

UCH-FC
MAG-BMCN
M971
C.1



**Cambios de la composición lipídica de las membranas
fotosensibles de los fotorreceptores de *Drosophila
melanogaster* por efecto de la luz.
Implicancias para la fototransducción.**

**Tesis Entregada a la Universidad de Chile
en Cumplimiento Parcial de los Requisitos
para Optar al Grado de**

**Magíster en Ciencias con Mención en Biología Molecular,
Celular Y Neurociencias**

Facultad De Ciencias

Yorka Alejandra Muñoz Muñoz

Diciembre, 2012

Directores de Tesis:

Dr. Juan Bacigalupo

Dr. Alejandro Roth

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por la candidata.

Yorka Alejandra Muñoz Muñoz

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 06 de Diciembre del 2012.

Directores de Tesis:
Dr. Juan Bacigalupo

Dr. Alejandro Roth

Comisión Evaluadora de la Tesis

Dr. Oliver Schmachtenberg
Presidente Comisión

Dr. John Ewer










FACULTAD DE CIENCIAS
BIBLIOTECA CENTRAL
U. DE CHILE



Agradecimientos

"...Mientras los hombres sean libres para preguntar lo que deben; libres para decir lo que piensan; libres para pensar lo que quieran; la libertad nunca se perderá y la ciencia nunca retrocederá..."

Robert Oppenheimer

Quisiera reconocer que el término de esta etapa de mi vida es producto no sólo de mi perseverancia, esfuerzo y convicción, sino también del apoyo afectuoso de muchas personas que me han brindado conocimientos y cariño.

Agradezco al laboratorio de Fisiología Celular por darme la posibilidad de realizar mi tesis y por una continua formación académica y personal. A mis tutores Juan Bacigalupo, por haber confiado en mis capacidades, por fomentar mi desarrollo independiente y por su apoyo fraterno, y Alejandro Roth, por su paciencia y por sus asertivas propuestas. Un especial agradecimiento a Ricardo Delgado por su calidez, al ofrecerme siempre una mano amiga en aspectos profesionales y personales.

A todos los integrantes del laboratorio de Fisiología Celular, quienes me ayudaron a madurar ideas, tener un pensamiento más crítico y por su ayuda desinteresada. A mis compañeros de travesía Belén, Marcelo, Kris, German, Yerko, Patty D, Daniel K., Ale, por el humor, apoyo y complicidad, y profesores -Julio, Magda, Ceci-, quienes siempre me ayudaron sin dudar. También agradezco a Jeannette y Danny por su gran disposición y voluntad.

Quiero agradecer a Silvia Copaja, Andrés Barriga y Karen Fuenzalida, por su asesoría en espectrometría de masas y porque siempre estuvieron disponibles para resolver mis dudas. A Angie, Vale, Caro y Reyna quienes me ayudaron en mi paso por el INTA e hicieron más grata la realización de esta tesis. A Elvis Acevedo y Consuelo Ibar, por su ayuda en el mantenimiento de las moscas.

A Roger Hardie por facilitarnos la mutante con la cual se realizó este proyecto. A Hugo Peña Cortés por facilitarnos el uso del espectrómetro de Alemania.

Como no agradecer a mis queridos amigos Pamela Izaurieta, Sofía Zamudio, Carlos Rubilar, Isabel Cayul, Marcelo Berrios, Manuel Morales, JP Weber y JP Lezana por todo su apoyo, por aguantarme, por su optimismo, por sus asertivos consejos y por que siempre me hicieron sonreír.

Agradezco a mi familia, por su cariño y apoyo incondicional en todas mis decisiones. A mi madre por siempre creer en mí, a mi tía por darme carácter, convicción y sueños, y a mi abueli por quererme y consentirme...

Como no agradecer a Bende, quien con su ternura y compañía ha hecho maravillosos estos casi 6 años juntos, riendo con mis alegrías y apoyándome en mis penas. Bende ha creído en mí, me ha alentado a pensar que mis sueños se pueden hacer realidad y ha sido mi pilar de fortaleza. Su ayuda fue fundamental en el desarrollo de este proceso.

Por último quiero agradecer a las instituciones que financiaron la ejecución de esta tesis: CONICYT por su beca de Magíster (N° 22110957), Instituto de Milenio de Dinámica Celular y Biotecnología por su beca de manutención, MIDEPLAN ICM P05-001F y Proyecto FONDECYT 1100730 (RD).



Índice de Materias

	Página
LISTA DE TABLAS	iv
LISTA DE FIGURA	v
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Estructura del ojo compuesto.....	2
1.2 Fototransducción en <i>Drosophila</i>	4
1.3 La cascada de los fosfoinosítidos está involucrada en la fototransducción.....	5
1.4 El papel de los lípidos en la apertura de los canales TRP.....	6
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	13
2.1 Hipótesis.....	13
2.2 Objetivo general.....	13
2.3 Objetivos específicos.....	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS	14
3.1 Material Biológico.....	14
3.11 Cepa de moscas.....	14
3.12 Solución Ringer mosca y Deslipidación.....	15
3.2 Materiales.....	16
3.21 Solventes orgánicos.....	16
3.3 Obtención de la fracción enriquecida en rabdomeros.....	17
3.31 Disección.....	17
3.32 Homogenización mecánica.....	18
3.33 Centrifugación diferencial.....	18
3.34 Cuantificación de proteínas.....	20
3.35 Análisis de proteínas mediante Inmunodetección.....	21
3.4 Técnicas de extracción de lípidos.....	22
3.41 Preparación de estándares lipídicos.....	23
3.42 Extracción de lípidos totales con Cloroformo (Extracción de Folch).....	24
3.43 Extracción con Metil-Tert-Butil-Eter (MTBE).....	25
3.5 Análisis de metil-ácidos grasos (FAME) mediante Cromatografía Gaseosa y Espectrometría de Masas (GC-MS) en modo de ionización por impacto electrónico (EI).....	26
3.51 Separación de las clases de lípidos mediante cromatografía líquida a presión atmosférica SPE (extracción en fase sólida).....	27
3.52 Preparación de metil-ácidos: Derivatización catalizada por ácido.....	28
3.53 Neutalización, Extracción e Inyección de las muestras en el GC-MS.....	29
3.54 Aspectos técnicos de la corrida cromatográfica.....	29
3.55 Controles básicos.....	30
3.56 Tiempos de retención, identificación de los metil-ácidos grasos, contaminación y análisis de datos.....	31
3.57 Análisis cualitativo, cuantitativo y estadístico.....	33
3.58 Preparación del Reactivo de Derivatización.....	37
3.6 Análisis de Diacilglicerol mediante UPLC-FT-ORBITRAP.....	38

3.61 Separación de las clases de lípidos mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (UPLC).....	39
3.62 Aspectos técnicos de la detección de analitos mediante FT-MS.....	40
3.63 Análisis de Cromatogramas y Espectros de masas.....	40
3.7 Análisis de Diacilglicerol mediante HPLC y TLC.....	41
3.71 Preparación de estándares para HPLC y TLC.....	41
3.72 HPLC-fase normal con detector de luz Ultravioleta (HPLC-UV).....	43
3.73 HPLC-fase normal con detector de Índice de Refracción (HPLC-IR).....	44
3.74 Tratamiento de la placa de TLC y Corrida Cromatográfica.....	44
3.75 Detección de las bandas.....	45
4. RESULTADOS	46
4.1. Preparación enriquecida en membranas fotosensibles (rabdomeros).....	46
4.2. Identificación de los PUFAs en las muestras de rabdomeros mediante los perfiles de ácidos grasos.....	51
4.21. Los PUFAs totales no cambian su contenido en respuesta a la luz en el rabdomero.....	54
4.3. Identificación de los DAGs en las membranas fotosensibles.....	58
4.31. Los ácidos grasos de los M-DAGs no cambiaron en respuesta a la luz.....	58
4.32. La presencia de DAG-34:1 en los rabdomeros de <i>Drosophila</i> es alterada en respuesta a la luz.....	61
4.4. Perfiles de ácidos grasos de otros lípidos presentes en los rabdomeros de mosca.....	71
4.41. Fosfolípidos.....	71
4.42. Triacilgliceroles.....	74
4.43. Ésteres de esteroles.....	77
4.5. Caracterización de los ácidos grasos en los rabdomeros de mosca.....	79
4.51. Ácidos grasos saturados.....	79
4.52. Ácidos grasos insaturados.....	81
5. DISCUSIÓN	86
5.1 Análisis de enriquecimiento de las muestras de rabdomeros.....	86
5.2 El agonista fisiológico de los canales de transducción.....	86
5.21. Los PUFAs totales no cambian con la luz.....	90
5.22. Identificación de un DAG-dependiente de luz.....	91
5.3. Perfiles de ácidos grasos de fosfolípidos, triacilgliceroles y ésteres de esteroles.....	96
5.31. Fosfolípidos.....	96
5.32. Triacilgliceroles.....	99
5.33. Esteres de esteroles.....	100
5.4. Carencia de PUFAs C ₂₀ y C ₂₂ en <i>Drosophila</i>	100
5.5. Proyecciones de este trabajo.....	102
6. CONCLUSIONES	104
7. ANEXO	108
7.1. Implementación de un protocolo para obtener fracciones enriquecidas en membranas de rabdomeros.....	108
7.2 Identificación de los ácidos grasos en las muestras de rabdomeros.....	112
7.21. Tiempos de retención de los ácidos grasos.....	112

7.22. Detección de los metil-ésteres de ácidos grasos según sus espectros de masa	112
7.221. Ácidos grasos saturados y estándares internos	113
7.222. Ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs)	119
7.223. Ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs)	121
7.3. Separación de las clases de lípidos mediante HPLC-UV	125
7.4. Separación de las clases de lípidos mediante HPLC-IR	133
7.5. Separación de los lípidos neutros mediante Cromatografía de adsorción (TLC)	137
7.51. El vapor de Yodo es el mejor método de detección de lípidos	137
7.52. La baja abundancia de los DAGs dificulta su identificación en las muestras de rabadómeros mediante TLC	142
8. REFERENCIAS	147



LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Solución extracelular Ringer mosca.....	15
Tabla 2. Solventes grado <i>Cromatografía Líquida</i> (HPLC) y <i>pro análisis</i> utilizados en todos los experimentos de análisis de lípidos.....	17
Tabla 3. Anticuerpos y diluciones utilizados en los experimentos de inmunodetección.....	22
Tabla 4. Separación de las principales clases de lípidos presentes en los tejidos animales mediante columnas SPE.....	27
Tabla 5. Intensidades de los estándares de diacilgliceroles a distintas concentraciones.....	64
Tabla 6. Concentraciones de los diacilgliceroles encontrados en muestras de ojos silvestres adaptadas a oscuridad, luz y ojos mutantes.....	68
Tabla 7. Tiempo de retención, fórmula molecular y masa exacta de las moléculas de los diacilgliceroles identificados.....	68
Tabla 8. Abundancias de los ácidos grasos saturados en las distintas fracciones lipídicas de las moscas silvestres y mutantes <i>Gaq¹;Gβe¹</i>	81
Tabla 9. Abundancias de los ácidos grasos insaturados en las distintas fracciones lipídicas de las moscas silvestres y mutantes <i>Gaq¹;Gβe¹</i>	83
Tabla 10. Proporciones de ácidos grasos saturados e insaturados en las muestras de rabdómeros de las moscas silvestres y mutantes <i>Gaq¹;Gβe¹</i>	85
Tabla 11. Identificación de los fosfoinosítoles (PI) y los triacilgliceroles (TAG) en cuerpos de <i>Drosophila melanogaster</i> (Tabla extraída de Hammad y cols, 2011).....	94
Tabla 12. Tiempos de retención (T_R) de los ácidos grasos identificados en la fracción P2 de las moscas silvestres y mutantes de la proteína G.....	112
Tabla 13. Valores Rf obtenidos para cada clase de lípido.....	141

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Omatidío y célula fotorreceptora de <i>Drosophila</i>	3
Figura 2. Esquema de la cascada de fototransducción de <i>Drosophila</i>	5
Figura 3. Protocolo que permite obtener una fracción enriquecida en membranas de rabdomeros (P2).....	19
Figura 4. Derivatización de las diferentes clases de lípidos con Metanol anhidro en medio ácido.....	28
Figura 5. Obtención de membranas enriquecidas en rabdomeros y verificación de contaminación por componentes celulares.....	49
Figura 6. Abundancia de los ácidos grasos provenientes de los diferentes lípidos presentes en los rabdomeros.....	53
Figura 7. Identificación de siete ácidos grasos “libres” en las muestras de rabdomeros.....	55
Figura 8. Los PUFAs (C18:2 y C18:3) de los ácidos grasos libres en los rabdomeros de mosca no cambian su contenido en respuesta a la exposición a la luz.....	57
Figura 9. Identificación de tres ácidos grasos de los mono-diacilgliceroles (M-DAGs) de las membranas rabdoméricas.....	59
Figura 10. Los ácidos grasos provenientes de los mono y diacilgliceroles no aumentaron ni disminuyeron con la luz.....	60
Figura 11. Separación e identificación de los estándares comerciales mediante UPLC-fase reversa y espectrometría de masas.....	62
Figura 12. Curva de calibración del estándar DAG-34:1 a distintas concentraciones 0,5, 5, 35 y 100 ng/mL.....	63
Figura 13. Separación de los lípidos totales de las muestras de membranas rabdoméricas de moscas silvestres y la mutante.....	65
Figura 14. Identificación de los DAGs en las muestras.....	67
Figura 15. El DAG-34:1 es el único diacilglicerol contenido cambia en respuesta a la luz en los rabdomeros de mosca.....	69
Figura 16. Estructura molecular de los diacilgliceroles identificados en las muestras enriquecidas de rabdomeros de ojos de <i>Drosophila</i>	70

Figura 17. La fracción de fosfolípidos de rabdómeros de <i>Drosophila</i> no presenta los PUFAs "AA, EPA y DHA" característico de los fosfolípidos de mamíferos.....	72
Figura 18. Los ácidos grasos provenientes de los fosfolípidos presentan diferencias entre las moscas silvestres y las moscas mutantes <i>Gaq¹</i> ; <i>Gβe¹</i>	73
Figura 19. La fracción de triacilgliceroles presentó seis ácidos grasos y ningún PUFA C ₂₀ y C ₂₂	75
Figura 20. El contenido de los ácidos grasos provenientes de los triacilgliceroles de la mutante es menor que en las silvestres pero los perfiles de ácidos grasos son idénticos en ambas moscas..	77
Figura 21. La fracción de esteres de esteroles presentó sólo dos ácidos grasos y ningún PUFA C ₂₀ y C ₂₂	78
Figura 22. Perfil de ácidos grasos provenientes de los esteres de esteroles.....	79
Figura 23. Modelo del mecanismo de activación de los canales de transducción TRP y TRPL.....	96
Figura 24. Resumen de las desaturasas encontradas en animales y plantas.....	101
Figura 25. Obtención de membranas enriquecidas en rabdómeros.....	109
Figura 26. Identificación del metil-ácido octadecanoico (me-C18:0) presente en la fracción P2 a partir de su espectro de masas.....	114
Figura 27. Identificación del metil-ácido hexadecanoico (me-C16:0) presente en la fracción P2 a partir de su espectro de masas.....	115
Figura 28. Identificación del metil-ácido tetradecanoico (me-C14:0) presente en la fracción P2 a partir de su espectro de masas.....	116
Figura 29. Identificación del metil-ácido pentadecanoico (me-15:0) presente en la fracción P2 a partir de su espectro de masas.....	117
Figura 30. Identificación del metil-ácido heptadecanoico (me-17:0) presente en la fracción P2 a partir de su espectro de masas.....	118
Figura 31. Identificación del metil-ácido nonadecanoico (me-19:0) presente en la fracción P2 a partir de su espectro de masas.....	119
Figura 32. Identificación del metil-octadecenoico (me-18:1ω-9 u oleico) presente en la fracción P2 a partir de su espectro de masas.....	120
Figura 33. Identificación del metil-hexadecenoico (me-16:1ω-7 o palmitoleico) presente en la fracción P2 a partir de su espectro de masas.....	121

Figura 34. Identificación del metil-linoleato (18:2 ω -6) presente en la fracción P2 a partir de su espectro de masas.....	123
Figura 35. Identificación del metil-linolenato (18:3 ω -3) presente en la fracción P2 a partir de su espectro de masas.....	124
Figura 36. Estandarización de la detección de una mezcla de estándares lipídicos con un detector UV.....	126
Figura 37. La limpieza de la columna de sílica con Isopropanol:Agua (1:1 v/v) generó un pico cromatográfico cuya identidad pareciera ser la PC-di-C18:1.....	128
Figura 38. El control negativo sin lípidos reveló la presencia de un artefacto en la corrida cromatográfica producido por el solvente de carga.....	129
Figura 39. El aumento del flujo de la fase móvil a 1,5 mL/min sólo permitió eluir dos de los cinco estándares de la mezcla.....	131
Figura 40. La disminución del flujo de la fase móvil a 0,75 mL/min no permitió la correcta separación de los estándares lipídicos de la mezcla.....	133
Figura 41. No se observó ningún pico cromatográfico usando el protocolo de separación de lípidos neutros utilizando un detector de índice de refracción.....	135
Figura 42. La conexión directa entre el inyector y el detector IR (sin el uso de columna) demostró que el detector IR no estaba funcionando adecuadamente.....	136
Figura 43. Comparación de los métodos de detección de los lípidos en las placas de TLC usando estándares comerciales.....	139
Figura 44. Separación de lípidos neutros de una muestra de rabdómeros de ojos de moscas silvestres adaptadas a luz mediante TLC.....	143
Figura 45. Composición lipídica de la muestra de rabdómeros de ojos silvestres adaptados a la oscuridad y a la luz no presenta diferencias.....	145

LISTA DE ABREVIATURAS

AA: ácido araquidónico

AGL: ácido graso libre

Ca²⁺: ión calcio

DAG: diacilglicerol.

DAGL: diacilglicerol lipasa

DAGK: diacilglicerol quinasa.

DS: desviación estándar

EC: éster de colesterol.

EE: éster de esterol.

ELSD: "*Evaporative Light Scattering Detector*".

ESI: "*ElectroSpray Ionization*", Ionización electro

FFA: "*Free Fatty Acid*", ácido graso libre.

FID: "*Flame-Ionization Detector*", detector de ionización en llama.

FT: espectrómetro de masa con detector *Transformada de Fourier* (alta resolución y sensibilidad)

Gα¹;Gβ¹: mutante de la subunidad α y β de la proteína G.

GC: "*Gas Chromatography*", Cromatografía Gaseosa.

HEPES: ácido-N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico

HPLC: "*High Performance Liquid Chromatography*", Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia.

HP-TLC: "*High Performance Thin Layer Chromatography*", Cromatografía en Capa Fina de Alta Eficiencia.

IP₃: Inositol trifosfato.

LC/MS/MS: "*Liquid Chromatography Mass Spectrometry in tandem*", Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas en tándem.

mA: miliamperios

mM: milimolar

mL: mililitro

MAG: Monoacilglicerol.

MS: Espectrometría de masas.

MUFA: "*Monounsaturated Fatty Acids*", Ácidos grasos monoinsaturados.

N: normalidad

OAG: 1-oleoil, 2-acetil-*sn*-glicerol.

PIP₂: Fosfatidilinositol bifosfato.

PLCβ: Fosfolipasa Cβ.

ppm: partes por millón.

pS: picoSiemens

PUFAs: "*Polyunsaturated Fatty Acid*", Ácidos grasos poliinsaturados.

SEM: "*Standard Error of the Mean*", Error estándar de la media.

SPE: "*Solid Phase Extraction*", Extracción en Fase sólida.

TAG: Triacilglicerol.

TBS-T: buffer salino Tris con detergente Tween 20

TIC: "*Total Ion Chromatogram*", Cromatograma de iones totales

TLC: "*Thin Layer Chromatography*", Cromatografía en Capa Fina.

TRP: "*Transient Receptor Potential*", Canales de potencial de receptor transitorio

TRPL: "*Transient Receptor Potential-Like*", Canales tipo TRP

uma: unidad de masa atómica

UPLC: "*Ultra Performance High Liquid Chromatography*", Cromatografía Líquida de Máxima Eficiencia.

µg: microgramo

V: voltio

XIC: "Extracted Ion Chromatogram", Cromatograma de iones extraídos

Nomenclatura de los ácidos grasos:

Fórmula química	Nombre IUPAC	Nombre común	Grado de insaturación	Posición insaturación	Serie
14:0	dodecanoico	mirístico	0, saturado	---	---
16:0	hexadecanoico	palmitico	0, saturado	---	---
16:1	9-(Z)-hexadecenoico	palmitoleico	1, MUFA	9	ω 7
18:0	octadecanoico	esteárico	0, saturado	---	---
18:1	9-(Z)-octadecenoico	oleico	1, MUFA	9	ω 9
18:2	9,12-(Z)-(Z)-octadecadienoico	linolénico	2, PUFA	9,12	ω 6
18:3	9,12,15-(Z)-(Z)-(Z)-octadecatrienoico	α -linolénico	3, PUFA	9,12,15	ω 3
18:3	6,9,12-(Z)-(Z)-(Z)-octadecatrienoico	γ -linolénico	3, PUFA	6,9,12,	ω 6
20:0	eicosanoico	araquídico	0, saturado	---	---
20:3	8,11,14-(Z)-(Z)-(Z)-eicosatrienoico	dihomo- γ -linolénico	3, PUFA		ω 6
20:4	5,8,11,14-(Z)-(Z)-(Z)-(Z)-eicosatetraenoico	araquidónico	4, PUFA	5,8,11,14	ω 6
20:5	5,8,11,14,17-(Z)-(Z)-(Z)-(Z)-(Z)-eicosapentaenoico	timnodónico	5, PUFA	5,8,11,14,17	ω 3
22:6	4,7,10,13,16,19-(Z)-(Z)-(Z)-(Z)-(Z)-(Z)-docosahexaenoico	cervónico	6, PUFA	4,7,10,13,16,19	ω 3

RESUMEN

En las membranas rabadómericas de las células fotorreceptoras de *D. melanogaster*, la luz gatilla un respuesta excitatoria asociada a un aumento de Ca^{2+} al interior de la célula. Esta respuesta se inicia en una proteína receptora de luz llamada rodopsina, que activa una cascada de señalización dependiente de la fosfolipasa C (PLC), la cual resulta en la apertura de dos canales catiónicos llamados TRP y TRPL. Existe evidencia que la activación de estos canales es mediada por el producto lipídico de la actividad de esta enzima, pero aún está en debate si es su producto directo, el diacilglicerol (DAG), los metabolitos de éste último (ácidos grasos poliinsaturados, PUFAs) los protones o la disminución del PIP_2 , el(los) responsable(s) de tal activación. Estudios en parches escindidos de la membrana fotosensible (rabadómero), demostraron la activación de los canales TRP y TRPL directamente con DAG y PUFAs, (Delgado y Bacigalupo, 2009). Además, experimentos electrofisiológicos recientes de los mismos autores muestran que el DAG es suficiente para activar al canal TRP mediante inhibidores y mutantes de las enzimas que metabolizan al DAG (DAG quinasa cataliza la fosforilación del DAG a ácido fosfatídico y DAG lipasa lo hidroliza y produce PUFA). Además, el PIP_2 aplicado a parches de membrana rabadómerica no disminuye la actividad del canal como han postulado otros autores (Estación y cols, 2001). Por otra parte, la acidificación del medio activa levemente al canal TRP, en ausencia de DAG (Huang y cols, 2010), pero la actividad del canal no se detiene al activar la DAG quinasa, como ocurre con la aplicación de DAG exógeno (Delgado y Bacigalupo, resultados no publicados). Estudios de otros grupos de investigación apoyan el posible rol activador de los PUFAs y rechazan al DAG y al IP_3 como los posibles activadores (Chyb y cols, 1999, Lev y cols, 2012).

Una parte básica de esta controversia es el absoluto desconocimiento de las

características lipídicas de este tejido. Por lo tanto, en esta tesis se realizó una caracterización cualitativa y cuantitativa de los PUFAs y los DAGs presentes en las membranas rbdoméricas y se examinó si su proporción se altera en respuesta a la luz. Para realizar este estudio se desarrolló un protocolo para la obtención de una fracción enriquecida en membranas rbdoméricas mediante centrifugación diferencial, que fue validada por inmunodetección de marcadores específicos. Usando ese protocolo se obtuvieron preparaciones de membranas rbdoméricas de moscas silvestres adaptadas a la oscuridad, a la luz y de la mutante *Gaq¹;Gβeq¹*, la cual es incapaz de responder a la luz, utilizada como modelo de la condición de oscuridad. Este modelo presentó similitudes y diferencias con las moscas silvestres adaptadas a oscuridad. Usando técnicas cromatográficas, se determinó la presencia y cantidad de PUFAs y DAG en los rbdómeros. En las tres condiciones experimentales se encontró que: 1) existen dos PUFAs en los rbdómeros (C18:2 y C18:3), ninguno de los cuales cambió en respuesta a la luz, 2) se detectaron cuatro especies de DAG, de las cuales sólo una, DAG-34:1, presentó un aumento en respuesta a la luz en las moscas silvestres. Se observó que el DAG-34:1 se encuentra en una baja abundancia en los rbdómeros, tal como se esperaría para el agonista fisiológico de los canales de transducción. Cabe destacar que la estructura del DAG-34:1 se asemeja a la parte hidrofóbica de los fosfoinosítidos (PI), mientras que los otros DAGs retienen una estructura similar a los triacilgliceroles más abundantes descritos recientemente en mosca completa, es decir, con dos cadenas aciles saturadas (Hammad y cols, 2011).

Los perfiles de ácidos grasos demostraron la ausencia de PUFAs C₂₀ and C₂₂ (Rietveld y cols, 1999; Shen y cols, 2010; Hammad y cols, 2011). Los experimentos cualitativos demostraron que ningún lípido presentó ácidos grasos saturados o insaturados con más de 18 carbonos y que los ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs) son más abundantes que los PUFAs en la mosca. Un resultado inesperado, pero interesante, fue el déficit de ácidos grasos insaturados en la mutante *Gaq¹;Gβeq¹* comparado con la mosca silvestre, debido a que la proteína mutada no está

implicada directamente en el metabolismo de los ácidos grasos insaturados.

Los resultados de esta tesis apoyan fuertemente al DAG como el activador fisiológico de los canales TRP/TRPL, debido a que se observó un cambio en el cantidad de este lípido en la membrana fotosensible por efecto de la luz, mientras que los PUFAs totales no tendrían un papel, pues no se observaron cambios en su concentración. Para reforzar esta última conclusión sería importante determinar si están presentes las enzimas que producen los PUFAs (a partir de DAG) y aquellas que lo metabolizan. Falta por dilucidar el mecanismo de activación de los canales por DAG y la posible participación de PIP_2 y protones en estos eventos.

ABSTRACT

Light elicits an excitatory response in the photoreceptors of *Drosophila melanogaster*. The underlying mechanism, termed phototransduction, involves an increase of calcium within specialized photosensory microvilli structure of these cells. This response begins with the photoisomerization of light-sensitive protein called rhodopsin, which in turn activates a phosphoinositide-mediated G protein-coupled signaling pathway, leading to activation of two cationic channels called TRPL and TRP-Like (TRPL). The activation of these channels is mediated by the lipid product of the phospholipase C (PLC) but it is still unclear whether the direct product diacylglycerol (DAG), DAG metabolites polyunsaturated fatty acids (PUFAs), the protons, or the substrate of the enzyme (PIP₂) which are responsible for gating TRP/TRPL. Studies in Inside-out excised photosensitive membrane (rhabdomere) patches demonstrated the direct activation of TRP and TRPL channels by DAG and PUFAs (Delgado and Bacigalupo, 2009). Moreover, recent electrophysiological experiments by same authors showed that DAG is sufficient to activate TRP channel. Furthermore, application of PIP₂ to rhabdomeric-membranes patches did not decrease the channel activity, in contrast to results reported by Estacion et al, (2001). On the other hand, acidification by itself also activated TRP, although only slightly (Huang *et al*, 2010). A possible activating role of PUFAs but not DAG was reported by others groups based on whole cell measurements (Chyb *y cols*, 1999, Lev *y cols*, 2012).

In this thesis we approach this problem with a novel biochemical study of the lipids that have been implicated in phototransduction. I carried out a qualitative and quantitative characterization of PUFAs and DAG present in rhabdomeric membranes and studied if their proportions were altered in response to light. I developed a protocol to obtain an enriched rhabdomeral membrane fraction using differential centrifugation, which was validated by

Western blotting with specific markers. With this protocol, rhabdomeric-membrane preparations of wild type flies adapted to dark or light, and the mutant *Gaq¹;Gβeq¹*, were obtained. The mutant was used as a model for the dark condition, as it is unable to respond to light. This genotype showed similarities and differences with wild type flies adapted to dark. The presence and content of PUFAs and DAGs was determined using chromatographic techniques. The main findings were the following: 1) there are two PUFAs (C18:2 y C18:3) in the rhabdomeres and neither change in response to light, 2) four DAG species were detected, only one of which, DAG-34:1, showed an increment in response to light (in wild type flies), while the others species did not change. The DAG-34:1 has a low abundance in the rhabdomeres, as would be expected for the physiological activator of TRP and TRPL channels. Notably, the DAG-34:1 structure is similar to that of the hydrophobic part of *Drosophila* phosphoinositides (PI) while the others DAGs retain the triacylglycerol (TAG) structure. Recently, the TAGs species have been described in whole fly tissue and have at least two saturated acyl-chains (Hammad *y cols*, 2011). Importantly, the lipids analyzed completely lack C₂₀ y C₂₂ PUFAs using fatty acid profile (Rietveld *y cols*, 1999; Shen *y cols*, 2010; Hammad *y cols*, 2011). Qualitative experiments revealed a complete absence of lipids with ≥ 18 carbons (saturated o unsaturated) and that monounsaturated fatty acid (MUFAs) are more abundant than PUFAs in the fly. An unexpected but interesting result, was that the mutant *Gaq¹;Gβeq¹* showed a deficit of polyunsaturated fatty acids compared with wild type fly, although this protein has not been implicated directly in unsaturated fatty acid metabolism.

My results strongly support DAG as the physiological activator of TRP and TRPL channels, because only the DAG content increased in the photosensitive membrane in response to light; by contrast total PUFAs would not have a role because they did not change their concentration. To strengthen this last conclusion it would be important to determine if the enzymes that generate PUFAs (from DAG) and those that metabolize it (DAG), are present in

the rhabdomere. An unresolved problem is determine the precise mechanism of gating channels by DAG and the possible participation of PIP_2 and H^+ in this event.

INTRODUCCION

El sentido de la visión permite tener una representación del medio ambiente a través de imágenes generadas por el sistema nervioso central (SNC) resultantes del procesamiento de las señales provenientes de la retina de los animales. Los fotorreceptores retinianos absorben la luz directa y la luz reflejada por los objetos ubicados en el campo visual y responden generando señales eléctricas que últimamente alcanzan la corteza visual.

La fototransducción es el proceso por el cual un fotón activa a una proteína de membrana (rodopsina), la cual desencadena una cascada de señalización que termina finalmente en la generación de una señal eléctrica (Hardie y Postma, 2008). Para comprender el fenómeno de fototransducción, los experimentos pioneros aprovecharon el tamaño de las células fotorreceptoras gigantes de especies de invertebrados como *Limulus* (Bacigalupo y Lisman, 1983). Posteriormente, se realizaron registros en células fotorreceptoras individuales de *Drosophila melanogaster*, registrando las corrientes dependientes de luz gracias al desarrollo de registros de célula completa ("*patch clamp-whole cell*"), los cuales permitieron obtener mediciones biofísicas más precisas, tal como selectividad iónica (Hardie, 1991). La ventaja de la mosca como modelo biológico, es su gran potencial genético, el cual permite obtener numerosos mutantes, cuyas enzimas están involucradas en la fototransducción. Así, se ha encontrado que algunas mutaciones afectan específicamente a genes expresados exclusivamente en los fotorreceptores, lo que resulta en mutantes viables. Esas mutantes han sido claves en la identificación y en la determinación de la identidad y las funciones de los componentes de la cascada de fototransducción. Sin embargo, tras treinta años de estudios de la fototransducción de invertebrados, aún no se comprende completamente el "mecanismo molecular" involucrado

en la respuesta a la luz (Katz y Minke, 2009). El trabajo que aquí se presenta busca hacer un aporte importante en este campo de investigación mediante el estudio de los lípidos de la membrana fotosensible involucrados en la fototransducción, un aspecto no explorado previamente.

1.1 Estructura del ojo compuesto

De los distintos tipos de ojos originados a lo largo de la evolución, destacan aquellos en base a lentes típicamente encontrados en vertebrados, los generados por los cefalópodos y los ojos compuestos de artrópodos. Estos últimos poseen varias unidades repetidas y bien organizadas llamadas omatidios (Figura 1A y 1B), los cuales se localizan en una esfera, cada uno con su propia córnea. El número de omatidios por ojo varía en los distintos tipos de insectos, desde unos cuantos en los primitivos *Archaeognatha* y *Thysanura* hasta cientos en *Diptera* (orden donde se incluye a la mosca hogareña *Musca* y a la mosca del vinagre *Drosophila*). En *Drosophila*, cada omatidio consiste de alrededor de 20 células, de las cuales 8 son células fotorreceptoras. Seis de ellas (R1-6) se extienden por todo el largo del omatidio (~85 μm), mientras que las dos restantes, R7 y R8, son más cortas, ubicándose la primera en la región distal y la segunda en la región proximal del omatidio (Fig. 1A). Cada omatidio consiste de un aparato dióptrico compuesto de una cutícula transparente de quitina, la cual forma la córnea (lente) y una cavidad llena de fluido extracelular llamada pseudocono. El fondo de la cavidad está formado por 4 células Semper y las paredes por células pigmentarias primarias (Wang y Montell, 2007; Hardie y Raghu, 2001).

Los fotorreceptores son células epiteliales altamente polarizadas con un compartimiento especializado conocido como rabdómero, el cual consiste de ~30-50.000 microvellosidades empaquetadas, cada una de 1-2 μm de largo y 60 nm de diámetro (Figura 1C y 1D), las cuales carecen de membranas internas. El rabdómero se extiende a lo largo del cuerpo celular como una

delgada banda. Cada microvellosidad contiene ~ 1000 moléculas de rodopsina empaquetadas en la membrana microviliar en una densidad de $\sim 4000 \mu\text{m}^{-2}$. La maquinaria de transducción está localizada en el rabdómero, mientras que el núcleo y los organelos celulares, tales como las cisternas microviliares, residen en el cuerpo celular (Hardie y Postma, 2008).

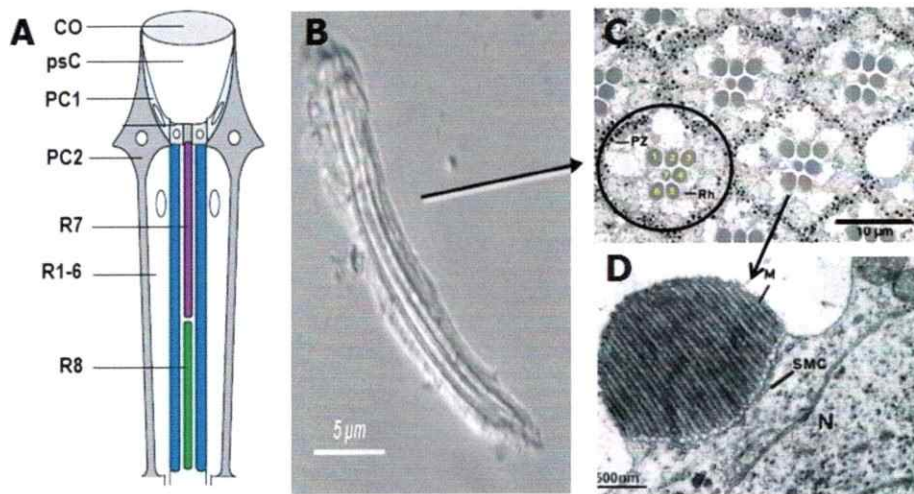


Figura 1. Omatidio y célula fotorreceptora de *Drosophila*. A, Esquema de un omatidio en una vista longitudinal: co, córnea; psC, pseudocono; PC1, célula pigmentaria primaria; PC2, célula pigmentaria secundaria; R1-6, células fotorreceptoras 1-6; R7, célula fotorreceptora 7; R8, célula fotorreceptora 8 (modificado de Wang y Montell, 2007). B, Fotografía de un omatidio disociado obtenida con microscopía Nomarski (modificado de Delgado y Bacigalupo, 2009). C, Microfotografía electrónica de transmisión de un corte transversal de un omatidio. Se indican las células pigmentarias accesorias de los omatidios (PZ) y en un color más oscuro y numerados, los rabdómeros (Rh) y sus respectivas células fotorreceptoras. Sólo se aprecian 7, ya que los fotorreceptores 7 y 8 están superpuestos y no se extienden a lo largo de todo el omatidio (modificado de Katz y Minke, 2009). D, Microfotografía electrónica que muestra una ampliación del rabdómero. Se aprecian las microvellosidades que componen al rabdómero (M), el núcleo de las células fotorreceptoras (N) y las cisternas submicroviliares (SMC) (modificado de Katz y Minke, 2009).

1.2 Fototransducción en *Drosophila*.

En la fototransducción la rodopsina se activa al absorber un fotón de luz, determinando, tras una serie de transformaciones moleculares, un cambio eléctrico en la membrana de las células fotorreceptoras. La rodopsina fotoisomerizada, se llama metarodopsina (Fig. 2); la cual promueve el intercambio de GDP por GTP en una proteína G heterotrimérica (Gq). En esta condición, la proteína G queda habilitada para activar a la fosfolipasa C_β (PLC) que actúa sobre su sustrato, el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂), un fosfolípido de membrana de muy baja abundancia (Huang *y cols*, 2004). La hidrólisis del PIP₂ genera un protón, inositol trisfosfato (IP₃) que es soluble, y diacilglicerol (DAG), que permanece asociado a la membrana. Estas dos últimas moléculas funcionan como segundos mensajeros en muchos procesos celulares. La fototransducción resulta en la apertura de los canales TRP y TRPL (TRP-Like), los responsables del cambio eléctrico de la membrana de los fotorreceptores. TRP ("Transient Receptor Potential") es un canal catiónico selectivo a Ca²⁺ y TRPL es un canal catiónico no selectivo. A pesar que el mecanismo de la transformación del PIP₂ se conoce en detalle y que se cuenta con mutantes de las enzimas participantes, el mecanismo y el agonista fisiológico que promueve la apertura de los canales TRP/TRPL aún se desconoce.

