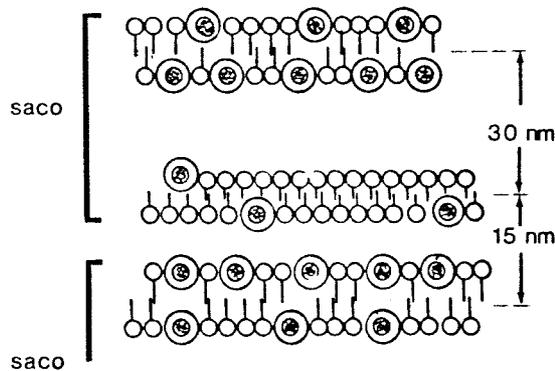


Diagrama 18

La actual interpretación del proceso de fractura, después de una larga polémica (BRANTON, 1966), indica que el plano de fractura procede generalmente por el interior

de la membrana quedando al descubierto las caras interiores de ésta, como lo muestra el diagrama 7. Según esto, las formas de quedar expuestas la membrana de los sacos cuando el plano de fractura es oblicuo se muestra en el diagrama 19, además se incluyen situaciones en que se exponen las caras exteriores de la membrana.

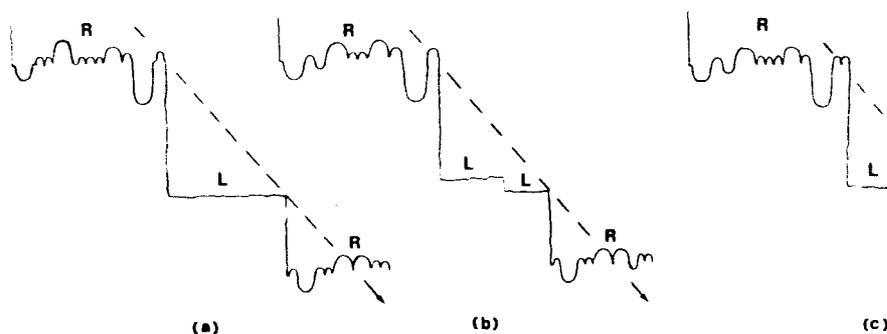


Diagrama 19. Muestra las posibilidades de fracturarse la membrana de los sacos cuando el plano de fractura es diagonal. La dirección de la fractura está indicado con la línea de trazo.

La elección de la modalidad de fractura de los sacos en estas condiciones debe ser hecha de acuerdo a lo que se observa en las M.F. 31 y 32, en esta se destaca la siguiente alternancia de superficies: rugosa (R), lisa (L), línea (Li), lisa (L) y Rugosa (R). Los únicos diagramas que están de acuerdo con esta alternancia son los 19 (b), (c) y (e).

Otro hecho que se destaca en las M.F. anteriores es que no se observa claramente la presencia de peldaños entre las superficies. Por ejemplo, se señala con Ru, en la M.F. 32 un sector que podría identificarse como un peldaño, pero hacia ambos lados en la misma línea, se observa que el cambio de superficie ocurre en forma suave y continua como lo destaca el sector encerrado en un círculo. Esto hace suponer que el sector Ru al igual que otros similares se producen por ruptura de la réplica durante su extracción del tejido o en el montaje de esta en la grilla. Los peldaños de los diagramas seleccionados presentan saltos de 30, 3.5, 18.5 nm, 30, 7, 15 nm y 52 nm respectivamente, la magnitud de estos saltos es bastante importante, sobre todo los de 30 y 52 nm como para

que pase desapercibido, en la M.F. 32, por ejemplo, se está resolviendo una línea (Li) de 7 nm. Por los motivos anteriores, no es posible relacionar algunos de los diagramas 21 s con las M.F. 31 y 32.

Una posible fractura, que no se describe en la literatura, es la que se muestra en el Diagrama 20.

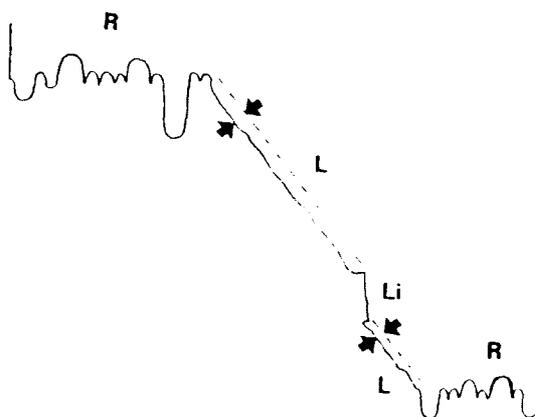


Diagrama 20. Describe un proceso de fractura en el que el plano de fractura no es escalonado entre membranas sino que viaja en dirección diagonal entre las membranas pobladas. Las flechas muestran el efecto de la sublimación.

Este diagrama coincide con la alternancia de superficies y además, reproduce el espaciamiento entre superficies y líneas que se observa en la M.F. 31. La forma de hacerse evidente la línea (Li) sería gracias a la sublimación.

Un punto interesante que se destaca con la ocurrencia de este tipo de fractura, es que las membranas pobladas, por el efecto de la fractura, se comporta según lo describe la literatura y en cambio las membranas poco pobladas presentan un carácter bastante amorfo para este efecto. Este hecho es muy significativo porque según lo que describe SINGER la matriz de las membranas la componen los lípidos y no las proteínas, parecería que en caso de los sacos la rodopsina le confiere a las membranas pobladas un carácter especial que se manifiesta por una mayor resistencia mecánica al proceso de fractura.

También es posible que esta rigidez de las membranas pobladas no se deba a un tipo particular de interacción lípidos-proteínas, sino sea el producto de la acción del glutaraldehído sobre éstos. Esto coincide con lo que se muestra en

las M.F. 33 a 35, donde es posible notar que en las caras de las membranas donde se observan protuberancias estas casi siempre se encuentran sólo en algunos sectores quedando sitios despoblados en la misma cara. Esta distribución en conglomerados de proteína es difícil de explicar en una membrana supuestamente de carácter homogéneo, a diferencia de algunos sectores especializados, como los Gap Junctions, de ciertas membranas que desempeñan roles específicos. Lo que sugiere que el responsable de la conglomeración de proteínas es el glutaraldehído y además sería el responsable de la rigidez de las membranas pobladas (BROWN, 1942).

Una evidencia importante en favor del rol del glutaraldehído es la que se observa en la M.F. 31. En esta se aprecia que los dos primeros sectores rugosos (R) se inician con una línea similar a la que separa las superficies lisas (L) y en ellas la fractura es perpendicular al plano de la membrana, de lo que se infiere lo siguiente:

- i) Las proteínas, por la acción del glutaraldehído forman dominios dentro del plano de la membrana.

- ii) Las membranas o sectores de ésta carentes de proteína son mecánicamente menos rígidos, lo que destaca la importancia de las proteínas en la configuración de la membrana.
- iii) La interacción glutaraldehído-proteína está mucho más favorecida que la interacción glutaraldehído-lípido.

La forma de resolver esta problemática de interacciones y distribución asimétrica de proteínas, consiste en efectuar réplicas de retina sin fijación y poder comparar de esta manera ambas situaciones.

Los resultados sobre la asimetría de la membrana de los sacos, difieren con los obtenidos por análisis de rayos X mencionados en pág. 13, dado que por este método no se ha reportado la posible asimetría en la membrana de los sacos, salvo una diferencia en la densidad de proteínas entre el lado citoplasmático y el exterior de la membrana, resultado que se observa en las réplicas en la mitad de la membrana de los sacos. Es posible que las membranas poco pobladas también posean la misma asimetría en una magnitud menor y

por este motivo no se detecta en las réplicas.

Debe destacarse que en la información obtenida por el método de difracción de rayos X está comprometida toda la muestra observada y no es puntual como la obtenida al microscopio electrónico, donde es posible analizar regiones particularizadas.

CONCLUSIONES

- 1: i) Los resultados obtenidos con la técnica montada son buenos, se logró una resolución de 13 \AA en algunas preparaciones.
- ii) Las exigencias del vacío para la calidad de los resultados es un punto secundario. Gran parte del trabajo se hizo con presiones que fluctuaban entre 10^{-2} a 10^{-4} Torr y los resultados obtenidos no fueron modificados respecto a aquellos que se hicieron con presiones menores a 10^{-5} Torr.
- 2: i) Como se demuestra en la Discusión, fue posible observar membranas artificiales. A pesar que en este aspecto el trabajo no se ha concluido, debo destacar la importancia de esta técnica en el estudio de la ultraestructura de las membranas, al permitir controlar la cantidad y tipos de proteína junto con las condiciones de medio en que tiene lugar la interacción de las bicapa

lipídicas con tales proteínas y poder comparar los cambios morfológicos inducidos por estas condiciones en que se forma la membrana con las propiedades eléctricas de ésta.

ii) La molécula de hemocianina, al igual que las subunidades penetran en el interior de membrana. Creo que este punto necesita una mayor fundamentación en lo que a resultados se refiere, esto debería lograrse con el nuevo sistema de cámaras.

3. i) Con la técnica de microscopía electrónica de tinción no ha sido posible observar las proteínas remanentes después de la extracción de los lípidos con el detergente, este hecho muestra alguna de las ventajas de la técnica montada, esto es, permite analizar los componentes de un sistema independientemente de las propiedades de reacción química de estos componentes con algún elemento de tinción.

ii) La membrana de los sacos de retina son asimétricas respecto a la distribución de la proteína. Se observa

en una de las mitades de la membrana de los sacos, suponiendo una división ecuatorial de estos.

- iii) El sector de la membrana más poblado presenta una asimetría respecto a la distribución de las proteínas en sus caras. La cara exterior es más poblada.
 - iv) Se pudo observar que el Tritón en la retina fijada con glutaraldehído actúa extrayendo los lípidos, los que se organizan formando miscelos. Mientras que las proteínas mantienen la distribución que tenían en la membrana.
 - v) Las evidencias obtenidas indican que el glutaraldehído forma fuertes enlaces con y entre las proteínas.
 - vi) Los sectores más poblados de proteínas, son mecánicamente más resistentes al proceso de fractura, ya sea por la presencia de una alta concentración de proteínas en el sector o por la acción del glutaraldehído
4. El modelo de SINGER y NICOLCON, esquematizados en los diagramas (7) y (8), muestra una matriz de lípidos interrumpida por la ubicación de proteínas en ella. Esta configuración implica interacciones hidrofóbicas entre las cadenas

de hidrocarburos de los lípidos con el medio. El mecanismo de hidrofobicidad también es aplicable a la presencia de proteínas en la membrana, por lo menos constituye un argumento viable que justifica la presencia de algunos tipos de moléculas de proteína en contacto con el interior hidrofóbico de la membrana, situación que está representada por la letra b y c del diagrama (7). En estas condiciones, la única restricción es mantener un grado de inmersión en la membrana, quedando libre de moverse en el plano de ésta. Dentro de este mismo mecanismo, cabe suponer que la molécula completa o subunidad de ésta presenta este efecto de hidrofobicidad y su configuración sería la que se muestra con la letra d del diagrama (7).