En la membrana del rabdómero, las proteínas PLC, PKC (proteína quinasa C) y el canal TRP interactúan con la proteína de andamio INAD, a través de los dominios PDZ de ésta, la cual a su vez interactúa con el citoesqueleto de la microvellosidad mediante una miosina llamada NINAC. La interacción entre estas proteínas forma un complejo molecular denominado signaplex, el cual se ha postulado que se encuentra en balsas lipídicas presentes en las membranas de las microvellosidades (Sanxaridis *y cols*, 2008). Este complejo macromoleculas compartimentaliza a las moléculas que participan en la fototransducción, facilitando una rápida respuesta frente a un estímulo.

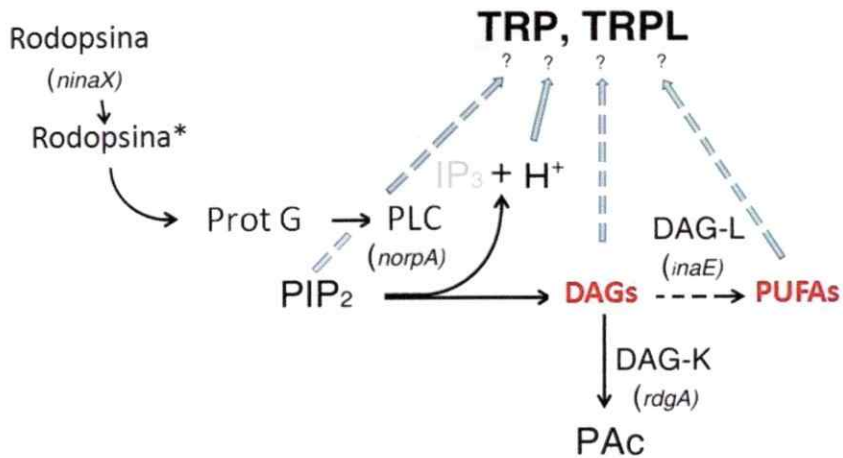


Figura 2. Esquema de la cascada de fototransducción de *Drosophila*. PLC, fosfolipasa C; PIP₂, fosfatidilinositol bifosfato; IP₃, inositol trisfosfato; DAG, diacilglicerol; DAGK, diacilglicerol quinasa; PAC, ácido fosfatídico; DAGL, diacilglicerol lipasa; PUFA, ácido graso poliinsaturado; TRP y TRPL, canales de transducción. Las líneas continuas indican procesos determinados de forma experimental y las líneas punteadas indican procesos por determinar.

1.3 La cascada de los fosfoinosítidos está involucrada en la fototransducción.

Se ha observado que los fotorreceptores de moscas mutantes que carecen de PLC (*norpA*) no responden a la luz, indicando que esta enzima juega un papel clave en la fototransducción (Bloomquist y cols, 1988). Por otra parte, en otros sistemas de transducción el IP₃ promueve la liberación de Ca²⁺ desde compartimentos intracelulares, principalmente desde el retículo endoplasmático, donde interactúa con el receptor de IP₃ (Berridge, 1993; Raghu y cols, 2000b). Sin embargo, los fotorreceptores de moscas mutantes que carecen del receptor IP₃ responden normalmente a la luz, observación que ha sido usada como un argumento para descartar la participación del IP₃ en el proceso de fototransducción de *Drosophila* (Acharya y cols, 1997; Raghu y cols, 2000b) y que es corroborada en experimentos que inducen liberación de IP₃ enjaulado en las células fotorreceptoras. Por lo tanto, existe consenso que el IP₃ es insuficiente para excitar a los canales (Hardie, 1995; Hardie y Postma, 2008).

1.4 El papel de los lípidos en la apertura de los canales TRP.

Diacilglicerol (DAG), el otro de los productos generados por la hidrólisis del PIP₂, es el sustrato de la proteína quinasa C (PKC) que se encuentra en los fotorreceptores de *Drosophila*. El mutante que carece de la PKC (*inaC*) responde a la luz, aunque posee una cinética de desactivación más lenta (Smith y cols, 1991; Hardie y cols, 1993), por lo cual esta enzima sólo ha sido involucrada en la desactivación de la respuesta a la luz y se ha descartado la participación de la PKC en el proceso de activación.

La propuesta de que un mensajero lipídico podría estar involucrado en la activación de los canales dependientes de luz, TRP y TRPL, surgió de la observación que ciertos ácidos grasos poliinsaturados derivados del DAG (PUFAs, en su abreviación en inglés), podían activar a ambos canales en fotorreceptores aislados intactos en oscuridad o en sistemas de expresión heteróloga. Al expresar el canal TRPL en células HEK se mostró que el DAG no tenía efecto sobre la fracción de tiempo abierto del canal cuando era aplicado de forma similar a los PUFAs (los lípidos fueron aplicados en el baño). Además, demostraron que el PUFA ácido linolénico (C18:3) podía activar al canal TRPL recombinante (Chyb y cols, 1999).

Por otra parte, estudios de corrientes totales (*patch clamp*) en fotorreceptores individuales llevados a cabo en omatidios que carecen de la enzima diacilglicerol quinasa (DAGK, mutante *rdgA*), las cuales no pueden convertir el DAG a ácido fosfatídico (PAc), presentan degeneración de la retina. Esto se debe a que los canales TRP y TRPL están constitutivamente activos en esos mutantes, lo que genera una alta concentración de Ca²⁺ al interior de los fotorreceptores, induciendo la degeneración del tejido (Raghu y cols, 2000a). Estudios en el doble mutante que carece de la DAGK y el canal TRP (*rdgA;trp*) demostraron que la degeneración del rabadómero podía ser rescatada, ya que en este mutante no ocurre la excesiva entrada constitutiva de Ca²⁺; atribuyendo un papel excitatorio al DAG. Posteriormente, estudios de corriente en célula completa en el doble mutante hipomórfico *norpA;rdgA* mostraron que la

mutación en el gen de la DAGK (*rdgA*) facilita enormemente la respuesta de los mutantes hipomórficos severos de la PLC (*norpA*) aumentando ~100 veces la intensidad de la respuesta (producida por un flash de luz). En este doble mutante el DAG producido se acumula ya que no es fosforilado. Esta evidencia apoya la idea de que el DAG podría ser el segundo mensajero que excita a los canales de transducción (Hardie y cols, 2002).

En nuestro laboratorio se logró desarrollar un método de disgregación suave de los omatidios, obteniéndose el acceso a los rabdómeros, los cuales normalmente se encuentran escondidos. Esto ha permitido obtener registros de canal único de los canales TRP y TRPL en la membrana nativa observando también que los parches aislados contenían, además de los canales dependientes de luz, las enzimas participantes en este proceso. De esta forma se ha podido establecer las conductancias de los canales de transducción ($56,8 \pm 3,7$ pS para TRP y $49,0 \pm 5,0$ pS para TRPL) y se comprobó que tanto el DAG como los PUFAs (linolénico y araquidónico), tienen un efecto activador sobre los canales que se encuentran en parches escindidos de rabdómero, cuando estos lípidos se suministran por el lado intracelular de la membrana (Delgado y Bacigalupo, 2009). Esta discrepancia con Chyb y cols, (1999) con respecto al efecto del DAG, podría deberse a que el DAG aplicado de forma externa a las células completas debe entrar a la microvellosidad, pero posiblemente no alcance la concentración necesaria para activar a los canales, debido a que sería eficientemente metabolizado por la DAGK y/o la DAGL, transformándolo a PAc o PUFA, respectivamente.

Actualmente, no existe consenso de qué molécula podría ser el mensajero excitatorio de los canales TRP y TRPL.

Dado que DAG y los PUFAs que resultan de su metabolismo han sido implicados en la activación de los canales TRP y TRPL, una enzima clave en este proceso es la diacilglicerol lipasa (DAGL), la cual cataliza la hidrólisis del DAG produciendo ácidos grasos libres y monoacilgliceroles (MAG). Uno de los primeros intentos para identificar la isoforma de DAGL

que participaría en la fototransducción fueron los estudios realizados en las cepas mutantes *Rolling Blackout (rbo)*. La mutante termosensible *rbo* presenta en sus fotorreceptores pérdida reversible de la activación por luz a temperaturas restrictivas. Debido a su homología con otras lipasas descritas en vertebrados, RBO fue calificada como una lipasa asociada a membrana. No obstante, los experimentos de bloqueo condicional de RBO permitieron concluir que esta enzima es requerida en la mantención de la actividad de la PLC y no corresponde a la supuesta DAGL de los fotorreceptores (Huang y cols, 2004). Recientemente, la identificación de la mutante hipomorfa *inaE*, que muestra alteraciones en la respuesta a la luz, permitió identificar un gen que codifica una proteína homóloga a una DAGL de vertebrados, llamada INAE, la cual presenta una elevada identidad de secuencia con las DAG lipasas de mamíferos; se expresa en fotorreceptores de mosca y presenta actividad lipasa en ensayos *in vitro*. En estos ensayos se mostró que el mecanismo de hidrólisis del DAG podía producir PUFAs, monoacilgliceroles (MAGs) y ácidos grasos saturados, el último en una proporción 10 veces mayor que los PUFAs (Leung y cols, 2008). Estos resultados van en contra de lo que se esperaría si los PUFAs fueran los agonistas fisiológicos de los canales de transducción. Sin embargo, estudios de inmunohistoquímica han mostrado que la proteína se localiza principalmente en el soma de las células fotorreceptoras y no en el rabdómero, como el resto de las proteínas de la fototransducción. No obstante es importante considerar que, por la naturaleza de esta técnica, esta evidencia no descarta la presencia de esta proteína en los rabdómeros, ya que la proteína podría estar presente pero en baja abundancia impidiendo su detección con esta técnica, la cual se vería saturada por su alta concentración en el soma.

A pesar que los miembros de la familia TRP son bastante heterogéneos en sus modos de activación, se ha reportado que algunos canales de la subfamilia TRPC (TRPC 2, 3, 6 y 7), a la cual pertenecen TRP y TRPL, son activados por DAG *in vitro* (Venkatachalam y Montell, 2007; Hardie, 2007). Se ha observado que los canales TRPC 3 y 6 de humanos expresados en células

CHO son activados por DAG en parches escindidos en configuración *inside-out*. La mayor activación de los canales se obtuvo con el DAG-38:4 (1-estearoil-2-araquidonoil-*sn*-glicerol; Hofmann *y cols*, 1999). Además, se ha visto que en células HEK transfectadas con el canal TRPC7 el DAG potencia la entrada de Mn^{2+} sin involucrar a la proteína quinasa C, en mediciones en célula completa con parche perforado. El DAG-16:0 (di-octanoil-*sn*-glicerol) fue el que produjo la mayor activación del canal (Okada *y cols*, 1999). En parches escindidos en configuración *inside-out* de neuronas disociadas del órgano vomeronasal de ratón, se demostró que específicamente el DAG aumentaba la actividad del canal TRPC2 (Lucas *y cols*, 2003).

Por otra parte, se ha postulado que la apertura de los canales de transducción podría resultar de la disminución de PIP_2 en el rabadómero cuando la PLC está activa. Al expresar el canal TRPL en células Sf9 de insecto y al aplicar PLC a los parches escindidos se observó como este canal era activado, mientras que si se aplicaba PIP_2 el canal se desactivaba (Estacion *y cols*, 2001). Otra aproximación a este planteamiento fue utilizar un canal de potasio llamado Kir2.1, el cual es sensible a PIP_2 , el que fue expresado de manera ectópica en los fotorreceptores de *Drosophila* y se utilizó para monitorear los niveles de PIP_2 en la membrana del fotorreceptor. Estos estudios demostraron que cuando el contenido de PIP_2 se reduce a cero en la membrana, por un periodo prolongado de tiempo, la respuesta a la luz presenta una desactivación rápida (respuesta transitoria) y no se reestablece hasta que el PIP_2 es recuperado en la membrana (Hardie *y cols*, 2004). Si los canales de transducción se abrieran en respuesta a la reducción de este fosfolípido de membrana, la respuesta debería persistir durante la iluminación. Asimismo, se demostró que mutaciones en enzimas tales como la PI-sintasa, la cual es una enzima clave en la regeneración del PIP_2 , no aumenta la respuesta a la luz (Wang y Montell, 2006). Por lo tanto, la disminución del PIP_2 en la membrana no parece promover la activación de los canales de transducción.

La hidrólisis del PIP_2 produce la liberación de un protón. Se ha demostrado que en

fotorreceptores aislados de moscas silvestres y mutantes *trpl* ocurre una rápida acidificación (20-40 ms) del rabadómero y del cuerpo celular de manera dependiente de PLC e inducida por la luz. Además se ha observado que el canal TRPL expresado de forma heteróloga es activado por aumentos en la acidez del medio cuando se evalúan en parches escindidos en modo *inside-out*, (Huang y cols, 2010). Si bien estas evidencias no excluyen el papel de los DAG y PUFAs en la activación de los canales, los autores postulan que el agotamiento de los fosfoinosítidos en combinación con la acidificación es suficiente para activar los canales de transducción TRP y TRPL. Esta última evidencia no está en contraposición con la idea que la vía del DAG parece ser la cascada que actúa en respuesta a la luz.

Hasta la fecha se conocen bastantes aspectos de la fototransducción gracias a la disponibilidad de mutantes de enzimas claves de este proceso, donde gran parte del conocimiento adquirido ha sido mediante el uso de técnicas electrofisiológicas y biología molecular. Sin embargo, existen pocos reportes acerca de los lípidos de *Drosophila* y ninguno específicamente en ojos. Se han investigado los perfiles lipídicos de insectos desde la década del 60. En esa fecha, se describieron las primeras diferencias en la proporción de los fosfolípidos de membrana del orden Diptera (al que pertenece *Drosophila melanogaster*). Para ello, se hicieron análisis de la razón de los fosfoglicéridos colina/etanolamina y de las cadenas aciles de estos lípidos provenientes de distintas especies de insectos, utilizando como muestra el cuerpo completo (Fast, 1966). Sin embargo, estos estudios estaban limitados por las técnicas cromatográficas disponibles para la detección de lípidos. El método más utilizado en el estudio de los lípidos de moscas ha sido la cromatografía en capa fina, sin embargo, esta es poco sensible, detectando lípidos en el rango de μg y la cromatografía gaseosa, la cual impide el estudio de lípidos de baja abundancia (detecta en el rango de ng de lípidos). El desarrollo de espectrómetros de masas modernos ha permitido la identificación y cuantificación de lípidos en un rango de pg. Así varios grupos de investigación han caracterizado los perfiles de ácidos

grasos en distintas etapas del desarrollo (Jones *y cols*, 1992; Rietveld *y cols*, 1999) y los perfiles de lípidos (Hammad *y cols*; 2011) y perfiles de ácidos grasos de moscas completas (Shen *y cols*, 2010, Parisi *y cols*, 2011). Lo más cercano a la medición de lípidos de ojos han sido los trabajos que han investigado los ácidos grasos de fosfolípidos y triacilgliceroles de cabezas de mosca (Yoshioka *y cols*, (1985); Stark *y cols*, (1993). No obstante estos estudios son aproximaciones gruesas, ya que comprenden ojos y cerebro; y no se estudió el posible efecto de la luz sobre los lípidos sino el efecto de la dieta en mutantes con defectos visuales (Stark *y cols*, 1993).

El agonista fisiológico de los canales de transducción es, actualmente, el mayor misterio en la fototransducción en *Drosophila*. Los principales candidatos corresponden a lípidos de membrana (PIP₂, DAG), ácidos grasos libres en el citoplasma (PUFAs) y protones. Los experimentos realizados hasta ahora son mediciones indirectas y gruesas de los lípidos involucrados en la apertura de los canales TRP/TRPL. Hasta la fecha, nadie ha investigado el perfil de lípidos en el rabdómero, el lugar donde se lleva a cabo la fototransducción y donde se alojan todas las enzimas involucradas en este proceso.

En esta tesis se exploró la identidad del activador de los canales sensibles a luz mediante la cuantificación de los PUFAs y los diacilgliceroles en una preparación enriquecida en rabdómeros, comparando la condición de luz y oscuridad. El estudio de los lípidos se efectuó con espectrometría de masas, de alto poder resolutivo, que permitió identificar y cuantificar estos lípidos que se caracterizan por ser extremadamente poco abundantes. Esta novedosa y potente aproximación fue clave, ya que las mediciones de los lípidos son las primeras que se realizan en membranas de los rabdómeros del fotorreceptor de *Drosophila*.

Las observaciones generadas en este estudio apoyan fuertemente la idea que el DAG es el principal agonista de los canales sensibles a la luz y que los PUFAs no participan, en concordancia con estudios electrofisiológicos realizados en este laboratorio.

Estos datos ayudan a completar el modelo de activación de los canales TRP de mosca.

Además podrían ayudar a esclarecer cómo se activan los canales análogos de vertebrados, los cuales han sido involucrados en una amplia variedad de modalidades sensoriales e implicados en distintas enfermedades. El descubrimiento del agonista fisiológico podría permitir grandes avances en el tratamiento de enfermedades asociadas a un mal funcionamiento de los canales la familia TRP.

OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESIS

Los niveles de Diaciglicerol (DAG) y ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) aumentan en presencia de luz.

2.2 OBJETIVO GENERAL

Determinar los cambios en los niveles de los diferentes lípidos que participan en la fototransducción de *Drosophila*.

2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desarrollar una preparación enriquecida en membranas rabdómicas.
2. Determinar si la luz produce cambios en los diacilgliceroles o ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) en el rabdómero.
3. Determinar el perfil de los ácidos grasos de los lípidos presentes en dichas membranas.

MATERIALES Y METODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

3.11 Ceba de moscas.

Se utilizaron stocks de *Drosophila melanogaster*, crecidas en un incubador a 18-25°C bajo ciclos lumínicos de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. La cepa silvestre usada fue *wild Oregon R* (WOR). Las cepas se mantuvieron en los frascos de vidrio (rotulados con la fecha en que fueron transferidas). Después de 3 semanas se cambiaron a frascos con alimento fresco. De estos mismos frascos se tomaron las moscas para los experimentos.

En el presente trabajo se utilizó también una cepa mutante de *Drosophila* denominada *Gaq¹;Gβe¹*, donada por el Dr. Roger Hardie, de la Universidad de Cambridge. Estas moscas poseen una doble mutación en el gen de la proteína G involucrada en la fototransducción. De acuerdo a lo descrito en Hardie y cols, 2002, las moscas *Gaq¹;Gβe¹* presentan una respuesta a la luz disminuida unas 1000 veces con respecto a las moscas silvestres. Las moscas *Gaq¹;Gβe¹* presentan una mutación hipomórfica severa de la subunidad *Gaq¹* (~1% de la proteína) y de la subunidad *Gβe¹* (<0,5% de la proteína), reduciendo 100 veces los niveles de expresión de estas isoformas (equivalente a una molécula por microvellosidad), mientras que los niveles de otras proteínas claves en la fototransducción se mantienen intactos (Hardie y cols, 2002).

Todas las cepas de *Drosophila* fueron alimentadas con la siguiente dieta estándar. Alimento para moscas (1litro): NaNO₃ 4,2g, K₂HPO₄ 1,2 g, KCl 0,57g; MgSO₄ 0,57g; FeSO₄ 0,0125 g; agar 10 g; sémola 60 g; levadura 10g; azúcar 43 g; NIPAGIN sódico 1,56 g.

El alimento se preparó en agua destilada caliente, donde se agregan todos los ingredientes excepto el NIPAGIN, el cual se agregó al final cuando la mezcla está tibia. El alimento recién preparado fue distribuido en porciones de 30 mL en frascos de vidrio estériles con tapones de

gasas y algodón, los cuales fueron previamente esterilizados a 180°C durante 2 horas. Una vez que el alimento se enfría, los frascos están listos para mantener moscas.

3.12 Solución de Ringer mosca y deslipidación

En esta tesis se utilizó la solución "Ringer mosca", la cual está adaptada a las condiciones fisiológicas de las células de *Drosophila*. En la tabla 1 se especifican los compuestos que contiene esta solución. En todos los experimentos se utilizó solución sin cationes divalentes.

Tabla 1. Solución extracelular "Ringer mosca". El pH se ajusta con NaOH 0,5N hasta obtener pH 7,15. En esta tesis se utilizó esta solución sin iones divalentes.

Compuesto	Concentración [mM]	Peso Molecular [g/mol]
NaCl	120	58,44
KCl	5	74,56
Sacarosa	2,5	342,30
L-prolina	25	115,10
HEPES	10	238,30
MgSO ₄	8	120,36
CaCl ₂	1,5	110,9

Deslipidación de Ringer Mosca usando carbón activado:

-Preparación del carbono activado: En un embudo Buchner se coloca un papel filtro y se filtra el carbón activado (1.02186.1000, Merck) usando agua HPLC (Ver tabla 2). El carbón activado se seca a temperatura ambiente.

-Protocolo Delipidación adaptado de Shen y cols, 1967

De aquí en adelante, las referencias a solución Ringer-Mosca se refieren a Solución isotónica de Ringer para *Drosophila*, la cual no presenta cationes divalentes y que ha sido previamente

deslipidada.

Se agregó carbón activado (1,0 mg/mg de proteína) y se mezcló en un vaso de precipitado. Para remover el C18:0 de la muestra se agregó 1,0 mg de carbón activado, lo cual permitió que el contenido de ácidos grasos libres se redujera hasta un 1%. Después se acidificó la solución con HCl 0,5N hasta llegar a pH 3 (a pH ácido los lípidos son protonados y son más afines al carbón activado). El vaso se colocó en un baño frío y se mezcló durante 1 hora. Luego, la mezcla fue centrifugada a una velocidad de 20.200 xg por 20 minutos a 2°C. (Si se usa la centrífuga Sorvall RC2B con rotor SS34, se debe centrifugar a 12.993 rpm). Se recuperó el sobrenadante y se descartó el pellet, que contiene el carbón activado unido a lípidos. Finalmente, al sobrenadante se le agregó NaOH 0,5N hasta alcanzar el pH fisiológico 7,0.

3.2 MATERIALES

3.21 Solventes orgánicos

En la extracción y el procesamiento de lípidos desde una matriz biológica se requiere el uso de solventes orgánicos. Debido a que las técnicas que se utilizaron son de alta sensibilidad a la contaminación, la mayoría de los solventes usados fueron de grado de pureza "Cromatografía líquida (HPLC)", sin embargo, aquellos solventes que se usaban en baja proporción tenían grado "pro análisis". La tabla 2 especifica las características de los solventes utilizados.

Tabla 2. Solventes grado *Cromatografía Líquida* (HPLC) y *pro análisis* utilizados en todos los experimentos de análisis de lípidos.

Solvente	Grado <i>Cromatografía Líquida</i> (HPLC)	Grado <i>pro análisis</i>
n- hexano	1.04391.4000, Merck	---
Acetona	1.00020.4000, Merck	---
Isopropanol	1.01040.4000, Merck	---
Cloroformo	1.02444.4000, Merck	---
Tolueno	1.08327.4000, Merck	---
Metanol	1.06007.4000, Merck	---
Metanol anhidro	1.06012.1000, Merck	---
Agua Lichrosolv	1.15333.4000, Merck	---
Isooctano	1.04717.2500, Merck	---
Tetrahidrofurano (THF)	1.08101.1000, Merck	---
Metil-Tert-Butil-Eter (MTBE)	1.01845.1000, Merck	---
Ácido acético glacial	---	1.00063.2500, Merck
Ácido clorhídrico concentrado	---	1.00317.2500, Merck
Éter dietílico	---	1.00921.1000, Merck
Etil acetato	---	1.09623.1000, Merck
Ácido sulfúrico concentrado	---	1.00731.2500, Merck
Ácido fórmico	---	1.00264.1000, Merck

3.3 OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN ENRIQUECIDA EN RABDÓMEROS

3.31 Disección

Moscas silvestres (WOR) y mutantes *Gaq¹*; *Gβeq¹* fueron anestesiadas por saturación del ambiente con CO₂ y se disectaron en hielo los ojos compuestos hasta obtener muestras de 250 ojos (aprox. 2 horas), las cuales fueron guardadas en tubos eppendorf de 1,5 ml. Los ojos se colocaron en una solución Ringer Mosca (500 μL) a 4°C suplementada con una mezcla de inhibidores de proteasas (2x, #11 836 170 001, Roche). Una vez colectados los 250 ojos de moscas silvestres, estos son adaptados a dos condiciones: luz potente u oscuridad absoluta por 10 minutos a temperatura ambiente, para que todas las células fotorreceptoras queden sincronizadas. Al término del tiempo de adaptación, los ojos fueron rápidamente congelados con nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C. Antes de homogenizar, se descongelaron y se mezclaron dos tubos con 250 ojos cada uno, para tener suficiente cantidad de muestra para los experimentos. Este procedimiento se hizo en hielo, con puntas de pipeta y tubos eppendorf

siliconizados para evitar que los ojos quedaran adheridos a los plásticos.

3.32 Homogenización mecánica

Las muestras de 500 ojos (en 1 mL de Ringer mosca) fueron homogenizadas mediante fraccionamiento mecánico utilizando un Mini-bead-beater (Mini-beadBeater-1, modelo 3110BXEUR, Biospec products, US/Canadá), el cual utiliza bolas de vidrio lisas con un diámetro de 0,1 mm. El protocolo de homogenización consiste en un minuto de agitación y 40 segundos de reposo en frío (-20°C). Este ciclo se repitió 10 veces para cada muestra. Posteriormente, las muestras se mantuvieron estáticas durante 15 minutos a 4°C, precipitando la quitina y las bolitas de vidrio. Se recuperó el sobrenadante (de aspecto turbio) y el pellet sólo se utilizó durante la caracterización de las fracciones mediante inmunoblotting (denominado pellet del extracto, PE).

3.33 Centrifugación diferencial

Al sobrenadante (de aspecto turbio y aproximadamente de 1 mL) obtenido de la homogenización mecánica se le extrajo una alícuota de 200 µL y se le denominó como "homogenizado"; el contenido restante fue centrifugado a 10xg durante 10 minutos, obteniéndose un sobrenadante y un pellet. De este sobrenadante se extrajeron 200 µL y se denominó "S1", mientras que el pellet de aproximadamente 60 µL fue llamado "P1". El contenido restante del sobrenadante fue centrifugado a 2.370xg por 5 minutos, obteniéndose un sobrenadante y un pellet. De este sobrenadante se extrajeron 200 µL y se denominó "S2", mientras que el pellet de aprox. 60 µL fue llamado "P2". Posteriormente, el contenido restante del sobrenadante fue centrifugado a 18.620xg durante 15 minutos, obteniéndose un sobrenadante y un pellet denominados "S3" y "P3" con volúmenes aproximados de 200 y 60 µL, respectivamente. Todas las centrifugaciones se realizaron a 4°C y tenían como objetivo separar

los distintos componentes celulares (Figura 3). Los análisis de lípidos se realizaron sólo en la fracción P2, la cual constituye la fracción enriquecida en rbdómeros.

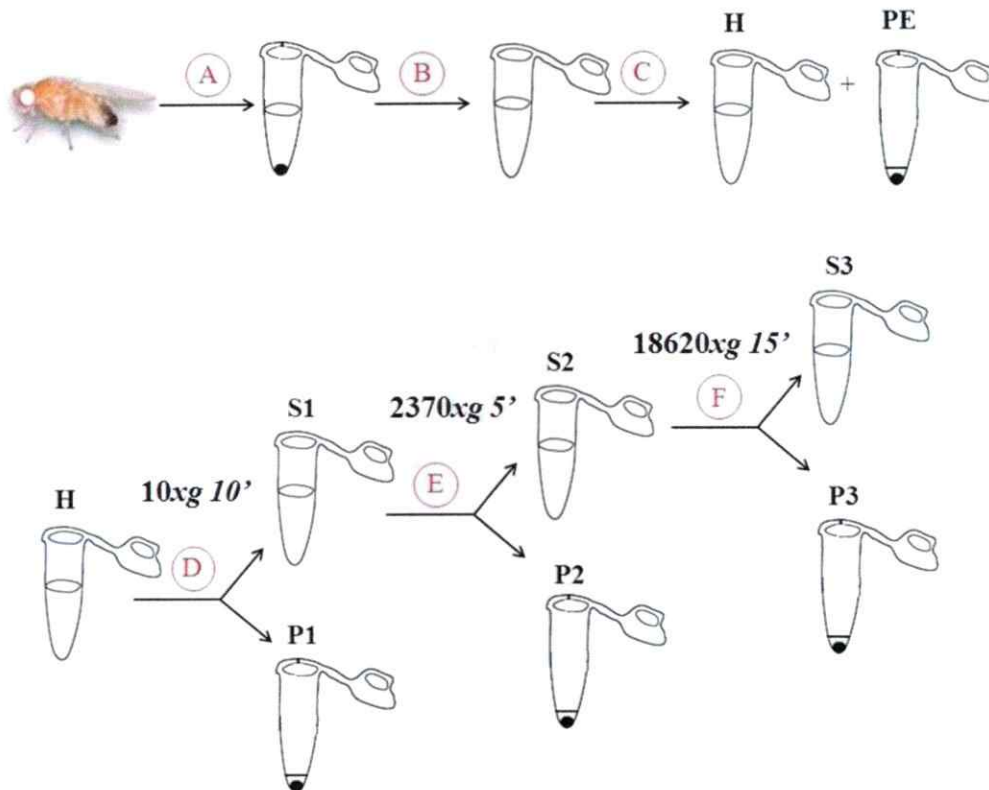


Figura 3. Protocolo que permite obtener una fracción enriquecida en membranas de rbdómeros (P2). Diagrama de flujo de la metodología realizada para obtener una fracción enriquecida en membranas de rbdómeros. A) disección de los ojos de *Drosophila*, recolección de 250 ojos por tubo y adaptación a condición de oscuridad o luz. B) Homogenización mecánica de los ojos con un mini-bead beater. C) Precipitación en frío. Obtención de un sobrenadante que representa la muestra homogenizada (H) y un pellet del extracto original (PE) que contiene las bolitas de vidrio y la quitina de los ojos. D) El homogenizado se centrifuga a 10xg por 10 minutos a 4°C y se obtuvo un sobrenadante y un pellet, llamados S1 y P1. E) S1 se centrifugó a 2.370xg por 5 minutos a 4°C y se obtuvo S2 y P2 (fracción de rbdómeros). F) S2 se centrifugó a 18.620xg por 15 minutos a 4°C y se obtuvo S3 y P3. De cada fracción del sobrenadante se recuperó una alícuota de 200 µL.

3.34 Cuantificación de proteínas

Para cuantificar las proteínas obtenidas en las fracciones obtenidas por centrifugación diferencial: homogenizado, S1, P1, S2, P2, S3, P3 y pellet del extracto (PE), se midieron las proteínas totales mediante el método de Lowry modificado de Hartree, (1972): en una placa de ELISA se colocaron por triplicado, un estándar de la proteína seroalbúmina de bovino (BSA, Sigma) de stock 1 mg/mL a distintas concentraciones, para obtener una curva de calibración. Se colocaron también por triplicado 1 μ L de cada una de las fracciones obtenidas por centrifugación diferencial cuya concentración debía determinarse. Las muestras se incubaron por 10 minutos a 50°C con la solución A (tartrato de Na-K, Na_2CO_3 , NaOH 1N); luego 10 minutos a temperatura ambiente con la solución B (tartrato de Na-K, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, NaOH 1N) y finalmente se incubaron por 10 minutos a 50°C con Folin Ciocalteu 1:15 (#1.09001.0500, Merck). La detección colorimétrica se realizó en un lector de ELISA (Sunrise Tecan A-5083) a una longitud de onda de 650 nm. Los datos fueron luego graficados y ajustados a una recta por regresión lineal para interpolar los datos de concentración de proteínas totales obtenidas.

3.35. Análisis de proteínas mediante Inmunodetección

La técnica de inmunodetección de proteínas, conocida como inmunoblot, consta de varias etapas, que se describen a continuación: las preparaciones de proteínas de las distintas fracciones obtenidas por centrifugación diferencial se calentaron por 10 minutos a 100°C. Se cargaron 6 μ L del ladder (#SM0671, Fermentas) y 20 μ g de muestra de proteínas totales en cada carril y se procedió con la electroforesis en geles de poliacrilamida al 7 y 10% en condiciones desnaturalantes, a 70V el gel concentrador y a 100 V el gel separador. Para visualizar proteínas totales, un gel se tiñó con azul de Coomassie y un segundo gel se sometió a electrotransferencia a un papel de nitrocelulosa para la detección con el anticuerpo para la proteína correspondiente. La transferencia se realizó en una cámara de transferencia húmeda (Biorad), en frío a 300 mA por

una hora y media (para ambas concentraciones de geles), con buffer de transferencial al 20% de metanol para los geles de 7% y buffer de transferencia al 10% metanol para los geles al-10%. Luego, la membrana se trató con leche descremada al 5% en TBS-T al 0,05% (a esta solución se le denominó Blotto) por 1 hora a temperatura ambiente, para bloquear sitios inespecíficos que podrían proporcionar una falsa señal. Posteriormente, las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con agitación constante con el anticuerpo específico respectivo*, diluido en la solución Blotto. En la Tabla 3 se especifican los anticuerpos primarios y secundarios utilizados. Luego, las membranas se lavaron 5 veces, cinco minutos cada vez con una solución de TBS-T al 0,05% y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa, una hora y media a temperatura ambiente con agitación, en la misma solución de bloqueo. Posteriormente, las membranas se lavaron 5 veces, 5 minutos cada vez con TBS-T al 0,05%. El revelado de las membranas se efectuó con un sustrato de peroxidasa quimioluminiscente (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate 34080, Pierce). La inmunorreactividad fue detectada utilizando películas radiográficas (Fujifilm HR-T30).

*Las proteínas TRP y actina fueron utilizadas como marcadores de rabdómeros. La lamina Dm0 de *Drosophila* fue usada como marcador de membrana nuclear y la enzima superóxido dismutasa 2 fue usada como un marcador de mitocondrias.

Tabla 3. Anticuerpos y diluciones utilizados en los experimentos de inmunodetección.

Anticuerpo (#Catálogo, fabricante)	Proteína reconocida	Estructura reconocida	Diluciones utilizadas.	Referencias
MAB83F6 monoclonal-IgG1, DSHB (mouse)	TRP, 173 kDa	todo el largo de la proteína TRP	1:200 Alta especificidad. Excelente	Pollock <i>y cols</i> , 1995; Gillo <i>y cols</i> , 1996
ADL84.12 monoclonal IgG1, DSHB (mouse)	lamina DmO, 72 kDa	epítoto entre los amino- ácidos 22 y 28	1:200 Alta especificidad. Excelente	Stuurman <i>y cols</i> , 1995; Stuurman <i>y cols</i> , 1996; Furukawa <i>y cols</i> , 2009.
Anti-SOD 2, Policlonal IgG, #ab13534, Abcam (rabbit)	Superóxido dismutasa 2, 26 kDa	todo el largo de la proteína SOD2	1:2000 excelente	Boyd <i>y cols</i> , 2009; Harada <i>y cols</i> , 2009.
Monoclonal anti- Actin clon AC-40 IgG2a, #A3853, Sigma (mouse)	actina 42 kDa	epítoto localizado en el N- terminal	1:1000 Funciona bien	Asher <i>y cols</i> , 2002; Maple <i>y cols</i> , 1997
Goat anti-mouse IgG conjugado con peroxidasa, #31430, Thermo Scientific	anticuerpo primario mouse	cadena ligera y pesada	1:10.000 Funciona bien	
Goat anti-rabbit IgG conjugado con peroxidasa, #31460, Thermo Scientific	anticuerpo primario rabbit	cadena ligera y pesada	1:5.000 Funciona bien	

3.4. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS

Antes que las muestras puedan ser analizadas por cualquier método cromatográfico, es necesario extraer los lípidos de las matrices de los tejidos en un estado relativamente puro. La alta sensibilidad de los métodos analíticos requiere el uso de solventes de alta pureza y material de vidrio bien lavado. La naturaleza química de los lípidos extraídos debe ser considerada, ya que es difícil aplicar una extracción con la que se obtengan altos rendimientos de lípidos dentro de un amplio rango de polaridades. Todos los lípidos deben ser protegidos contra la degradación

y oxidación. Para ello, es esencial el uso de solventes que protegen a los lípidos de la interacción con el oxígeno ambiental. Este punto es crucial cuando la muestra está enriquecida en ácidos grasos poliinsaturados, ya que una vez iniciada la reacción de autooxidación, ésta procede autocatalíticamente. El análisis de lípidos requirió el uso de material de vidrio lavado con detergente y un posterior tratamiento con metanol-hidróxido de potasio. Se utilizaron estándares internos de estructura y concentración conocida, al inicio de la extracción lipídica, los cuales permitieron la cuantificación de los lípidos presentes en la muestra. Los estándares internos son moléculas similares a las que se quiere identificar, sin embargo, no se encuentran en la naturaleza o su abundancia es extremadamente baja (ej, los ácidos grasos de cadenas aciles impares no existen en los animales y las moléculas con 3 o más deuterios existen en 0,01% en la naturaleza). En el mercado existe una amplia variedad de estándares disponibles para realizar distintos análisis lipídicos.

3.41 Preparación de los estándares de lípidos

1) Preparación de estándares de ácidos grasos: 19:0-AGL, 15:0-AGL y 17:0-AGL

Se resuspendieron en cloroformo HPLC: 5 mg de ácido nonadecanoico (19:0-AGL Sigma Aldrich), ácido pentadecanoico (15:0-AGL, Sigma Aldrich) y ácido heptadecanoico (17:0-AGL, Sigma Aldrich), y se guardaron en tubos nuevos a una concentración de 5 mg/mL. Mediante dilución seriada, se generaron estándares de trabajo a una concentración de 0,05 mg/mL. Todos los estándares fueron almacenados a -20°C. Cada vez que se utilizó un estándar, se realizó una marca del volumen resultante que quedaba en el tubo. Esta es una medida de control para saber si hay evaporación significativa de solvente, lo que implicaría un cambio en la concentración del estándar lipídico.

2) Preparación del estándar deuterado (1,3-di-18:0-DAG-d5)

El estándar comercial 1,3-di-octadecanoil-2-OH-*sn*-glicerol d5 (1,3-di-18:0-DAG-d5, #110580, Avanti Polar Lipids) presenta 5 deuterios en el carbono 2 del esqueleto glicerol de la molécula. Un mg de 1,3-di-18:0-DAG-d5 fue extraído del vial con cloroformo HPLC, se colectó a un tubo limpio, fue secado bajo corriente de nitrógeno y resuspendido a una concentración final de 0,1 mg/mL en cloroformo HPLC. Se almacenó a -20°C bajo nitrógeno.

3.42. Extracción de lípidos totales con Cloroformo (Extracción de Folch)

Los lípidos de la muestra P2 fueron extraídos utilizando cloroformo como el solvente de extracción (Folch y cols, 1957). Se ha descrito que la extracción de Foch es eficiente cuando se utilizan muestras pequeñas (<1 g). Cada muestra fue descongelada en hielo mientras se agregaban 5 µg de 19:0-AGL (0,05 µg/µL), a cada tubo de vidrio. Posteriormente, el estándar fue secado bajo corriente de nitrógeno leve y se agregó 4 mL de una mezcla de Cloroformo:Metanol (2:1 v/v) a cada tubo. Una vez descongeladas las muestras, éstas fueron sometidas a una centrifugación de 1 min a 50.000 rpm a temperatura ambiente, se les agregó Ringer mosca hasta completar 200 µL y se adicionó 800 µL de una solución de NaCl 0,9% a cada muestra. Después, se agregó 50 µL de ácido acético glacial, se agitó vigorosamente varias veces y se centrifugó a 2.000 rpm por 5 min a 7°C. Luego, se colectó la fase clorofórmica (inferior) con pipeta Pasteur de vidrio y se traspasó a un tubo nuevo. La fase acuosa fue extraída con 3 mL de cloroformo y se repitió el procedimiento. Se juntaron ambas fracciones orgánicas y se secaron bajo corriente de nitrógeno leve. Con este procedimiento se obtuvieron los "lípidos totales" de la muestra, libres de proteínas, azúcares u otras pequeñas moléculas que podían interferir con los pasos cromatográficos siguientes.

3.43 Extracción con Metil-Tert-Butil-Eter (MTBE)

Con el fin de obtener extracciones más limpias, rápidas y compatibles con espectrómetros de masas sofisticados, se utilizó metil-tert-butil-éter (MTBE) como un solvente de extracción de lípidos totales para la identificación de especies de diacilglicerol. La baja densidad del MTBE permite coleccionar fácilmente los lípidos de la muestra, ya que flota sobre el agua. Esto además evita la pérdida de gotas lipídicas, un problema recurrente en el método de Folch. La recuperación de las mayores clases de lípidos es similar e incluso mejor que la obtenida por este último método (Matyash *y cols*, 2008). El protocolo que sigue describe la extracción lipídica utilizando MTBE.

Se agregaron 50 μL del estándar deuterado 1,3-di-octadecanoil-2-OH-*sn*-glicerol d_5 (0,1 mg/mL) a cada tubo y luego fue secado bajo suave corriente de nitrógeno. Se agregó 1 mL de MTBE:Metanol (3:1 v/v)* al tubo que contenía la fracción P2 y se vortexeó hasta que se obtuvo una solución homogénea. La muestra fue traspasada al tubo Eppendorf (2 mL) que contenía el estándar interno deuterado. Los tubos fueron agitados en un vórtex y las muestras fueron incubadas por 10 minutos en un agitador orbital a 4°C, seguido de una sonicación por 10 minutos en un baño frío. Después se agregaron 500 μL de Metanol:Agua (3:1 v/v) frío a cada muestra, se agitaron y se centrifugaron a 18620g por 5 minutos a 4°C. Se recuperó la fase superior (aproximadamente 500 μL) y se traspasó a un tubo nuevo previamente enfriado. Finalmente, todas las muestras fueron secadas bajo corriente de nitrógeno.

* La mezcla de MTBE:Metanol (3:1 v/v), se puede almacenar a -20°C durante 2 semanas.

3.5 ANÁLISIS DE METIL-ÁCIDOS GRASOS (FAME) MEDIANTE CROMATOGRAFÍA GASEOSA Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC-MS) EN EL MODO DE IONIZACIÓN POR IMPACTO ELECTRÓNICO (EI)

El análisis de las cadenas aciles de las diferentes clases de lípidos requiere una separación en columna después de la extracción de lípidos. La separación se puede realizar mediante distintos tipos de cromatografía. Las principales clases de lípidos en tejidos animales que varían en su polaridad desde ésteres de colesterol hasta lisofosfatidilcolina, pueden ser separados por Cromatografía en Capa fina (TLC), Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) o alguna otra columna cuyo adsorbente puede adsorber eficazmente los lípidos, como es el caso del aminopropilo. Posteriormente, los lípidos deben ser tratados químicamente (o derivatizados) antes de ser inyectados en el cromatógrafo.

La preparación de metil-ésteres de ácidos grasos (FAME, por sus siglas en inglés, Fatty Acid Methyl-Ester) es la reacción química más usada por los analistas de lípidos, ya que es un procedimiento simple donde la hidrólisis del lípido y metilación del grupo carboxilo de los ácidos grasos ocurre en varias horas a si se incubaba a 50°C. Esterificar los lípidos ayuda a convertirlos en derivados de bajo peso molecular y polaridad, estabiliza el grupo funcional a una temperatura superior a los 200°C y aumenta la volatilidad de la molécula, resultando en una notable mejora de la forma y resolución del pico cromatográfico. Si se inyectan lípidos sin derivatizar, se aumenta el riesgo de contaminar la columna cromatográfica, ya que la interacción de ésta con el lípido no derivatizado es varias veces superior a la interacción con el lípido derivatizado. Posterior a la derivatización, se debe realizar una extracción con solvente apolar para recuperar todos los ácidos grasos esterificados, los cuales finalmente serán inyectados en el cromatógrafo de gases. Los FAMEs son identificados y cuantificados usando espectrometría de masas. La energía impartida por el haz de electrones rompe algunos enlaces de la molécula. De esta forma, el analito completo sin un electrón (ión molecular) o porciones grandes de la

estructura original permanecen intactas, permitiendo su identificación.

3.51 Separación de las clases de lípidos mediante cromatografía líquida a presión atmosférica (SPE, extracción en fase sólida)

Con el fin de separar las principales clases de lípidos de una muestra biológica, se utilizó una columna de aminopropilo (Supelclean™ LC-NH₂ SPE Tube, #57014, SUPELCO, Sigma Aldrich). Los lípidos se unieron a la columna y fueron eluidos con diferentes solventes que presentaron un aumento progresivo de la polaridad, lo que permitió eluir en primera instancia lípidos apolares, seguido de lípidos neutros y finalmente lípidos altamente polares, con una recuperación >98% de cada una de las clases de lípidos (Agreen y cols, 1992). Los lípidos totales fueron secados bajo nitrógeno y resuspendidos en 1 mL de solvente de carga Hexano: Dietiléter: Ácido acético (100:3:0,3 v/v); se cargaron sobre una columna de aminopropilo (500 mg) preconditionada (*) y se eluyeron secuencialmente utilizando los siguientes solventes (Tabla 4).

Tabla 4. Separación de las principales clases de lípidos presentes en los tejidos animales mediante columnas SPE.

Nº fracción	Compuestos eluidos	Solvente
1	Esteres de colesterol	Hexano, 5 mL
2	Triacilgliceroles	Hexano: Cloroformo: Acetato de etilo (100: 5: 5 v/v), 6 mL
3	Mono y Diacilgliceroles	Cloroformo: Isopropanol (2:1 v/v), 5 mL
4	Ácidos grasos libres	Cloroformo: Metanol: Ácido acético (100:2:2 v/v), 6 mL
5	Fosfolípidos	Metanol: Cloroformo: Agua con 0,9% NaCl (10:5:4 v/v), 6 mL

Las fracciones 1, 2, 3 y 4 corresponden a lípidos neutros.

Las fracciones eluidas fueron secadas bajo corriente de nitrógeno y derivatizadas según se

describe a continuación. Se utilizaron los estándares internos 17:0-AGL y 15:0-AGL para cuantificar los esteres de esteroles, triacilglicéridos, mono y diacilglicéridos y fosfolípidos. Estos estándares fueron agregados al tubo donde se recolectaba el solvente eluido.

*El acondicionamiento de la columna de aminopropilo fue con 2 mL de acetona: agua (7:1 v/v) seguido de 4 mL de hexano. Posteriormente, se hizo la separación de las clases lipídicas.

3.52. Preparación de metil-ácidos grasos: Derivatización catalizada por ácido

La derivatización o formación de los metil-esteres de ácidos grasos se muestra en la Figura 4. Las distintas clases de lípidos secos, obtenidas después de la separación por la columna de aminopropilo, fueron resuspendidas en 0,5 mL de Tolueno y se les agregó 1 mL de Metanol anhidro ácido ($\geq 1N$). Las muestras fueron derivatizadas durante toda la noche a 50°C (los lípidos fueron hidrolizados y sus constituyentes ácidos grasos fueron metil-esterificados).

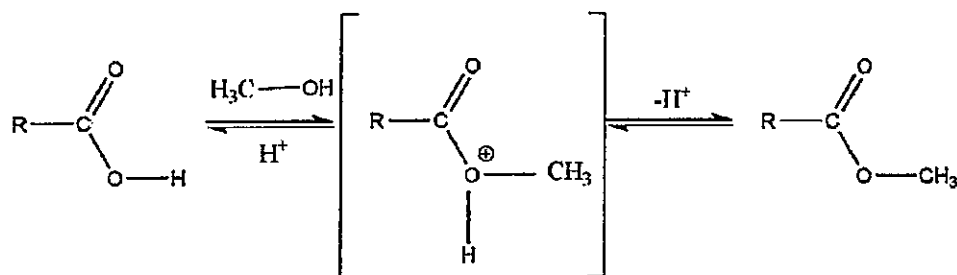


Figura 4. Derivatización de las diferentes clases de lípidos con Metanol anhidro en medio ácido. El metanol ataca el grupo carbonilo de los ácidos grasos del lípido produciendo la hidrólisis de éste. De esta forma los ácidos grasos de las moléculas quedan libres y son esterificados por el metanol, generándose metil-ácidos grasos. El medio ácido sirve como un catalizador de la reacción.

Adicionalmente, se realizó un control del reactivo de derivatización en cada corrida, al cual se le agregó 5 µg del estándar 19:0-AGL y se sometió al mismo procedimiento que el resto de las

muestras. Este control fue necesario para verificar la pureza del reactivo con el cual se derivatizan las muestras.

3.53. Neutralización, extracción e inyección de las muestras en el GC-MS

La reacción de esterificación en medio ácido es altamente eficiente, sin embargo, algunos ácidos grasos no logran ser esterificados y deben ser descartados de la preparación. El bicarbonato de Sodio cambia el pH del medio, deteniendo el proceso de derivatización y el agua contribuye a la formación de 2 fases distinguibles. Los ácidos grasos esterificados se extraen con un solvente apolar (hexano) y los ácidos grasos no esterificados se descartan junto al medio acuoso.

Las muestras derivatizadas durante la noche fueron neutralizadas con 2 mL de bicarbonato de Sodio al 6% y se extrajeron con 2 mL de Hexano. Luego, se centrifugó a 2000 rpm por 5 min a 10°C, se recolectó la fase orgánica (fase superior) y se traspasó a un tubo nuevo. La fase acuosa fue extraída por segunda vez con 2 mL de Hexano y se repitió el procedimiento. Se recolectaron ambas fracciones orgánicas y se secaron bajo leve corriente de nitrógeno. Los ácidos grasos secos de cada muestra fueron resuspendidos en 500 µL de Hexano y el volumen fue traspasado a un vial de cromatografía de 2 mL. Se inyectó 5 µL de cada muestra en el cromatógrafo de gases.

3.54 Aspectos técnicos de la corrida cromatográfica

Es posible identificar los ácidos grasos sólo usando GC por que se conocen los tiempos de retención, sin embargo, GC combinado con la espectrometría de masas (MS) es una herramienta poderosa para la caracterización de los compuestos. El cromatógrafo de gases separa los componentes de una mezcla según la interacción del analito con la fase estacionaria de la columna y el solvente de elución, generando un tiempo de retención característico. Los compuestos separados ingresan al espectrómetro de masas, el cual genera partículas cargadas

(iones) a partir de las moléculas originales. Entonces, analiza esos iones para proveer información de la molécula, como su peso molecular y su estructura química.

Los ácidos grasos fueron analizados por cromatografía de gases y espectrometría de masas en el modo de impacto electrónico en un cromatógrafo de gases HP 5890 serie II con inyector automatizado modelo HP185968 e inyector modelo HP7673, acoplado a un espectrómetro de masas Hewlett Packard 5972 equipado con un analizador cuadrupolo. La corrida cromatográfica se realizó con una columna capilar HP-INNOWAX #19091N-102 de 25 m de largo, 0,2 mm de diámetro interno y 0,2 μm de grosor de película. La temperatura del inyector fue mantenida a 220°C y la separación se realizó mediante dos rampas lineales de temperatura, la primera partiendo en 150°C y terminando en 200°C (15°C/min) en un tiempo de 5 minutos y la segunda desde los 200°C hasta los 260°C (12°C/min) en un tiempo de 5 minutos. La temperatura del detector fue 275°C. La duración total de la corrida fue 19 minutos. Se utilizó helio como gas transportador (UHP 99,999 % de pureza, AGA) a un flujo de 1 mL/min y la inyección se hizo en modo "splitless" (se analizó toda la muestra inyectada). El calibrador del espectrómetro fue perfluorotributilamina (PFTBA).

3.55 Controles básicos

En cada corrida fue necesario verificar que la columna cromatográfica se encontraba limpia. Para ello se realizaron 2 controles, ambos con hexano HPLC. El primer control llamado limpieza, consistía en correr hexano junto a una rápida rampa de temperatura hasta alcanzar la temperatura máxima permitida (260°C). La temperatura interrumpe la interacción entre el adsorbente y el analito que se encontraba adsorbido desde la corrida anterior, ya que a alta temperatura el analito se evapora y eluye por la columna. El segundo control consistía en correr hexano HPLC (sin derivatizar) en el cromatógrafo, para ver si el solvente en el cual eran resuspendidas las muestras estaba contaminado. La columna que se utilizó en este estudio es

compatible con hexano, sin embargo, en las hojas de datos de cada columna se especifica que solvente de carga que debe ser usado.

3.56 Tiempos de retención, identificación de los metil-ácidos grasos, contaminación y análisis de datos.

A medida que se van haciendo cada vez más experimentos, el analista de lípidos adquiere un entendimiento intuitivo de la relación entre los tiempos de retención de los picos cromatográficos en un cromatograma y la identidad de la molécula desconocida. Cada analito posee un tiempo de retención característico, por ejemplo, independiente que el ácido esteárico (C18:0) sea identificado en la fracción de fosfolípidos, ácidos grasos libres o triacilgliceroles, siempre tendrá el mismo tiempo de retención en la corrida cromatográfica realizada en las mismas condiciones. Es importante considerar que al retirar la columna, se le colocan una septas para que ésta no quede en contacto con el aire. Al colocar la columna en el cromatógrafo, ésta debe ser cortada en sus extremos (aproximadamente 1 cm a cada lado). Como el largo de la columna cambia, también lo hace el tiempo de retención disminuyendo un par de décimas o centésimas de minuto.

La identidad de un compuesto se establece por la comparación de su espectro de masas con espectros de masas de compuestos conocidos (espectros de referencia) que se encuentran en bibliotecas computarizadas, obteniéndose una determinada coincidencia. En este caso, el mínimo porcentaje de coincidencia entre los espectros fue de 80%, usando la biblioteca computarizada específica de metil-ácidos grasos (NBS75K.L). El programa de análisis de datos utilizado fue MSDA (Hewlett Packard). La probabilidad que tienen compuestos distintos de dar el mismo espectro de masas se hace cada vez menor a medida que aumenta la cantidad de picos en el espectro de masa (además del ión molecular). Por esta razón, la ionización por impacto de electrones es el método elegido para comparar espectros de masa. En general, algunos analistas

confirman la identidad de un compuesto por comparación de su espectro de masas con el espectro de un compuesto auténtico (siempre y cuando esté disponible en el comercio) con el mismo instrumento y bajo condiciones de trabajo idénticas.

La identificación de los plásticos se realizó con la comparación del espectro de masas experimental y el de la biblioteca. Los plásticos (o ftalatos), poseen un fragmento característico de $m/z = 190$ unidades de masa atómica (uma). Además, el patrón de fragmentación de los plásticos es característico. Los plásticos aparecieron después de los 11 minutos de elución. Estos plásticos provienen en su mayoría de las columnas SUPELCO y de puntas de micropipetas que se usan en la extracción de lípidos.

Otra característica de los cromatogramas es el aumento de la línea base a partir de los 12 minutos de la corrida. Este aumento es producto de la rampa de temperatura usada, específicamente cuando se alcanzan temperaturas sobre los 200°C. Ese fenómeno se denomina "sangrado de la columna" y corresponde al desprendimiento de la fase estacionaria por alta temperatura. A medida que aumentan el número de corridas de la columna, aumenta el sangrado de ésta. Todas las columnas sangran en cierta medida, sin embargo, cuando el sangrado es alto, la cuantificación de los compuestos se hace difícil. Por ello, fue establecido en el laboratorio que cuando el sangrado superaba las 50.000 unidades de abundancia (u.a.), se debía realizar un cambio de columna cromatográfica.

En las fracciones de ésteres de esteroles, triacilglicérolos, mono-diacilglicérolos y fosfolípidos se utilizaron los estándares internos: ácidos pentanoico (C15:0) y heptanoico (C17:0) para cuantificar las muestras y a pesar de agregar la misma cantidad de cada uno a cada muestra, el C15:0 siempre mostró una abundancia menor a la del C17:0. La relación de estos dos ácidos grasos fue 1:3, respectivamente. Por esta razón, el C17:0 fue usado como el estándar interno para la cuantificación de los lípidos. En la fracción de ácidos grasos libres se usó el ácido nonadecanoico (C19:0) como estándar interno.

3.57 Análisis cualitativo, cuantitativo y estadístico

-Análisis cualitativo: Composición de ácidos grasos de la muestra de rabdomeros

Una de las dificultades que presentó la separación de los lípidos en la columna SUPELCO fue la observación de contaminación producida por los ácidos grasos C16:0 y C18:0. Por esta razón, en cada corrida cromatográfica se hizo un control negativo que sólo contenía Ringer mosca. A este control se le agregó estándar interno y se prosiguió con los pasos siguientes al igual que las muestras P2. Entonces, este control otorgó un área para cada ácido graso contaminante. Con el área del ácido graso contaminante se puede calcular su masa o su concentración. Entonces, las áreas de los ácidos grasos de cada muestra P2 fueron corregidas de la siguiente forma:

A las áreas de los metil-ácidos grasos de la muestra P2 se le restó el área de los metil-ácidos grasos contaminantes. Para ello, las áreas de los estándares internos de las dos muestras deben estar en el mismo orden de magnitud. Por lo tanto, es fundamental hacer la corrida de las muestras junto con la corrida del control negativo, en la misma columna cromatográfica y (en lo posible) hacer las corridas de forma consecutiva y dentro del mismo día.

Con las áreas corregidas, se hicieron los análisis cualitativos, los cuales son independientes de la masa inicial de las muestras.

I. Para conocer la composición de ácidos grasos de "cada fracción" se realizó el siguiente cálculo:

- 1) Se obtuvo la razón del área de un metil-ácido graso dividido por la suma total de áreas de los metil-ácidos grasos de la fracción, sin considerar el área del estándar interno y se multiplicó por 100.

$$\% = \frac{\text{area}A}{\sum \text{areas}F} \cdot 100,$$

donde A es el área de un ácido graso particular (por ejemplo, 16:0 de los TAGs) y F es el área total de la fracción lipídica TAGs.

II. Para conocer qué porcentaje representan los ácidos grasos de la "fracción lipídica" en la muestra P2, se realizó el siguiente cálculo:

$$\% = \frac{\text{area}F}{\sum \text{area}M} \cdot 100$$

donde F es la suma de las áreas de todos los metil-ácidos grasos de una fracción lipídica (por ejemplo, ácidos grasos de los TAGs de la muestra P2 de ojos silvestres adaptados a luz) y M es el área total de la muestra de ojos silvestres adaptados a luz.

III. Para conocer el porcentaje que representan los ácidos grasos saturados de cada fracción en la muestra P2, se realizó el siguiente cálculo:

$$\% = \frac{\text{areas}S}{\sum \text{areas}M} \cdot 100$$

donde, S es la suma de las áreas de los metil-ácidos grasos saturados de una fracción lipídica (por ejemplo, C16:0 + C18:0 de los MDAGs de la muestra de ojos silvestres adaptados a luz) y M es el área total de la muestra de ojos silvestres adaptados a luz.

IV. Para conocer el porcentaje que representan los ácidos grasos insaturados de cada fracción en la muestra P2, se realizó el siguiente cálculo:

$$\% = \frac{\text{areas}I}{\sum \text{areas}M} \cdot 100$$

donde, I es la suma de las áreas de los metil-ácidos grasos insaturados de una lipídica (por ejemplo, C16:1+C18:1+C18:2 de los TAGs de la muestra de ojos silvestres adaptados a luz) y M es el área total de la muestra de ojos silvestres adaptados a luz.

V. Para conocer el porcentaje que representan los ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs), se realizó el siguiente cálculo:

$$\% = \frac{\text{areasMI}}{\sum \text{areasM}} \cdot 100$$

donde, MI es la suma de las áreas de los metil-ácidos grasos monoinsaturados de una fracción lipídica (por ejemplo, C16:1+C18:1 de los TAGs de la muestra de ojos silvestres adaptados a luz) y M es el área total de la muestra de ojos silvestres adaptados a luz.

VI. Para conocer el porcentaje que representan los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), se realizó el siguiente cálculo:

$$\% = \frac{\text{areasPI}}{\sum \text{areasM}} \cdot 100$$

donde, PI es la suma de las áreas de los metil-ácidos grasos poliinsaturados de una fracción lipídica (por ejemplo, C18:2+C18:3 de los fosfolípidos de la muestra de ojos silvestres adaptados a luz) y M es el área total de la muestra de ojos silvestres adaptados a luz.

VII. Para conocer el porcentaje que representa un ácido graso particular en la muestra, se realizó el siguiente cálculo:

$$\% = \frac{\text{areasA}}{\sum \text{areasM}} \cdot 100$$

donde, A es el área de un ácido graso particular de una fracción (por ejemplo, C16:0 de la fracción de TAGs de la muestra de ojos silvestres adaptados a luz) y M es el área total de la muestra de ojos silvestres adaptados a luz.

-Análisis cuantitativo: Contenido de ácidos grasos de la muestra de rabdómeros

Se utilizaron los valores corregidos de áreas de los ácidos grasos y se calculó la masa de cada ácido graso utilizando una proporción directa entre la masa conocida del estándar interno, su área y el área del ácido graso. Este cálculo dio la masa del ácido graso en el volumen de inyección (5 μ L), por lo tanto, se calculó la cantidad de masa que había en el volumen de resuspensión de la muestra (500 μ L). Posteriormente, se calculó el número de moles, ya que se disponía del peso molecular de cada ácido graso (no del metil éster). Después, los moles fueron normalizados con la cantidad total de ácidos grasos de cada muestra. Este valor se obtuvo sumando las áreas de todos los ácidos grasos de la muestra y transformándolo a un valor de masa utilizando el área y la masa conocida del estándar interno 19:0-AGL, el cual fue agregado en el primer paso del análisis de lípidos (extracción lipídica), por lo que sufrió todos los procedimientos analíticos. El valor de esta masa se expresó en mg de ácidos grasos. Se asume que cualquier pérdida de muestra es equivalente a la pérdida observada en el estándar interno. Los valores son expresados como la media de 5 repeticiones más el error estándar de la media (SEM).

-Análisis estadístico

Para establecer las comparaciones de las tres condiciones experimentales se calculó la media, el error estándar de la media (SEM) y se demostró la homocedasticidad de las variancias de las fracciones mediante la prueba C de Cochran. Esta prueba se basa en comparar la varianza más grande de todos los grupos a comparar contra la sumatoria de las varianzas de todos los

grupos al cuadrado.

$$Cohran C = s_k^2 \text{ mayor} / \sum s_k^2$$

El valor observado se comparó contra un valor tabulado de C bajo la hipótesis de homogeneidad de varianzas, con α grupos y $n-1$ grados de libertad. Esta prueba exige que el número de repeticiones sea idéntico en todas las condiciones (en este caso el número de repeticiones fue 5). Se consideró un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$ y 4 grados de libertad y se obtuvo un valor C crítico de 0,74. Todos los valores C observados fueron menores que el valor teórico, por lo tanto, se consideró que había una varianza homogénea (se cumplió la hipótesis nula). Posteriormente, se demostró la diferencia estadística entre las medias de las diferentes fracciones lipídicas de las condiciones de ojos silvestres adaptados a la oscuridad, a la luz y la mutante *Gaq¹;G β e¹*, mediante un análisis de las varianzas utilizando la prueba ANOVA paramétrica dos vías y el post test llamado Bonferroni, el cual identificó a los grupos que diferían estadísticamente. Estas dos últimas pruebas estadísticas se realizaron con el programa Graph Pad Sigma 5. Valores p: $p > 0,05$ no significativo (ns), $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

3.58 Preparación del Reactivo de Derivatización

La derivatización catalizada por ácido se lleva a cabo utilizando un reactivo que no está disponible de forma comercial, por lo que debe ser fabricado en el laboratorio. El metanol es el reactivo que esterifica los lípidos, el ácido del medio es el catalizador y el agua es un fuerte interferente de la reacción. Para preparar el reactivo de derivatización se requirió un sistema de destilación donde el metanol anhidro fue acidificado lentamente. La preparación del reactivo requirió metanol anhidro de alta pureza, ácido sulfúrico y ácido clorhídrico concentrado. En la preparación se utilizaron 2 trampas de ácido sulfúrico, las cuales deshidratan el ácido

clorhídrico, de esta forma el gas HCl acidifica directamente al metanol anhidro. La mezcla de ácido clorhídrico con ácido sulfúrico siempre estuvo en agitación. El proceso de acidificación termina cuando el reactivo alcanza una normalidad de $\geq 1N$. Durante la preparación del reactivo de derivatización es importante verificar la ausencia de agua, ya que ésta afecta la reacción de metilación, sobre todo si la muestra usada está en el orden de los μg . Una forma de evaluar esto es agregar a un tubo limpio 0,5 mL de tolueno y 0,5 mL de reactivo de derivatización. Si hay agua, se formarán 2 fases distinguibles. En ese caso, se debe descartar el reactivo y comenzar la preparación nuevamente.

Determinación de la Normalidad del Reactivo

Para conocer la normalidad del Reactivo de Derivatización se realizaron titulaciones. Para ello, se agregaron 2 gotas de fenolftaleína 1%* a 2 vasos, uno con agua destilada (control) y a otro vaso que tiene reactivo diluido (0,5 mL reactivo + 49,5 mL de agua destilada). La titulación del reactivo ácido se realiza con NaOH 0,1N hasta que se alcanza un color fucsia intenso. El reactivo está listo cuando se alcanza una normalidad $\geq 1N$. El reactivo es útil durante pocos meses, así que se aconseja la preparación de éste cada dos meses.

*La fenolftaleína fue disuelta en Etanol 90% y se almacenó a temperatura ambiente protegida de la luz.

3.6 ANÁLISIS DE DIACILGLICEROL MEDIANTE UPLC-FT-ORBITRAP

Los sistemas de cromatografía líquida de gran eficiencia (UPLC) toman ventajas de los avances en la tecnología de la química de las partículas. UPLC es una nueva categoría de separación analítica que retiene los principios del HPLC, mientras que mejora los atributos generales de resolución, sensibilidad y velocidad.

Por otra parte, el espectrómetro híbrido FT-Orbitrap combina la más avanzada tecnología de los analizadores Transformada de Fourier y Orbitrap (Trampa de Iones optimizada), generando un

instrumento único con un poder analítico sin precedentes y de gran versatilidad. El rápido escaneo (sobre los 10 Hz), la alta resolución ($R > 100.000$ o 5 decimales de masa atómica) y alta sensibilidad, acopladas con una precisión de masa menor a 2 parte por millón (ppm), hacen de este espectrómetro de masas una herramienta robusta para aplicaciones que requieren de rigurosa caracterización estructural. Estos tres atributos permitieron no sólo distinguir compuestos con masas muy similares, sino también dilucidó las composiciones elementales sin necesidad de un compuesto de referencia, basado en la medición de masas exactas (Xu y cols, 2010). El método de ionización de este equipo fue ESI (ElectroSpray Ionization), es decir, una ionización suave de la muestra que permite la obtención del ión molecular intacto y la identificación de la masa molecular.

3.61 Separación de las clases de lípidos mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (UPLC)

El protocolo de separación de las especies lipídicas se basó en la publicación de Hummel y cols, (2011). Los extractos de lípidos secos fueron resuspendidos en un volumen de 200 μL de solución B y posteriormente fue transferido a un vial de vidrio. Dos microlitros de esta muestra fueron inyectados en una columna de fase reversa C8 (100 mm x 2,1 mm x 1,7 μm de tamaño de partículas), usando un sistema Waters Acquity UPLC System. Las dos fases móviles usadas fueron agua (grado UPLC MS, Biosolve) con 1% de acetato de amonio 1M con 0,1% de ácido acético (solución A) y acetonitrilo:isopropanol (7:3 v/v, grado UPLC, Biosolve) conteniendo 1% de acetato de amonio 1M con 0,1% de ácido acético (solución B). El gradiente de separación, el cual fue realizado a un flujo de 400 $\mu\text{L}/\text{min}$, fue: 1 minuto 45% A, 3 minutos de gradiente lineal de 45% de A a 35%A, 8 minutos gradiente lineal de 25 a 11% A, 3 minutos de gradiente lineal de 11%A a 1% de A. Después de lavar la columna durante 3 minutos con 1% A, se utilizó nuevamente una solución con 45% A y la columna fue re-equilibrada por 4 minutos.

El tiempo total de corrida fue 22 minutos.

3.62 Aspectos técnicos de la detección de analitos mediante FT-MS.

Los espectros de masa fueron adquiridos usando un espectrómetro de masas Exactive (Thermo-Fisher, Bremen, Alemania). Los espectros fueron registrados usando un escaneo total alternado y un modo de escaneo de todos los iones producto de la fragmentación, cubriendo un rango de masas de 100-1500 m/z . la resolución fue programada en 1000 con 10 escaneos por segundo, restringiendo el tiempo de carga del Orbitrap a un tiempo máximo de 100 ms con un valor blanco de $1E6$ iones. El voltaje del capilar fue 3kV con un flujo de gas neblina de 60 y un flujo de gas auxiliar de 35. La temperatura del capilar fue programada a 150°C, mientras que el gas de secado en la fuente de electrospray caliente fue programada a 350°C. El voltaje colador (skimmer) fue 25 V mientras que las lentes tubulares fueron programadas a un valor de 130 V. Los espectros fueron registrados desde 1 a 22 minutos de los gradientes de UPLC.

3.63 Análisis de Cromatogramas y Espectros de Masas

Los cromatogramas de las corridas en el UPLC-FT-MS fueron analizadas y procesadas usando el programa Xcalibur (Versión 2.10, Thermo-Fisher, Bremen, Germany). En la aproximación automatizada la masa molecular, el tiempo de retención y las intensidades de picos asociados para los 3 replicados de cada muestra fueron extraídos desde los archivos crudos, los cuales contenían los escaneos totales de los espectros y todos los espectros de fragmentación de iones. El ruido químico fue removido automáticamente de los espectros antes que los cromatogramas fueran alineados, usando un algoritmo de alineamiento pareado basado en aciertos. En la aproximación manual, los espectros fueron extraídos utilizando un filtro de picos de los programas Excel o Acces (Microsoft, Seattle, USA).

3.7 ANÁLISIS DE DIACILGLICEROL MEDIANTE HPLC y TLC

La cromatografía en capa fina (TLC) ha sido ampliamente utilizada por los analistas ya que el procedimiento es barato, simple, flexible y puede ser utilizado analíticamente y preparativamente con diferentes tipos de capas. Con los años, la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) ha reemplazado al TLC, debido que con este método se pueden separar una amplia gama de compuestos en un sólo paso en comparación a la TLC, que requiere al menos de dos, uno para separar lípidos apolares y otro para separar lípidos polares. El HPLC incluso ha reemplazado a la cromatografía gaseosa, debido a que el espectro de compuestos que pueden ser analizados es mucho mayor, no hay restricciones de temperatura y existen diversos detectores que permiten detectar prácticamente todo tipo de moléculas, incluso se puede acoplar al espectrómetro de masas, haciendo de ésta una herramienta sumamente versátil. De las dos clases de cromatografía líquida existentes (HPLC-fase normal o HPLC-fase reversa), el HPLC-fase normal fue utilizado en esta tesis.

3.7.1 Preparación de estándares para HPLC y TLC

Los estándares de lípidos (Nu-Check-Prep Inc, Elysian, USA) fueron descongelados a temperatura ambiente y centrifugados a 2.500 rpm por 3 minutos a 4°C para recuperar todo el contenido, el cual se trasladó a un tubo nuevo. Se le hicieron varios lavados del vial, que contenía los estándares, con una mezcla de Hexano:Cloroformo (1:1 v/v) para recuperar los lípidos remanentes y se colectaron en el tubo. Los lípidos fueron secados bajo leve corriente de nitrógeno y fueron resuspendidos en el volumen deseado. Todos los estándares fueron almacenados a -20°C, en tubos con tapa rosca y bajo nitrógeno.

-Mezcla de estándares de referencia para TLC (glicerolípidos, #18-6 C, Nu-ChekPrep):

La mezcla contiene ácido oleico (C18:1), monooleína (MAG-18:1), dioleína (DAG-36:2) y trioleína (TAG-54:3) en las siguientes proporciones: 40, 25, 20 y 15%. Todos los lípidos tienen

una pureza >99%. Los 50 mg totales de la mezcla contenían 20 mg de C18:1, 12,5 mg de MAG-18:1, 10 mg de DAG-36:2 y 7,5 mg TAG-54:3. Debido a las distintas proporciones de los estándares de la mezcla, ésta se debe resuspender en un volumen tal que el estándar limitante quede a la concentración deseada. Por esta razón, la mezcla fue resuspendida en 1,5 mL de Hexano:Clorofomo (1:1 v/v), quedando el estándar limitante (trioleína) a una concentración final de 0,01 µg/µL. Por lo tanto, en 200 µL de la mezcla había 20 µg de TAG-54:3, 27 µg de DAG-36:2, 33 µg de MAG-18:1 y 54 µg de C18:1. Esta mezcla fue utilizada para estandarizar experimentos de TLC y el HPLC con detectores UV e IR.

-1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfolina (DOPC, #850375P, Avanti Polar Lipids): Los 100 mg fueron resuspendidos en cloroformo quedando a una concentración final de 10 µg/µL. Pureza >99%.

-Preparación de la mezcla glicerolipidos + DOPC (Stock 18-6 C + DOPC):

Se traspasaron 200 µL del stock TLC a un eppendorf de 1,5 mL. Los lípidos se secaron bajo una suave corriente de nitrógeno. Se agregaron 100 µg de DOPC (10 µg/µL) y se secó bajo corriente de nitrógeno. Los lípidos fueron resuspendidos en 200 µL de Hexano:Clorofomo (1:1 v/v).

-Stock Colesterol (CH-S, Sigma): 100 mg de Colesterol fueron resuspendidos en cloroformo quedando a una concentración final de 10 µg/µL. La solución se solubiliza rápidamente luciendo ligeramente amarilla.

-Estándares glicerolipidos (Nu-ChekPrep): MAG-18:1 (M-239), TAG-54:3(T-235), Colesterol oleato (colesterol-18:1, CH-828), DAG-36:2(D-236) y C18:1(AGL, U-46A).

Todos estos estándares fueron resuspendidos en Hexano:Clorofomo (1:1 v/v) y mediante diluciones seriadas se generaron estándares de trabajo a concentraciones de 50, 25 y 12,5 mg/mL. Estos estándares fueron usados en las corridas de TLC con el objetivo de identificar las clases de lípidos de las muestras de rabdomeros. Todos los estándares tienen pureza >99%.

3.72 HPLC-fase normal con detector de luz Ultravioleta (HPLC-UV)

La cromatografía líquida fue desarrollada usando un HPLC modelo SCL-10A (Shimadzu, Japón) con dos bombas, cuyos modelos eran LC-10AS y LC-10AT (Shimadzu, Japón). El sistema HPLC consistió de un inyector modelo Rheadyne 7125 (Cotati, California USA) con un loop de 200 μ L. Se usó un convertidor análogo-digital Radiomatic Flo-One beta 500TR, (Series Flow Scintillation Analyzer, Packard Instrument Company, USA) y un detector de luz ultravioleta variable, modelo SPD-10AV (detector UV-VIS, Shimadzu, Japón) operado a 205 nm. Se utilizó una columna analítica de sílica Inertsil SIL-100A de 100 Å, 4,6 mm de diámetro interno y 250 mm de largo, empaquetada con partículas esféricas de 5 μ m (no se utilizó pre-columna ni filtro entre el inyector y la columna). Todas las muestras fueron disueltas en el solvente que fue usado como fase móvil. El sistema HPLC se mantuvo a 20°C controlado por aire acondicionado.

El sistema de elución estuvo basado en Christie W., (1986) y consistió en el sistema terciario A, Hexano; B, Isopropanol; C, Isopropanol-Agua (1:1 v/v). Para optimizar la elución de componentes polares, el agua en el solvente C contenía 0,5 mM de serina ajustada a pH 7.5 con etilamina. Todos los solventes utilizados eran de grado HPLC y fueron desgasificados en un sonicador durante 10 minutos.

El solvente B fue introducido en el solvente A en un periodo de 5 minutos con el objetivo de separar los lípidos simples, entonces se retiraba B y se agregaba C, lo que permitía la separación de los fosfolípidos. Del protocolo original se realizaron dos modificaciones, que consistían en el cambio del volumen de inyección de la muestra y la forma de hacer el gradiente. Se agregó un volumen de inyección de 200 μ L, de la mezcla de estándares de TLC y DOPC en el solvente de carga Hexano:Cloroformo (1:1 v/v), en vez de 5 μ L como estaba descrito en Christie W., (1986). Sobre el gradiente, se alternó el solvente B y C ya que se disponía de sólo de 2 bombas. Mayor detalle se puede obtener en el anexo, donde se caracteriza este método para un detector UV en

vez de un detector de masas o "evaporative light scattering detector (ELSD)".