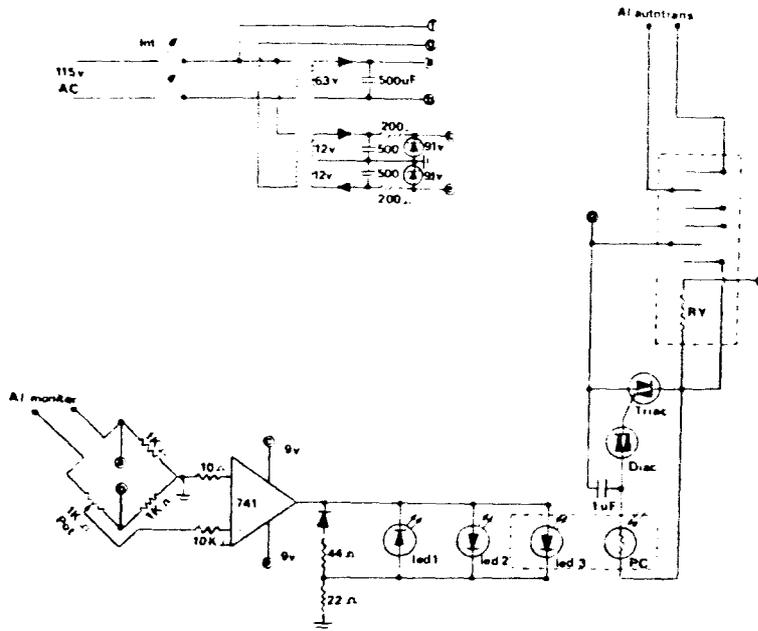
Considerando el aspecto destacado antes, y de acuerdo con los resultados obtenidos, habría que indicar los siguientes hechos:

- i) A pesar del carácter hidrofóbico de la hemocianina en solución, que se deduce de su facilidad de disociación en medio acuoso, parecería que una estructuración hidrofóbica

por parte de la molécula, es una situación mucho más estable para ella, esto por las evidencias obtenidas en favor de la ubicación de la hemocianina y sus subunidades en el interior de la membrana, lo que explicaría el que la membrana se deforma para dar cabida en su interior a la molécula.

- ii) La matriz lipídica no es un constituyente pasivo de la membrana puesto que es capaz de deformarse para dar cabida en su interior a las moléculas de hemocianina.
- iii) Los miselos que se observan en las M.F. 36 y 37, señalan que los lípidos que constituyen la membrana de los sacos son anfifilos, o sea, presentan extremos polares (hidrofílicos) y apolares (Hidrofóbicos).
- iv) La movilidad de las proteínas en el plano de la membrana parecería estar muy bien señalada en las M.F. 33 a 35, donde se observan agrupaciones de proteínas en algunos sectores de la membrana. Posiblemente este fenómeno se deba a la acción del glutaraldehído, la confirmación de este punto se debe obtener al observar membranas sin fijar.

APENDICE



Cuando la resistencia del sensor es menor que la resistencia del potenciómetro el Led 3 se enciende y el reloj se cierra cortando la alimentación del primario del autotransformador.

Led 3 está ópticamente acoplado a PC.

REFERENCIAS

- ALVAREZ, C., DEAZ, E., LABORIE, R. (1975) *Biochimica et Biophysica Acta*, 389, 444-448.
- AMBRON H. (1890). *Ber Sächs. Ges. (Akad.) Will.* 42, 419 - 429.
- BANKHAM, A.D. (1968). Eds. Buttler, J.A.V. & Noble, D. (Pergamon Press, New York), pp. 29 - 95.
- BLASIE, J.F. (1972). *Biophys. J.* 12, 191 - 204.
- BRANTON, D. and PARK, R.B. (1968). *Paper on Biological Membrana Structure*. Boston: Little Brown and Co.
- BRANTON, D. (1966). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 55 1048 - 1056.
- BROWN, P.K. (1972). *Nature New Biol.*, 236, 35 - 38.
- van BRUGGEN, E.F.J. and WIEGENGA, E.H. (1962). *J. Mol. Biol.*, 4, 8 - 9.
- CHERN, P. and SCHMITT, F.O. (1937). *J. Cell. Comp. Physiol.*, 9, 289 - 296.
- CONE, R.A. (1972). *Nature New Biol.*, 236, 39 - 43.
- DANIELLI, J.F., and HARVEY, E.N. (1935). *J. Cell Comp. Physiol.* 5, 483 - 494.

DANIELLI, J., and DAVSON, H.A. (1935). *J. Cell. Comp. Physiol.* 5, 495 - 500

DUCKWITE-PETERLEIN, G., EILEN BERGER, G. and OVERATH, R. (1977). *Biochim. Biophys. Acta*, 469, 311 - 325.

ELKES, J. and FINEAN, J.B. (1949). *Faraday Soc.* 6, 134 - 141.

ELKES, J. and FINEAN J.B. (1953). *Exp. Cell. Res.* 4, 69-81.

ENGELMAN, D.M. (1969). *J. Molec. Biol.* 47, 115-117.

ENGELMAN, D.M. (1970). *J. Mol. Biol.* 47, 115

ENGSTROM, L.H. (1970). Ph.D. Dissertation. U.C.L.A., Berkeley

FINEAN, J.B. (1953). *Exp. Cell. Res.*, 5, 202 - 215.

GORTER, E., and GRENDL, F. (1925). *J. Exper. Med.* 41, 439 - 443.

GREEN, D.E., and FLEISCHER (1963). *Biochim. Biophys. Acta*, 70, 554.

HENN, F.A., and THOMPSON, T.E. (1969). *Ann. Rev. Biochem.* 38, 241 - 263.

- ROBBELL, W.L., and MCCONNELL, H.M. (1969). *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 64, 20 - 27.
- KAUFMAN, S., SPEIN, J.M. and GIBBS, J.M. (1970). *Nature*, London. 225, 743 - 744.
- HORN, E.D. (1966). *Science*, N.Y. 153, 1491 - 1495.
- LANGMUIR, I. (1917). *J. Amer. Chem. Soc.* 371, 1848 - 1905.
- LIEBMAN, P.A., BENTINE, G. (1974). *Sciences* 185, 457 - 459.
- MELCHOR, D.L., MOROWITZ, H.J., STORTEVANT, J.M., TSONG, T.Y. (197). *Biochim. Biophys. Acta* 219, 114.
- MONTAL, M. and MUELLER, P. (1972). *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 69 (12), 3561 - 3566.
- MOOR, H., MUHLETHALER, K., WALCNER, H. and FREY-WYSSLING, A. (1961). *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 10, 1 - 13.
- MOOR, H. (1964). *Z. Zellforsch.* 62, 546 - 580.
- MUELLER, P., RUDIN, D.D. (1963). *J. Theor. Biol.* 4, 268-280.
- QUERTON, E. (1845). *Vielteljahresschr. Naturforsch. Zürich* 40, 159 - 201.
- PANT, H.C., CONRAN, P. (1972). *J. Membrane Biol.* 8, 357-362.
- POO, M., CONE, R.A. (1974). *Nature* 247, 438 - 441.
- RIEHLE, U. (1968). *Dissertation ETH, N° 4271, Zürich.*
- ROBERTSON, J.D. (1959). *Biochem. Society (London) from Biochem. Symposium N° 16, 3 - 43.*
- SOHRAMM, G. and BERGER, G. (1952). *Z. Naturf.* 76, 284.
- SCHMIDT, W.Y. (1936). *Z. Zellforsch U. Mikm. Anat.* 23, 657 - 676.

- SINGER, S.J. and NICOLSON, G.L. (1972). *Science* 175, 150-172.
- SJØSTRAND, F.S. (1963). *J. Ultrastruct. Res.*, 9, 340.
- STEERE, R.L. (1957). *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 3, 45 - 60.
- STEERE, R.L. (1960). *Cryobiology* 6 (3), 137 - 150.
- STEERE, R.L. (1978). *Comunicación personal*
- STEIM, J.M. et al. (1969). *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, 63, 104 - 109.
- STEIM, J.M., TOORTELLOTTE, M.E., REINERT, J.C. McELHANEY, R. N., RADER, R.L., (1969). *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.* 63, 104.
- STOECKENIUS, W. and ENGELMAN, D.M. (1969). *J. Cell Biol.*, 42, 613 - 646.
- TOORTELLOTTE, M.E., BRANTON, D. and KEITH, A.D. (1970). *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, 66, 909 - 916.
- VAIL, W.J., PAPANADJOPOULOS, D. and MOSCARELLO, M.A. (1974). *Biochim. Biophys. Acta* 345, 463 - 467.
- WEIR, T.E., ENGELBRECHT, A.H.P., HARRISSON, A. and RISLEY, E. (1965). *J. Ultrastruct. Res.*, 13, 92.
- WILKINS, M.H.F., BLAUROCK, A.E., ENGELMAN, D.M., (1971) *Nature* 230, 72.
- WILLIAN, R., Balzers Report N° 2.

ILUSTRACIONES

Nota: La flecha en la esquina inferior izquierda de las
M.F. indica la dirección y sentido del sombreado.

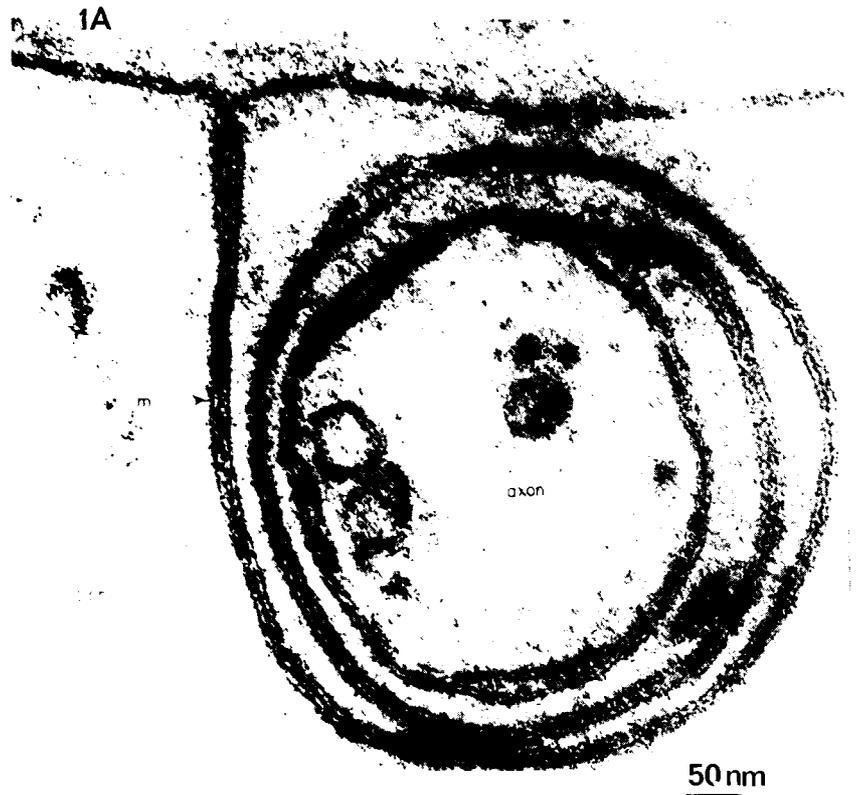


Foto 1A. Formación de Mielina. La membrana de la célula de Schwann aparece como una doble línea oscura, que según la interpretación de ROBERTSON correspondería a la presencia de dos capas de proteínas rodeando una capa de lípido representada por el espacio claro. La mielina se forma por el adosamiento de dos de estas membranas.