3.73 HPLC-fase normal con detector de Índice de Refracción (HPLC-IR)

La cromatografía líquida fue desarrollada en el mismo sistema de HPLC, bajo las condiciones mencionadas anteriormente salvo el detector, el cual es un detector de índice de refracción, modelo ERC-7510 (Instrumentation for R & D, inc). El detector de índice de refracción se mantuvo a una temperatura constante de 40°C mediante un termostato interno.

El sistema de elución empleado se basó en el protocolo descrito por Greenspan and Schroeder, (1982) y consistió en el siguiente sistema de elución isocrático: 2,2,4-trimetilpentano(isooctano):Tetrahidrofurano(THF):ácido fórmico (90:10:0,5 v/v). Todos los solventes fueron desgasificados en un sonicador durante 10 minutos. El tetrahidrofurano fue almacenado bajo nitrógeno para evitar la formación de peróxidos y el solvente de elución fue mantenido por sólo 3 días, para prevenir la aparición de picos negativos (Greenspan and Schroeder, 1982). El volumen de inyección fue 200 µL (mezcla de estándares de TLC en el solvente de carga), en vez de 20 µL como se describía en Greenspan and Schroeder, 1982.

3.74 Tratamiento de la placa de TLC y corrida cromatográfica

Las placas (20 cm x 20 cm, TLC sílica gel 60 vidrio, #1.11845.0001, Merck) fueron activadas a 100°C durante 1 hora y luego se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Con un lápiz mina se marcaron los puntos de siembra de la muestra. El acondicionamiento de la cámara de vidrio se realizó con el solvente de elución durante 30 minutos. Las muestras resuspendidas en un volumen de 20 µL fueron sonicadas, vortexeadas y aplicadas a la placa de sílica con una pipeta Hamilton de 25 µL. La limpieza de la pipeta consistió en varios lavados con Metanol, Cloroformo y posterior ambientación con Hexano:Cloroformo (1:1 v/v), que fue el solvente de carga y en el cual se resuspendieron todas

las muestras.

Para la separación de los lípidos neutros, la cromatografía fue desarrollada en una cámara saturada en el sistema de elución: Hexano-Dietiléter-ácido fórmico (80:20:2 v/v). El frente del solvente migró hasta llegar a 1 cm del tope de la placa y se marcó con lápiz mina. El tiempo promedio de corrida fue de 1 hora en una cámara de vidrio cerrada, bajo campana de extracción. En el cálculo de los Rf de cada una de las clases de lípidos se consideró la distancia final recorrida y el sitio de siembra de la muestra.

3.75 Detección de los bandas

Las placas fueron secadas bajo campana de extracción durante 30 minutos y las bandas fueron detectadas con vapor de yodo. El revelado se hace bajo campana conectando una pipeta Paster (con yodo) a una fuente de nitrógeno, esparciendo el vapor sobre la placa de sílica gel. Las placas fueron escaneadas rápidamente antes que perdieran su coloración café.

RESULTADOS

4.1 PREPARACIÓN ENRIQUECIDA EN MEMBRANAS FOTOSENSIBLES (RABDÓMEROS)

Para realizar el análisis cromatográfico de la composición de lípidos de los ojos de *Drosophila* fue fundamental contar con una fracción de membranas enriquecida en rabdómeros, de modo que los cambios observados pudieran atribuirse a los lípidos del rabdómero de la célula fotorreceptora y no a otras membranas.

Se ha descrito un método para obtener rabdómeros purificados mediante una extracción en frío y en un gradiente de Percoll en moscardones. Para ello, se colocaban las retinas homogenizadas en un gradiente de Percoll y se centrifugaban y se aislaban en luz roja, para conservar la rodopsina en estado desactivado (y prevenir la pérdida de pigmento visual por el lento decaimiento térmico de la metarrodopsina) y así identificar las fracciones enriquecidas en rabdómeros en esta condición (Bentrop y Paulsen, 1986). No obstante, en esta publicación se estudiaron las proteínas involucradas en ADP-ribosilación inducida por luz, por lo que no se requería mantener en óptimo estado la membrana fotosintética y se agregaban varios reactivos que destruían la membrana nativa. Por esta razón, se optó por generar un protocolo original, que permita mantener la estructura de la membrana de los rabdómeros para los experimentos posteriores. Esto implica que no se pueden utilizar detergentes o sonicación. Estas limitantes obligaron a ensayar múltiples protocolos de fraccionamiento subcelular considerando que los rabdómeros poseen un alto grado de empaquetamiento de las microvellosidades, lo que genera una estructura compacta y pesada. Se intentaron diversos protocolos de homogenización, ultracentrifugación, centrifugación en gradiente de sacarosa (continuo y discontinuo) y

finalmente centrifugación diferencial, a fin de lograr un enriquecimiento satisfactorio. Las condiciones óptimas logradas están descritas en la sección de Materiales y Métodos y las pruebas de ensayo y error en el Anexo. El grado de enriquecimiento de la fracción de membranas de rabdómeros se analizó por el método de inmunodetección conocido como Inmunoblot (ver Materiales y Métodos).

Para determinar el grado de enriquecimiento de las fracciones obtenidas se evaluó la presencia del canal TRP, proteína de transmembrana específica de membranas rabdómeras (ver introducción). Así, se realizó un análisis por electrotransferencia e inmunoblot utilizando el anticuerpo monoclonal Mab83F6 que reconoce a TRP. Luego de probar múltiples condiciones de fraccionamiento se determinó que una centrifugación lenta de 10xg por 10 minutos, acoplada a una centrifugación media de 2.370xg por 5 minutos y una última centrifugación rápida de 18.620xg (14.000 rpm) por 15 minutos (todas en frío), permite eliminar la mayoría de los núcleos y mitocondrias en P2 y concentrar rabdómeros en esa fracción. La última centrifugación permitiría precipitar aquellas membranas que podían quedar en suspensión después de la centrifugación media.

Como se observa en la Figura 5 la primera centrifugación da origen a S1 y P1, la centrifugación de S1 a S2 y P2 y la centrifugación de S2 a S3 y P3 (Figura 5A). Se observó que apareció una banda de TRP en todos los pellets y en S1, sin embargo, la banda más intensa fue en P2. Es difícil que las todas las membranas rabdómeras floten en la centrifugación lenta debido a que el peso de la estructura siempre hacía que precipitaran al fondo del tubo, no completamente separadas de otros tejidos

Para corroborar que la fracción estaba enriquecida en rabdómeros, se determinó la presencia de otra proteína de las microvellosidades de los rabdómeros: actina (Hardie y Postma, 2008). Cada microvellosidad contiene una estructura de microfilamentos de actina en el centro; considerando que cada rabdómero contiene ~30.000-50.000 microvellosidades, es de esperar que

la fracción enriquecida en rabdómeros contenga actina concentrada. Se utilizó el anticuerpo monoclonal A3853 (Sigma, Asher *y cols*, 2002) que identifica un epítoto conservado localizado en el N-terminal de la actina de varias especies. En la Figura 5C se muestra la detección de actina en el fraccionamiento. Se aprecia una banda intensa, con un tamaño estimado de 43 kDa en S1 y P2 y, tal como se esperaba, en concordancia con lo observado anteriormente para el marcador TRP (Fig. 5B). Esta banda también se observa en el homogenizado de ojos (control positivo) y en el pellet del extracto (PE) que se obtiene tras la precipitación de las bolas de vidrio utilizadas en la homogenización. La marca de actina observada en PE, señala que algunas membranas de rabdómeros precipitan junto con las bolas de vidrio. No obstante no se observó marca en P1, como se esperaba. Se apreció una segunda banda con un peso aproximado de 34 kDa en las fracciones anteriormente mencionadas, salvo en PE, lo que sugiere que posiblemente ocurrió degradación de la muestra mientras ésta era centrifugada.

Por lo tanto, la inmunodetección de TRP y actina mostró un enriquecimiento de membranas de rabdómeros en las fracciones P2 y S1, obtenidas mediante centrifugación diferencial, siendo más satisfactorias las inmunotransferencias contra el canal TRP que la detección de actina.

A fin de verificar el grado de pureza de las membranas rabdoméricas obtenidas por centrifugación diferencial, se utilizó un anticuerpo que reconoce un epítoto corto de la proteína de membrana nuclear lamina Dmo. En la Fig. 5D se muestra la detección de esta proteína en la preparación de rabdómeros mediante análisis por inmunotransferencia. Se apreciaron bandas en el control positivo homogenizado de ojos y en las fracciones de membrana rabdomérica P2 y S1. Este resultado sugiere que esta proteína se encontró levemente enriquecida en la fracción de rabdómeros, sin embargo, estas fracciones están más enriquecidas en TRP como se observa en la figura 5B.

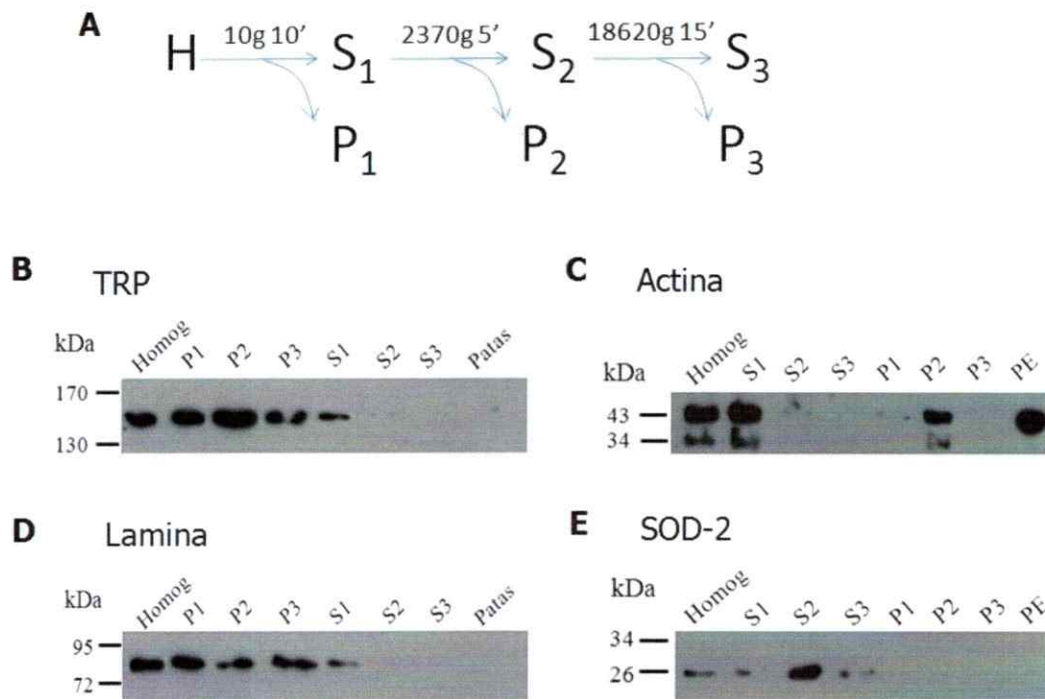


Figura 5. Obtención de membranas enriquecidas en rabdómeros y verificación de contaminación por componentes celulares. **A**, Protocolo de centrifugación diferencial que permite obtener una fracción enriquecida en membranas de rabdómeros. **B**, Análisis mediante inmunodetección usando un anticuerpo monoclonal anti-TRP (1:200) como marcador de rabdómeros. La marca observada corresponde a un valor estimado de 143 kDa. S1 y P1 (10xg por 10 min), S2 y P2 (10xg por 10 min + 2.370xg por 5 min), S3 y P3 (10xg por 10 min + 2.370xg por 5 min + 18620xg por 15 min), homogenizado de ojos (control positivo), patas (control negativo). **C**, Análisis mediante inmunodetección usando un anticuerpo monoclonal anti-actina (1:1000), para corroborar fracción enriquecida en rabdómeros. La marca observada corresponde a un valor estimado de 43 kDa. Las fracciones desde S1-P3 son idénticas a las descritas en D, homogenizado (control positivo), PE (pellet del extracto). **D**, Análisis mediante inmunodetección utilizando un anticuerpo anti-lamina Dmo (1:2000), como marcador de núcleos. Las fracciones desde S1-P3 son idénticas a las descritas en A, homogenizado (control positivo), patas (control negativo). La marca observada corresponde a un valor estimado de 76 kDa. **E**, Análisis mediante inmunodetección utilizando un anticuerpo anti-SOD-2 (1:2000), como marcador de mitocondrias. Las fracciones desde S1-P3 son idénticas a las descritas en A, homogenizado (control positivo), PE (pellet del extracto). La marca observada corresponde a un

valor estimado de 26 kDa. Se cargaron 20 μ g en cada carril.

Debido a la contaminación observada, se buscó determinar si había algún otro componente celular que pudiera estar precipitando junto con los rabdomeros. Para ello se probó un anticuerpo policlonal que reconoce a la proteína Superóxido Dismutasa 2 (SOD-2), un marcador de mitocondrias. Se realizó una estandarización del anticuerpo y se determinó que la dilución 1:2000 genera una marca suficientemente intensa como para seguir usándola en los siguientes experimentos. En la Fig. 5E, se observa que la marca de SOD-2 aparece sólo en los sobrenadantes (S1, S2 y S3), siendo más intensa en S2 y no hubo marca en los pellets, sugiriendo que las mitocondrias no precipitan con los rabdomeros. Que este marcador se mantenga en suspensión indica que se debe centrifugar a una velocidad mayor para que esta proteína y el organelo al cual se asocia, precipite. Como se esperaba, esta banda también se observa en el homogenizado de ojos (control positivo), ya que está presente desde el principio de la muestra. Estos resultados indican que la fracción de membrana rabdomérica, obtenida por este método, se encuentra libre de contaminación por mitocondrias pero no así de núcleos.

Estos cuatro ensayos de inmunotransferencia (detección TRP, actina, lamina y SOD-2) permitieron comprobar que la fracción de membrana rabdomérica de *Drosophila* (P2) obtenida por centrifugación diferencial está enriquecida en al menos un componente molecular del sistema de fototransducción (TRP) y un componente estructural del rabdomero (actina). Las fracciones P2 y S1 presentan enriquecimiento pero también un cierto grado de contaminación con membranas nucleares (presencia de la proteína lamina Dmo). Si bien no se logró una fracción con alto grado de pureza, se obtuvo una fracción enriquecida donde se identificó la presencia de membranas rabdoméricas y, lo más importante, estas membranas están concentradas. Independiente que estén presentes las membranas nucleares, es esperable que sólo las membranas rabdoméricas cambien su composición lipídica en respuesta a la luz. No existe

ningún estudio hasta la fecha en donde se haya estudiado los lípidos pertenecientes a los ojos de mosca. Lo más cercano, ha sido el estudio de cabezas de *Drosophila* (Yoshioka y cols, 1985; Stark y cols, 1993).

En conclusión se generó un método para el enriquecimiento de las membranas rabdoméricas a partir de los ojos de *Drosophila*. Esto valida el uso de dichas membranas en los experimentos de composición de lípidos de las membranas rabdoméricas.

4.2 IDENTIFICACIÓN DE LOS PUFAs EN LAS MUESTRAS DE RABDÓMEROS MEDIANTE LOS PERFILES DE ÁCIDOS GRASOS

Los ácidos grasos son componentes básicos de varias moléculas biológicas y sus papeles en el almacenamiento de la energía metabólica, estructura celular, de membrana y fisiología celular parecen ser comunes entre los diferentes organismos. Los ácidos grasos se pueden encontrar asociados a una estructura compleja (como el glicerol) o se pueden encontrar libres en el citoplasma, asociados a proteínas. Para dilucidar si los PUFAs involucrados en la fototransducción, cambian su contenido con la luz, se decidió analizar el perfil de los ácidos grasos libres de la fracción P2 y de otros lípidos presentes en la muestra. Los ácidos grasos libres son compuestos de baja abundancia comparado con los fosfolípidos o los triacilgliceroles (Fig. 6). Por esa razón se utilizó cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas para cuantificarlos. La combinación de ambas técnicas asegura una identificación y cuantificación más precisa.

Hasta la fecha nadie ha determinado el perfil de ácidos grasos de los "ojos" de *Drosophila*. Esta tesis corresponde a la primera caracterización detallada del perfil de ácidos grasos de los lípidos presentes en el ojo de *D. melanogaster* y los cambios generados en respuesta a la luz.

Se determinó el contenido de ácidos grasos de los lípidos de las membranas

fotosensibles de ojos de moscas silvestres adaptadas a la oscuridad, a la luz y en las moscas mutantes *Gaq¹;Gβe¹*. En un principio se utilizaron las moscas mutantes, como una aproximación a la condición oscuridad, ya que la cascada de transducción no funciona debido a la expresión hipomorfa de las subunidades α y β de la Proteína G (sólo posee ~1% de la proteína normal; Hardie y cols, 2002) se razonó que el uso de estas moscas, evitaría la extracción de los 500 ojos en oscuridad, procedimiento extremadamente laborioso y, en la práctica, irrealizable. Sin embargo, en el transcurso de esta tesis se ha evidenciado que los perfiles de ácidos grasos de las moscas mutantes difieren a los de las moscas silvestres adaptadas a oscuridad en algunos lípidos, lo cual invalida el uso de la mutante para el propósito mencionado. En base a estos resultados se decidió cambiar la estrategia de trabajo, buscando adaptar post-extracción los ojos de las moscas a oscuridad o luz y comparar los perfiles de ácidos grasos. Los valores graficados representan la media \pm error estándar de la media para cinco experimentos realizados de forma independiente. Se analizaron los ácidos grasos de cinco distintas fracciones lipídicas: ácidos grasos libres, mono y diacilgliceroles, fosfolípidos, triacilgliceroles y esteres de esteroles.

Las fracciones que poseen mayor cantidad de ácidos grasos corresponden a los fosfolípidos y los triacilgliceroles, los cuales en conjunto representan el 82,0% de los ácidos grasos totales en las moscas silvestres y el 55,0% en las moscas mutantes. La diferencia en la proporción de los ácidos grasos de estos lípidos en conjunto, entre las moscas silvestres y la mutante es significativa ($p < 0,001$, Fig.6). Cabe destacar que los fosfolípidos poseen en su estructura dos cadenas de ácidos grasos y los triacilgliceroles, tres cadenas. Si se realiza la razón de los ácidos grasos de los fosfolípidos/triacilgliceroles se observa que este valor se encuentra en un rango entre 1,1 y 1,4 para las tres condiciones experimentales utilizadas en esta tesis, lo cual ratifica que los fosfolípidos son los lípidos más abundantes de los rabadómeros.

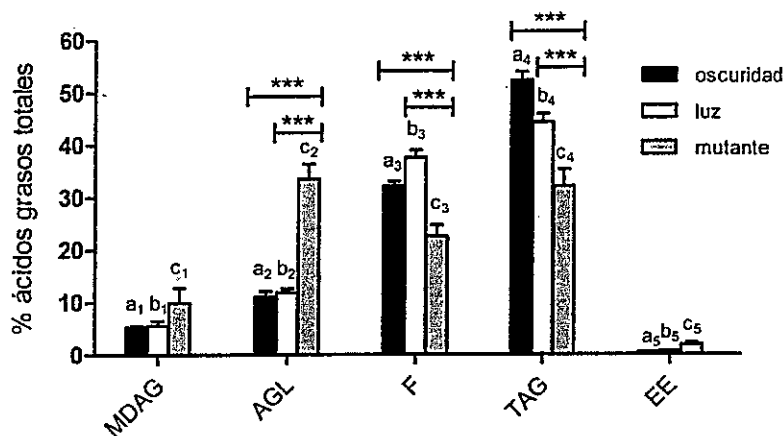


Figura 6. Abundancia de los ácidos grasos provenientes de los diferentes lípidos presentes en los rabdómeros. Los triacilgliceroles (TAG) presentan la mayor abundancia de “ácidos grasos”, seguido por los fosfolípidos (F), los ácidos grasos libres (AGL), los mono-diacilgliceroles (MDAGs) y finalmente los esteres de esterol (EE). La relación entre fosfolípidos y triacilgliceroles varía en un rango entre 1,1 y 1,4, siendo los fosfolípidos los “lípidos” más abundantes de la muestra P2. a₂ vs. c₂ (p<0,001), b₂ vs. c₂ (p<0,001), a₂ vs. b₂ (ns); a₃ vs. c₃ (p<0,001), b₃ vs. c₃ (p<0,001), a₃ vs. b₃ (ns); a₄ vs. c₄ (p<0,001), b₄ vs. c₄ (p<0,001), a₄ vs. b₄ (ns). n= 5.

Los ácidos grasos libres son la siguiente fracción lipídica más abundante representando el 11,5% en moscas silvestres y el 33,5% en las moscas mutantes. La diferencia entre las moscas silvestres y las mutantes es significativa (p<0,001). Los mono y diacilgliceroles son lípidos poco abundantes en las muestras P2 ya que representan el 5,5% de los ácidos grasos totales. Sin embargo, hay que considerar que los diacilgliceroles (DAG) contienen 2 cadenas de ácidos grasos y los monoacilgliceroles (MAG) sólo una cadena acil. Lamentablemente, con esta metodología no se pudo separar estos glicerolípidos, por lo que no se puede determinar claramente cuál es la contribución de cada glicerolípidos a esta mezcla que representa el 5,5%. No obstante, es claro que los DAGs tengan una abundancia menor que este porcentaje. El detalle de los perfiles de ácidos grasos de fosfolípidos, triacilgliceroles y esteres de esterol se

encuentra más adelante (Sección 5.4).

4.21 LOS PUFAs TOTALES NO CAMBIAN SU CONTENIDO EN RESPUESTA A LA LUZ EN EL RABDÓMERO

Los PUFAs que posiblemente están involucrados en la fototransducción de *Drosophila*, se pueden determinar por el análisis de ácidos grasos de la fracción de ácidos grasos libres. El perfil de los ácidos grasos libres de las muestras de rabdómeros (muestra P2) reveló la presencia de siete ácidos grasos, tres de ellos saturados (ácido mirfístico (C14:0), palmítico (C16:0) y esteárico (C18:0)), dos monoinsaturados (MUFAs: palmitoleico (C16:1) y oleico (C18:1)) y sólo dos correspondieron a ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs: linoleico (C18:2) y α -linolénico (C18:3)). Como estándar interno se utilizó el ácido nonadecanoico (C19:0), cuya cadena con un número impar de carbonos no se encuentra en la naturaleza, y que permite la cuantificación de la muestra. La identificación de cada uno de los ácidos grasos se realizó en base a la comparación del espectro de masas experimental contrastado con el espectro de masa de una biblioteca específica de metil-ácidos grasos (NBS75K.L). Los espectros de masa de los ácidos grasos identificados en esta fracción lipídica y en los otros lípidos de las muestras de rabdómeros, se muestran en el Anexo (Sección 8.2).

En la Figura 7 se muestra un cromatograma TIC (Cromatograma de iones totales) representativo de los metil-ácidos grasos detectados en esta fracción lipídica de la muestra P2 de ojos de moscas silvestres adaptados a la oscuridad (Fig. 7A), a la luz (Fig. 7B) y ojos de la mutante (Fig. 7C). La mayoría de los ácidos grasos se identificó correctamente debido a que su abundancia es lo suficientemente alta para lograr un buen apareamiento entre los espectros de masa (sobre el 80% de similitud entre los espectros teórico y experimental). Los únicos ácidos grasos que presentaron una abundancia cercana al límite de resolución del equipo fueron C14:0 y C18:3. Todos los picos cromatográficos fueron, al menos, tres veces más abundantes que la línea base. La observación de contaminantes como plásticos, cuyos picos cromatográficos tienen

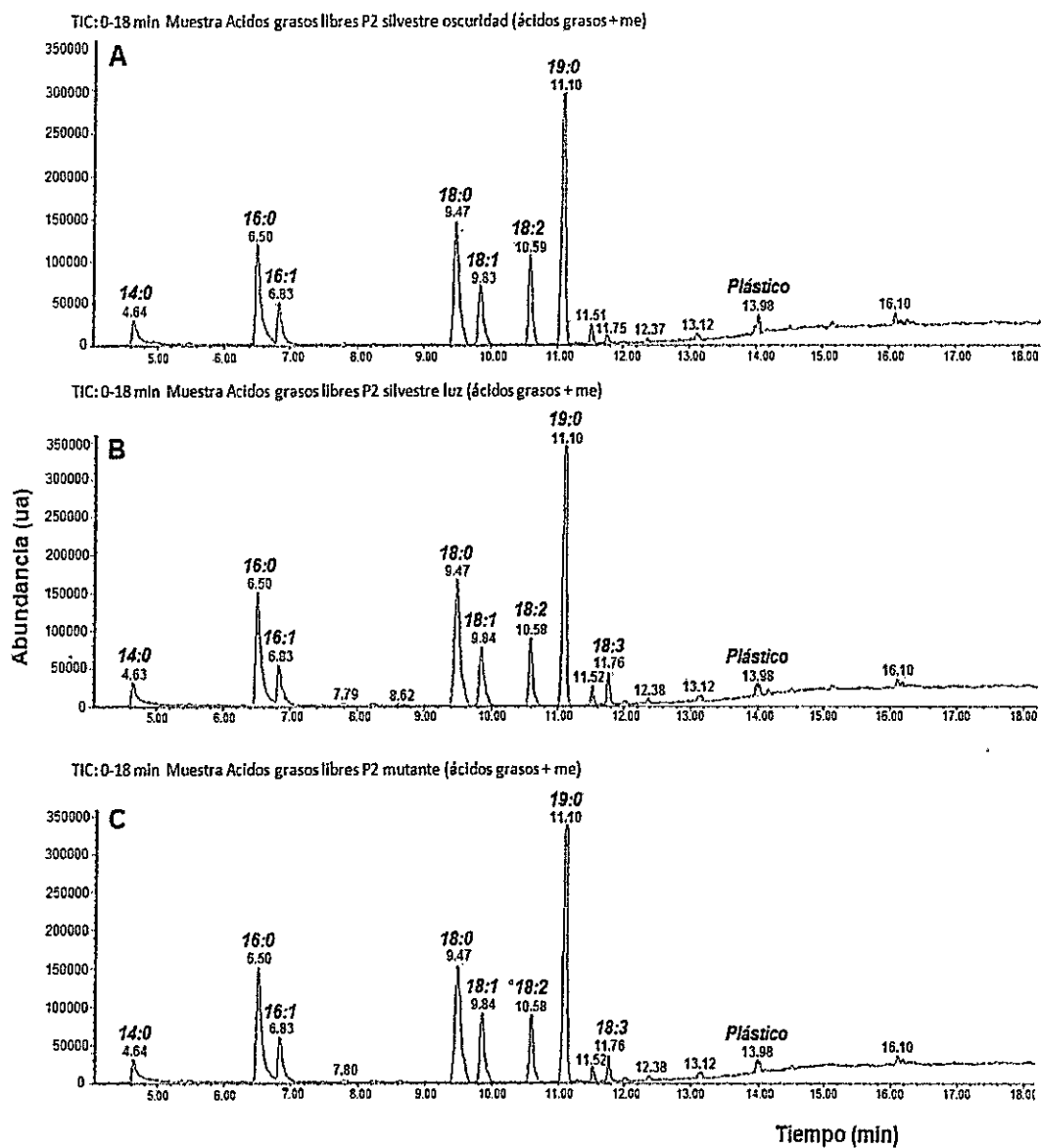


Figura 7. Identificación de siete ácidos grasos “libres” en las muestras de rabdomeros. Se muestra un cromatograma TIC representativo de la separación de los distintos ácidos grasos encontrados cuyo estándar interno es 19:0. **A**, Fracción P2 de ojos silvestres adaptados a oscuridad. **B**, Fracción P2 de ojos silvestres adaptados a luz. **C**, Fracción P2 de ojos mutante. Ácido mirístico (14:0), palmítico (16:0), palmitoleico (16:1), estearico (18:0), oleico (18:1), linoleico (18:2) y α -linolénico (18:3). $n= 5$.

tiempos de retención (T_R) de 11,52 y 13,98 minutos, son característicos en experimentos donde se utilizan columnas de separación de lípidos cuyo envase es plástico, como se observa en la fig. 7. El espectro de masas del plástico posee un fragmento característico y de gran abundancia con una relación $m/z = 190$ unidades de masa atómica (uma).

La cuantificación de los PUFAs de la fracción de los ácidos grasos libres totales reveló que no hubo cambios en C18:2 o C18:3 por efecto de la luz (Fig. 8A) en las moscas silvestres; tampoco hubo cambios significativos en el C18:1. Sólo se observó una diferencia significativa en el contenido de C16:0, cuya abundancia es mayor que en las moscas mutantes (150 nmols/mg) que en las moscas silvestres (~70 nmols/mg, $p < 0,01$).

El análisis porcentual o perfil de ácidos grasos de una fracción representa la abundancia de un determinado ácido graso en la fracción analizada, siendo un dato útil en la caracterización de tejidos. Este análisis cualitativo se muestra en la Fig. 8B y es un análisis independiente de la masa total de muestra inicial. Los ácidos grasos C16:0 y C18:0 fueron los más abundantes de la muestra, representando en conjunto el 61,1, 49,5 y 51,0% en moscas adaptadas a la oscuridad, a la luz y en la mutante, respectivamente. Sólo los ácidos grasos C18:0 presentaron una diferencia significativa entre las moscas adaptadas a oscuridad y las mutantes ($p < 0,001$; Fig. 8B). El ácido graso C14:0 sólo representó el 1% de los ácidos grasos saturados en moscas silvestres y la mutante, observándose como una traza.

Siguiendo con los ácidos grasos libres, los ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs) son más abundantes que los PUFAs. Los MUFAs representaron el 22,1, 30,4 y 28,1% de abundancia en las moscas silvestres adaptadas a la oscuridad, a la luz y la mutante, respectivamente. Dentro de los monoinsaturados, el C18:1 presentó el doble de abundancia que el C16:1.

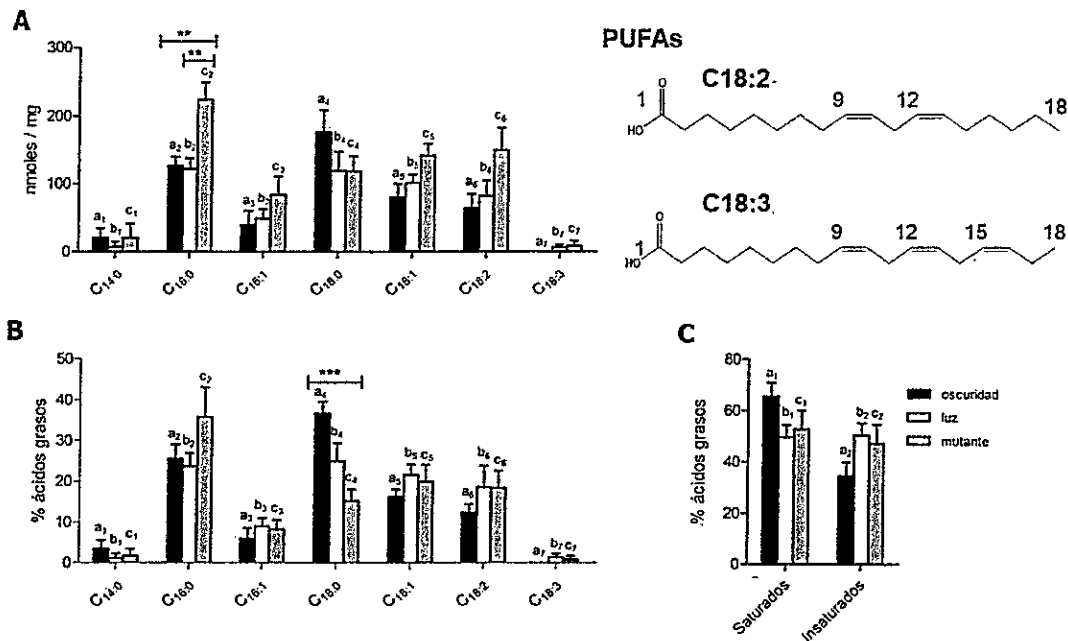


Figura 8. Los PUFAs (C18:2 y C18:3) de los ácidos grasos libres totales en los rabdómeros de mosca no cambian su contenido en respuesta a la exposición a la luz. **A**, (izquierda) Cuantificación de los ácidos grasos libres, (derecha) se muestra la estructura de los PUFAs identificados. Los números indican los carbonos de la molécula y las posiciones de los dobles enlaces. a_2 vs. c_2 ($p < 0,01$), b_2 vs. c_2 ($p < 0,01$), a_2 vs. b_2 (ns). **B**, Perfil de ácidos grasos, a_4 vs. c_4 ($p < 0,01$), b_4 vs. c_4 (ns), a_4 vs. b_4 (ns). **C**, Comparación de ácidos saturados e insaturados totales de los ácidos grasos libres. $n = 5$.

Por otra parte, los PUFAs en conjunto representaron el 12,3, 19,8 y 19,1% de abundancia en moscas silvestres adaptadas a la oscuridad, a la luz y en la mosca mutante, respectivamente. Los ácidos grasos C18:2 son alrededor de quince veces más abundantes que los C18:3, ya que éstos últimos representan el 1% de los ácidos grasos (traza). La carencia de C18:3 en las muestras silvestres adaptadas a oscuridad posiblemente se debe su extremadamente baja abundancia en el cromatograma, lo cual lo descarta del análisis. Esta premisa se apoya en los valores porcentuales obtenidos en las otras condiciones.

Finalmente, los ácidos saturados de los ácidos grasos libres se caracterizaron por tener el

doble de abundancia que los insaturados, aunque esto no generó diferencias significativas entre las tres condiciones experimentales, ni entre los dos tipos de ácidos grasos (Fig. 8C).

4.3. IDENTIFICACIÓN DE DAGs EN LAS MEMBRANAS FOTOSENSIBLES

4.31. *Los ácidos grasos de los M-DAGs no cambiaron en respuesta a la luz*

La separación de los ácidos grasos libres permitió además la obtención de otros lípidos presentes en la fracción P2, como los mono y diacilgliceroles (M-DAGs) entre otros lípidos, lo que permitió caracterizar los ácidos grasos asociados a estos glicerolípidos. Con esta información se puede conocer de forma indirecta la estructura de los diacilgliceroles aunque según el protocolo realizado (Agreen *y cols*, 1992), hay que tener claro que esta es una mezcla ya que es difícil separar los monoacilgliceroles (MAGs) de los diacilgliceroles (DAGs), ya que poseen polaridades y estructuras similares.

La Fig. 9 muestra un cromatograma TIC representativo de los metil-ácidos grasos detectados en la fracción de mono y diacilgliceroles de ojos silvestres adaptados a la oscuridad (Fig. 9A), a la luz (Fig. 9B) y ojos de la mutante (Fig. 9C). Se detectaron sólo tres ácidos grasos, dos de ellos saturados (palmitico (C16:0) y esteárico (C18:0)) y sólo un ácido graso monoinsaturado, el ácido oleico (C18:1). Es importante destacar que esta fracción no presentó PUFAs. Para cuantificar los ácidos grasos se utilizaron los estándares internos C15:0 y C17:0, aunque sólo el C17:0 se usó en la cuantificación (ver materiales y métodos). En dos de cinco experimentos realizados, se observó un pico cromatográfico con un T_R de 6,81 minutos, el cual corresponde a C16:1 (según la identificación en otras fracciones lipídicas), sin embargo, su extremadamente baja abundancia, impidió que identificación definitiva en la biblioteca, debido a que el porcentaje de similitud de los espectros de masas teórico y experimental fue menor al 80%, lo cual descartó su detección en el cromatograma TIC. Lo mismo ocurrió con otro pico cromatográfico con un T_R de 4,41 minutos, el cual fue identificado como C14:0, en otras

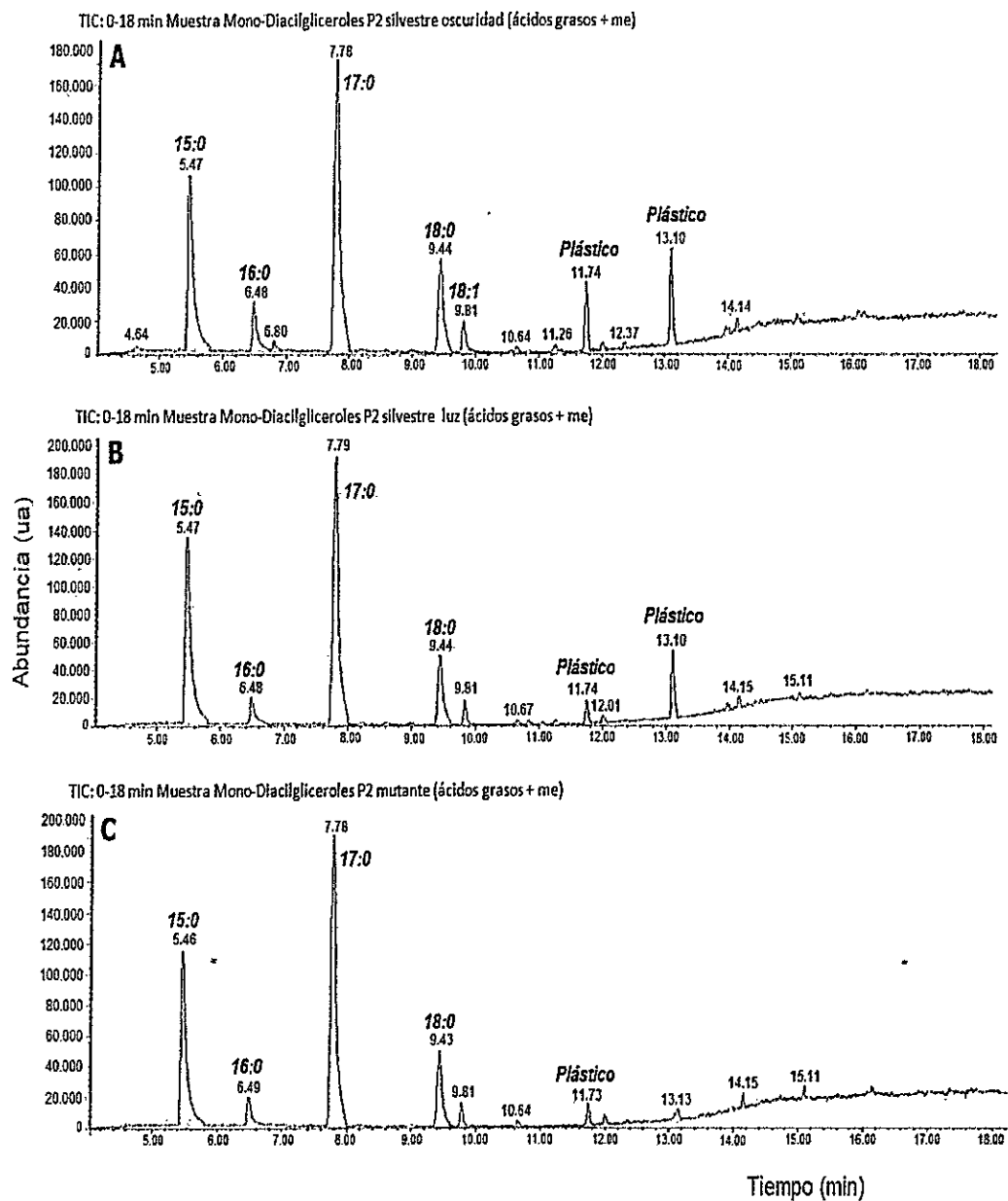


Figura 9. Identificación de tres ácidos grasos de los mono-diacilgliceroles (M-DAGs) de las membranas rdoméricas. Se muestra un cromatograma TIC representativo, 15:0 y 17:0 fueron utilizados como estándares internos. **A**, Fracción P2 de ojos silvestres adaptados a oscuridad. **B**, Fracción P2 de ojos silvestres adaptados a luz. **C**, Fracción P2 de ojos mutante. Ácido palmítico (16:0), esteárico (18:0) y oleico (18:1). n= 5.

fracciones lipídicas. Al igual que en los ácidos grasos libres se identificaron picos cromatográficos de plásticos, los cuales esta vez tuvieron un T_R de 11,74 y 13,10 minutos.

La cuantificación de los ácidos grasos de los mono y diacilgliceroles no reveló cambios en ningún ácido graso por efecto de la luz (Fig. 10A) en las moscas silvestres ni en las moscas mutantes.

En el perfil de ácidos grasos de esta fracción lipídica (mostrado en la Fig. 10B), se observó una alta proporción de ácidos grasos saturados, los cuales promediaron el 80% de los ácidos grasos totales (Fig. 10C). Según el análisis estadístico realizado, no se observaron diferencias significativas entre las tres condiciones experimentales (oscuridad, luz y mutante) o entre los distintos ácidos grasos.

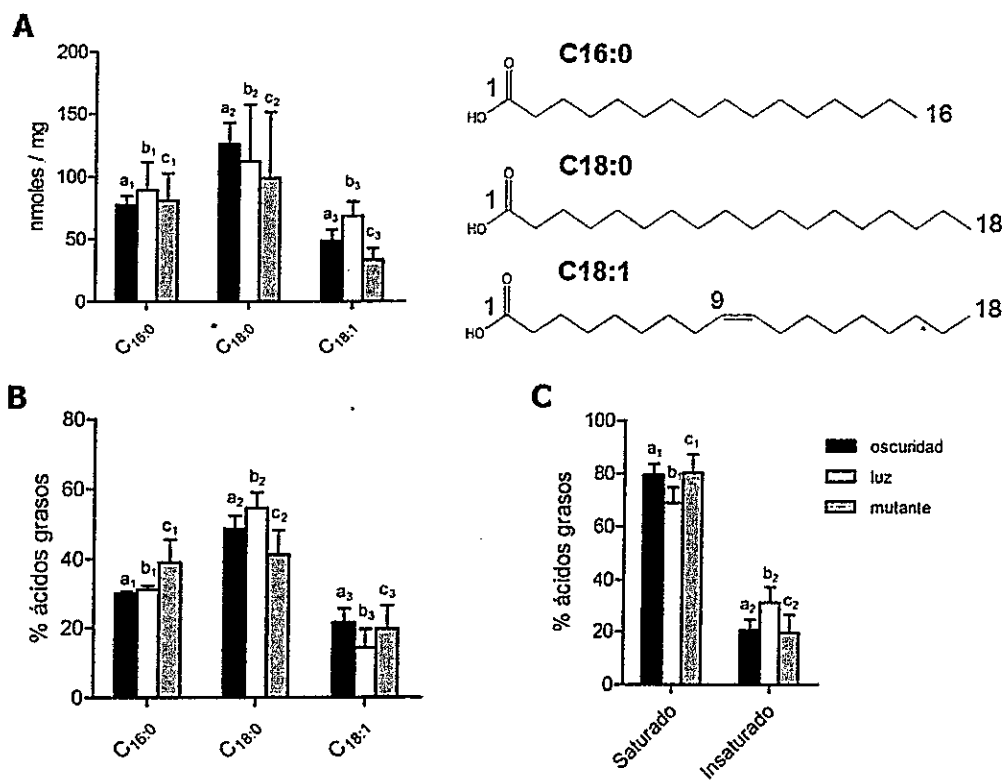


Figura 10. La concentración de los ácidos grasos provenientes de los mono y diacilgliceroles no cambió con la luz. A, (izquierda) Cuantificación de los ácidos grasos de los

MDAGs, (derecha) se muestra la estructura de los ácidos grasos identificados. **B**, Perfil de ácidos grasos de los MDAGs. **C**, Comparación de los ácidos saturados e insaturados. El 80% de los ácidos grasos fue saturado. n= 5.

Si bien los ácidos grasos de los M-DAGs no cambiaron en respuesta a la luz, esto no implica que el contenido de DAGs como una molécula completa, no lo haga ya que existe la posibilidad que el equipo utilizado no sea lo suficientemente sensible para detectar este cambio. Estos resultados sirvieron para conocer de forma indirecta la estructura de los DAGs presentes en la muestra P2, lo que permitió la adquisición de cuatro estándares de diacilgliceroles comerciales, que luego fueron utilizados para la identificación de la estructura intacta de los DAGs.

4.32-La presencia de DAG-34:1 en los rabdómeros de Drosophila es alterada en respuesta a la luz

Las corridas cromatográficas (realizadas en un sistema de cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa, UPLC-RF) de los estándares comerciales de DAGs sirvieron para identificar los tiempos de retención (T_R) de estos analitos y conocer el comportamiento que presentan en el equipo a través de curvas de calibración. Los T_R de los estándares (que son idénticos a las presuntas moléculas identificadas en los perfiles de ácidos grasos), proveen la zona del cromatograma TIC donde eluyen las distintas especies de DAGs de la muestra.

La separación de los cuatro estándares comerciales de diacilglicerol se muestra en la Fig. 11. Se observa el cromatograma TIC correspondiente de cada estándar obtenido mediante la UPLC-RF. Los espectros de masa fueron registrados en modo de ionización positivo, detectándose los iones aductos de sodio $[M + Na]^+$ de los lípidos. El estándar DAG-32:0 (1,2-dihexadecanoil-*sn*-glicerol) presentó un tiempo de retención de 10,71 min y la m/z del $[M + Na]^+$ fue 591,49603 uma; el estándar DAG-34:1 (1-hexadecanoil-2-oleoil-*sn*-glicerol) presentó un tiempo de retención de 10,89 min y la m/z del $[M + Na]^+$ fue 617,51135 uma; el estándar DAG-

34:0 (1-octadecanoil-2-hexadecanoil-*rac*-glicerol) presentó un tiempo de retención de 11,72 min y la m/z del $[M + Na]^+$ fue 619,52710 uma y el estándar DAG-36:0 (1,2-dioctadecanoil-*rac*-glicerol) presentó un tiempo de retención de 12,64 min y la m/z del $[M + Na]^+$ fue 647,55859 uma. Cada pico cromatográfico presentó una distribución Gaussiana.

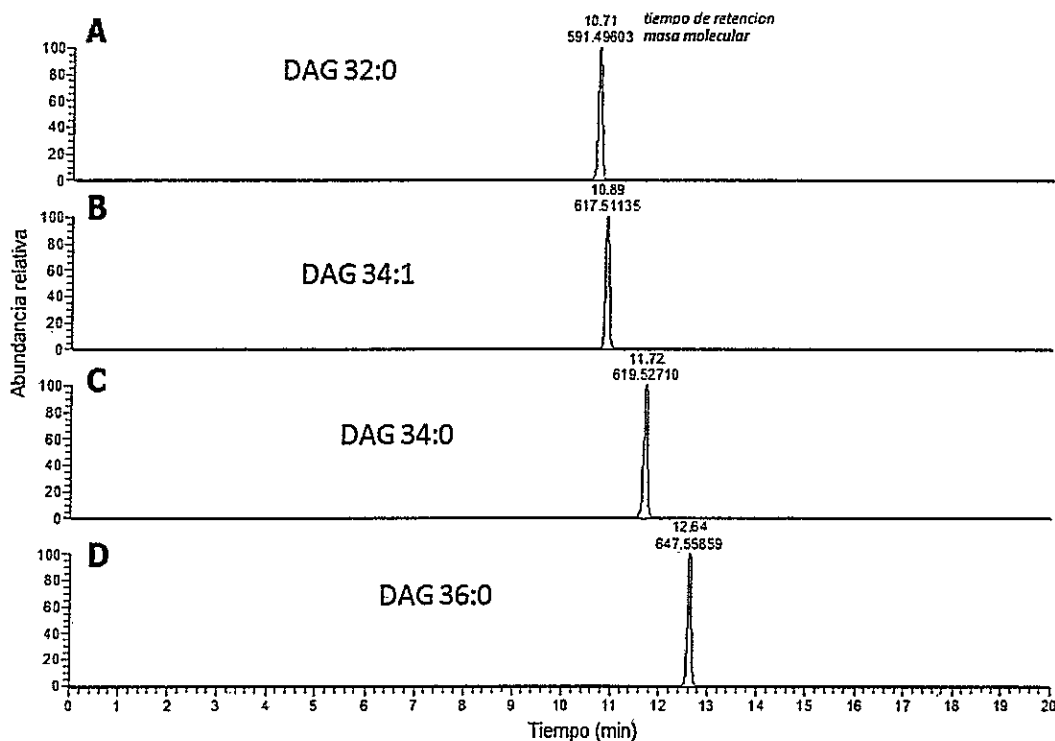


Figura 11. Separación e identificación de los estándares comerciales mediante UPLC-fase reversa y espectrometría de masas. A-D, Cromatogramas TIC de estándares lipídicos DAG-32:0, DAG-34:1, DAG-34:0 y DAG-36:0, respectivamente. La concentración de cada estándar fue 100 ng/mL. A medida que aumenta el número de carbonos de la cadena acil, se observa un mayor T_R , sin embargo, las cadenas insaturadas lo disminuyen. **DAG-32:0, 1,2-di-C16:0-*sn*-glicerol; **DAG-34:1**, 1-C16:0-2-C18:1-*sn*-glicerol; **DAG-34:0**, 1-C18:0-2-C16:0-*rac*-glicerol; **DAG-36:0**, 1,2-C18:0-*rac*-glicerol. T_R , tiempo de retención**

La linealidad del método fue determinada inyectando cantidades mayores de cada uno de los

estándares comerciales: 0,5, 5, 35 y 100 ng/mL. Se construyeron curvas de calibración ajustadas a una función lineal que relacionan la intensidad del pico y la respectiva concentración del estándar donde el valor de la pendiente de la curva permite la posterior cuantificación de los DAG encontrados en las muestras en función de la intensidad observada. En la Fig. 12 se muestra la curva de calibración del estándar DAG-34:1 (1-C16:0-2-C18:1-*sn*-glicerol). Estas curvas se realizaron para los cuatro estándares. Se obtuvieron los valores de las intensidades y áreas a cada concentración de estándar. Se observa la variación de la intensidad y el área en función de la concentración. El mejor ajuste los datos fue logrado con las intensidades; generalmente las áreas introducen ruido en el cálculo porque dependen sustancialmente de la *forma* del pico (si es agudo y bien definido o extendido). Por esta razón, se utilizó los valores de las intensidades (amplitudes del pico). La función lineal para cada estándar fue la siguiente:

$y = 3132x + 35373$ (DAG-32:0), $y = 5709x + 39925$ (DAG-34:1), $y = 2900x + 51085$ (DAG-34:0) $y = 3793x + 34287$ (DAG-36:0). El límite de detección del equipo fue 10-50 pg/mL (0,01-0,05 pg/ μ L) y el límite de cuantificación fue 100-500 pg/mL (0,1-0,5 pg/ μ L).

En la tabla 5 se reportan las intensidades observadas de cada uno de los estándares comerciales.

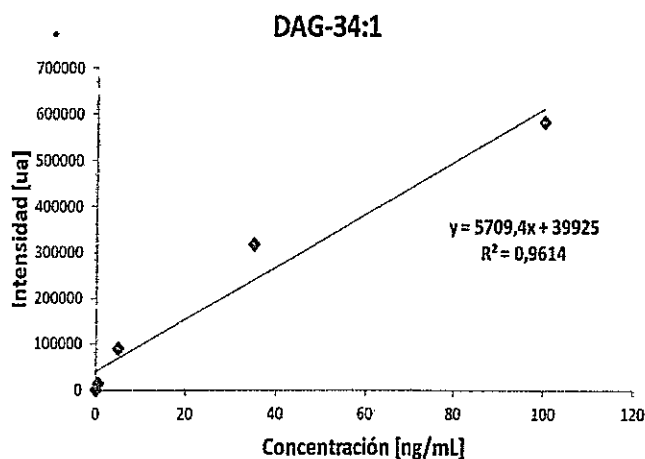


Figura 12. Curva de calibración del estándar DAG-34:1 a distintas concentraciones 0,5, 5, 35 y 100 ng/mL. Se realizó un ajuste lineal de la función.

Luego, se realizó una corrida cromatográfica de las muestras enriquecidas en rbdómeros de moscas silvestres y la mutante (n=3). La figura 13 muestra la separación de los lípidos presentes en las fracciones P2 de moscas silvestres adaptadas a la oscuridad, a la luz y la mutante.

Tabla 5. Intensidades de los estándares de diacilgliceroles a distintas concentraciones

Conc. ng/mL	Intensidades (ua)			
	DAG-32:0	DAG-34:1	DAG-34:0	DAG-36:0
0,5	21.600	13.800	12.600	13.000
5	67.400	88.000	88.400	64.400
35	199.000	317.000	259.000	239.000
100	329.000	583.000	303.000	388.000

Los cromatogramas TIC muestran el total de lípidos observados en las muestras de ojos de mosca, en donde cada pico cromatográfico corresponde a una especie lipídica distinta. Este método de cuantificación asume que las eficiencias de ionización entre varias especies de diacilglicerol presentes en la muestra son las mismas que las eficiencias de los estándares (Fenn *et al.*, 1989). El estándar interno 1,3-dioctadecanoil-2-hidroxi-*sn*-glicerol-d5, fue agregado en la extracción pero no fue encontrado en las muestras.

La zona donde se encuentran todos los diacilgliceroles (Región de los DAGs), se encontró entre los 10 y 13 minutos de la corrida cromatográfica, aproximadamente. Con los insertos de colores se indica la abundancia del diacilglicerol DAG-34:1 en las 3 condiciones. Se observa que las abundancias de los diacilgliceroles fueron extremadamente bajas en comparación a otros lípidos presentes en las membranas rbdoméricas de las moscas silvestres y las moscas mutantes. Como se conocían los iones aductos de los estándares comerciales, se realizó una extracción de esos iones desde los cromatogramas TIC. De esta forma se generaron los cromatogramas de iones extraídos (XIC) de los diacilgliceroles encontrados en las muestras P2 de ojos de moscas silvestres y mutantes.

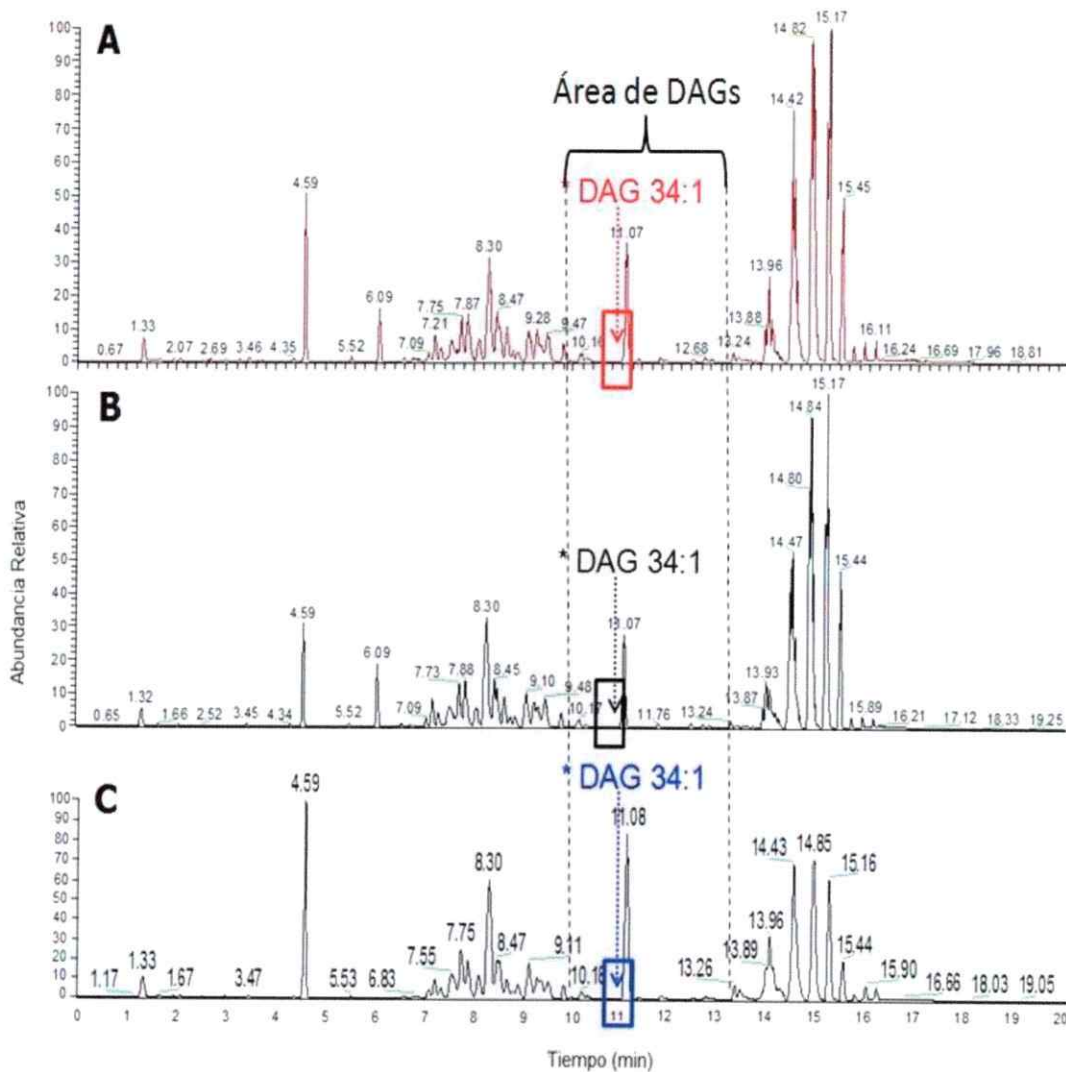


Figura 13. Separación de los lípidos totales de las muestras de membranas rdoméricas de moscas silvestres y la mutante. La separación se realizó utilizando UPLC-fase reversa. **A-C**, Cromatogramas TIC. **A**, Fracción P2 de ojos silvestres adaptados a la oscuridad. **B**, Fracción P2 de ojos silvestres adaptados a la luz. **C**, Fracción P2 de ojos de la mutante *Gaq¹;Gpe¹*. Los insertos rojo, negro y azul destacan la baja abundancia de los DAG en la muestra (particularmente se observa la presencia del DAG-34:1). n= 3.

Los cromatogramas XIC son cromatogramas reconstruidos que permiten recuperar uno o más analitos del conjunto de datos totales de una corrida cromatográfica. La Fig. 14 muestra el cromatograma TIC y los cromatogramas XIC de cada uno de los diacilgliceroles encontrados en la muestra de ojos adaptados a oscuridad. Las figuras 14A y 14B son equivalentes y demuestran la reproducibilidad de las muestras. Las 4 especies de DAG identificadas fueron estructuralmente idénticas a los estándares comerciales (Fig. 14 C, D, E y F). Se obtuvo la fórmula molecular y la masa exacta (con 5 decimales de masas), de cada una de estas moléculas. Se observó un pequeño cambio en los tiempos de retención de las moléculas, cuyo rango varió de 0,06 a 0,18 min, con respecto a los valores observados de los estándares puros, lo cual se encuentra en el rango normal de variación del equipo. Además hay que considerar que los diacilgliceroles identificados se encontraban en una compleja matriz biológica y no estaban puros como los estándares comerciales.

De las 4 especies de diacilglicerol encontradas en estas muestras, el DAG-34:0 fue el más abundante en todas las condiciones (Tabla 6), seguido del DAG-36:0 y del DAG-32:0, todos ellos con cadenas saturadas. El único diacilglicerol con cadena insaturada fue el DAG-34:1, el menos abundante de estas especies (Tabla 6) y el único que mostró cambios de abundancia en respuesta a la luz (Fig. 15).

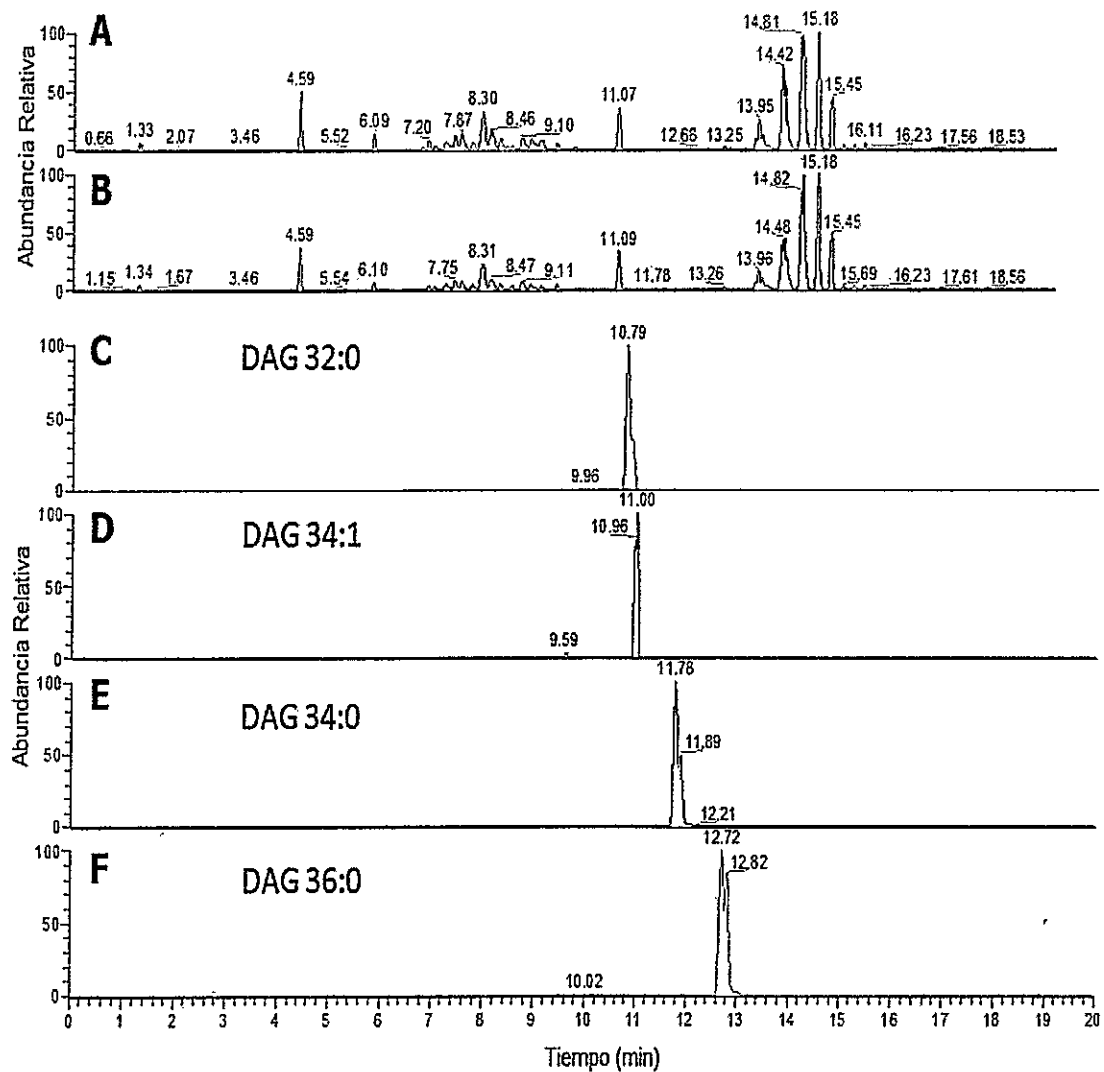


Figura 14. Identificación de los DAGs en las muestras. A y B, Cromatogramas TIC de dos muestras de rhabdomeros de ojos silvestres adaptados a oscuridad. Son dos muestras distintas de ojos, que revelan la alta reproducibilidad de la muestra. C, D, E y F, Cromatogramas de iones extraídos (XIC) de los diacilgliceroles encontrados en las muestras: DAG-32:0, DAG-34:1, DAG-34:0 y DAG-36:0, respectivamente.

Tabla 6. Concentraciones de los diacilgliceroles encontrados en muestras de ojos silvestres adaptadas a oscuridad, luz y ojos mutantes. Se utilizaron 3 muestras de cada condición.

Condiciones	Concentración (ng/mL)			
	DAG-32:0	DAG-34:1	DAG-34:0	DAG-36:0
Osc. 1	24,1	0,4	139,6	91,7
Osc. 2	23,8	1,0	141,4	89,0
Osc. 3	23,2	1,2	146,5	101,2
promedio ± SEM	23,7 ± 0,3	0,9 ± 0,3	142,5 ± 2,6	93,9 ± 4,6
Luz 1	21,6	2,0	131,7	84,8
Luz 2	29,3	2,1	162,7	119,1
Luz 3	23,8	1,4	144,8	94,0
promedio ± SEM	24,9 ± 2,8	1,8 ± 0,3	146,4 ± 11,1	99,3 ± 12,7
Mutante 1	20,6	0,5	135,8	81,9
Mutante 2	24,1	0,4	130,7	88,0
Mutante 3	31,8	0,6	150,7	92,5
promedio ± SEM	25,5 ± 4,1	0,5 ± 0,1	139,1 ± 7,4	87,4 ± 3,8

Las especies de diacilglicerol identificadas en las muestras son resumidas en la Tabla 7, indicándose su nombre IUPAC, la fórmula molecular y la masa molecular exacta en las muestras. En la figura 16 se indica la estructura molecular de los diacilgliceroles identificados.

Tabla 7. Tiempo de retención, fórmula molecular y masa exacta de las moléculas de los diacilgliceroles identificados.

Fórmula abreviada	Tiempo retención (min)	Nombre IUPAC	Fórmula molecular	Masa molecular exacta
DAG-32:0	10,79	1,2-dihexadecanoil- <i>sn</i> -glicerol	C ₃₅ H ₆₈ O ₅	568,91142
DAG-34:1	11,00	1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicerol	C ₃₇ H ₇₀ O ₅	594,94870
DAG-34:0	11,78	1-octadecanoil-2-hexadecanoil- <i>rac</i> -glicerol	C ₃₇ H ₇₂ O ₅	596,53796
DAG-36:0	12,72	1,2-dioctadecanoil- <i>rac</i> -glicerol	C ₃₉ H ₇₆ O ₅	625,01774

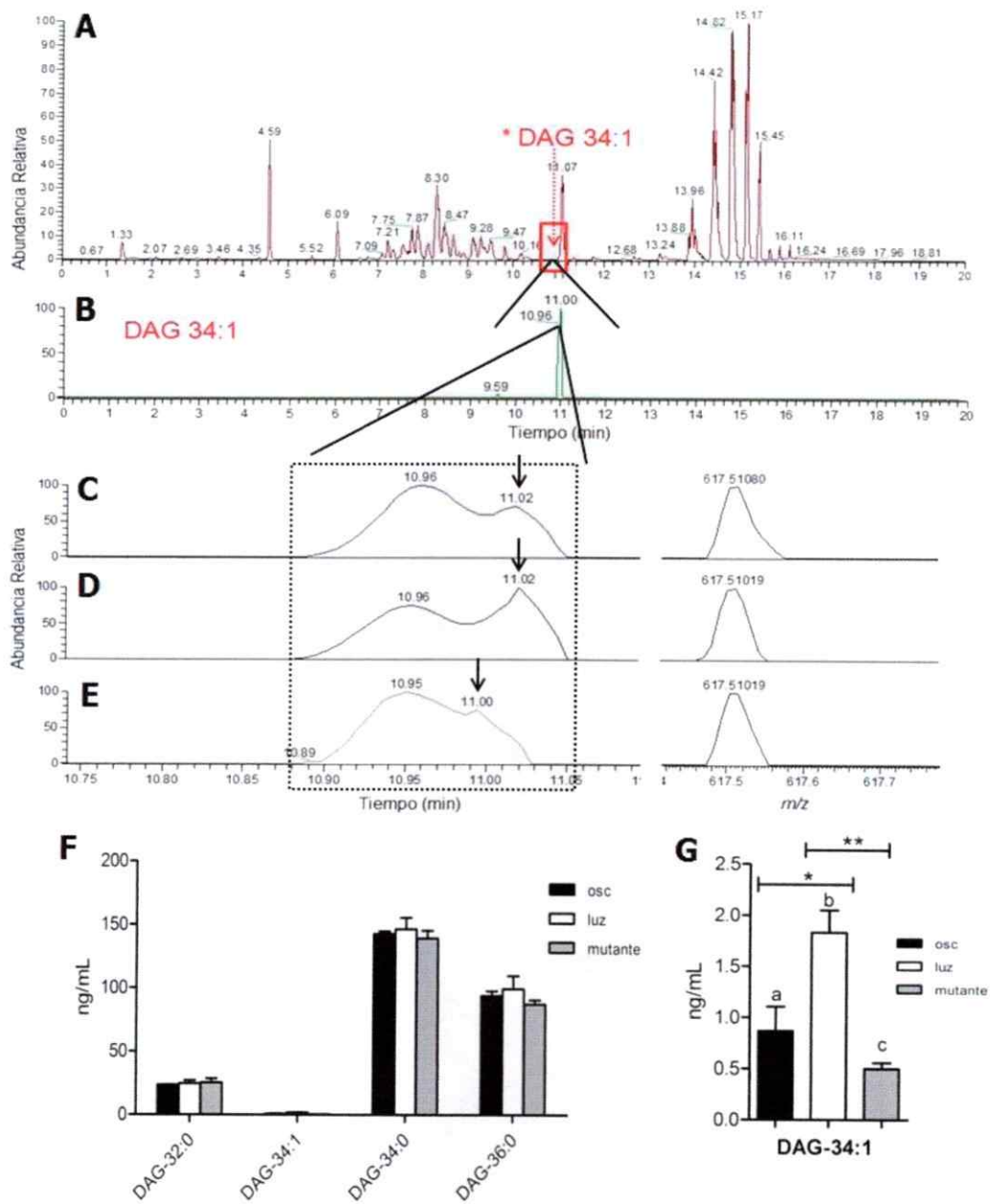


Figura 15. El DAG-34:1 es el único diacilglicerol cuyo contenido cambia en respuesta a la luz en los rabdómeros de mosca. **A**, Cromatograma TIC de una muestra de rabdómeros de ojos adaptados a la oscuridad. **B**, Cromatograma XIC del DAG-34:1 de ojos adaptados a la oscuridad. **C**, Ampliación del cromatograma XIC del 34:1 de ojos adaptados a la oscuridad. **D**, Ampliación del cromatograma XIC del 34:1 de ojos adaptados a la luz. **E**, Ampliación del cromatograma XIC del 34:1 de ojos de la mutante. El DAG-34:1 tiene un tiempo de retención de 11,02 minutos

en las muestras. A la derecha de cada cromatograma (C, D, E) se muestra el respectivo espectro de masas con un único pico de 617,51019 uma que corresponde al aducto $[M + Na]^+$. F, Concentraciones promedio de los DAGs identificados en los rabdómeros de ojos silvestres adaptados a la oscuridad, la luz y ojos de la mutante. G, Detalle de la cuantificación del DAG-34:1, barra a vs. b ($p < 0,05$), b vs. c ($p < 0,01$), a vs. c (ns). $n=3$.

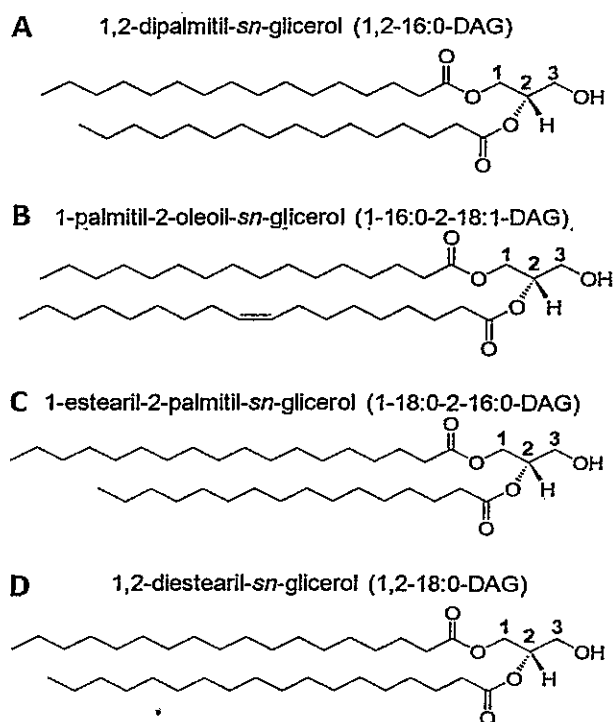


Figura 16. Estructura molecular de los diacilgliceroles identificados en las muestras enriquecidas de rabdómeros de ojos de *Drosophila*. A, DAG-32:0. B, DAG-34:1. C, DAG-34:0. D, DAG-36:0.

Los resultados obtenidos muestran que los lípidos cuya abundancia cambia en respuesta a la iluminación son los diacilgliceroles, mientras que los PUFAs totales permanecen constantes. Estas evidencias apoyan fuertemente el papel de los diacilglicerol como posibles agonistas fisiológicos de los canales TRP y TRPL.

4.4. PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE OTROS LÍPIDOS PRESENTES EN LOS RABDÓMEROS DE MOSCA

4.4.1. Fosfolípidos

Como se detalla en Materiales y Métodos, se determinó la abundancia relativa de los ácidos grasos provenientes de los fosfolípidos presentes en los rabdómeros de *Drosophila*. En la Figura 17 se muestra un cromatograma TIC representativo de los metil-ácidos grasos detectados en la fracción de fosfolípidos de una muestra de membranas rabdómeras proveniente de ojos de moscas silvestres adaptadas a la oscuridad. Se detectaron 6 ácidos grasos: palmítico (16:0), palmitoleico (16:1), esteárico (18:0), oleico (18:1), linoleico (18:2) y α -linolénico (18:3), los que fueron cuantificados en comparación al estándar interno ácido heptadecanoico (17:0). El PUFA C18:3 presentó baja abundancia, comparado con el C18:2.

No se logró detectar PUFAs C₂₀ y C₂₂, es decir, no se identificó ningún ácido graso poliinsaturado con una cadena de más de 18 carbonos y que tuviera más de 3 insaturaciones, en las moscas silvestres ni la mutante, pese a que se consideran ácidos grasos estructurales de las membranas. Por lo tanto se descarta la presencia del ácido docosahexaenoico (DHA, C22:6(ω -3)), ácido eicosapentanoico (EPA, C20:5(ω -3)), ácido araquidónico (AA, C22:4(ω -6)) y ácido γ -dihomo linolénico (DGLA, C20:3(ω -6)), el cual es producto de desaturación del ácido linoleico (LA, C18:2(ω -6)) y precursor del araquidónico (Fig. 17). Cabe destacar que estos PUFAs tampoco fueron encontrados en las otras fracciones de lípidos analizados.

En uno de cinco experimentos se observaron dos picos cromatográficos que presentaron los tiempos de retención (T_R): 12,4 y 14,5 minutos, los cuales posiblemente correspondían a los ácidos grasos araquídico (C20:0) y docosanoico (22:0). Sin embargo, la abundancia de esos ácidos grasos fue muy baja y el porcentaje de identidad de los espectros de masa, fue menor al 80% lo que descartó su detección. Además, el compuesto con t_R 14,5 minutos se encontraba

sobre el sangrado de la columna, lo que dificultó aún más su identificación. Hubo otro pico cromatográfico que presentó un tiempo de retención de 4,6 minutos. El compuesto con ese T_R fue identificado como ácido mirístico (C14:0), en otras clases de lípidos, sin embargo, en esta fracción la abundancia de este pico fue tan baja, que la biblioteca de lípidos no lo reconoció como un metil-éster. Como el porcentaje de identidad fue menor al 80%, se descartó su detección en esta muestra.

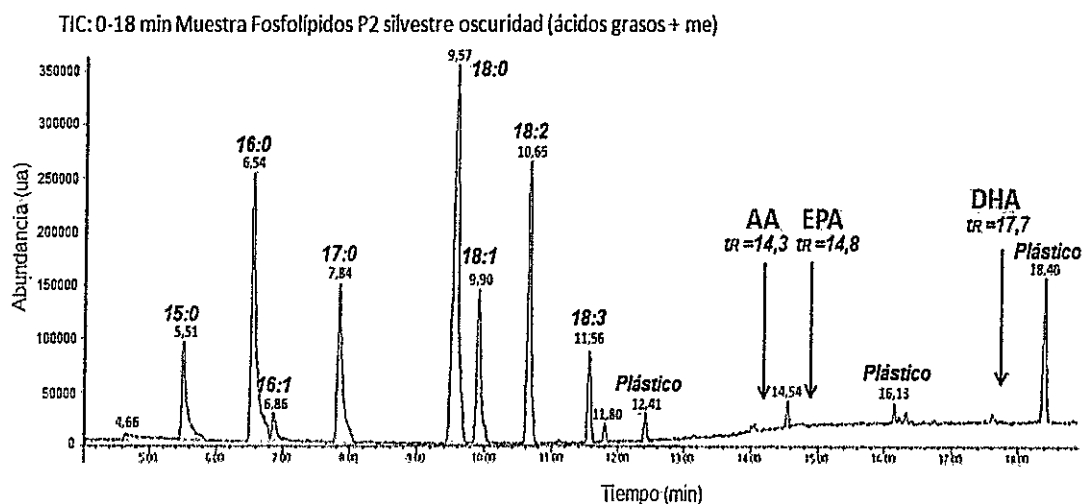


Figura 17. La fracción de fosfolípidos de rabadómeros de *Drosophila* no presenta los PUFAs “AA, EPA y DHA” característico de los fosfolípidos de mamíferos. Cromatograma TIC representativo que evidencia la ausencia de los PUFAs C_{20} y C_{22} , los cuales son indicados con flechas. Los estándares internos utilizados fueron 15:0 y 17:0. La ausencia se repite en todas las fracciones de lípidos de *Drosophila*. Ácido palmítico (16:0), palmitoleico (16:1), esteárico (18:0), oleico (18:1), linoleico (18:2) y α -linolénico (18:3). $n=5$.