1B

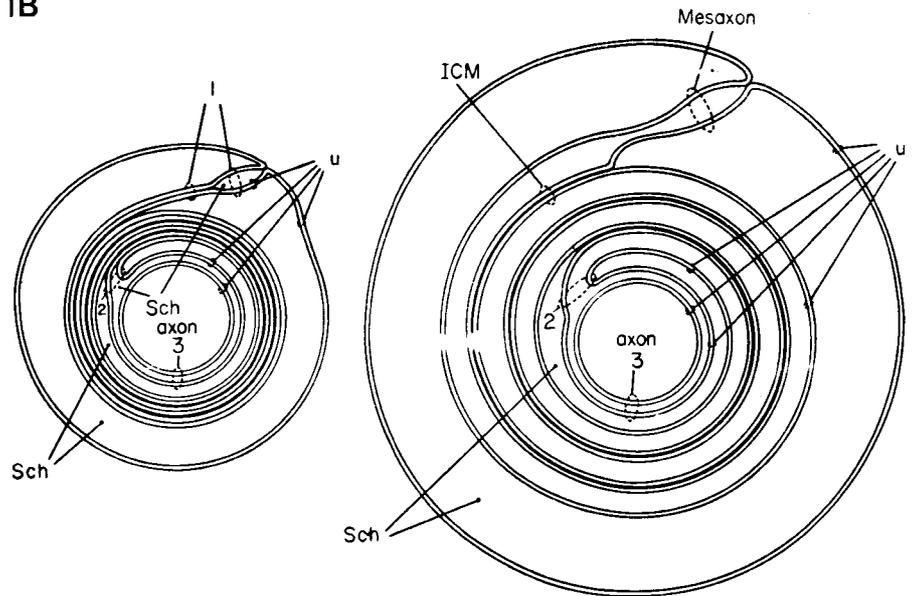
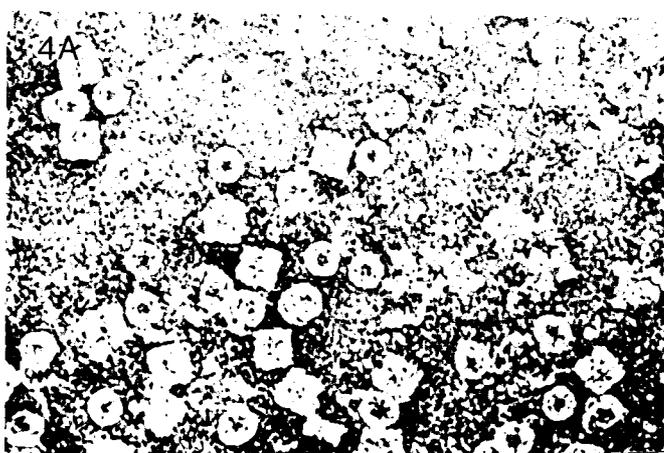
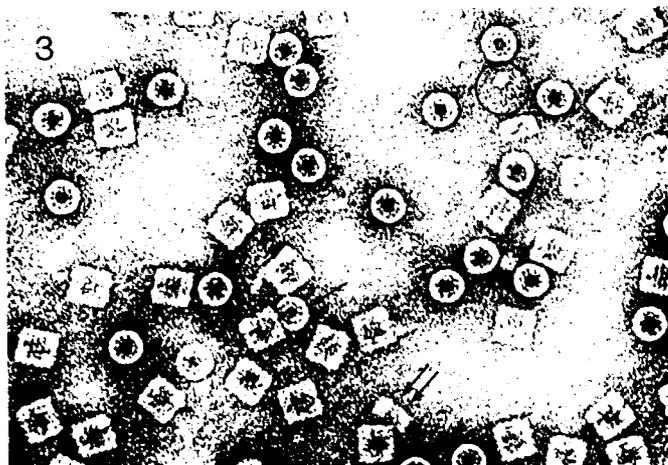
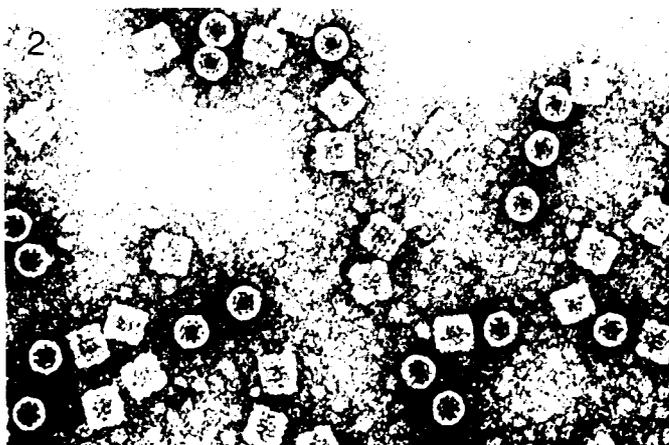
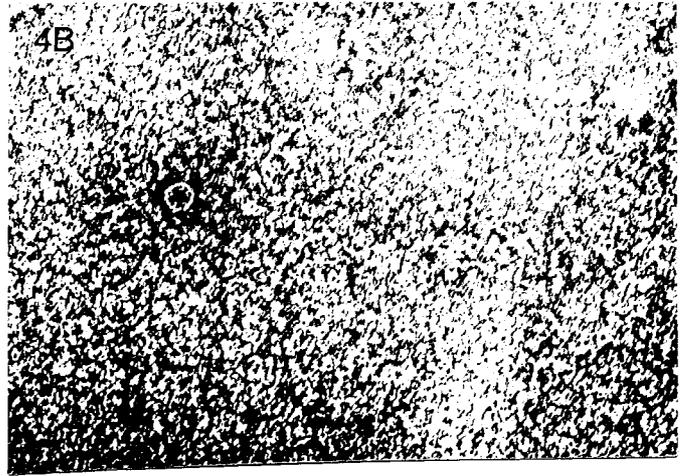
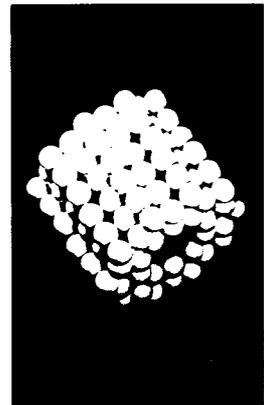
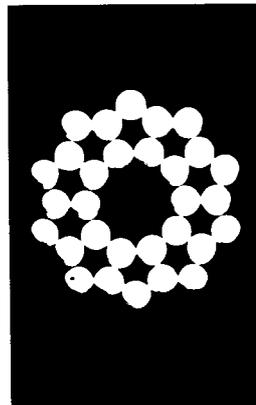
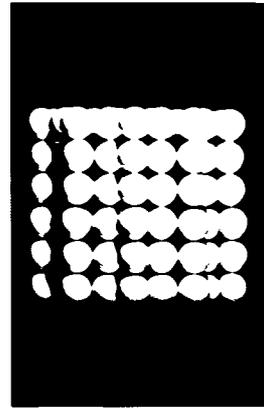
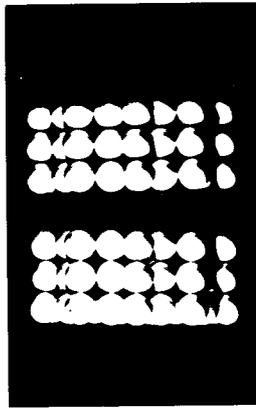


Foto 1B. Esquema que muestra la formación de mielina. elementos que contribuyen al diagrama de difracción está constituidos por dobles membranas, como se señala en ICM evidente que ésto corresponde a dos membranas provenientes de la célula de Schwann (u). Además Sch, citoplasma de célula de Schwann. El esquema A2 corresponde a mielina dratada.





5



Las Fotos 2 a 5 muestran el grado de disociación de la hemocianina según el valor del pH. Foto 2 correspondiente a hemocianina a pH 6.0, se observan sólo estructuras cuadradas y circulares.

Foto 3. Hemocianina a pH 7.6, van BRUGGEN destaca en esta situación algunas estructuras circulares con menor contraste, como lo muestra la flecha. A este valor de pH empiezan a aparecer estructuras rectangulares, doble flecha que corresponden al primer clivaje de la molécula, estas estructuras y algunos cuadrados también muestran poco contraste. El círculo destaca una subunidad.

Foto 4A. Junto con aumentar el valor del pH, 8.2, aumenta la cantidad de estructuras rectangulares, también se observan varias subunidades. Aquí también se aprecia el grado de contraste no guarda relación con el proceso de disociación de la molécula.

Foto 4B. Hemocianina a pH 8.7, En esta situación el ruido impide destacar las subunidades, se observa una

estructura circular. Es posible reasociar la molécula de hemocianina disminuyendo el valor del pH en presencia de un catión divalente.

Foto 5. Muestra el modelo de moléculas de hemocianina según van BRUGGEN. Las proyecciones (b) y (c) corresponden a las estructuras cuadradas y circulares respectivamente, observadas en las fotos anteriores. En (d) se muestra como ocurre el primer clivaje de la molécula.

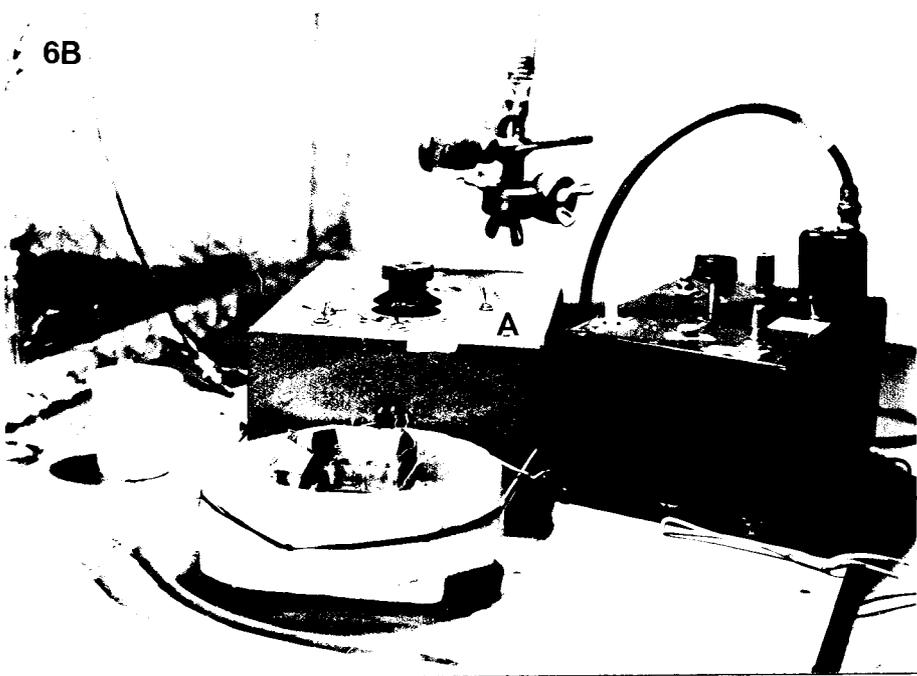
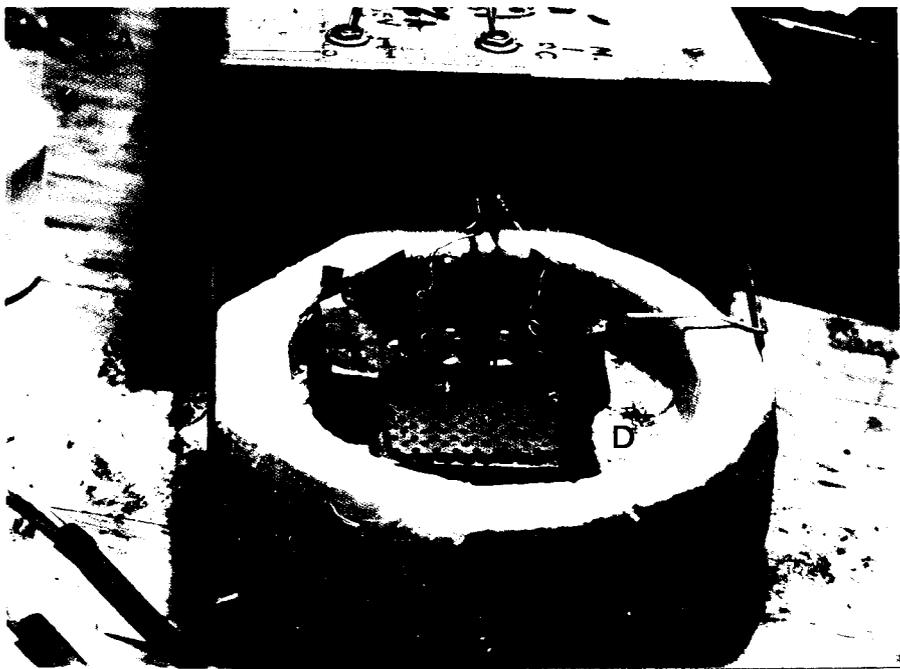
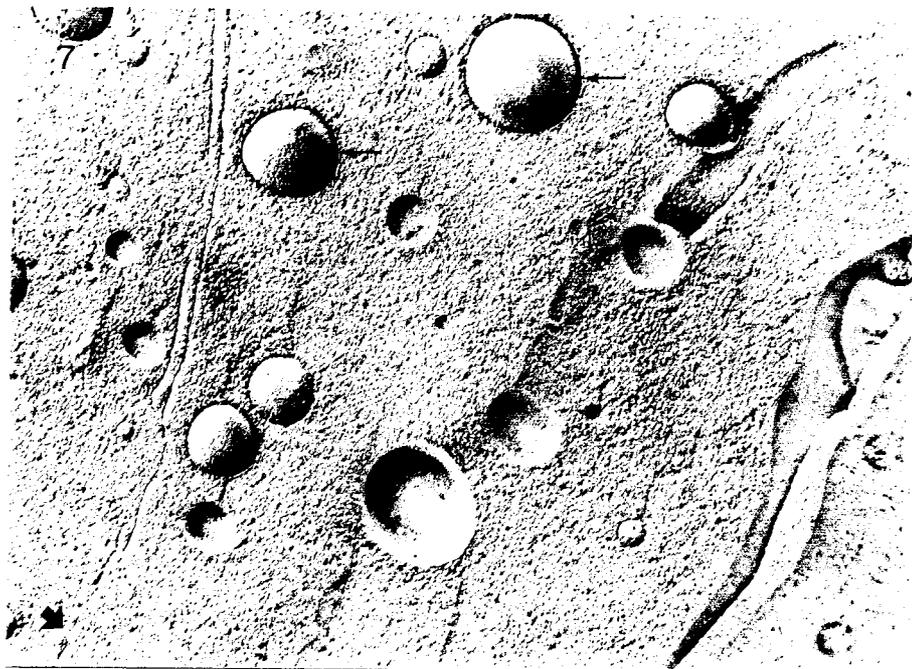
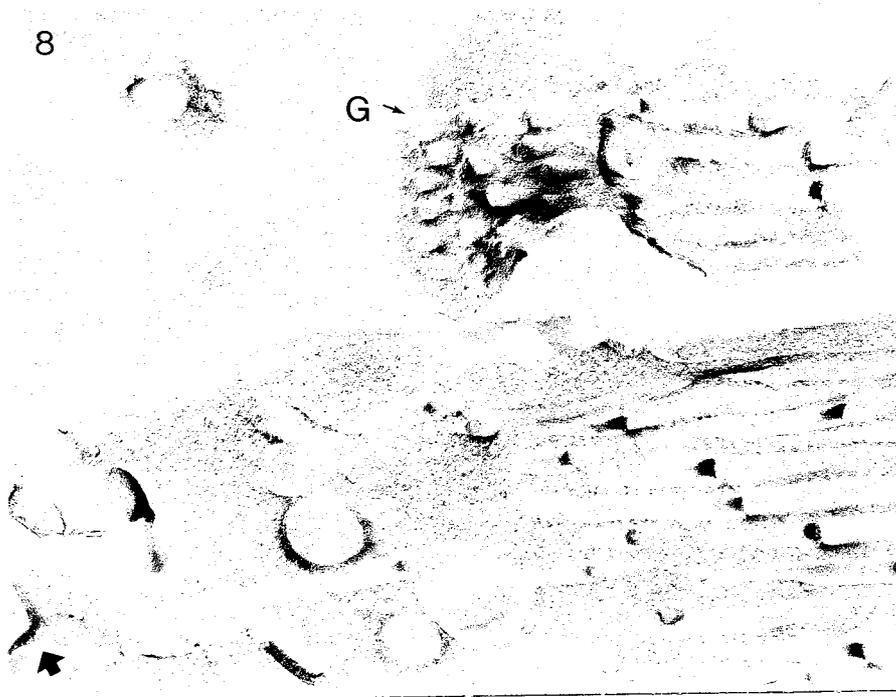