La cuantificación de los ácidos grasos de los fosfolípidos reveló que no hubo cambios en la cantidad de C18:2 o C18:3 por efecto de la luz en las moscas silvestres (Fig. 18A); sin embargo, si se observó diferencias en el C18:2 entre las dos adaptaciones de las moscas silvestres y la mutante (ambas con un valor $p<0,001$). Además, hubo diferencias en el C18:1

entre los ojos de la mosca silvestre adaptada a la oscuridad y la mutante ($p < 0,05$) y entre la silvestre adaptada a la luz y la mutante ($p < 0,01$). Las moscas mutantes contienen menor cantidad de C18:1 y C18:2 en los fosfolípidos de las membranas rabdoméricas al compararlas con las moscas silvestres.

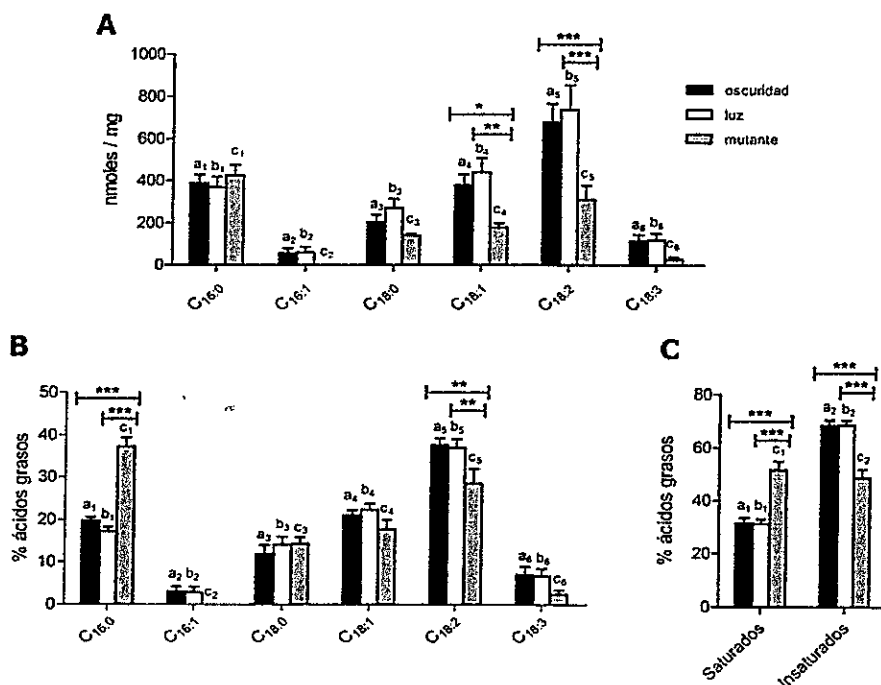


Figura 18. Los ácidos grasos provenientes de los fosfolípidos presentan diferencias entre las moscas silvestres y las moscas mutantes *Gaq¹*; *Gβe¹*. **A**, Cuantificación de los ácidos grasos de los MDAGs. a₄ vs. c₄ ($p < 0,05$), b₄ vs. c₄ ($p < 0,01$), a₄ vs. b₄ (ns); a₅ vs. c₅ ($p < 0,001$), b₅ vs. c₅ ($p < 0,001$), a₅ vs. b₅ (ns). **B**, Perfil de ácidos grasos de los fosfolípidos. a₁ vs. c₁ ($p < 0,001$), b₁ vs. c₁ ($p < 0,001$), a₁ vs. b₁ (ns); a₅ vs. c₅ ($p < 0,01$), b₅ vs. c₅ ($p < 0,01$), a₅ vs. b₅ (ns). **C**, Comparación de los ácidos grasos saturados e insaturados. a₁ vs. c₁ ($p < 0,001$), b₁ vs. c₁ ($p < 0,001$), a₁ vs. b₁ (ns); a₂ vs. c₂ ($p < 0,001$), b₂ vs. c₂ ($p < 0,001$), a₂ vs. b₂ (ns). n = 5.

Por otro lado, el perfil de ácidos grasos de esta fracción se muestra en la Fig. 18B. Los ácidos grasos C18:2 y C18:1 fueron los más abundantes de las moscas silvestres (~37,0 y 22,0%,

respectivamente), mientras que en las moscas mutantes representaron el 28,4% y 17,7%, respectivamente. La menor abundancia de C18:2 en la mosca mutante generó diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) al compararla con las dos condiciones de adaptación de los ojos de las moscas silvestres. Además, el C16:0 fue inusualmente alto en la mutante representando el doble que en las muestras silvestres (37% contra un 18%, respectivamente). Estas diferencias son significativas entre las tres condiciones experimentales ($p < 0,001$).

Dentro de los ácidos grasos insaturados, los PUFAs fueron más abundantes que los MUFAs en moscas silvestres (44% contra un 31%, respectivamente). Lo mismo ocurrió en la mutante (25% contra un 18%, respectivamente). A pesar de las diferencias en los porcentajes entre las tres condiciones experimentales, el análisis estadístico no detectó diferencias significativas. La abundancia, en orden decreciente, de los ácidos grasos insaturados fue el siguiente: C18:2 > C18:1 > C18:3 > C16:1. Al comparar los ácidos insaturados en las tres condiciones experimentales, se observó que las moscas silvestres presentaron un mayor porcentaje que las moscas mutantes (68% contra un 49%, Fig. 18C), lo cual generó diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$). La razón insaturados/saturados (U/S) de los fosfolípidos fue 3,0 en las moscas silvestres, igual al valor descrito por Bennett *y cols*, 1997 en los fosfolípidos de otro díptero.

4.42. *Triacilgliceroles (TAGs)*.

En la Figura 19 se muestra un cromatograma TIC representativo de los metil-ácidos grasos detectados en la fracción de triacilgliceroles de una muestra de membranas rabdómicas proveniente de ojos de moscas silvestres adaptadas a la oscuridad. Se detectaron 6 ácidos grasos: mirístico (14:0), palmítico (16:0), palmitoleico (16:1), esteárico (18:0), oleico (18:1) y linoleico (18:2). Para cuantificar se utilizó el estándar interno ácido heptadecanoico (17:0).

La cuantificación de los ácidos grasos de los triacilgliceroles reveló que no hubo

cambios en las abundancias de los ácidos grasos en respuesta a la luz en las moscas silvestres y las moscas mutantes (Fig. 20A). Además se observó que las moscas mutantes contienen menor cantidad de ácido palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1) y oleico (C18:1) en los triacilgliceroles de las membranas rdboméricas, cuando se les compara con las moscas silvestres. Estas diferencias son significativas ($p < 0,05$, $p < 0,01$ y $p < 0,001$, Fig. 20A). Las moscas mutantes también poseen menor cantidad de ácido linoleico (C18:2), pero esta diferencia no es significativa.

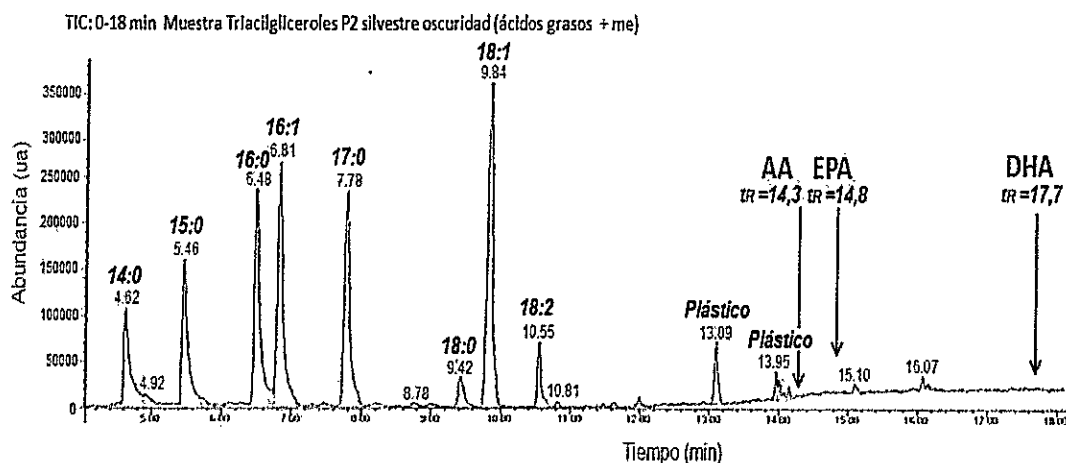


Figura 19. La fracción de triacilgliceroles presentó seis ácidos grasos y ningún PUFA C_{20} y C_{22} . Se muestra un cromatograma TIC representativo de esta fracción en donde 15:0 y 17:0 fueron utilizados como estándares internos. En esta fracción también hubo ausencia de PUFAs C_{20} y C_{22} , los cuales son indicados con flechas. Ácido mirístico (14:0), palmítico (16:0), palmitoleico (16:1), esteárico (18:0), oleico (18:1) y linoleico (18:2). $n = 5$.

El perfil de ácidos grasos se muestra en la Fig. 20B. Las proporciones de ácidos grasos fueron similares en las moscas silvestres y en la mutante. El único ácido graso que generó una diferencia significativa entre las cepas, fue el ácido mirístico (C14:0), el cual presentó una mayor abundancia en la mutante que en las silvestres (23% contra un 15%, respectivamente; $p < 0,001$).

A diferencia de los observado en fosfolípidos, en la fracción de los triacilgliceroles los

MUFAs C18:1 y C16:1 junto con el C16:0, fueron los ácidos grasos más abundantes en las tres condiciones experimentales, juntos representaron el 75,5% de los ácidos grasos en las moscas silvestres y 70,5% en la mosca mutante. Además, hay que considerar que esta es la única fracción donde se observa una alta abundancia de C16:1, la cual es equivalente al C18:1 (~25%). Esto demuestra la gran abundancia de los MUFAs en esta fracción lipídica, la cual representó ~56,0% de los ácidos grasos de los TAGs. Esta fracción también se caracterizó por poseer una alta abundancia de C14:0 (15,5% en moscas silvestres y 23,1% en moscas mutantes). Al contrario del resto de las fracciones lipídicas, el C18:0 es los TAGs es una traza en las moscas silvestres y la mutante, ya que posee una abundancia muy baja (~1%). Por otra parte, el único PUFA identificado fue el C18:2, el cual representó ~7,4% en las moscas silvestres y 3,2% en la mutante. A pesar que las moscas silvestres presentaron el doble de C18:2, el análisis estadístico realizado no detectó diferencias significativas entre estas condiciones.

Al comparar los ácidos insaturados en las tres condiciones experimentales, se observó que las moscas silvestres presentaron un mayor porcentaje que las moscas mutantes (56% contra un 51%, Fig. 20C), lo cual generó diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, Fig. 20C).

Las abundancias de los ácidos grasos provenientes de los fosfolípidos y los triacilgliceroles en las muestras rabadómeras son enormes. Sin embargo, hay que considerar que los fosfolípidos están compuestos de 2 cadenas de ácidos grasos y los triacilgliceroles de 3 cadenas. Si el total de fosfolípidos y de triacilgliceroles se divide por 2 y por 3, respectivamente, se puede tener una noción de la cantidad real de fosfolípidos y TAGs presentes en las muestras de rabadómeros.

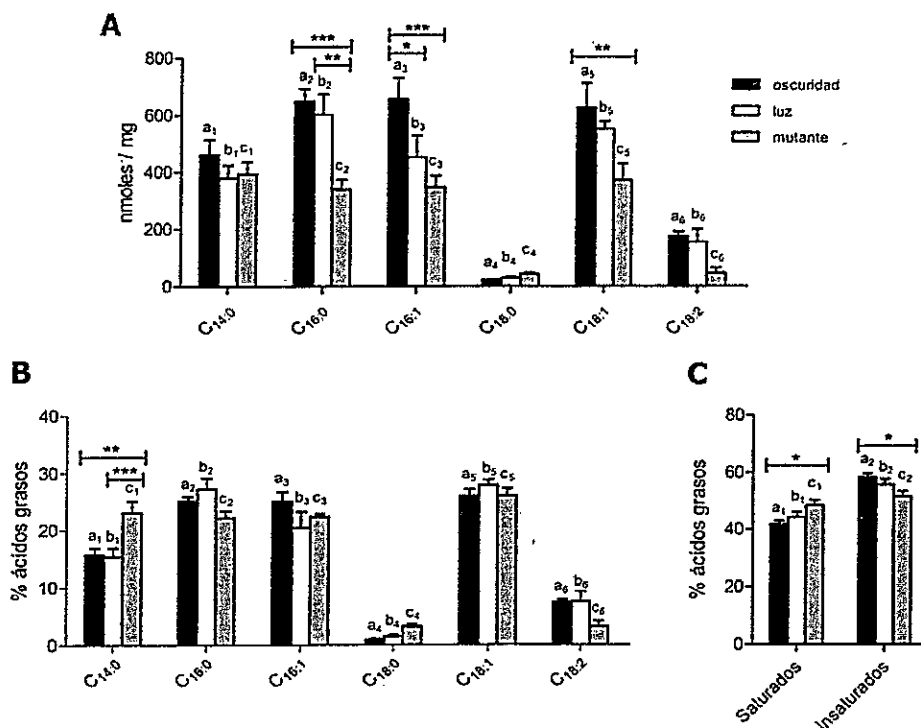


Figura 20. El contenido de los ácidos grasos provenientes de los triacilglicerolos de la mutante es menor que en las silvestres pero los perfiles de ácidos grasos son idénticos en ambas moscas. A, Cuantificación de los ácidos grasos de los TAG, a_2 vs. c_2 ($p < 0,001$), b_2 vs. c_2 ($p < 0,01$), a_2 vs. b_2 (ns); a_3 vs. c_3 ($p < 0,001$), b_3 vs. c_3 ($p < 0,05$), a_3 vs. b_3 (ns); a_5 vs. c_5 ($p < 0,01$), b_5 vs. c_5 (ns), a_5 vs. b_5 (ns). B, Composición de ácidos grasos. a_1 vs. c_1 ($p < 0,01$), b_1 vs. c_1 ($p < 0,001$), a_1 vs. b_1 (ns). C, Comparación de los ácidos saturados e insaturados, a_1 vs. c_1 ($p < 0,05$); b_1 vs. c_1 (ns); a_1 vs. b_1 (ns); a_2 vs. c_2 ($p < 0,05$); b_2 vs. c_2 (ns); a_2 vs. b_2 (ns). $n = 5$.

4.43. Esteres de esteroil (EE).

En la Fig. 21 se muestra un cromatograma TIC representativo de los metil-ácidos grasos detectados en la fracción ester de esteroil de una muestra de ojos silvestres adaptados a la oscuridad. Se detectaron sólo dos ácidos grasos: palmítico (C16:0) y esteárico (C18:0). Para cuantificar se utilizaron los estándares internos: 15:0 y 17:0. No se observó algún otro pico cromatográfico que representara a otro ácido graso, sólo hubo picos correspondientes a plásticos,

cuyos T_R fueron 11,73 y 13,08 minutos.

En esta fracción lipídica se identificó que ~60% de los ácidos grasos fue C18:0 y ~40% correspondió a C16:0. La Figura 22A, muestra la cuantificación de estos ácidos grasos. Esta fracción lipídica resultó ser la menos abundante de todas las fracciones analizadas (Fig. 6).

La cuantificación y el perfil de ácidos grasos de los EE no mostró una diferencia significativa en las abundancias de los ácidos grasos identificados en las tres condiciones experimentales (Fig. 22 A y B), sin embargo, si hubo diferencias significativas entre los promedios de los ácidos grasos ($p < 0,001$).

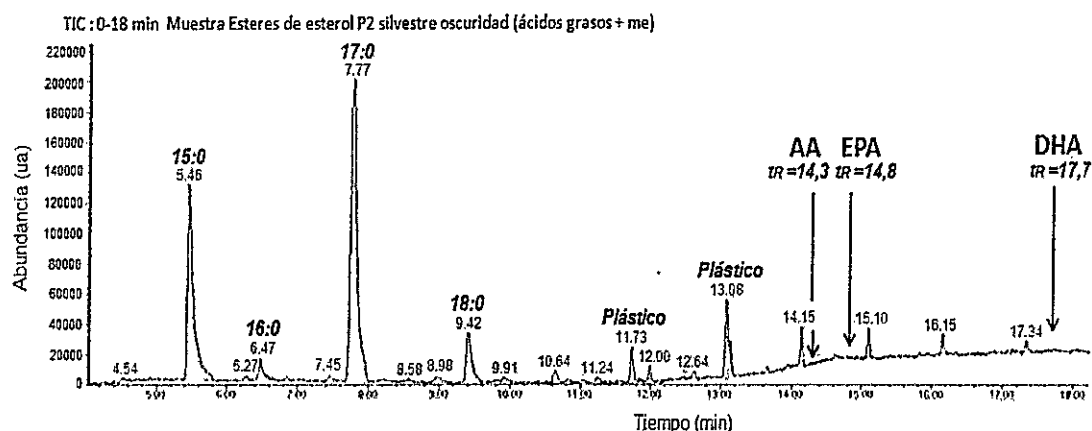


Figura 21. La fracción de esteres de esterol presentó sólo dos ácidos grasos y ningún PUFA C_{20} y C_{22} . Se muestra un cromatograma TIC representativo de esta fracción en donde 15:0 y 17:0 fueron utilizados como estándares internos. En esta fracción también hubo ausencia de PUFAs C_{20} y C_{22} , los cuales son indicados con flechas. Ácido palmítico (16:0) y esteárico (18:0). $n = 5$.

En la Fig. 22C se muestra la ausencia absoluta de ácidos grasos insaturados en los esteres de esterol.

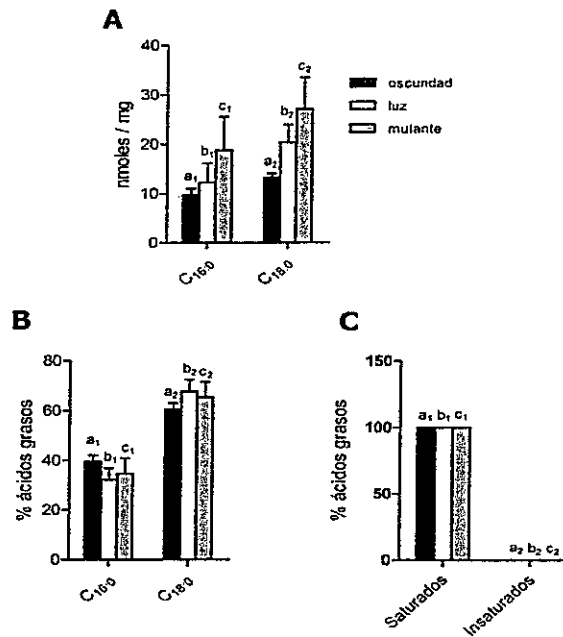


Figura 22. Perfil de ácidos grasos provenientes de los esteres de esteroles. A, Cuantificación de los ácidos grasos de los EE. B, Composición de ácidos grasos de la fracción lipídica. C, Comparación de los ácidos saturados e insaturados. n= 5.

4.5. CARACTERIZACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS EN LOS RABDÓMEROS DE MOSCA

4.5.1. Ácidos grasos saturados

En los lípidos presentes en los rabdómeros de *Drosophila* se observa la presencia de tres ácidos grasos saturados, de los cuales ácido palmítico (C16:0) y esteárico (C18:0), están presentes en todos los lípidos analizados (Tabla 8). Al contrario, el ácido mirístico (C14:0) sólo está presente en los triacilglicéridos (TAGs) y en los ácidos grasos libres (AGL) de las muestras P2. El C16:0 es el más abundante de los ácidos grasos saturados en las tres condiciones experimentales (moscas silvestres adaptadas a la oscuridad, a la luz y la mutante *Gaq¹;Gβe¹*), representando un 23% en moscas silvestres y 32% en la mutante. Esta diferencia es estadísticamente significativa ($p < 0,001$, Tabla 8, última columna).

Los TAGs y los fosfolípidos presentaron las mayores abundancias de C16:0 y en los TAGs se observó diferencias significativas entre las moscas silvestres y la mutante (ambas con un valor de $p < 0,001$, Tabla 8, columna TAGs). Particularmente, en los AGL se observa que el C16:0 es cuatro veces más abundante en la mosca mutante que en las moscas silvestres adaptadas a oscuridad o luz. Esta diferencia es significativa ($p < 0,001$) entre estas condiciones (Tabla 8). El C16:0 de los mono-diacilgliceroles (MDAGs) es poco abundante (menor al 2% del total de ácidos grasos) y no mostró diferencias significativas entre las tres condiciones experimentales. En los esteres de esterol (EE), el C16:0 de las moscas silvestres y la mutante se observa como una traza, ya que su abundancia es menor al 1% de los ácidos grasos totales.

Por otra parte, el ácido esteárico (C18:0) tuvo una abundancia entre el 10-15% de los ácidos grasos totales, en cada una de las condiciones experimentales, sin mostrar diferencias significativas entre ellas. Este ácido graso presenta su mayor abundancia en los fosfolípidos y en los AGL, mostrando diferencias significativas sólo en los fosfolípidos entre las moscas silvestres adaptadas a luz y la mutante ($p < 0,05$, Tabla 8, columna Fosfolípidos). El C18:0 de los MDAGs tiene abundancias similares en las 3 condiciones, sin presentar diferencias significativas entre las cepas de moscas. Curiosamente, su abundancia en los TAGs y en los esteres de colesterol es muy baja siendo una traza (Tabla 8, columnas TAGs y EE). Sin embargo, la abundancia total de los TAGs en la muestra es decenas de veces mayor que en los EE.

Tabla 8. Abundancias de los ácidos grasos saturados en las distintas fracciones lipídicas de las moscas silvestres y mutantes *Gaq¹;Gβe¹*.

<i>Abundancia de los ácidos grasos del total (%)</i>						
	<i>MDAGs</i>	<i>AGL</i>	<i>Fosfolíp.</i>	<i>TAGs</i>	<i>EE</i>	<i>total de la muestra</i>
SAT.						
C14:0						
<i>osc</i>	---	0,4 ± 0,05 ^e	---	8,1 ± 0,62 ^c	---	8,4 ± 0,68
<i>luz</i>	---	0,2 ± 0,03 ^e	---	6,8 ± 0,73 ^c	---	7,0 ± 0,63
<i>mutante</i>	---	0,7 ± 0,08 ^e	---	7,3 ± 0,75 ^c	---	8,0 ± 1,15
C16:0						
<i>osc</i>	1,5 ± 0,16	2,7 ± 0,32 ^e	6,2 ± 0,15	12,9 ± 0,59 ^e	0,2 ± 0,02	23,6 ± 0,88 ^e
<i>luz</i>	1,7 ± 0,31	2,8 ± 0,41 ^c	6,4 ± 0,24	12,1 ± 1,17 ^c	0,2 ± 0,03	23,2 ± 1,33 ^e
<i>mutante</i>	3,5 ± 0,82	12,0 ± 3,06 ^e	8,3 ± 0,74	7,1 ± 0,71 ^c	0,7 ± 0,28	31,5 ± 3,37 ^e
C18:0						
<i>osc</i>	2,7 ± 0,40	3,9 ± 0,30	3,7 ± 0,75	0,5 ± 0,06	0,3 ± 0,04	11,1 ± 0,95
<i>luz</i>	2,4 ± 0,94	3,0 ± 0,80	5,3 ± 0,85 ^a	0,6 ± 0,1	0,4 ± 0,04	11,8 ± 1,20
<i>mutante</i>	3,9 ± 1,16	5,1 ± 1,17	3,1 ± 0,15 ^a	1,0 ± 0,07	1,2 ± 0,3	14,2 ± 1,23

^a: diferencias estadísticamente significativas (p<0,05)

^c: diferencias estadísticamente significativas (p<0,001)

El menos abundante de todos los ácidos grasos saturados, el ácido mirístico (C14:0), representa menos del 10% de los ácidos grasos totales de los rbdómeros de moscas silvestres y las mutantes y no presenta diferencias significativas entre las condiciones experimentales (Tabla 8, última columna). La mayor abundancia del C14:0 se observa en los TAGs, representando el ~7,0% de los ácidos grasos totales, mientras que en los AGL es una traza. Si se comparan las abundancias de estas dos fracciones lipídicas, se observa que hay diferencias significativas (p<0,001). Sin embargo, no hay diferencias significativas entre las condiciones de oscuridad, luz y mutante en las dos fracciones de lípidos (Tabla 8).

4.52. Ácidos grasos insaturados

En los lípidos de los rbdómeros de *Drosophila* se observan cuatro ácidos grasos insaturados (a excepción de los EE, los cuales son exclusivamente saturados); dos de ellos

monoinsaturados (MUFAs): ácido palmitoleico (C16:1) y oleico (C18:1) y dos poliinsaturados (PUFAs): ácido linoleico (C18:2) y α -linolénico (C18:3). El MUFA más abundante de las fracciones lipídicas es el C18:1, representando entre el 21-25% de los ácidos grasos totales de las muestras de rabadómeros de moscas silvestres adaptadas a oscuridad, luz y la mutante (Tabla 9, última columna). El C16:1 representa menos del 15% de los ácidos grasos totales y al igual que el C18:1, no presenta diferencias significativas entre las tres condiciones experimentales (Tabla 9). Sólo hubo diferencias entre la abundancia (%) del C18:1 y C16:1 ($p < 0,001$).

La distribución del C18:1 y C16:1 es distinta en los lípidos analizados. En las moscas silvestres, la abundancia del C18:1 es la siguiente (en orden decreciente): TAG > Fosfolípidos > AGL > MDAG. En la moscas mutante, el orden cambió de la siguiente forma: TAG > AGL > Fosfolípidos > MDAG. Los valores se señalan en la tabla 9. Los TAGs presentaron diferencias significativas entre las moscas silvestres (ambas condiciones) y la mutante (ambas con un valor de $p < 0,001$, Tabla 9, columna TAGs). Los fosfolípidos presentaron diferencias significativas entre las moscas silvestres adaptadas a la oscuridad y la mutante ($p < 0,001$) y entre las moscas silvestres adaptadas a la luz y la mutante ($p < 0,05$, Tabla 9, columna Fosfolípidos). Los AGL presentaron diferencias significativas entre las moscas silvestres y la mutante (ambas con un valor de $p < 0,001$, Tabla 9, columna AGL). El C18:1 de los MDAGs no presentó diferencias significativas entre las condiciones experimentales.

Por otra parte, el C16:1 se encuentra sólo en tres de las cinco fracciones lipídicas analizadas (TAGs, AGL y fosfolípidos), presentando diferencias significativas entre las abundancias de estas fracciones ($p < 0,001$). En las moscas silvestres adaptadas a oscuridad, la abundancia del C16:1 (en orden decreciente) es TAG > F > AGL, en las moscas adaptadas a luz: TAG > F y F = AGL y en las mutantes: TAG > AGL. No se observa C16:1 en los fosfolípidos de la mosca mutante y no se observó diferencia entre las dos condiciones de adaptación de los ojos de las moscas silvestres (Tabla 9, columna fosfolípidos). En los TAGs se observó diferencias

significativas entre las moscas adaptadas a la oscuridad y a la luz y entre oscuridad y la mutante (ambos con un valor $p < 0,001$, tabla 9). Además, en los AGL hay diferencias entre las moscas adaptadas a la oscuridad y la mutante ($p < 0,05$, Tabla 9).

En resumen, los MUFAs son abundantes en los triacilgliceroles y los PUFAs en los fosfolípidos. La mosca mutante presentó de un déficit de ácidos grasos insaturados en esas fracciones, a excepción de los AGL (Tabla 9).

Tabla 9. Abundancias de los ácidos grasos insaturados en las distintas fracciones lipídicas de las moscas silvestres y mutantes *Gaq¹*; *Gβe¹*.

		<i>Abundancia de los ácidos grasos del total (%)</i>				<i>total de la muestra</i>
		<i>MDAGs</i>	<i>AGL</i>	<i>Fosfolípidos</i>	<i>TAGs</i>	
MUFAs						
<i>CI6:1</i>						
<i>osc</i>	---		$0,7 \pm 0,41^a$	$0,9 \pm 0,43$	$12,9 \pm 1,01^c$	$14,5 \pm 1,34$
<i>luz</i>	---		$1,1 \pm 0,35$	$1,1 \pm 0,59$	$9,0 \pm 1,59^c$	$11,3 \pm 1,53$
<i>mutante</i>	---		$2,9 \pm 0,92^a$	---	$7,2 \pm 0,91^c$	$10,1 \pm 1,47$
<i>CI8:1</i>						
<i>osc</i>	$1,0 \pm 0,20$		$1,8 \pm 0,40^c$	$6,7 \pm 0,5^c$	$13,4 \pm 1,00^c$	$23,0 \pm 1,10$
<i>luz</i>	$1,5 \pm 0,21$		$2,6 \pm 0,35^c$	$8,3 \pm 0,52^a$	$12,3 \pm 0,40^c$	$24,8 \pm 1,00$
<i>mutante</i>	$2,6 \pm 1,63$		$6,3 \pm 1,15^c$	$3,9 \pm 0,33^{a,c}$	$8,5 \pm 1,30^c$	$21,2 \pm 2,77$
PUFAs						
<i>CI8:2</i>						
<i>osc</i>	---		$1,4 \pm 0,44^c$	$11,9 \pm 0,73^c$	$3,8 \pm 0,35^a$	$17,2 \pm 0,81^a$
<i>luz</i>	---		$2,1 \pm 0,62^c$	$13,8 \pm 0,58^c$	$3,3 \pm 0,92$	$19,2 \pm 0,98^c$
<i>mutante</i>	---		$6,3 \pm 1,62^c$	$6,7 \pm 1,41^c$	$1,1 \pm 0,46^a$	$14,1 \pm 1,08^{a,c}$
<i>CI8:3</i>						
<i>osc</i>	---		---	$2,2 \pm 0,73^c$	---	$2,2 \pm 0,70$
<i>luz</i>	---		$0,2 \pm 0,11$	$2,6 \pm 0,75^c$	---	$2,7 \pm 0,79$
<i>mutante</i>	---		$0,3 \pm 0,04$	$0,6 \pm 0,30^c$	---	$0,9 \pm 0,47$

^a: diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$),

^c: diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$)

Con respecto a los PUFAs, el linoleico (*CI8:2*) es el más abundante en las muestras de rabdomeros de las moscas silvestres y mutantes, representando casi el 20% de los ácidos grasos totales (Tabla 9, última columna). Se observaron diferencias significativas entre las moscas

silvestres adaptadas a la oscuridad y la mutante ($p < 0,05$) y entre las adaptadas a la luz y la mutante ($p < 0,001$, Tabla 9, última columna). El ácido α -linolénico (C18:3) es escaso en los rabdómeros y representa alrededor del 2,5% de los ácidos grasos totales en las moscas silvestres y menos del 1% en la mutante (tabla 9, última columna).

El C18:2 sólo se encuentra en los fosfolípidos, los TAGs y los AGL. Los fosfolípidos presentan la mayor abundancia de todas (~12%), siendo 4 veces más abundante que los TAGs (~4%) y 6 veces mayor que en los ácidos grasos libres (~2%), en las moscas silvestres. Los fosfolípidos y AGL de la mutante tienen la misma abundancia de C18:2 (~6,5%) y los TAGs presentaron el 1% de los ácidos grasos totales. Esto generó diferencias significativas entre las fracciones lipídicas ($p < 0,001$) y entre las condiciones experimentales de cada clase de lípido: en los fosfolípidos hay diferencias significativas entre las moscas silvestres y la mutante (ambas con un valor de $p < 0,001$); en los TAGs hay diferencias entre las moscas silvestres adaptadas a la oscuridad y la mutante ($p < 0,05$) y en los AGL hay diferencias entre las moscas silvestres y la mutante (ambas con un valor de $p < 0,001$; Tabla 9, columnas fosfolípidos, TAGs y AGL).

La distribución del C18:3 es más acotada que la del C18:2 y sólo se encuentra en los fosfolípidos y los AGL de los rabdómeros. Los fosfolípidos presentan la mayor abundancia de C18:3 en moscas silvestres, representando el 2,5% de los ácidos grasos totales, mientras que en la mutante sólo se observó un 0,6%, generando una diferencia significativa entre las dos condiciones silvestres y la mutante (ambas con un valor $p < 0,001$, Tabla 9, columna fosfolípidos). En los AGL la abundancia fue baja, representando el 0,1%, sin presentar diferencias significativas, sin embargo, al comparar los fosfolípidos con los AGL si hubo diferencias ($p < 0,001$, tabla 9). La ausencia de C18:3 en la condición de oscuridad de los AGL posiblemente se debe a su baja abundancia en la muestra, la cual está por debajo del límite de detección del equipo.

Por otra parte, las moscas silvestres presentaron un mayor porcentaje de ácidos grasos insaturados que los saturados (58% contra un 42%, respectivamente) cuando se analizaron los ácidos grasos totales de los rabdómeros, mientras que la mutante fue al revés (46% insaturados y 54% saturados, respectivamente). Estas diferencias entre las moscas silvestres y mutantes son significativas ($p < 0,01$; Tabla 10).

Al analizar los ácidos grasos insaturados, se encontró que los monoinsaturados representan una mayor abundancia que los poliinsaturados en las muestras de rabdómeros de moscas silvestres y la mutante, mostrando una diferencia significativa ($p < 0,001$). Además, hubo diferencias entre los MUFAs de las moscas adaptadas a la oscuridad y los de la mutante ($p < 0,05$) y entre los PUFAs de la mosca silvestre adaptada a la luz y los de la mutante ($p < 0,05$, Tabla 10, columna 3 y 4).

Tabla 10. Proporciones de ácidos grasos saturados e insaturados en las muestras de rabdómeros de las moscas silvestres y mutantes *Gaq¹;Gbe¹*.

<i>Condiciones Experimentales</i>	<i>Abundancia de los tipos de ácidos grasos (%)</i>			
	<i>Saturados</i>	<i>Insaturados</i>	<i>MUFAs</i>	<i>PUFAs</i>
<i>osc</i>	43,1 ± 1,50 ^b	56,9 ± 1,50 ^b	37,5 ± 1,62 ^a	19,4 ± 0,77
<i>luz</i>	42,1 ± 2,14 ^b	58,0 ± 2,14 ^b	36,1 ± 2,16	21,9 ± 2,14 ^a
<i>mutante</i>	53,7 ± 3,15 ^b	46,3 ± 3,15 ^b	31,3 ± 3,11 ^a	15,0 ± 1,37 ^a

^a: diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

^b: diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$)

DISCUSION

Lo que esta tesis abordó, mediante el estudio de los diacilgliceroles y PUFAs, tuvo su motivación en las diversas hipótesis que han surgido en los últimos diez años sobre el mecanismo de activación de los canales TRP. Dichas observaciones ponen de manifiesto la necesidad de identificar la posible molécula involucrada en las membranas rabdoméricas de *Drosophila*.

5.1 Análisis de enriquecimiento de las muestras de rabdomeros.

Se logró generar un método para aislar membranas rabdoméricas de ojos de *Drosophila* obteniendo una fracción de membrana. Si bien existe alguna contaminación con membranas nucleares, las únicas membranas que deberían cambiar su composición lipídica con la luz, son las rabdoméricas.

5.2 El agonista fisiológico de los canales de transducción

El mecanismo de activación de los canales de transducción es la gran pregunta sin responder en la fototransducción en *Drosophila* y la respuesta puede tener además implicancias para el mecanismo de activación de los canales de la subfamilia TRPC, homólogos a TRP en vertebrados.

Se han postulado tres modelos para explicar el mecanismo por el cual los canales TRP y TRPL pueden ser activados.

Se sabe que la cascada de la fosfoinositidos es fundamental para la transducción, ya que las mutantes de la enzima fosfolipasa C (*norpA*) no responden a la luz. Sin embargo, se ha descartado la participación del IP₃ en la activación de los canales. Por mucho tiempo se pensó

que el IP_3 difundía a través del citoplasma y se unía a receptores de IP_3 permeables a Ca^{2+} en la membrana del retículo endoplasmático, permitiendo el vaciamiento de los reservorios de Ca^{2+} . Sin embargo, tapsigargina (inhibidor específico de la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana del retículo endoplasmático) o el vaciamiento mediado por IP_3 , no producen la activación del canal *in vivo* (Hardie y Raghu, 1998; Ranganathan y cols, 1994). Además, los fotorreceptores de mutantes que carecen del receptor IP_3 responden normalmente a la luz (Acharya y cols 1997). Toda esta evidencia descartó el mecanismo SOC (Store-operated channel) mediado por IP_3 en la activación de los canales.

El segundo modelo sugiere que la disminución de PIP_2 , debido a la activación de la PLC, produce la activación de los canales. Se ha reportado que el PIP_2 inhibe la actividad de los canales TRPL expresados de forma heteróloga en parches *inside-out* (Estacion y cols, 2001). Por lo tanto, la actividad de la PLC podría permitir la activación del canal al aliviar el efecto inhibitorio del PIP_2 . Aunque el PIP_2 puede ser inhibitorio, la eliminación del PIP_2 no es suficiente para la activación del canal *in vivo*. Mediante el uso del canal de potasio rectificador de entrada llamado Kir2.1, el cual fue utilizado como un monitor de los niveles de PIP_2 en el rabdómero, se observó que ese fosfolípido de membrana efectivamente disminuye con la luz sin que los canales se activen (Hardie y cols, 2001).

Considerando lo anterior, la activación de los canales parece más bien estar mediada por el DAG o sus metabolitos, los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs). Los PUFAs activan los canales TRP y TRPL en células fotorreceptoras disgregadas en oscuridad y al canal TRPL expresado de forma heteróloga (Chyb y cols, 1999) y el DAG y PUFAs activan a los canales TRPL expresados de forma heteróloga en células de insectos (Estacion y cols, 2001). En nuestro laboratorio se demostró que los PUFAs y el DAG activan a los canales TRP y TRPL en moscas silvestres, mutantes *trp* y *trpl* (esta última en menor medida) mediante registro de canales únicos en parches aislados de rabdómeros (en configuración *inside-out*, Delgado y Bacigalupo, 2009).

Por otro lado, la mutante de la DAG quinasa (DAGK, *rdgA*), que fosforila el DAG en ácido fosfatídico (PAC), presenta degeneración de los fotorreceptores producto de la actividad constitutiva de los canales TRP y TRPL, que ocurre como consecuencia de la acumulación del DAG. Asimismo, se observó que en el doble mutante que carece de la DAGK y del canal TRP (*rdgA;trp*), la degeneración del rabdomero es rescatada (Raghu y cols, 2000a). Estas evidencias apoyan la propuesta que el DAG y/o sus metabolitos son los mensajeros de excitación de los fotorreceptores de *Drosophila*. Siguiendo esta idea, estudios de célula completa en el doble mutante *norpA;rdgA* (hipomorfo de la PLC y no presenta DAGK), donde hay poco DAG y el canal TRP se encuentra abierto modestamente, mostraron que la respuesta fue 10-20 veces mayor que en los mutantes hipomórficos de la PLC (*norpA*), apoyando la idea de que DAG podría ser el segundo mensajero de excitación, ya que la cantidad de DAG es muy baja debido a la actividad de la PLC, éste se acumula y activa los canales (Hardie y cols, 2002). Una evidencia *in vivo* del rol del DAG en la activación del canal TRP se obtuvo en las moscas que tenían mutaciones en la enzima fosfatasa PA (PAP), la cual convierte el ácido fosfatídico en DAG. Esas moscas presentaron una pequeña respuesta a la luz (Kwon y Montell, 2006) mientras que la sobreexpresión de PAP aumenta la actividad del canal (García-Murillas y cols, 2006).

Todas estas evidencias aún generan controversia. Esta tesis se enfocó en investigar cual(es) lípido(s) es(son) el(los) agonista(s) fisiológico(s) de los canales de transducción mediante una nueva aproximación, consistente en la caracterización de los perfiles de lípidos o de ácidos grasos de los ojos de moscas silvestres y mutantes y determinar cuáles de estos lípidos cambian con la luz. Para esto se estudiaron los PUFAs mediante análisis de ácidos grasos y los DAGs mediante la identificación de la molécula intacta, en las muestras enriquecidas en rabdomeros de *Drosophila*.

No se analizó el PIP₂ debido a dificultades metodológicas, ya que los fosfoinosítoles son moléculas cargadas y de extremadamente baja abundancia (~1% de los fosfolípidos), por lo que

se requieren pasos adicionales en la extracción y separación, para estabilizar la molécula y con ello, evitar la pérdida de muestra.

El uso de las moscas mutantes *Gaq¹*; *Gbe¹* fue concebido como un modelo de moscas que no han sido expuestas a la luz (adaptadas a la oscuridad), sin embargo, no fue un buen modelo ya que con el transcurso de los experimentos se observó que los perfiles de ácidos grasos de las moscas mutantes difieren con los observados en las moscas silvestres. Se encontró que las mutantes presentan un déficit de ácidos grasos mono y poliinsaturados en los fosfolípidos y triacilgliceroles y una cantidad alta de palmitato (C16:0) en los ácidos grasos libres. Esta baja cantidad de ácidos grasos insaturados encontrados en la mutante podría deberse a un requerimiento no descrito que involucra a la Proteína G y que altera el metabolismo de los ácidos grasos, es decir, su síntesis o su degradación. La síntesis de ácidos grasos ocurre en el citoplasma de las células y finaliza con la producción de palmitato. La elongación y desaturación de los ácidos grasos ocurre en el retículo endoplasmático, al igual que la síntesis de lípidos complejos, tales como fosfolípidos y triacilgliceroles. Como se observan niveles normales de C18:0 en fosfolípidos y triacilgliceroles, probablemente la elongación no sea el proceso afectado, más bien serían las desaturaciones. Una demostración de esta propuesta sería medir los ácidos grasos de fosfolípidos y triacilgliceroles de una mosca mutante inducible de la enzima $\Delta 9$ desaturasa, cuya expresión dependa de la temperatura y este bajo un promotor exclusivo de ojo, para que no afecte al resto del cuerpo. Esta enzima es clave en la generación de ácidos grasos insaturados ya que produce ácido oleico.

5.21 Los PUFAs totales no cambian con la luz

Los ácidos grasos libres, de la fracción enriquecida en rabdómeros de *Drosophila*, son más cortos que en mamíferos. El ácido graso más largo en la mosca es un C₁₈, mientras que en mamíferos hay cadenas aciles con C₂₂.

Este estudio reveló que los PUFAs (C18:2 y C18:3) no cambian con la luz. Además, el espectro de PUFAs en *Drosophila* es más compacto que en mamíferos, ya que no se detectaron PUFAs C₂₀ y C₂₂, es decir, no se detectaron EPA (C20:5), DHA (C22:6) ni ácido araquidónico (C20:4). Este último es un PUFA que experimentalmente produce gran actividad de los canales y que ha sido utilizado en muchos registros electrofisiológicos (Chyb y cols, 1999; Jors y cols, 2006; Delgado y Bacigalupo, 2009). Otro PUFA ampliamente utilizado en los estudios de electrofisiología es el C18:3, cuyo contenido en los ácidos grasos libres es extremadamente bajo y no cambió de forma significativa con la luz (Fig. 7). Según el estudio de Chyb y cols, (1999), mientras más insaturaciones tiene el ácido graso produce mayor activación de los canales de transducción. No obstante, el perfil de los ácidos grasos libres de muestras enriquecidas en rabdómeros, demuestran que los PUFAs son una minoría, ya que los ácidos grasos insaturados más abundantes son el linoleico (C18:2) y el ácido oleico (C18:1); el primero de estos es un PUFA y el segundo un ácido graso monoinsaturado (MUFA). En las muestras se observó seis veces más ácido linoleico (C18:2) que α -linolénico (C18:3) pero tampoco se observó un aumento estadísticamente significativo de éste con la luz, en moscas silvestres ni en la mutante.

Sólo hay un reporte cualitativo del perfil de ácidos grasos libres de *D. melanogaster*. En ese estudio se observó que los MUFAs eran dos veces más abundantes y que los ácidos grasos saturados fueron menos abundantes, que lo determinado en esta tesis. Los PUFAs representaron el mismo porcentaje en ambos estudios (Parisi y cols, 2011). Sin embargo, ese trabajo no detalla la identidad de los ácidos grasos fueron encontrados en el cuerpo completo, sino que sólo reportó los porcentajes totales de los distintos tipos de ácidos grasos (saturados, MUFAs y

PUFAs).

Estos resultados no apoyan a los PUFAs como los posibles agonistas fisiológicos de los canales de transducción en *Drosophila melanogaster*.

5.22 Identificación de un diacilglicerol-dependiente de luz

Existe poca información en la literatura acerca de los diacilgliceroles de *Drosophila*. La baja abundancia de estos lípidos en las membranas ha generado dificultades en su identificación. Los diacilgliceroles son componentes celulares involucrados en cascadas de señalización y también son intermediarios en el metabolismo de fosfolípidos y triacilgliceroles. En esta tesis se identificaron sólo tres ácidos grasos provenientes de los DAG (C16:0, C18:0 y C18:1, Fig. 8) y los porcentajes obtenidos para C16:0 y C18:1 son reafirmados por otro estudio, aunque hubo algunas diferencias (Yoshioka *y cols*, 1985). En el otro estudio se identificaron varios ácidos grasos de cadenas de menos de 16 carbonos (C12:0, C14:0 y C16:1) en las cabezas de moscas (Yoshioka *y cols*, 1985). En esta tesis se observó que en una de cinco repeticiones había un pico cromatográfico con un tiempo de retención (T_R) idéntico al C16:1 pero su abundancia fue tan baja que fue descartado. Otro estudio identificó que el 10% de los ácidos grasos totales provenientes de DAGs correspondían a PUFAs en moscas completas (Parisi *y cols*, 2011). No obstante, no especificaron la identidad de los ácidos grasos. Lamentablemente, Parisi *y cols*, (2011) no describe el procedimiento analítico que utilizaron para analizar las muestras, lo que dificulta la interpretación de sus datos.

Por lo tanto, el perfil de ácidos grasos provenientes de los DAG reveló que esos ácidos grasos no cambiaron con la luz, sin embargo, este dato permitió conocer de forma indirecta las especies de DAGs presentes en el rabadómero. Esto facilitó la elección de los estándares comerciales con los que se generaron las curvas de calibración que permitieron determinar la identidad y la concentración de los DAGs intactos de las muestras de rabadómeros mediante un

espectrómetro de masas híbrido. Lamentablemente, no existen todos los estándares comerciales que se necesitaban. La cuantificación de los DAG se realizó en un espectrómetro de masas de alta resolución y sensibilidad, que permitió determinar que el contenido de los DAGs era demasiado bajo en las muestras de rabadómeros y por esa razón no pudo ser detectado con las técnicas analíticas clásicas (HPLC y TLC). Se identificaron cuatro especies de diacilglicerol, de éstas sólo una cambió estadísticamente con la luz (DAG-34:1, $p < 0,05$) en moscas silvestres, resultando ser la de menor abundancia. La estructura del DAG-34:1 (1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicerol) es consistente con la estructura descrita recientemente para la parte hidrofóbica de los fosfoinositoles, es decir, contiene una cadena saturada y la otra insaturada (Tabla 11). El resto de los diacilgliceroles identificados posee sólo cadenas saturadas, reteniendo la estructura de los triacilgliceroles principales y más abundantes de las muestras de mosca completa, donde dos o tres de las cadenas aciles son saturadas (Tabla 11, Hammad y cols, 2011). Además, se evidenció que la abundancia del DAG-34:1 resultó ser muy baja. Esto es consistente con la idea que un compuesto involucrado en un proceso tan importante como la apertura de los canales de transducción, debe ser finamente regulado, es decir, puede producirse y metabolizarse rápidamente, lo que se relaciona con la extremadamente rápida respuesta de este fenómeno (la cascada de transducción asociada a proteína G más rápida conocida). De esta forma, los canales de transducción permanecen abiertos el tiempo suficiente para que aumente el nivel de Ca^{2+} intracelular y desencadene la respuesta del fotorreceptor, permitiendo que este quede disponible para responder a un nuevo estímulo.

El contenido de DAG-34:1 fue menor en la mosca mutante que en la silvestre adaptada a oscuridad y esto tiene relación con la mutación de la proteína G. La escasa proteína G normal que hay en ese mutante (~1%), activa pocas moléculas de PLC por acción de la luz. Esto produce una cantidad basal de DAG asociado a la absorción de un fotón, que se observa en la Fig. 14. El contenido de DAG-34:1 en la mosca silvestre adaptada a luz es significativamente

mayor que el observado en la mutante ($p < 0,01$), sin embargo, entre la mutante y la mosca adaptada a oscuridad no se observó diferencias estadísticamente significativas.

Si bien no se determinó la cantidad de PIP_2 presente en los rabdómeros, la literatura indica que este fosfolípido es muy poco abundante en las membranas, lo que explicaría a su vez la baja abundancia de su producto DAG.

Los resultados obtenidos en esta tesis sugieren fuertemente que el agonista fisiológico de los canales de traducción TRP y TRPL es el diacilglicerol, específicamente el que posee una cadena de ácido oleico (C18:1) y una cadena de palmítico (C16:0), ya que fue el único compuesto que sufrió cambios con la luz. Estudios electrofisiológicos recientes realizados en el laboratorio avalan este resultado. En registros de canal único de parches escindidos de membranas de moscas mutantes *trpl*, la cual carece del canal TRPL, se observa que el canal TRP se activa al agregar DAG en presencia del inhibidor de la DAGL (RHC-80267, 250 μ M). Esto implica que el DAG es suficiente para activar al canal TRP y que el inhibidor no previene la activación del canal, contrario a lo que se esperaría si los PUFAs fueran necesarios. Si al parche se le agrega ATP, el cual es necesario para la actividad de la DAGK, el canal se silencia ya que el DAG es transformado en ácido fosfatídico. Si se lava el inhibidor y se aplica nuevamente DAG, el canal TRP vuelve a abrirse.

Tabla 11. Identificación de los fosfoinosítoles (PI) y los triacilgliceroles (TAG) en cuerpos de *Drosophila melanogaster*. Se identificaron 7 especies de PI y 15 especies de TAGs. Los PI fueron identificados en modo de ionización negativa y los TAGs en modo de ionización positiva (Tabla extraída de Hammad y cols, 2011).

Table 1. Lipid ions found in the *Drosophila melanogaster* extract using LC/MS/MS methods on the LTQ Orbitrap instrument

Ion	m/z measured	m/z theoretical	Error (ppm)	Ion atomic composition	Assignment
[PI-H] ⁻	805.483	805.4862	-3.97	C41H74O13P1	16:1/16:1
[PI-H] ⁻	807.4991	807.5018	-3.34	C41H76O13P1	16:1/16:0
[PI-H] ⁻	831.4992	831.5018	-3.13	C43H76O13P1	18:2/16:1
[PI-H] ⁻	833.5148	833.5175	-3.24	C43H78O13P1	16:1/18:1; Major 16:0/18:2; Minor
[PI-H] ⁻	857.5146	857.5175	-3.38	C45H78O13P1	18:2/18:2
[PI-H] ⁻	859.5302	859.5331	-3.37	C45H80O13P1	18:2/18:1
[PI-H] ⁻	861.5433	861.5468	-6.38	C45H82O13P1	18:2/18:0
[TAG + NH ₄] ⁺	710.6294	710.6293	0.14	C43H84N1O6	14:0-12:0-14:1
[TAG + NH ₄] ⁺	712.6449	712.6450	-0.14	C43H86N1O6	14:0-12:0-14:0
[TAG + NH ₄] ⁺	738.6608	738.6606	0.27	C45H88N1O6	12:0-14:0-16:1
[TAG + NH ₄] ⁺	740.6766	740.6763	0.41	C45H90N1O6	12:0-14:0-16:0
[TAG + NH ₄] ⁺	766.6920	766.6919	0.13	C47H92N1O6	12:0-14:0-18:1
[TAG + NH ₄] ⁺	792.7083	792.7076	0.88	C49H94N1O6	16:1-14:0-16:1
[TAG + NH ₄] ⁺	794.7247	794.7232	1.8	C49H96N1O6	16:0-14:0-16:1
[TAG + NH ₄] ⁺	820.7397	820.7389	0.97	C51H98N1O6	14:0-16:1-18:1
[TAG + NH ₄] ⁺	822.7551	822.7545	0.73	C51H100N1O6	14:0-16:0-18:1
[TAG + NH ₄] ⁺	846.7553	846.7545	0.94	C53H100N1O6	16:1-16:1-18:1
[TAG + NH ₄] ⁺	848.7712	848.7702	1.18	C53H102N1O6	16:0-16:1-18:1
[TAG + NH ₄] ⁺	874.7869	874.7858	1.26	C55H104N1O6	16:1-18:1-18:1
[TAG + NH ₄] ⁺	876.8021	876.8015	0.68	C55H106N1O6	16:0-18:1-18:1
[TAG + NH ₄] ⁺	900.8035	900.8015	2.2	C57H106N1O6	18:0-16:0-18:1
[TAG + NH ₄] ⁺	902.8196	902.8171	2.7	C57H108N1O6	18:0-16:0-18:0

Por otro lado, se han hecho experimentos en parches escindidos de moscas mutantes *rdgA*; *ninaE*; *trpl*, la cual es deficiente en rodopsina, DAGK y expresa el canal TRP. Esta mutante no puede generar DAG porque está mutado el gen de la proteína que comienza la cascada de señalización (rodopsina) y por lo tanto es lógico pensar que está desprovista de DAG. Si al parche escindido se le agrega DAG se observa un aumento de la actividad del canal TRP, el cual no es silenciado con la aplicación de ATP, ya que no está presente la DAGK. Además, en parches escindidos de rbdómeros de mutantes *trpl*, que sólo expresan TRP, al agregar PIP₂ (PI(4,5)P₂^{diC8}), no se observa la disminución de la actividad del canal TRP que se había postulado anteriormente (Estacion y cols, 2001).

Con respecto a la participación de los protones en la activación de los canales de transducción (Huang y cols, 2010), se observó en parches escindidos de rbdómeros de mutantes

ninaE;trpl que la disminución del pH del medio desde 7,15 a 6,4 produce una leve activación del canal TRP, sin embargo, si se agrega ATP al medio con pH 6,4, el canal sigue abierto, ya que el ATP es incapaz de cerrar el canal TRP (Delgado y Bacigalupo, resultados no publicados).

Hay que considerar que no hay evidencia convincente sobre la presencia de la DAGL en los rabdómeros de *Drosophila*, que pudiera producir los PUFAs a partir del DAG. Se identificó un gen llamado *inaE* que codifica una DAGL que posee una alta similitud de secuencia con DAGL de vertebrados y cuyo mutante responde de forma defectuosa a la luz. Ese gen genera dos isoformas llamadas INAE-D e INAE-A mediante empalme alternativo, las cuales tienen actividad lipasa *in vitro*. En el ensayo de actividad se utilizó el DAG-38:4 (1-estearoil-2-araquidonoil-*sn*-glicerol), el cual es un clásico DAG presente en mamíferos y se demostró que ambas isoformas poseen una selectividad diez veces mayor por la actividad *sn-1* que por la *sn-2*, es decir, cortan en el DAG en la posición 1 del esqueleto de glicerol, liberando ácido esteárico (18:0) y a un monoacilglicerol que posee la cadena araquidonoil (MAG-20:4), como productos primarios, mientras que los productos de la hidrólisis en la posición *sn-2* son minoritarios (ácido araquidónico (C20:4) y MAG-18:0). Esto implica que la producción de PUFAs es baja comparada con la generación de los ácidos grasos saturados y que se requeriría una alta actividad de esta enzima para producir una alta abundancia de PUFAs en las vecindades de los canales. Además, estas isoformas INAE se encuentran mayoritariamente en el soma del fotorreceptor y sólo se observó una escasa marca en los rabdómeros mediante microscopía confocal de fluorescencia. Esto implicaría que estas enzimas deberían traslocarse para participar en la fototransducción (Leung *y cols*, 2008)

Toda esta evidencia experimental permite proponer el siguiente mecanismo de activación de los canales TRP y TRPL, el cual se ilustra en la figura 23.

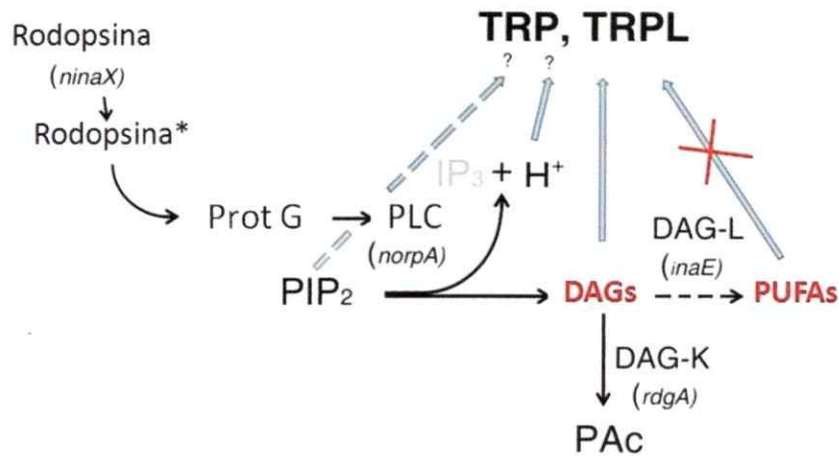


Figura 23. Modelo del mecanismo de activación de los canales de transducción TRP y TRPL. El aporte fundamental de esta tesis fue la determinación del DAG y de los PUFAS involucrados en la fototransducción. No hay trabajos precedentes de esta naturaleza en este campo de investigación.

5.3 Perfiles de ácidos grasos de fosfolípidos, triacilgliceroles y ésteres de esteroil

5.31. Fosfolípidos

En la fracción de fosfolípidos de membranas rabdoméricas de ojos de moscas silvestres, el 68% de los ácidos grasos son insaturados (AGI), similar a las razones encontradas en células de mamíferos (Klenk y Choppin, 1970). Este resultado posee amplio apoyo. En cabezas de moscas adultas los AGI representan el 61% de los ácidos grasos totales de los fosfolípidos (Yoshioka y cols, 1985). En cuerpos completos de larvas y prepupas los AGI representaron el 73,0% de ácidos grasos de fosfolípidos (Jones y cols, 1992). En cuerpos y cabezas de moscas recién eclosionadas observaron que el 70,8% de los ácidos grasos de fosfolípidos eran insaturados (Stark y cols, 1993). En embriones de *Drosophila*, encontraron que los AGI representaron el 63% de los ácidos grasos de fosfolípidos (Rietveld y cols, 1999). En el cuerpo completo de moscas adultas observaron que el 71% de los ácidos grasos de fosfolípidos son insaturados (Parisi y cols, 2011). En esta tesis, las moscas mutantes *Gaq¹;Gβe¹* presentaron

diferencias significativas con las moscas silvestres, ya que los AGI representan sólo el 51% de los ácidos grasos de los fosfolípidos (Fig. 18C). Los porcentajes observados en *D. melanogaster* se relacionan con estudios en otro díptero llamado *Eurosta solidaginis*, donde se reportó que el 60% de los ácidos grasos de fosfolípidos eran insaturados (Bennet y cols, 1997).

El ácido graso más largo fue C₁₈, mientras que en mamíferos se han observado cadenas aciles con más de C₂₄. Los ácidos C_{15:0}, C_{17:0} y C_{20:0} sólo fueron detectados en Yoshioka y cols, (1985) y su identificación es cuestionable, ya que ésta se realizó sólo en base al T_R en la cromatografía gaseosa. En esta tesis, se identificaron dos picos cromatográficos con tiempos de retención de 12,4 y 14,5 minutos, que posiblemente correspondían a C_{20:0} y C_{22:0}, los cuales fueron descartados por su baja abundancia.

En general, los porcentajes de ácidos grasos encontrados en esta tesis son concordantes con los datos publicados anteriormente., aunque algunos ácidos grasos presentaron diferencias porcentuales. El primero fue el ácido C_{16:1}. Algunos estudios reportaron que los dípteros se caracterizaban por poseer altos niveles de este ácido graso en moscas completas (Barlow J, 1964), sin embargo, no todos los dípteros compartían esta característica (Fast, 1966). Varios estudios han determinado que este ácido graso representa un porcentaje $\geq 10\%$ de los ácidos grasos en los fosfolípidos de *Drosophila* (Yoshioka y cols, 1985; Stark y cols, 1993; Rietveld y cols, 1999). No obstante, en esta tesis no se logró ver una abundancia alta de C_{16:1} (ver Fig. 18). Sólo en los fosfoinosítoles (PI) estudiados por Jones y cols, (1992), se observó un porcentaje similar a este estudio. Otro ácido graso controversial es el C_{14:0}. En esta tesis, no se detectó en los fosfolípidos de ojos de mosca. Se observó un pequeño pico cromatográfico con un T_R idéntico al C_{14:0} pero su abundancia era tan baja que se descartó. En la literatura se ha observado una baja proporción de este ácido graso (1-3%, Hammad y cols, 2011, Yoshioka y cols, 1985 y Stark y cols, 1993) y una alta proporción (10%) fue sólo reportado por Rietveld y cols, (1999). El C_{14:1} sólo ha sido identificado por investigadores que han usado equipos más

sensibles (Rietveld *y cols*, 1999, Hammad *y cols*, 2011). Ese hallazgo no fue reafirmado en esta tesis. También mostraron diferencias los PUFAs C₁₈. El C_{18:2} fue muy abundante, al igual que en Jones *y cols*, (1992) en las muestras silvestres. No obstante, la mayoría de los estudios reportó una abundancia similar al mutante (~25%). Por otra parte, en esta tesis los niveles C_{18:3} fueron sustanciales, al igual que en Stark *y cols*, (1993) y contrario a lo descrito por otras publicaciones. Este ácido graso es considerado una traza en otros dípteros como en *Eurosta solidaginis* donde representa el 1,2-1,8% de los ácidos grasos de fosfolípidos (Bennet *y cols*, 1997).

Hay diferencias estructurales entre las moscas silvestres (adaptadas a oscuridad o luz) y las moscas mutantes, ya que en las últimas no se detectó C_{16:1} y los otros ácidos grasos insaturados están disminuidos. (Fig. 18).

Hay varios estudios sobre los principales lípidos de *Drosophila* pero nada sobre membranas fotosensibles especializadas. No obstante, hay un reporte sobre el equivalente funcional del rabdómero en vertebrados: los discos del segmento externo de los fotorreceptores. Estos discos corresponden a una membrana fotosensible derivada de un cilio modificado ubicado en la zona apical del fotorreceptor. La composición de ácidos grasos de estas membranas difieren de la membrana plasmática de los bastones de bovino, mostrando un enriquecimiento del PUFA C_{22:6} en el segmento externo, el cual es siete veces más abundante (Boesze-Battaglia *y Albert*, 1989). Las principales diferencias entre los ácidos grasos encontrados en los rabdómeros de *Drosophila* y en los discos de vertebrados son las proporciones de los ácidos grasos insaturados. En vertebrados, los más abundantes son los PUFAs C₂₀ y C₂₂ (C_{20:4}, C_{22:n}, C_{22:6}), los cuales representan el 51,2% de los ácidos grasos totales; estos no han sido detectados en la mosca. En moscas silvestres y la mutante, los ácidos grasos provenientes del C₁₈ (C_{18:1}, C_{18:2} y C_{18:3} representan el 66% y 49%, respectivamente). Si sólo se comparan los PUFAs, C_{18:2} y C_{18:3} en moscas silvestres y mutantes, los porcentajes descienden a 44% y 31%, respectivamente, demostrando la importancia del C_{18:1} en los rabdómeros, mientras que los

PUFAS C₁₈ sólo representan el 7,4% de la muestra en los vertebrados. En los vertebrados la abundancia de los MUFAs es baja (el C18:1 representa sólo el 5% de los ácidos grasos totales y el C16:1 no es detectado). No hay diferencias en los ácidos grasos saturados entre vertebrados y moscas silvestres, pero sí en la mutante.

5.32. Triacilgliceroles

Los triacilglicéridos no son lípidos importantes de membranas. No obstante, en esta tesis fueron observados en la fracción enriquecida en membranas rabdoméricas de *D. melanogaster* utilizando dos técnicas analíticas distintas: cromatografía gaseosa-espectrometría de masas (GC-MS) y cromatografía en capa fina (TLC). Esto sirvió para corroborar su identificación y descartar que los ácidos grasos medidos sean artefactos (Fig. 19). Al igual que en los otros lípidos, el ácido graso más largo es un C₁₈, mientras que en mamíferos se han observado cadenas aciles C₂₄. Los valores encontrados en este estudio son concordantes con los obtenidos en distintos tejidos (Stark y cols, 1993; Parisi y cols, 2011) y en distintos estados del desarrollo de *Drosophila melanogaster* (Jones y cols, 1992). Se observó que los triacilgliceroles se caracterizaron por estar enriquecidos en C14:0 y C16:1. El primero fue menos abundante en las moscas silvestres que lo reportado (> 15%), mientras que en la mutante se observó sobre el 20% igual que Jones y cols, (1993) y Stark y cols, (1993).

En este estudio no se detectó C18:3, probablemente, debido a su baja abundancia. En el díptero *Eurosta solidaginis*, C18:3 fue detectado a nivel de traza (<1%) en triacilgliceroles (Bennett y cols, 1997). Otro estudio reveló que el ~60% del total de ácidos grasos de los triacilgliceroles corresponde a ácidos grasos saturados, el 35% a MUFAs y un 5% a PUFAs (Parisi y cols, 2011). En esta tesis los ácidos grasos saturados y MUFAs difieren ampliamente de esos valores (42 y 51%, respectivamente).

5.33. Esteres de esteroles

Los ésteres de esteroles detectados en este estudio tuvieron una abundancia bajísima, siendo considerados trazas en las muestras (<1% de los ácidos grasos totales). La composición de los ésteres de esteroles reveló la presencia de dos ácidos grasos saturados (ácido palmítico y esteárico). Este estudio reveló que los ácidos grasos de los ésteres de esteroles no aumentaron con la luz. Sólo hay un reporte sobre los ácidos grasos asociados a esteroides en *Drosophila* y en él se observó diferencias asociadas al sexo de las moscas. En los machos el 45% de los ácidos grasos fue insaturado y en las hembras el 80%. Ambos valores difieren completamente de los resultados obtenidos en esta tesis (Parisi y cols, 2011). Además, se reportó que estos lípidos representaban el 5% de los lípidos totales de las muestras, un valor lejano al 0,8% detectado en esta tesis, el cual fue considerado “traza”. Como se ha comentado antes, Parisi y cols, (2011) no especifica la metodología utilizada, lo que dificulta la interpretación de sus resultados. Además, este grupo presenta diferencias con el resto de los estudios de lípidos realizados en *Drosophila* (Stark y cols, 1993; Rietveld y cols, 1999; Hammad y cols, 2011).

5.4 Carencia de PUFAs C₂₀ y C₂₂ en *Drosophila*

Todos los animales y plantas pueden generar ácidos grasos saturados, ya que la biosíntesis de ácidos grasos a partir de malonil-CoA y su posterior elongación, es un proceso compartido; de esta forma animales y plantas pueden generar ácido C_{16:0} y C_{18:0}. Luego, la esteroil-CoA desaturasa, conocida como Δ -9 desaturasa, adiciona un doble enlace en el carbono 9, produciendo C_{18:1}(ω -9). Sin embargo, el resto de las desaturasas son específicas de plantas o de animales. La fig: 24 muestra la divergencia de las desaturasas. En plantas, es común que un doble enlace sea insertado entre un doble enlace existente y el grupo metilo de ácido graso. Sin embargo, en animales ocurre todo lo contrario, ya que un enlace doble adicional sólo puede ser formado entre un enlace doble existente y el grupo carboxilo.

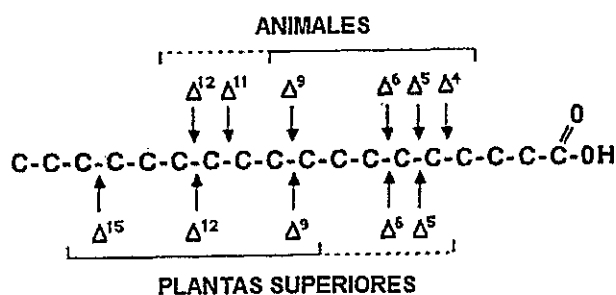


Figura 24. Resumen de las desaturasas encontradas en animales y plantas. En general, las plantas superiores poseen las desaturasas Δ_{12} y Δ_{15} , las cuales generan los ácidos grasos esenciales C18:2 y C18:3. Los animales, poseen las desaturasas Δ_4 , Δ_5 y Δ_6 , las cuales producen los PUFAs C20:4, C20:5 y C22:6. Sin embargo, esta distinción ha sido ofuscada por la presencia de las desaturasas Δ_5 y Δ_6 en ciertas plantas y por las desaturasas Δ_{11} y Δ_{12} en algunos insectos de los órdenes optóptera, homóptera, isóptera y neuróptera (figura modificada de Stanley-Samuelson *y cols*, 1988).

Además de los esteroides, la mayoría de los insectos que no realizan simbiosis requieren ácidos grasos esenciales en su dieta (Stanley-Samuelson *y cols*, 1988). Hay un estudio que muestra que *Drosophila melanogaster* no requiere PUFAs en la dieta, ya que diez generaciones de moscas crecidas en una dieta axénica (sin PUFAs ni organismos vivos), se desarrollaban de forma normal, sugiriendo que esta especie carece de este requerimiento (Rapport *y cols*, 1984). Además, si las moscas son crecidas en un medio suplementado con los ácidos grasos esenciales: C18:2 y C18:3, no se observan PUFAs C₂₀ y C₂₂ en los distintos tejidos de la mosca completa, como se pensaría si éstos fueran vitales (Shen *y cols*, 1992). Con esos datos, se hizo un análisis bioinformático del genoma de *Drosophila* y encontró que la mosca no tiene las desaturasas Δ_5 y Δ_6 , como el resto de los animales (mamíferos, nemátodos) y otros organismos (hongos, levaduras, protistas marinos, microalgas y musgos; Shen *y cols*, 2010). Esto hace que las moscas sean más semejantes a las plantas que a los animales, lo cual es lógico ya que la mosca es vegetariana. Lo extraordinario de esto es que *Drosophila* no requiere de PUFAs C₂₀ y C₂₂ para la formación de

eicosanoides y otros metabolitos oxigenados, los cuales son considerados de gran significancia en los animales. La ausencia de PUFAs C₂₀ y C₂₂ en *D. melanogaster*, encontrada en esta tesis fue concordante con varias publicaciones anteriores: Yoshioka *y cols*, (1985); Stark *y cols*, (1993); Rietveld *y cols*, (1999); Shen *y cols*, (2010) y Hammad *y cols*, (2011). Hay sólo 15 especies de insectos - pertenecientes a los órdenes: ortóptera, homóptera, isóptera y neuróptera- que pueden sintetizar el ácido graso esencial C18:2 (Stanley-Samuelson, 1988). Muestras de células humanas analizadas con este mismo protocolo identificaron PUFAs C20:3 (ácido dihomo- γ -linolénico), C20:4, C20:5 y C22:6, con sus respectivos T_R, indicando que el hecho de no identificar estos ácidos grasos en las muestras de mosca se debe a que esos ácidos grasos no están presentes y no es problema de la metodología utilizada (datos no publicados de Karen Fuenzalida, laboratorio del Dr. Miguel Bronfman).

5.5. Proyecciones de este trabajo

Por lo tanto, el presente estudio es pionero en cuanto a la determinación de estos lípidos. Este trabajo sustenta la idea que los DAG son los lípidos relevantes en la activación de los canales TRP y TRPL, aunque el mecanismo por el cual el DAG activa a los canales es una pregunta aún pendiente y que debiera ser abordado. Además, sería importante determinar si están presentes en los rabdómeros las enzimas que generan PUFAs (DAGL) y las que lo degradan (lipooxigenasa y ciclooxigenasa), ya que éstas últimas son necesarias para evitar la acumulación de los PUFA en el rabdómero. Se ha especulado la presencia de estas enzimas en los fotorreceptores (Leung *y cols*, 2008; Chyb *y cols*, 1999), sin embargo, no existen pruebas experimentales de su existencia. Estas proteínas pueden ser determinadas mediante proteómica de la muestra enriquecida en rabdómeros. El estudio de los fosfoinositoles (particularmente PIP₂) en las muestras enriquecidas en rabdómeros de *D. melanogaster* también es un tema que quedó pendiente. La baja abundancia de este fosfolípido en las membranas (según lo descrito en

mamíferos) y su carga, provoca una gran dificultad metodológica, ya que se requiere una gran cantidad de muestra, estabilización en la extracción y técnicas analíticas sofisticadas.

CONCLUSIONES

- Se logró obtener una muestra enriquecida en membranas rabadómicas mediante centrifugación diferencial.
- El análisis cuantitativo del perfil de ácidos grasos de la fracción lipídica “ácidos grasos libres” de los rabadómeros, reveló que los dos PUFAs presentes en la muestra (C18:2 y C18:3), no cambian en respuesta a la luz.
- El análisis de los DAGs (mediante UPLC-MS) reveló la presencia de cuatro especies de DAGs, las cuales fueron concordantes con los ácidos grasos encontrados en el perfil de ácidos grasos de los mono y diacilgliceroles. De estas cuatro especies, sólo DAG-34:1 (1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicerol) alteró su contenido con la luz. La abundancia del DAG-34:1 es extremadamente baja y su estructura es similar a la parte hidrofóbica de los fosfoinosítidos de *Drosophila* descritos recientemente, mientras que los otros DAGs retienen una estructura similar a los triacilgliceroles. Las abundancias de los diacilgliceroles encontrados fue la siguiente: DAG-34:0 > DAG-36:0 > DAG-32:0 > DAG-34:1.
- Debido a la baja abundancia de los DAGs en las muestras de rabadómeros no fue posible detectarlos con cromatografía en capa fina, a pesar de ocupar una muestra concentrada. Además, la escasez de dobles enlaces que presentan estos DAGs dificulta su identificación mediante HPLC con el detector de luz ultravioleta, ya que la molécula en sí no posee más cromóforos que faciliten su

identificación a longitudes de onda cercanas a los 205 nm.

- Se identificaron siete diferentes ácidos grasos: ácido mirístico (14:0), ácido palmítico (16:0), ácido palmitoleico (16:1 ω -7), ácido esteárico (18:0), ácido oleico (18:2 ω -9), ácido linoleico (18:2 ω -6) y α -linolénico (18:3 ω -3), los cuales provienen de los fosfolípidos, mono, di y triacilgliceroles (TAGs), ácidos grasos libres (AGL) y esteres de esteroles (EE).
- No se detectó ácido araquidónico (20:4 ω -6), ácido eicosapentanoico (20:5 ω -3), ácido docosahexaenoico (22:6 ω -3) ni ningún otro ácido graso poliinsaturado C₂₀ o C₂₂ en ninguno de los lípidos presentes en los rbdómeros. En mamíferos esos PUFAs son importantes componentes estructurales de membranas.
- Se determinó que las fracciones que presentaron mayor abundancia de ácidos grasos fueron los triacilgliceroles y fosfolípidos. La proporción “fosfolípidos/triacilgliceroles” reveló que los fosfolípidos son los lípidos más abundantes de las muestras de membranas rbdoméricas en las tres condiciones experimentales, manteniéndose en una proporción de 1,1 a 1,4. Los ácidos grasos libres, mono-diacilgliceroles y esteres de esteroles fueron mucho menos abundantes en las muestras y en conjunto representaron ~20% en moscas silvestres y el 40% en las moscas mutantes.
- Se observó un déficit de ácidos grasos insaturados en las moscas mutantes. En esta cepa el 46% de los ácidos grasos totales fueron insaturados mientras que estos ácidos grasos representaron el 58% en las moscas silvestres. Esto generó diferencias significativas ($p < 0,01$).