Foto 6A. Se observan las cámaras (C) y también los electrodos (E). El depósito (D) hace las veces de termo al poner en su interior aire líquido para enfriar las cámaras.

Foto 6B. Se muestra el generador de pulsos (G) y el sistema de amplificación (A).

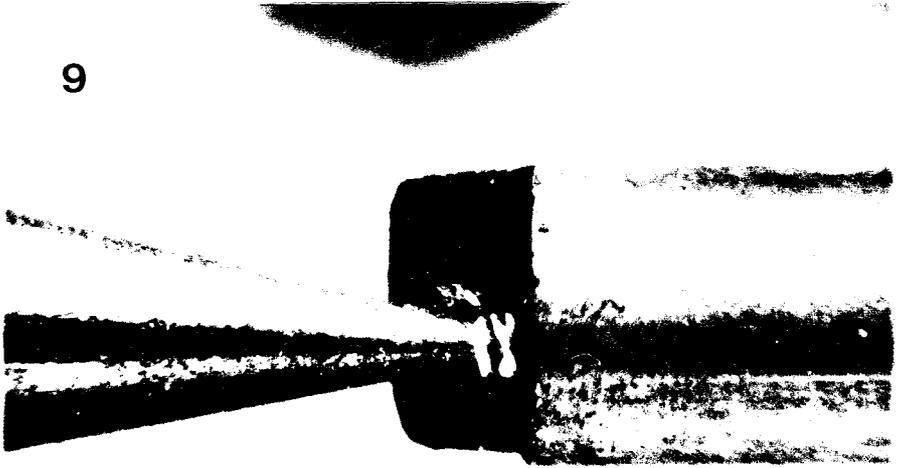




M.F. 7. Las flechas muestran membranas que quedan expuestas por efecto de la sublimación, esto ocurre sólo cuando la estructura en cuestión se fractura. De esta forma, es posible determinar la dirección del sombreado. También se observan mitocondrias (M).

M.F. 8. Muestra las prolongaciones de las células gliales (G).

9



10

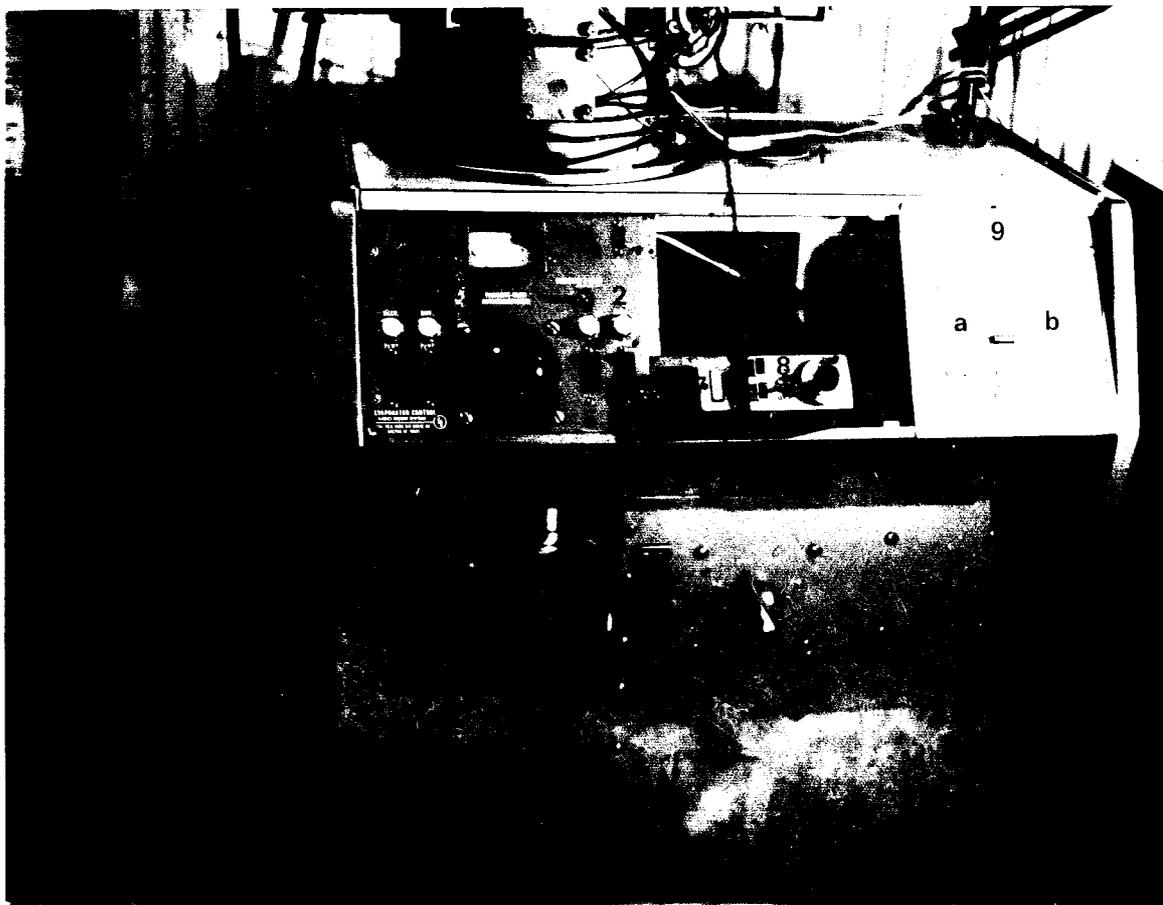


11



Fotos 9 y 10. Muestran las etapas de la preparación del Pt para su evaporación posterior. F 9 muestra el alambre de Pt antes de fundirse y F 10 la mezcla Pt-C lista para sombrear.

Foto 11. Muestra la forma de contactar los carbones para facilitar la evaporación de Carbón.



BANCO DE VACIO

1. Entrada de aire líquido a la trampa
2. Interruptor principal
3. Interruptor de la bomba rotatoria
4. Interruptor de la bomba difusora
5. Interruptor de alimentación del autotransformador
6. Amperímetro
7. Interruptor para enfriado rápido de la difusora
8. Control de espesor de las películas metálicas
9. Medidores de vacío, a) Pirani, b) Penning
10. Conmutador de fuente de evaporación

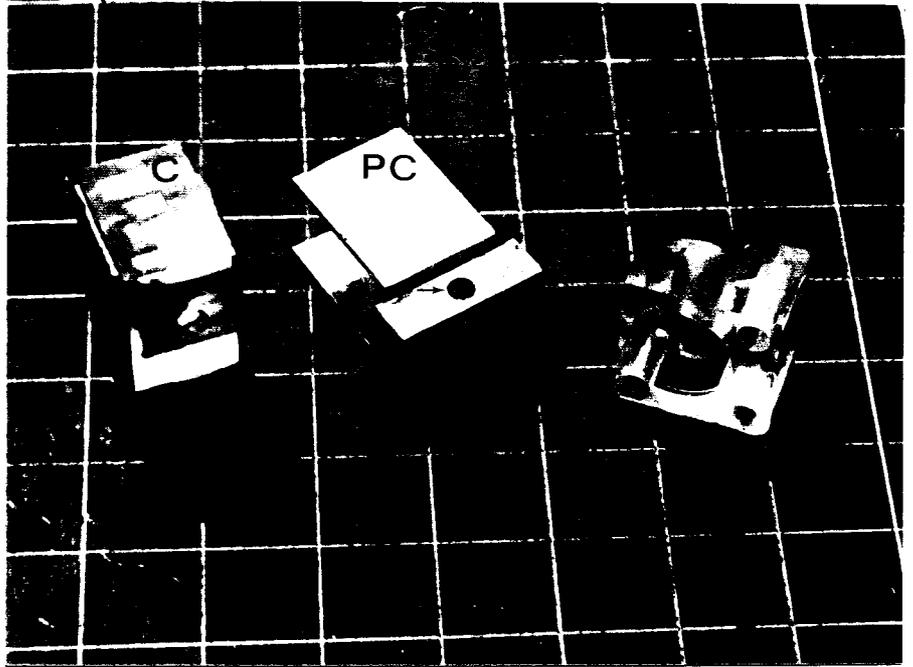
5 de enero de 1979

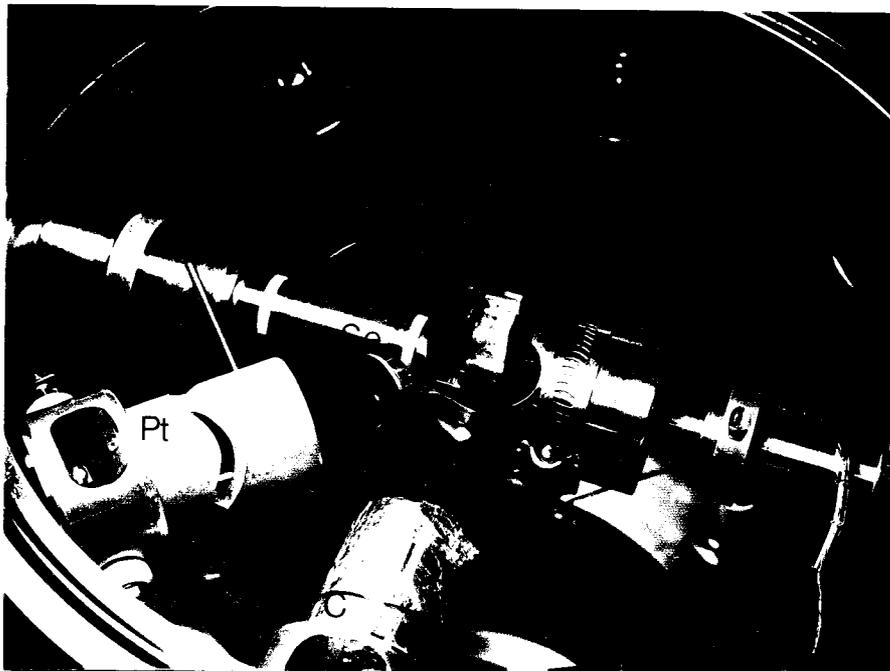
Santiago de Chile



EVAPORADOR DENTON

- 1 a, b. Termos de aire líquido
- 2 a, b. Palancas que permiten rotar el brazo 7 y 8
3. Conducto de aire líquido para mantener fría la preparación.
4. Conducto de aire líquido para mantener fría la cámara descontaminadora.
5. Válvulas que permiten controlar el flujo de aire
6. Indicador de temperatura
7. Brazo de soporte de la preparación
8. Brazo que soporta a camisa descontaminadora
9. Válvulas para introducir aire seco en la cámara

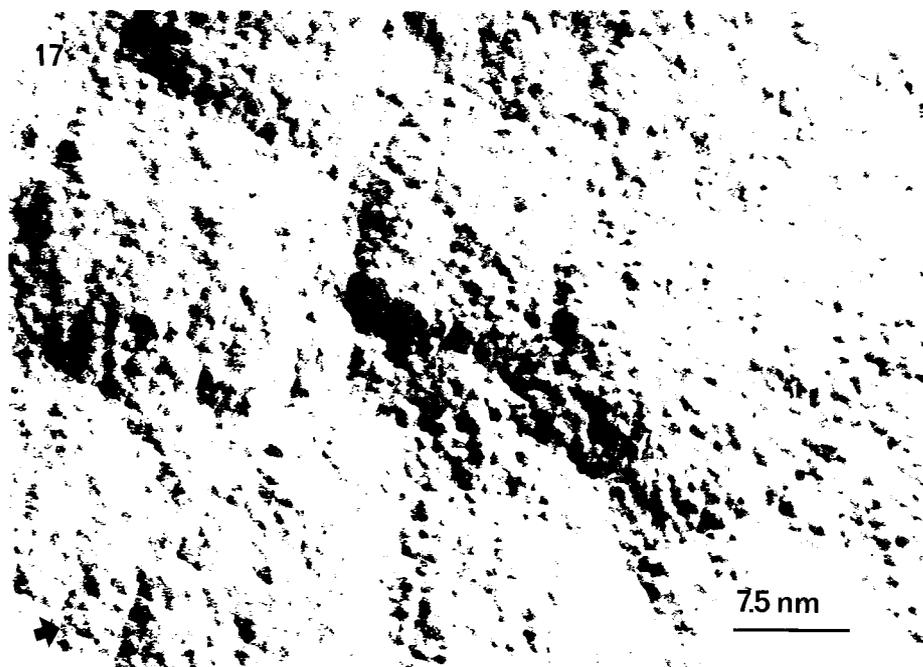




M.F. 14. Se muestran las cámaras (C) y el portacámara (PC). La flecha señala el sitio al cual se fija la pinza para asar el portacámara.

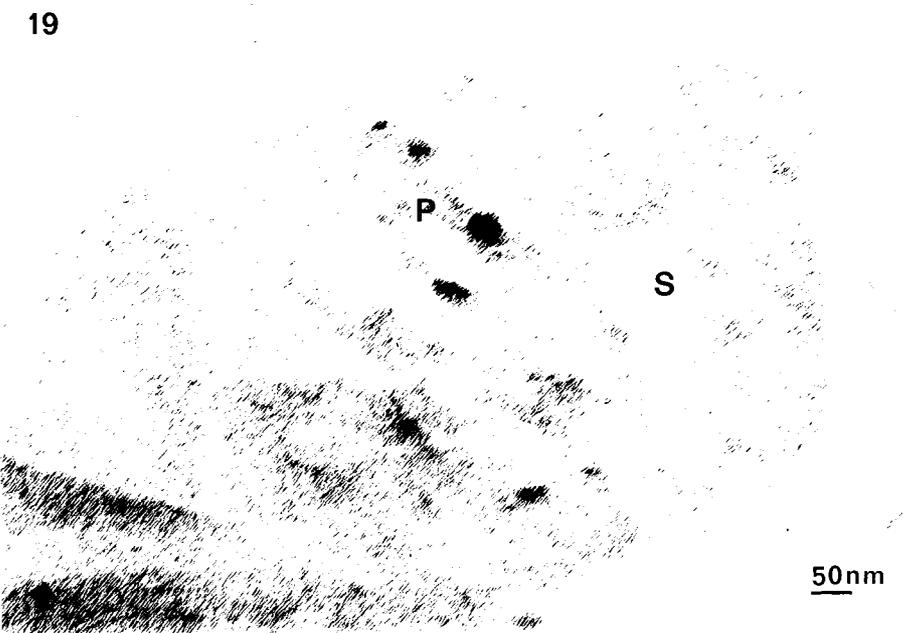
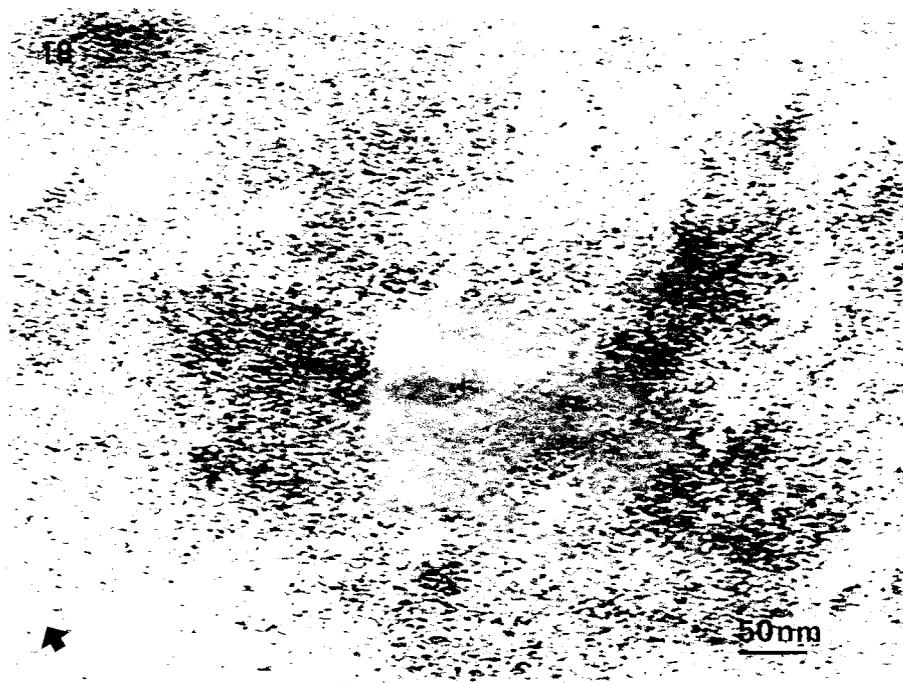
M.F. 15. Se observa el portacámara en el momento de introducirlo en el evaporador DENTON.

M.F. 16. El portacámara ya se encuentra enroscado en el pivote. En esta se observan el sensor (Se), el descontaminador (De), el cañón para evaporar metal (Pt) y el cañón para evaporar carbón (C).



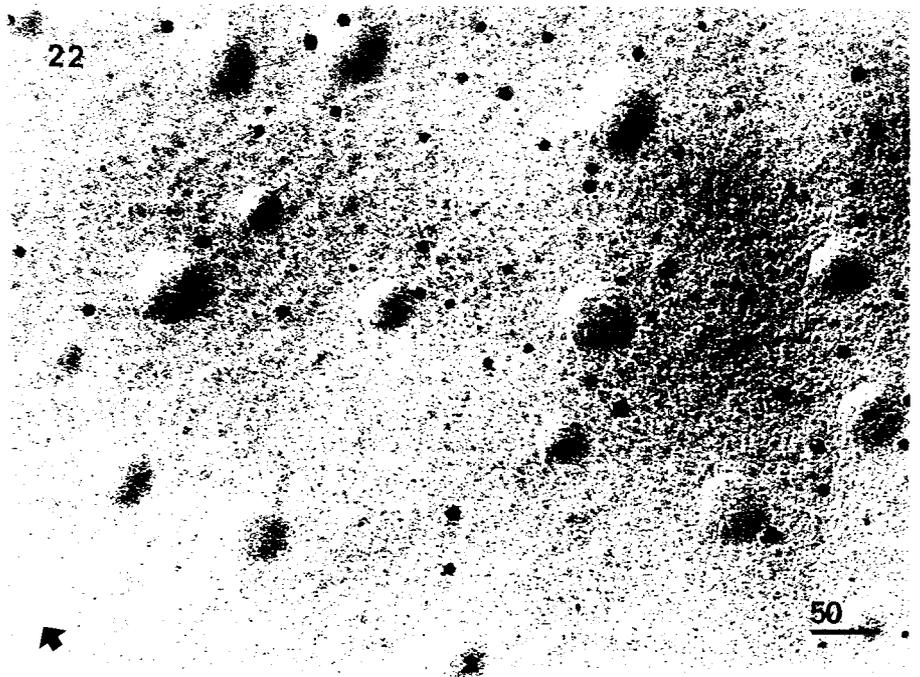
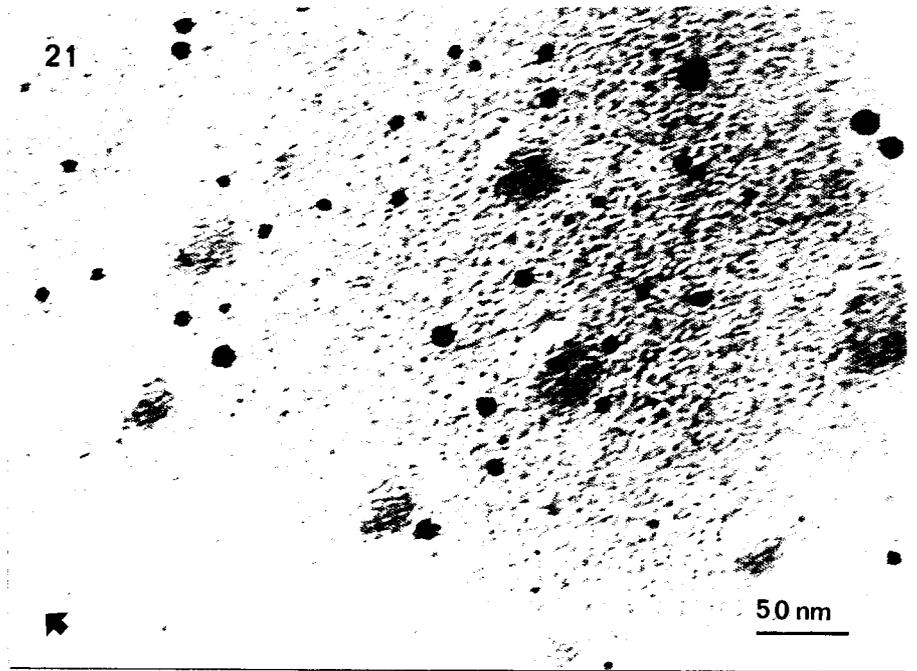
17

M.F. 17. Réplica de membrana en cuya solución no se ha puesto hemocianina. Muestra un aspecto globular, pero el tamaño de éstos es aproximadamente 10 veces menor que las protuberancias de las membranas (M.F. 18 a 29). Posiblemente se debe a condensación de hielo sobre la membrana pero en menor cantidad que la mostrada por STEERER (Foto 30).



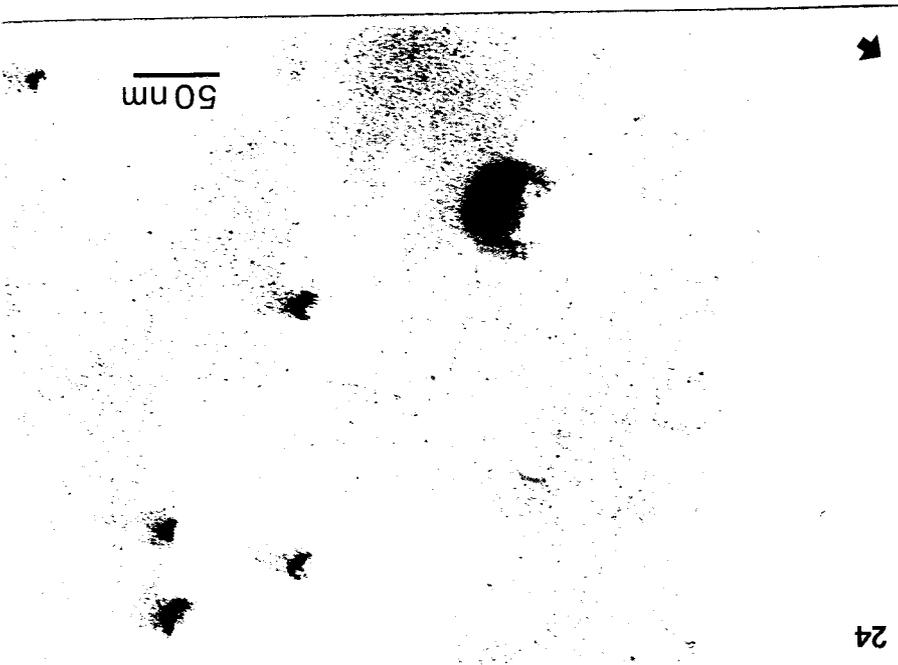


M.F. 18 a 20. Membranas sombreadas con Pt. El fondo de las réplicas que correspondería a la matriz lipídica presenta un aspecto muy suave salvo por las protuberancias (P) y otros solevantamientos (S) de límites poco definidos.

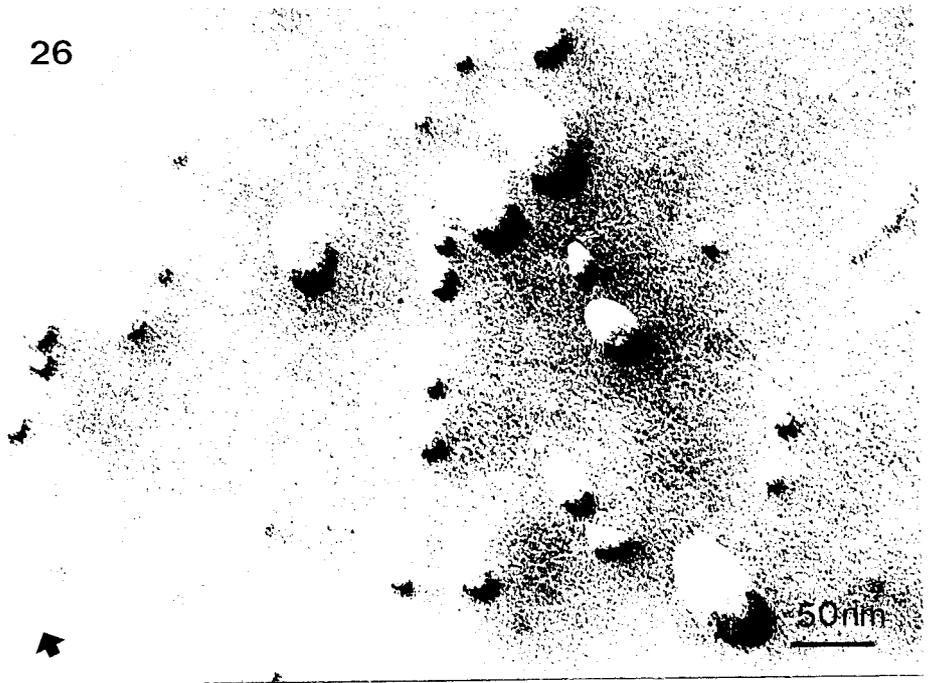




M.F. 21 a 23. Membranas sombreadas con Cr. A pesar que el aspecto de la membrana también es suave, la textura de ésta es granulosa, como se observa en la M.F. 23, efecto producido por la nucleación del Cr sobre la superficie de la membrana. Los puntos negros en las M.F. 21 y 22 se deben a contaminación de la membrana.

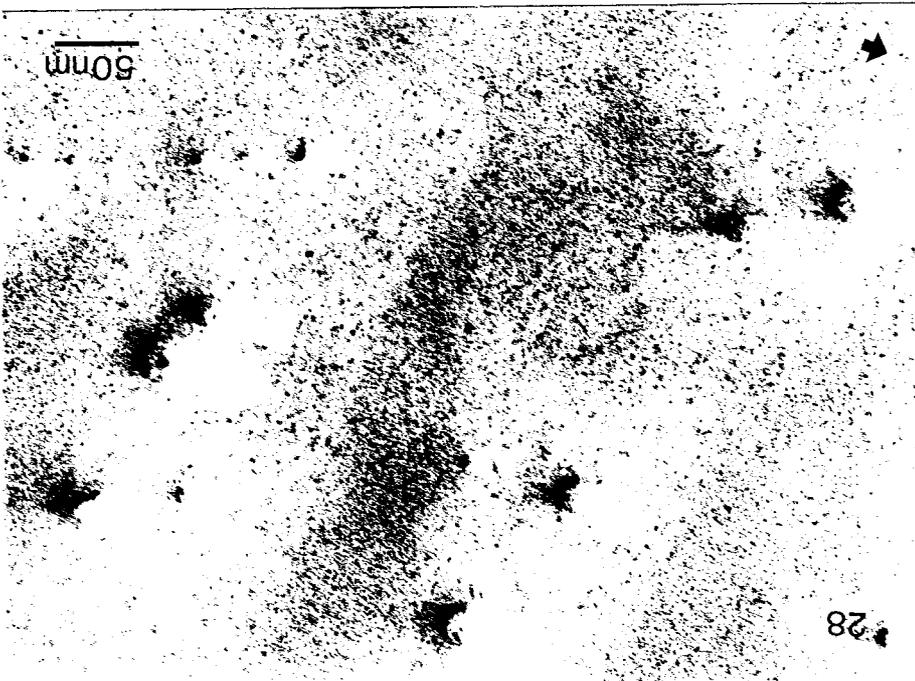
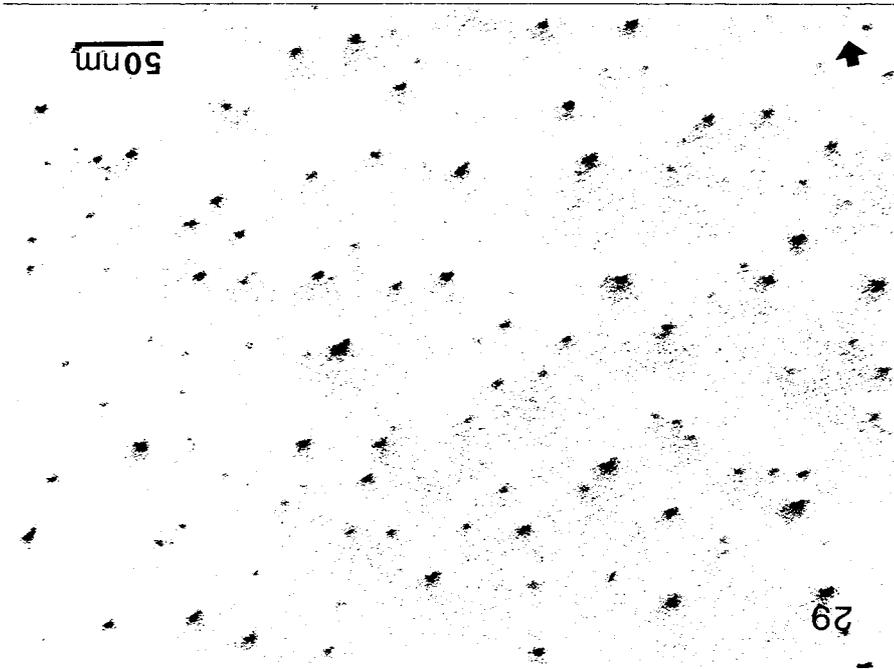


26



27





M.F. 24 a 29. Las M.F. 24 a 28 muestra hemocianina diluida a pH 7.0. En ninguna de éstas se observan estructuras retangulares, en general son muy poco frecuentes. La M.F. muestra hemocianina totalmente disociada a pH 8.5. Se destaca la ventaja en este aspecto, de la técnica en comparación con los resultados obtenidos por van BRUGGEN al mismo pH, por la eliminación del ruido entre las estructuras.

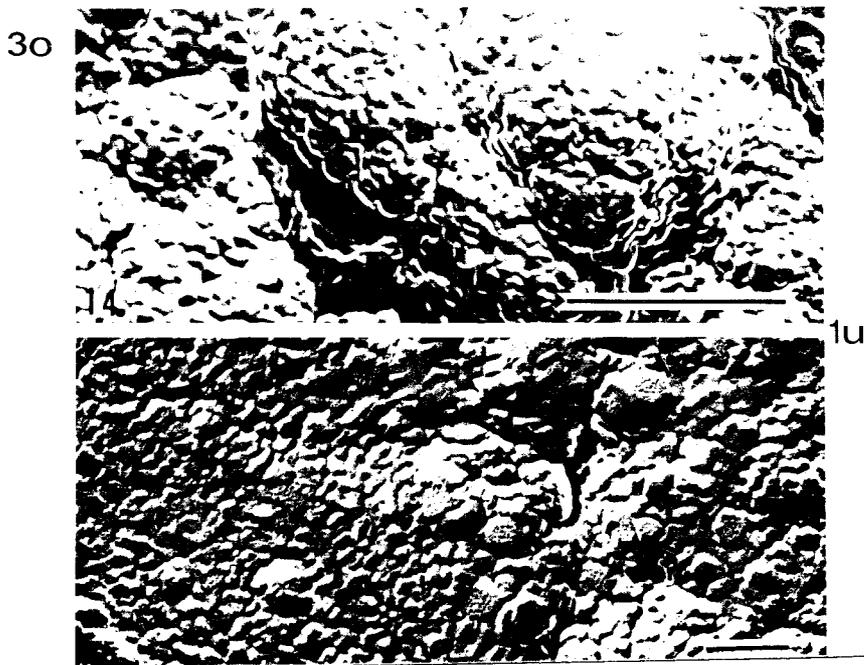
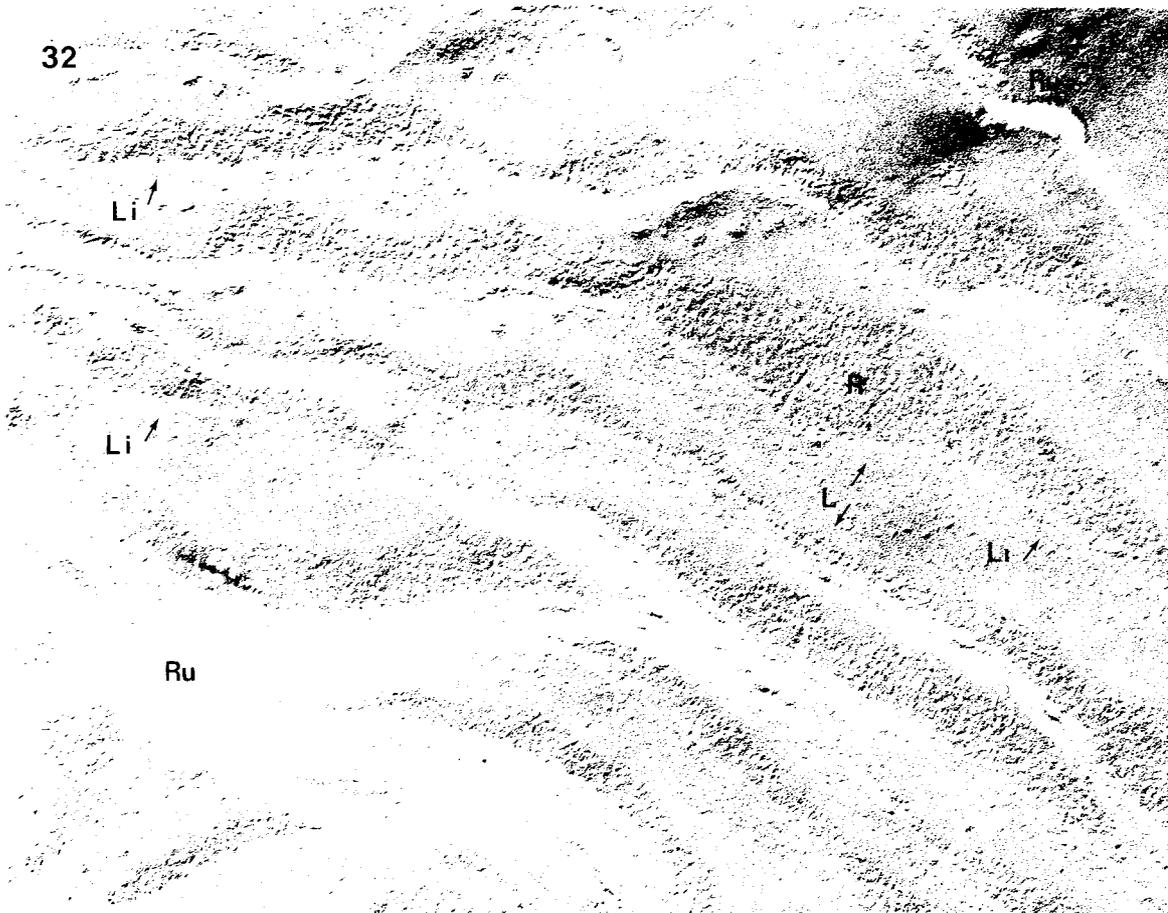
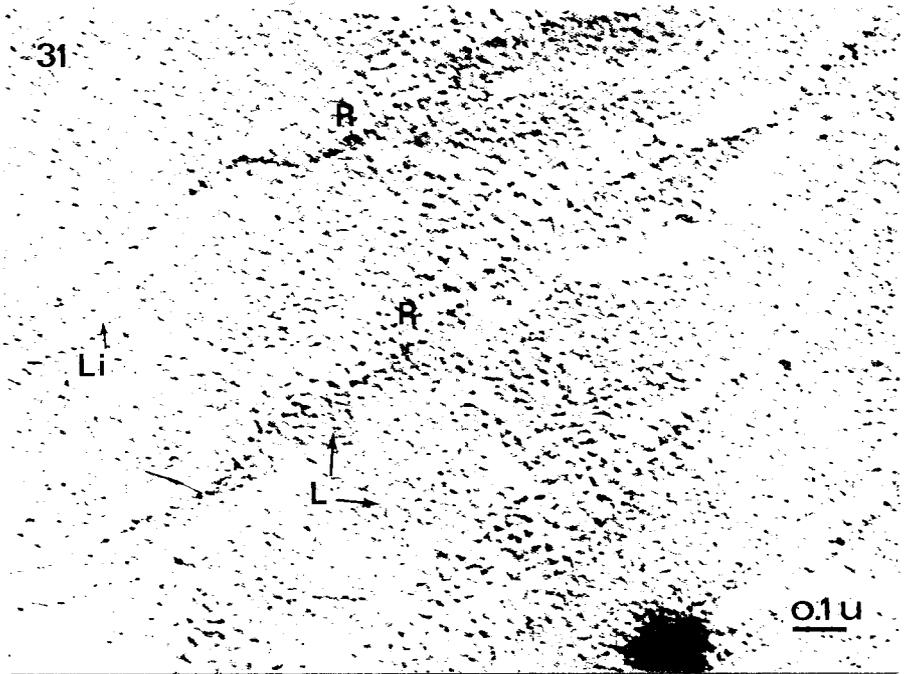
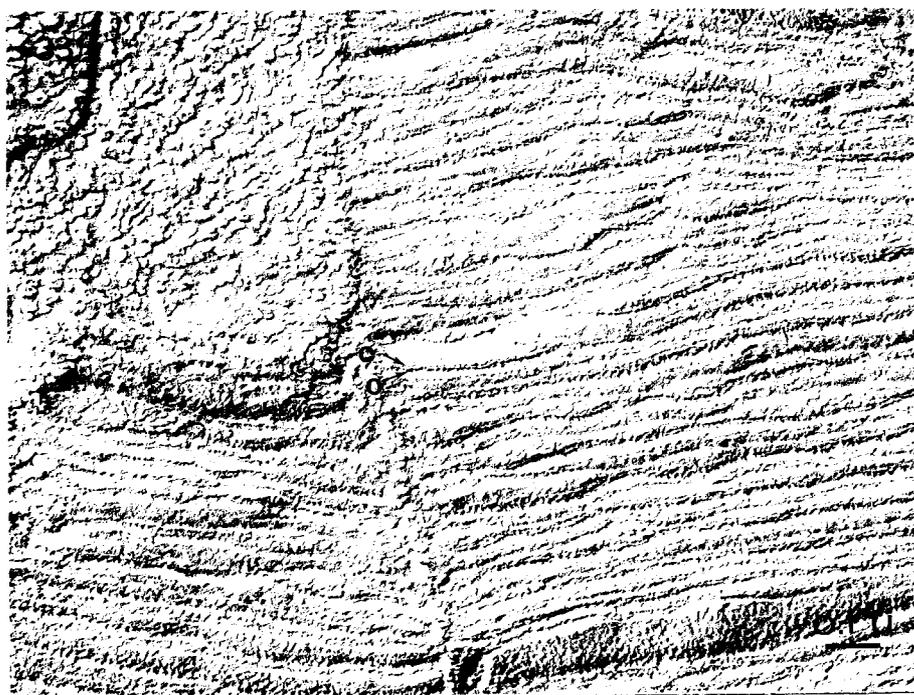
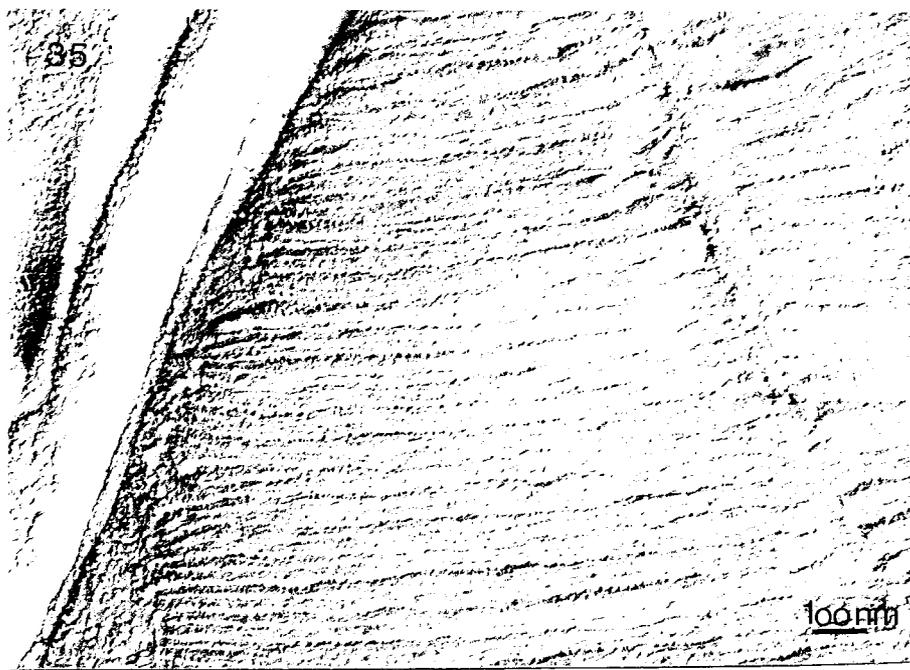


Foto 30. Vapor de agua condensado en la superficie de la muestra después de fracturar y antes de evaporar el metal. Normalmente, este tipo de condensación presenta un aspecto globular (STEERE, 1969).

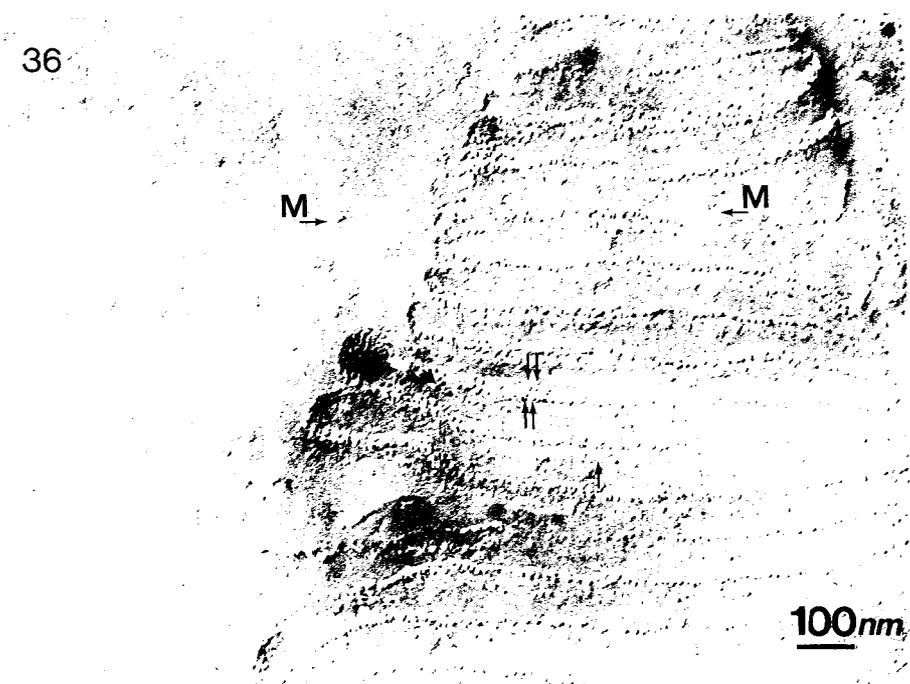


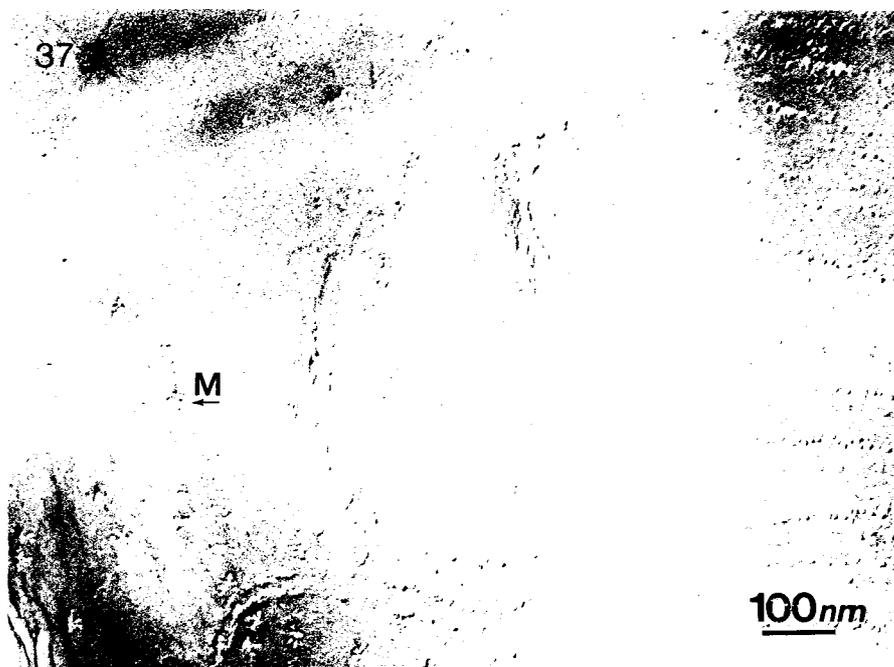
M.F. 31 y 32. Al ser el plano de fractura bastante oblicuo respecto a la posición de los sacos, se observa una alternancia de superficies rugosas (R) y lisas (L).



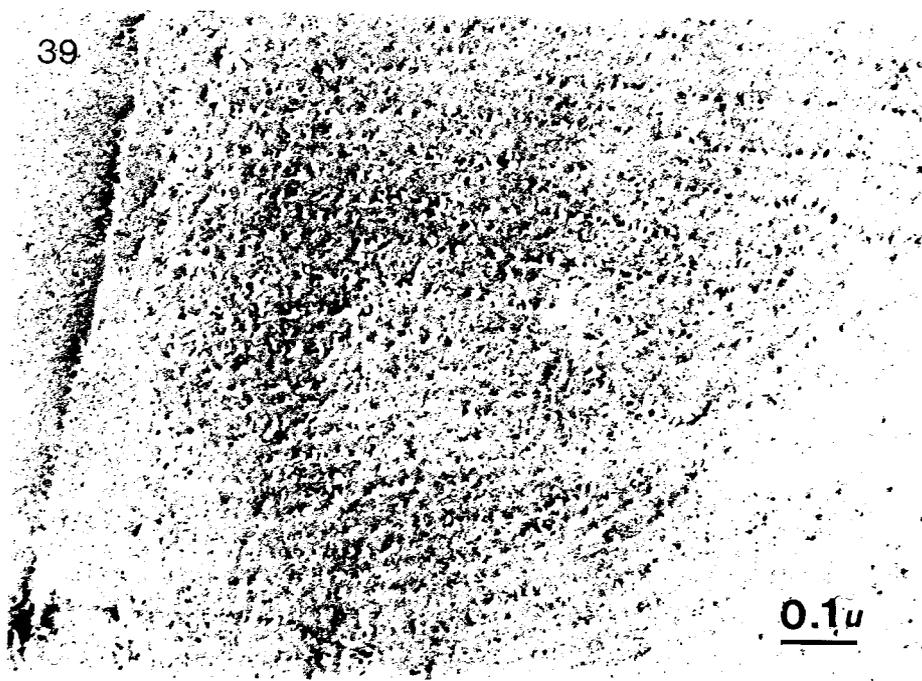
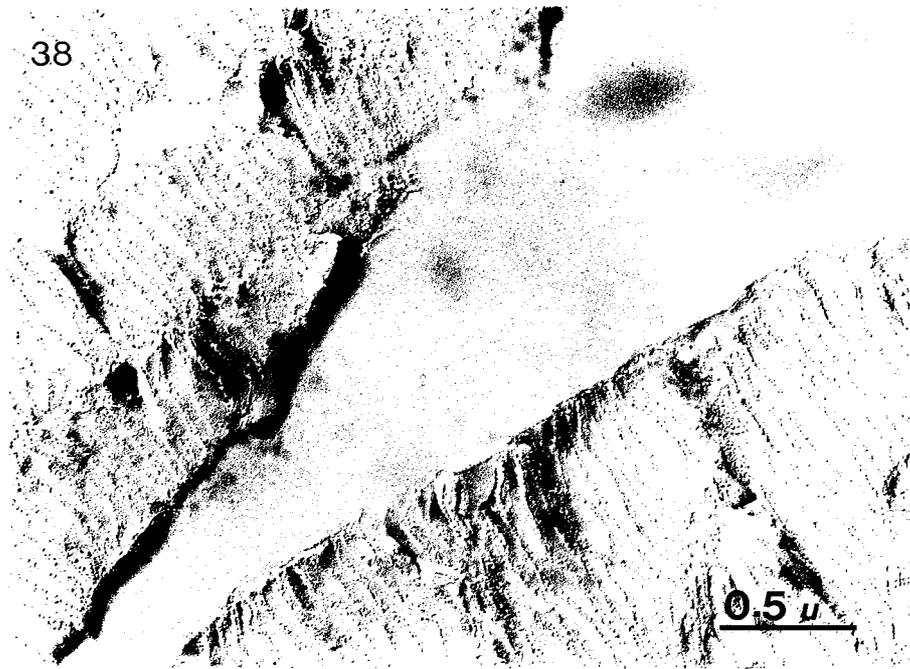


M.F. 33 a 35. En estas M.F. se observan dos tipos de alternancia. La primera, muestra líneas oscuras (O) y claras (C) correspondientes a una misma membrana, lo que se justifica por la mayor cantidad de protuberancias en una de las caras de la membrana. La segunda alternancia muestra membranas pobladas (trazo grueso), seguida de membranas poco pobladas de protuberancias (trazo fino).





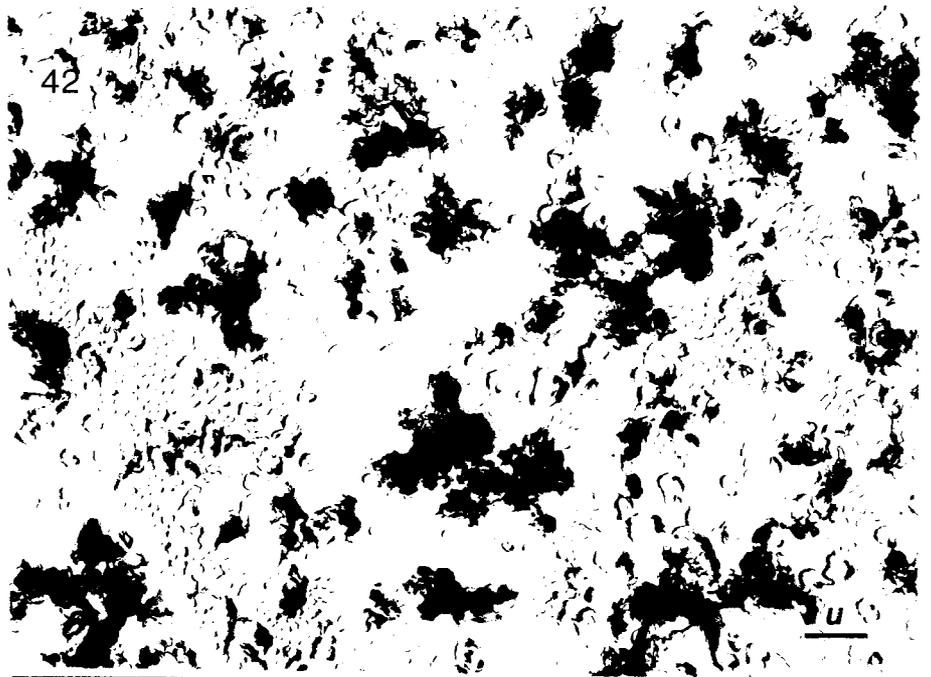
M.F. 36 y 37. Muestra la membrana durante la extracción de los lípidos por la acción del Tritón. Se puede distinguir la misma configuración de las protuberancias en la membrana que la mostrada en las M.F. 31 a 35.



M.F. 38 y 39. Se observa la distribución en hileras de protuberancias después de la extracción de los lípidos. la M.F. 39 se observa, a mayor aumento, la membrana plasmática y también se distingue la alternancia descrita anteriormente.

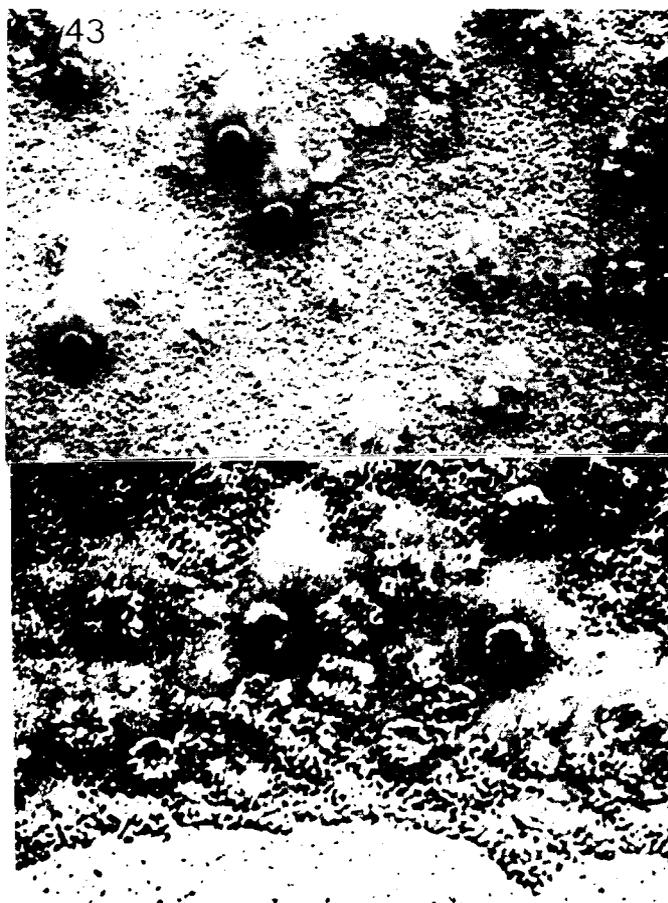


M.F. 40. Se observa en la ampliación de la M.F. 39 el espacio interior de la membrana.

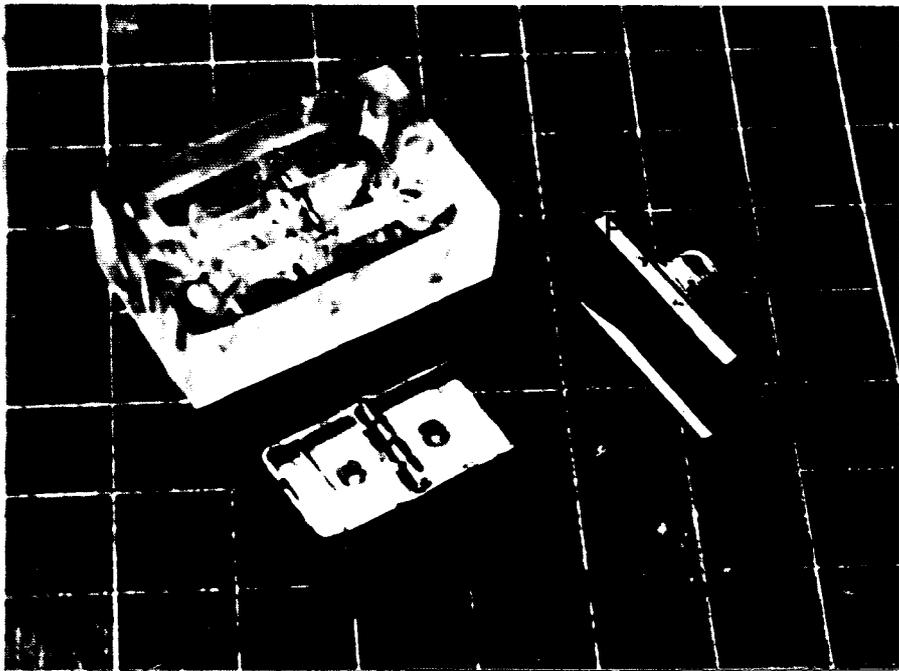


M.F. 41. Réplica de la superficie de la lámina de teflón cubierta con vaselina.

M.F. 42. Réplica de una membrana rota por la formación de cristales de hielo.



M.F. 43. Hemocianina teñida y sombreada con Pd. También se observan estructuras cuadradas y rectangulares; a pesar que el ángulo de sombreado fue de 12° , no se aprecia la forma tridimensional de la molécula.



44A. Se observa la cámara (C) con la bisagra (B) montada. También se observan los portabisagras (PB), uno de ellos con una bisagra abierta, de la misma forma que queda al fracturarse la membrana en el interior del evaporador Den

44B. La flecha muestra la cámara en el interior de la camisa descontaminadora, quedando totalmente rodeada por esta. También se observa el sensor de películas metálicas.