- En los rabdómeros de las moscas silvestres y mutantes, los ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs) fueron más abundantes que los PUFAs (66 y 34%, respectivamente).
- Sobre los ácidos grasos de las muestras de rabdómeros de moscas silvestres y mutantes, los más abundantes fueron: ácido palmítico (C16:0, saturado), oleico (C18:1, monoinsaturado) y ácido linoleico (C18:2, poliinsaturado).
- El perfil de ácidos grasos de los mono-diacilgliceroles (MDAG) de los rabdómeros de moscas silvestres y mutantes reveló la presencia de sólo 3 ácidos grasos (C16:0, C18:0 y C18:1), donde ninguno de ellos es un PUFA. Los ácidos grasos saturados representaron el 80% y los monoinsaturados el 20%. No hubo cambios en estos ácidos grasos en respuesta a la luz, posiblemente debido a la poca sensibilidad del equipo.
- El perfil de ácidos grasos de los fosfolípidos de moscas silvestres, evidenció la presencia de 6 ácidos grasos (C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2 y C18:3). La mosca mutante tuvo los mismos ácidos grasos excepto el C16:1. En las moscas silvestres hubo una mayor abundancia de ácidos grasos insaturados (~70%) que saturados. Al contrario, las moscas mutantes presentaron una proporción de ácidos grasos saturados e insaturados prácticamente idéntica (51 y 49%, respectivamente). Esta diferencia entre moscas silvestres y moscas mutantes es significativa ($p < 0,001$). Además, esta fracción lipídica se caracterizó por una mayor abundancia de PUFAs que MUFAs. Ninguno de los ácidos grasos de los fosfolípidos presentó cambios en respuesta a la luz.

- El perfil de ácidos grasos de los triacilgliceroles (TAG) de las moscas silvestres y mutantes evidenció la presencia de 6 ácidos grasos (C14:0, C16:0, C16:1, C18:0, C18:0 y C18:2), donde el C14:0 y el C16:1 fueron significativamente más abundantes que en otras fracciones lipídicas. Por el contrario, el C18:0 presentó una baja abundancia comparado con el resto de los lípidos de los rabdómeros. Esta fracción se caracterizó por una mayor abundancia de MUFAs que PUFAs y al igual que los fosfolípidos, las moscas silvestres poseen una mayor abundancia de ácidos grasos insaturados que las mutantes, lo que genera diferencias significativas entre estas cepas ($p < 0,001$).
- El perfil de ácidos grasos de los esteres de esterol (EE) de las moscas silvestres y mutantes reveló la presencia de sólo 2 ácidos grasos, ambos saturados (C16:0 y C18:0), los cuales no sufrieron cambios en respuesta a la luz. Estos ácidos grasos presentaron una baja abundancia (~1% de los ácidos grasos totales) en los rabdómeros (son lípidos traza). No se observó diferencias significativas entre moscas silvestres y mutantes.

ANEXO

7.1 IMPLEMENTACION DE UN PROTOCOLO PARA OBTENER FRACCIONES ENRIQUECIDAS EN MEMBRANAS DE RABDÓMERO

Ya que se deseaba mantener intactos los rabdómeros para realizar el análisis cromatográfico posterior, se ensayaron múltiples protocolos basados en las propiedades similares entre las membranas rabdómicas y las membranas de la mielina. Después de haber probado protocolos de ultracentrifugación y centrifugación en gradiente de sacarosa que no funcionaron, se decidió utilizar centrifugación diferencial, con el fin de lograr un enriquecimiento satisfactorio. Los ensayos realizados fueron de prueba y error, observando el enriquecimiento en membranas rabdómicas mediante inmunodetección.

Para ello, lo primero que se probó fue dos centrifugaciones: una a 2.370xg (5.000 rpm) por 10 minutos (donde se obtuvo S1 y P1) seguido por una segunda centrifugación a 18.620xg (14.000 rpm) por 10 minutos, obteniéndose S2 y P2. Se usaron como controles positivos el homogenizado de ojos y una muestra de ojos intactos y como control negativo las cabezas de moscas a las cuales se le extrajeron los ojos (Figura 25A).

Se observa que el control negativo "cabezas sin ojos" mostró inmunoreactividad positiva. Una posible causa de esto pueden haber sido restos de retinas en las cabezas de moscas, ya que hay publicaciones que demuestran que han encontrado al canal TRP en la lámina y médula de los fotorreceptores de mosca (Pollock y cols, 1995, Astorga y cols, (publicación en prensa)). El control positivo "homogenizado de ojos" presentó baja inmunoreactividad para la proteína TRP, mientras que el otro control positivo, "ojos completos", resultó ser un excelente control; sin embargo, debido a que la obtención de los ojos es laboriosa, resultó difícil seguir ocupando esa muestra.

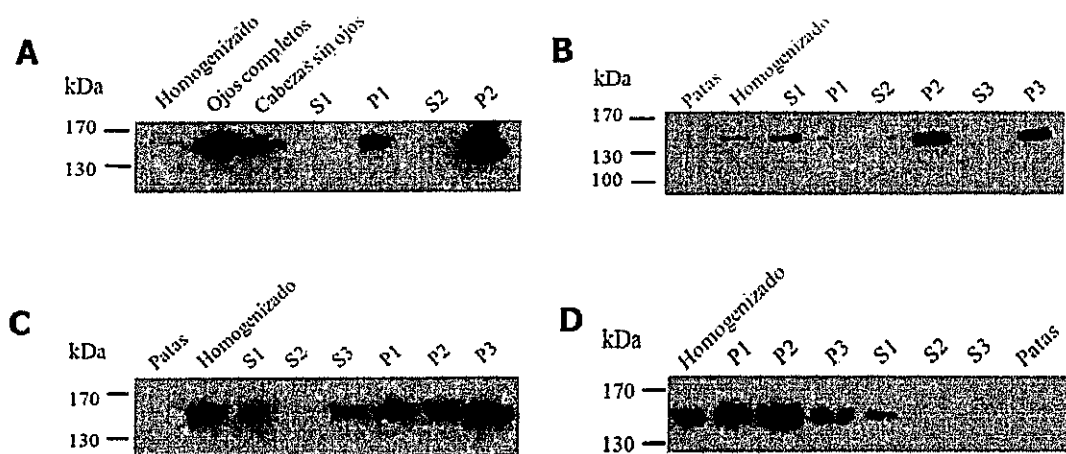


Figura 25. Obtención de membranas enriquecidas en rabdómeros. A-D, Análisis mediante inmunodetección usando un anticuerpo monoclonal anti-TRP (1:200) como marcador de rabdómeros. La marca observada corresponde a un valor estimado de 143 kDa. **A,** S1 y P1 (2.370xg por 10 min), S2 y P2 (18.620xg por 10 min), homogenizado de ojos y ojos intactos (controles positivos), cabeza sin ojos (control negativo). **B,** S1 y P1 (10xg por 5 min), S2 y P2 (2.370xg por 1 min), S3 y P3 (2.370xg por 10 min), homogenizado (control positivo), patas (control negativo). **C,** S1 y P1 (10xg por 5 min), S2 y P2 (10xg por 5 min + 2.370xg por 5 min), S3 y P3 (10xg por 10 min), homogenizado (control positivo), patas (control negativo). **D,** S1 y P1 (10xg por 10 min), S2 y P2 (10xg por 10 min + 2.370xg por 5 min), S3 y P3 (10xg por 10 min + 2.370xg por 5 min + 18620xg por 15 min), homogenizado de ojos (control positivo), patas (control negativo).

Desde el punto de vista analítico, el control positivo correcto corresponde al homogenizado de ojos, debido que es a partir de éste del que se obtienen las fracciones enriquecidas en rabdómeros. Sin embargo, se debe considerar que en este experimento no funcionó de forma correcta, posiblemente debido a problemas en desnaturación de las proteínas de esta muestra, lo que produjo una migración anómala de la proteína TRP la cual quedó en el gel concentrador. Se observó que el marcador de las membranas rabdoméricas se encontró en los pellets de las centrifugaciones, lo cual sugiere que los rabdómeros son estructuras densas y

compactas y que precipitan como un bloque, ya que no se observó marca en los sobrenadantes. Esta distribución generó la idea de acoplar centrifugaciones para enriquecer cada vez más la fracción de rabdómeros. Para ello se debía probar una centrifugación lenta durante varios minutos, en donde se supuso que los rabdómeros deberían flotar, seguida de una centrifugación intermedia para precipitarlos. Por lo tanto, fue necesario esclarecer cual era mejor estrategia: un tiempo corto o largo de centrifugación. Así, se realizaron tres experimentos usando centrifugaciones: la primera fue lenta a 10xg (300 rpm) por 5 minutos, donde se obtuvo S1 y P1; las siguientes a 2.370xg (5.000 rpm) siendo la segunda de 1 minuto (obteniéndose S2 y P2), y la tercera por 10 minutos, obteniéndose S3 y P3 (Figura 25B). Se observó que el nuevo control negativo "patas de mosca" no presentó inmunoreactividad para TRP, por lo tanto este control se usó de ese momento en adelante. El control positivo "homogenizado de ojos" presentó inmunoreactividad para TRP, al contrario que la vez anterior aunque la banda fue débil lo que realza que no aprecia una alta concentración. Pese a un protocolo de desnaturación más agresivo (proteínas fueron hervidas a 95°C por 15 minutos), se observó que persistieron los problemas de desnaturación. La banda del TRP que se observó en los pellets fue más intensa lo que denota una mayor concentración con respecto al homogenizado de ojos. En las fracciones S1, P2 y P3 apareció una banda intensa con un tamaño estimado de 143 kDa, tal como se esperaba. Estos resultados sugieren que rabdómeros flotaron cuando fueron centrifugados a baja velocidad y precipitaron a velocidades medias, independiente del tiempo de centrifugación. Debido a esto, se decidió acoplar la centrifugación lenta (10xg por 5 minutos) a la centrifugación media de 2.370xg por 5 minutos. La primera centrifugación permitiría mantener los rabdómeros en el sobrenadante mientras se eliminan otros restos del tejido en el P1 y la segunda centrifugación haría que estas estructuras precipitaran en el pellet, concentrándose las membranas rabdoméricas en el P2. La primera centrifugación generó S1 y P1 y la segunda centrifugación a S2 y P2. Independientemente, se realizó una centrifugación lenta de 10xg por 10 minutos para observar si

la banda de TRP era más densa. Esta centrifugación generó S3 y P3 (Figura 25C). Se obtuvo membranas rabadómicas en todas las centrifugaciones, salvo en el S2, implicando que todas las membranas rabadómicas habían precipitado después de la segunda centrifugación y no había quedado nada en suspensión. Se observó una intensa banda en P1 por lo que se debía realizar esa centrifugación en un tiempo mayor para que más membranas rabadómicas flotaran y después precipitaran en P2. Al aumentar el tiempo de la centrifugación lenta al doble, se observó que la banda del sobrenadante fue mayor. Por lo tanto, se dedujo que la condición óptima era una centrifugación lenta de 10xg por 10 minutos acoplada a la centrifugación media 2.370xg por 5 minutos. Esta combinación de centrifugaciones generaría una fracción altamente enriquecida en membranas rabadómicas, ya que todas las membranas presentes en el sobrenadante de la centrifugación lenta podrían ser precipitadas en la centrifugación media siguiente, si ésta última se realizaba durante varios minutos. Luego de probar múltiples condiciones para el protocolo escogido, llegamos a uno satisfactorio el cual consistió en la centrifugación lenta de 10xg por 10 minutos, acoplada a una centrifugación media de 2.370xg por 5 minutos y una última centrifugación rápida de 18.620xg (14.000 rpm) por 15 minutos. La última centrifugación permitiría precipitar aquellas membranas que podían quedar en suspensión después de la centrifugación media. Con este protocolo se esperaba una enorme banda de TRP (enriquecimiento) en la fracción P2. La primera centrifugación generó S1 y P1, la segunda centrifugación a S2 y P2 y la tercera centrifugación a S3 y P3 (Figura 25D). Se observó que apareció una banda en todos los pellets y en S1, sin embargo, la banda más intensa fue en P2. Fue difícil que las todas las membranas rabadómicas flotaran en la centrifugación lenta. La pesada estructura siempre hacía que precipitaran al fondo del tubo, como un hecho inevitable ya que no se podía centrifugar a menor velocidad.

7.2 IDENTIFICACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS EN LAS MUESTRAS DE RABDÓMEROS

7.21. Tiempos de retención de los ácidos grasos

En la Tabla 12 se muestran los tiempos de retención, en la columna cromatográfica INNOWAX que permite separar ácidos grasos que contienen desde 12 hasta 24 carbonos incluidos aquellos que presentan insaturaciones, de los ácidos grasos detectados en la fracción P2 de moscas silvestres adaptadas a la oscuridad, a la luz y la mutante *Gaq¹;G β e¹*. Los tiempos de retención presentaron una ligera variación (centésimas de minuto) cada vez que se cambió la columna cromatográfica.

Tabla 12. Tiempos de retención (T_R) de los ácidos grasos identificados en la fracción P2 de las moscas silvestres y mutantes de la proteína G.

<i>Ácidos grasos A:B</i>	<i>Tiempo de retención [min]</i>
14:0	4,63 \pm 0,01
15:0	5,48 \pm 0,03
16:0	6,49 \pm 0,03
16:1	6,83 \pm 0,03
17:0	7,79 \pm 0,03
18:0	9,46 \pm 0,06
18:1	9,85 \pm 0,04
18:2	10,60 \pm 0,05
18:3	11,50 \pm 0,14
19:0	11,10 \pm 0,03

A corresponde al número de carbonos del ácido graso y B es el número de dobles enlaces presentes.

7.22. Detección de los metil-ésteres de ácidos grasos según sus espectros de masa

En la caracterización de los ácidos grasos provenientes de los diferentes lípidos presentes en las muestras de rabdómeros (fracción P2) se identificaron 7 ácidos grasos pertenecientes a ácidos grasos saturados, monoinsaturados (MUFAs) y poliinsaturados (PUFAs). En las moscas silvestres se identificaron siete ácidos grasos y en la mutante seis, con una

sensibilidad del orden de ng de muestra. Los ácidos grasos saturados fueron: ácido mirístico (C14:0), palmítico (C16:0) y esteárico (C18:0); los MUFAs fueron: ácido palmitoleico (C16:1(ω -7)) y oleico (C18:2(ω -9)) y los PUFAs fueron: ácido linoleico (C18:2(ω -6)) y α -linolénico (C18:3(ω -3)). El método y los criterios de identificación de los compuestos se muestran a continuación. Los espectros de masa de cada ácido graso fueron contrastados con los espectros de masa de la biblioteca específica de metil-ácidos grasos (NBS75K.L). Se utilizaron ácidos grasos de cadena impar como estándares internos, los cuales experimentaron el mismo procedimiento que la muestra. Para cuantificar los ácidos grasos libres se usó ácido nonadecanoico (C19:0) y los ácidos penta y heptadecanoico (C15:0 y C17:0), para cuantificar fosfolípidos, triacilgliceroles (TAG), mono y diacilgliceroles (MDAG) y ésteres de esteroles (EE). Los espectros de masa de los estándares internos también se muestran a continuación.

7.221. Ácidos grasos saturados y estándares internos

Si bien el espectro de masas experimental de un compuesto se puede parecer a varios espectros de masa de distintos compuestos presentes en la biblioteca, existen fragmentos que son característicos de un compuesto por su abundancia en el espectro. Por ejemplo, los derivados metil-ésteres de ácidos grasos de cadenas saturadas son fácilmente identificados por espectrometría de masas ya que sus espectros se caracterizan por la presencia de un ión molecular* prominente (M^+) y otros fragmentos con abundancias significativas como el fragmento $m/z = 74$, conocido como ión del rearrreglo de McLafferty** y los fragmentos típicos $m/z = 55, 87, 143$ y 199 una. La figura 26, muestra el espectro de masas experimental del metil-ácido octadecanoico (C18:0) y el espectro de masas de ese ácido graso presente en la biblioteca de lípidos NBS75K.L. Además del C18:0, en las muestras se detectaron los ácidos palmítico (C16:0, Fig. 27) y mirístico (C14:0, Fig.28).

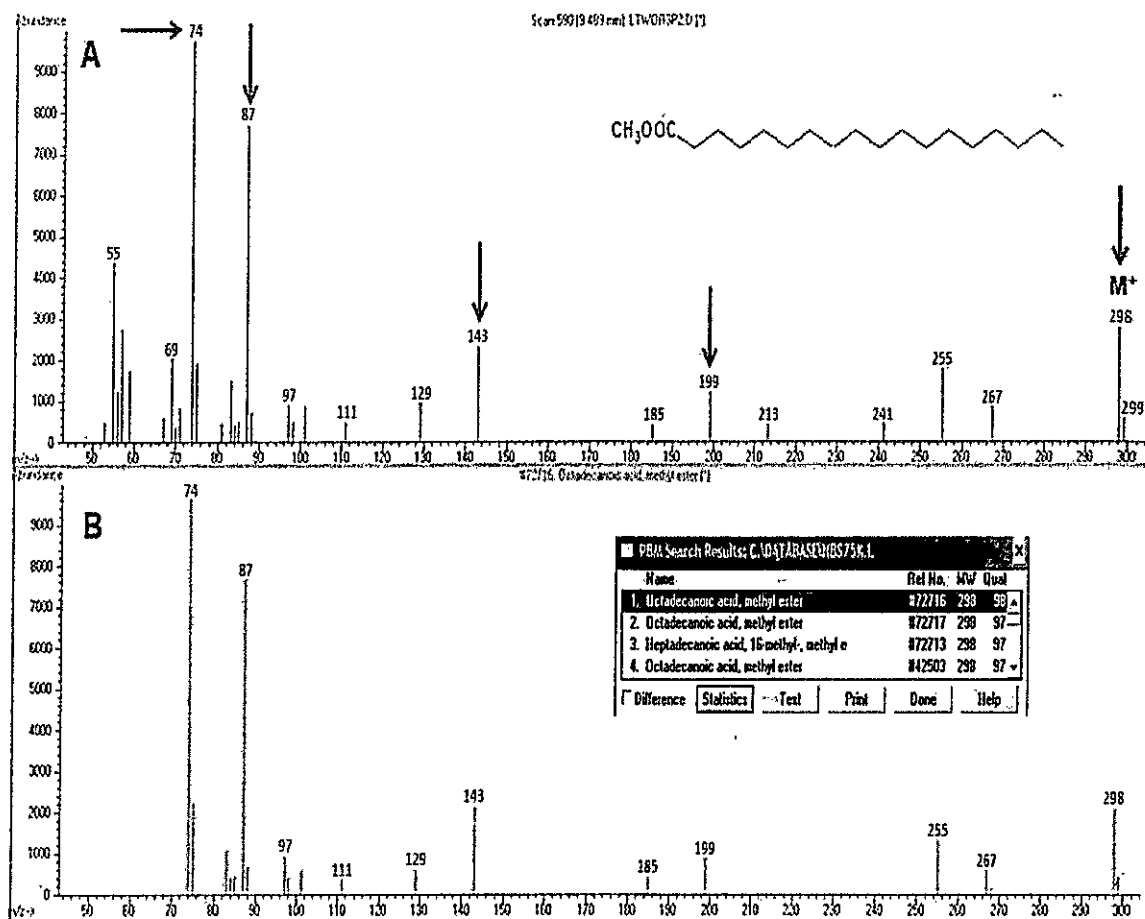


Figura 26. Identificación del metil-ácido octadecanoico (me-C18:0) presente en la fracción P2 a partir de su espectro de masas. A, espectro de masas obtenido de forma experimental. B, espectro de masas del metil-ácido octadecanoico en la biblioteca NBS75K.L. Las flechas indican los iones característicos, M⁺ es el ión molecular ($m/z = 298$).

*El ión molecular es un ión que representa el peso molecular del analito y su aparición depende de la estabilidad del compuesto. La masa del ión molecular está basada en la masa del isótopo más abundante para cada elemento de la molécula. Este no es el peso atómico de la molécula pues éste es un valor redondeado del número entero más cercano, llamado masa nominal. El ión molecular es identificado como aquel ión con la razón m/z más alta. El ión molecular no es necesariamente el de mayor abundancia, ya que éste corresponde al pico base del espectro de masas.

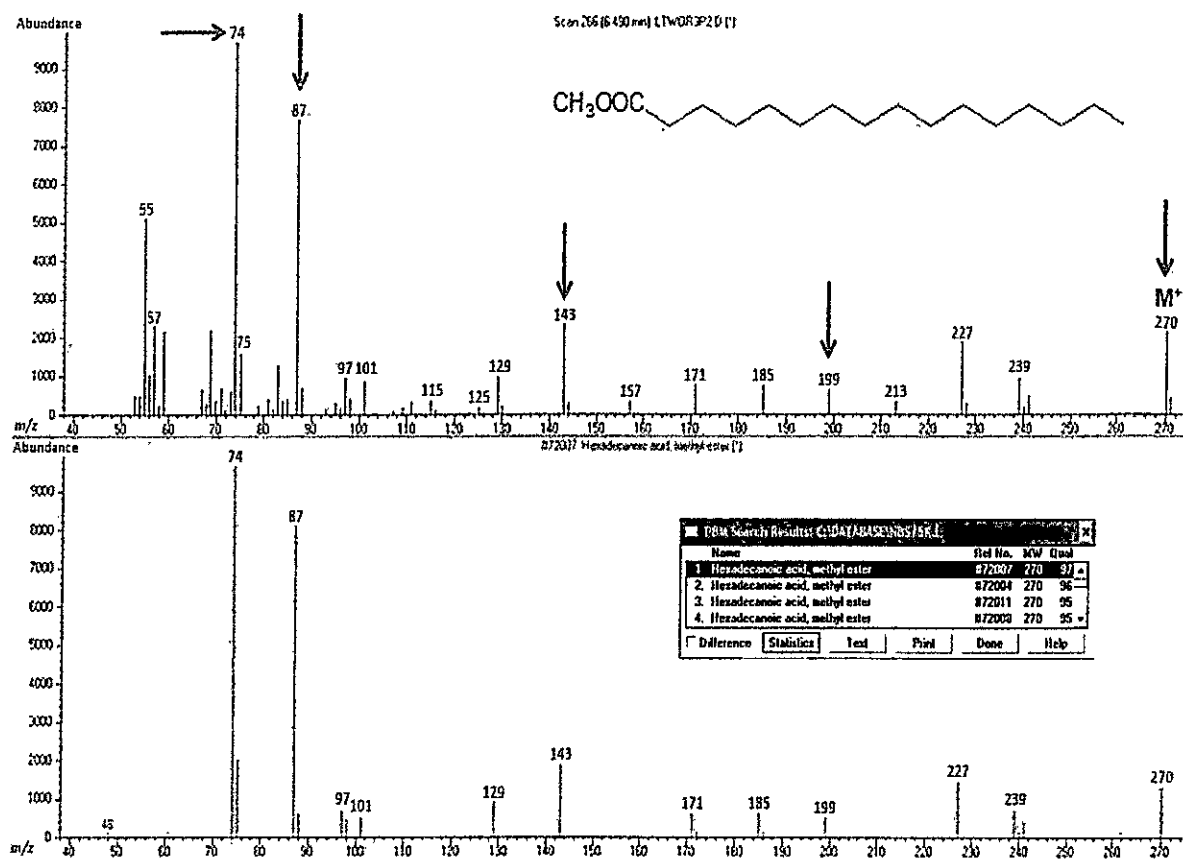


Figura 27. Identificación del metil-ácido hexadecanoico (me-C16:0) presente en la fracción P2 a partir de su espectro de masas. A, espectro de masas experimental. B, espectro de masas del metil-ácido hexadecanoico en la biblioteca NBS75K.L. Las flechas indican los iones característicos, M⁺ es el ión molecular ($m/z = 270$).

**El arreglo de McLafferty es un arreglo que resulta en la formación de una molécula neutra intacta y un ión radical con una relación m/z impar. En general se observa en compuestos carbonilos que contienen una cadena alquílica lineal. Esta reacción es energéticamente favorable, ya que resulta en la pérdida de un alqueno neutro y en la formación de un alqueno radical estabilizado por resonancia.

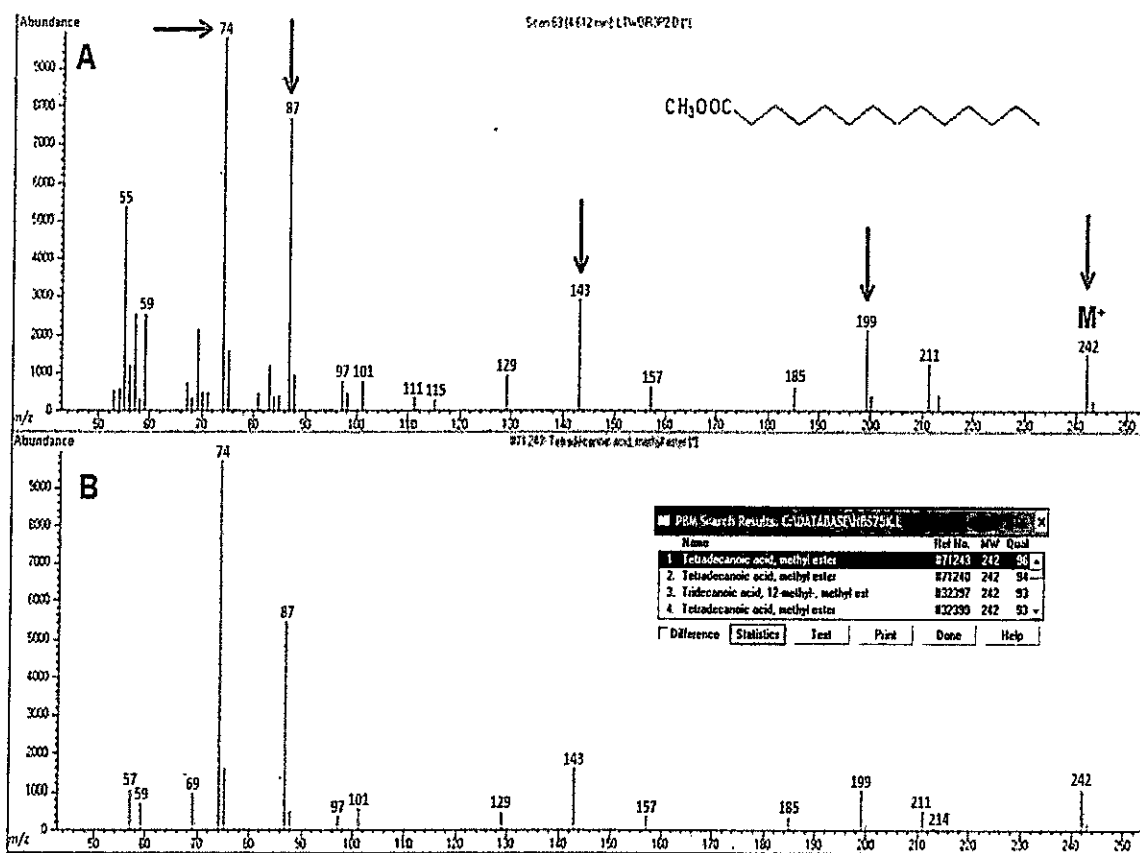


Figura 28. Identificación del metil-ácido tetradecanoico (me-C14:0) presente en la fracción P2 a partir de su espectro de masas. A, espectro de masas experimental. B, espectro de masas del metil-ácido tetradecanoico en la biblioteca NBS75K.L. Las flechas indican los iones característicos, M⁺ es el ión molecular ($m/z = 242$).

Los espectros de masa de cada estándar interno se muestran en las Figuras 29, 30 y 31.

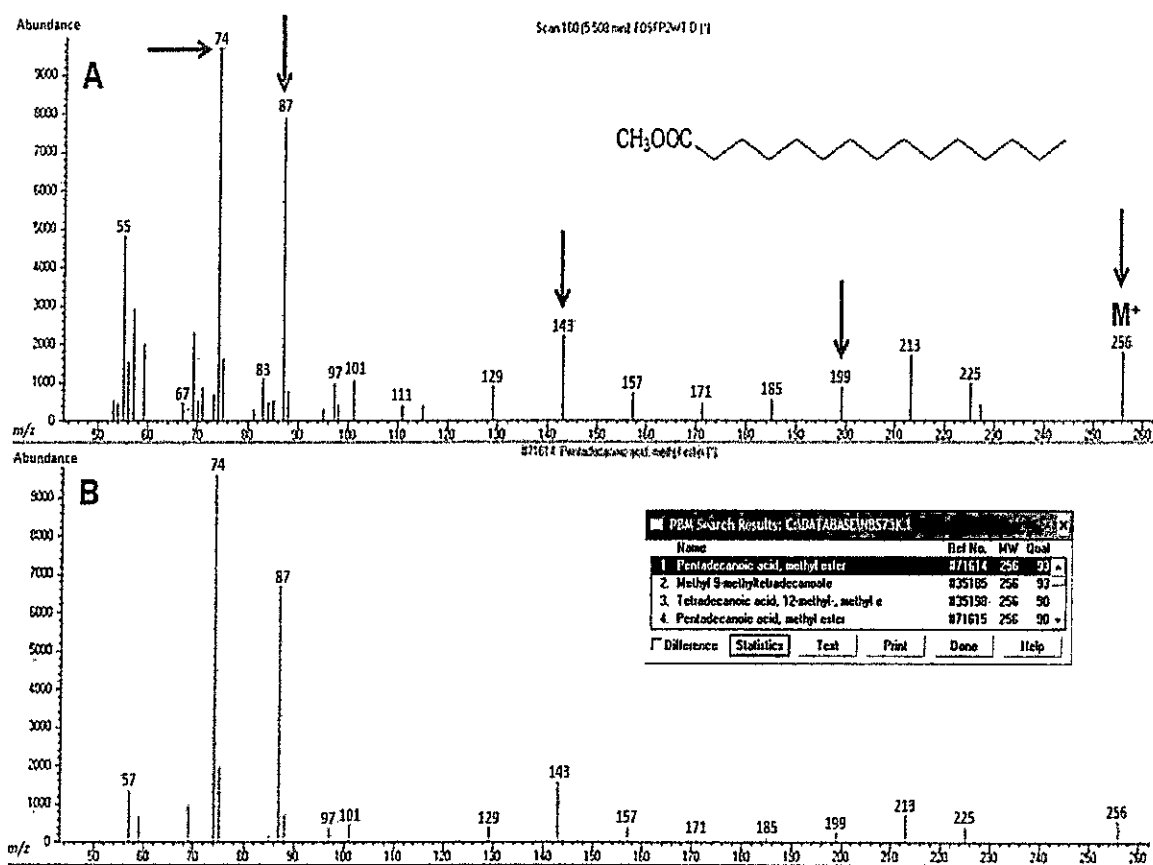


Figura 29. Identificación del metil-ácido pentadecanoico (me-C15:0) presente en la fracción P2 a partir de su espectro de masas. A, espectro de masas experimental. B, espectro de masas del metil-ácido pentadecanoico en la biblioteca NBS75K.L. Las flechas indican los iones característicos en el espectro de masas, M⁺ es el ión molecular ($m/z = 256$).

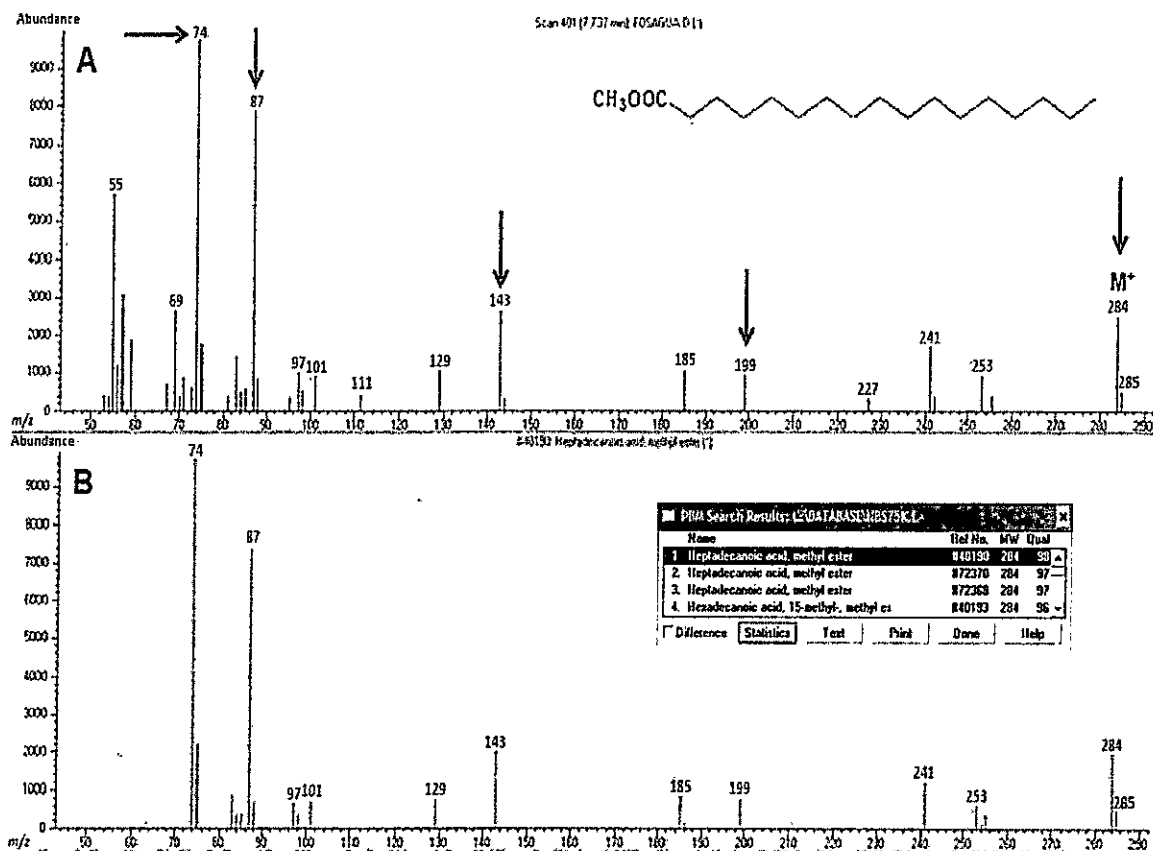


Figura 30. Identificación del metil-ácido heptadecanoico (me-C17:0) presente en la fracción P2 a partir de su espectro de masas. A, espectro de masas experimental. B, espectro de masas del metil-ácido heptadecanoico en la biblioteca NBS75K.L. Las flechas indican los iones característicos en el espectro de masas, M⁺ es el ión molecular ($m/z = 284$).

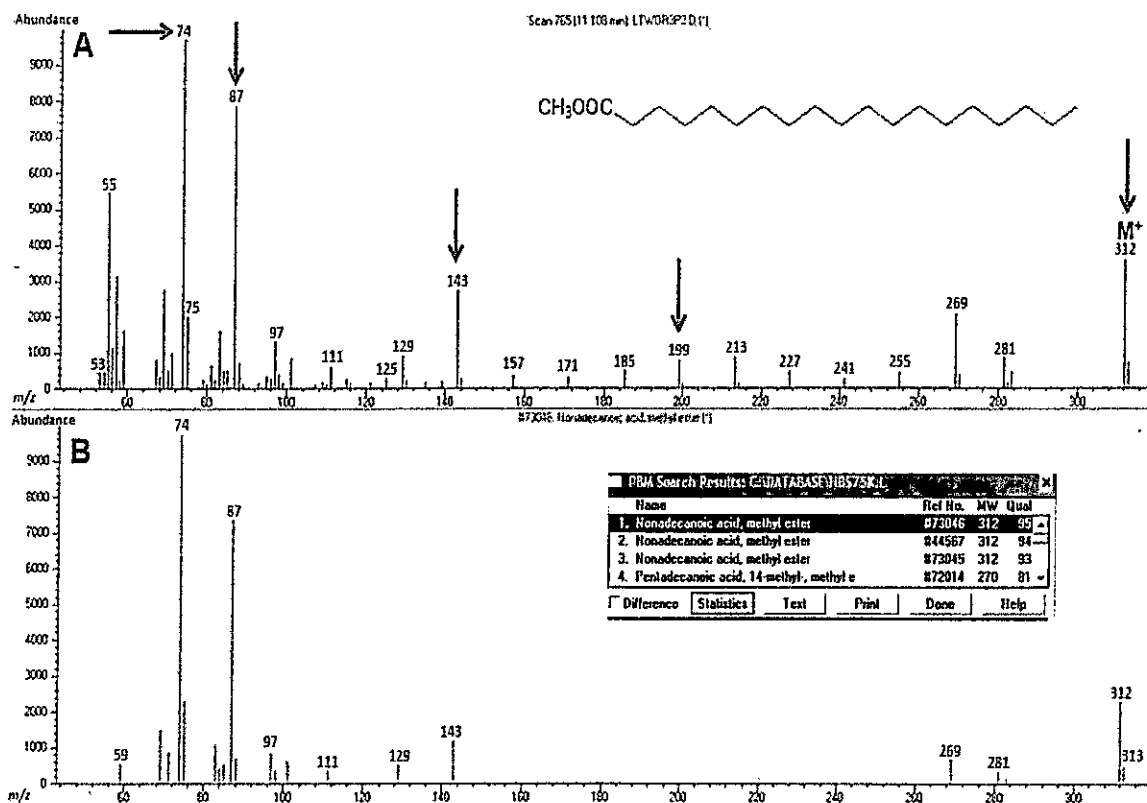


Figura 31. Identificación del metil-ácido nonadecanoico (me-C19:0) presente en la fracción P2 a partir de su espectro de masas. A, espectro de masas experimental. B, espectro de masas del metil-ácido nonadecanoico en la biblioteca NBS75K.L. Las flechas indican los iones característicos en el espectro de masas, M⁺ es el ión molecular ($m/z = 312$).

7.222. Ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs).

El espectro de masas de los ácidos grasos insaturados es diferente de los análogos saturados y a su vez hay variaciones según el grado de insaturación que presentan las moléculas. Por ejemplo, en el espectro de masas del metil oleato (C18:1) hay un ión molecular distintivo con una relación $m/z = 296$ (M⁺), mientras que los iones más prominentes son $m/z = 264$ [M-32]⁺, 222 [M-74]⁺ el cual corresponde a una pérdida de un ión de McLafferty, 180 [M-116]⁺ y 74 (ión McLafferty *per se*); El ión $m/z = 180$ es característico de este ácido graso junto con sus iones

homólogos $m/z = 166, 152$, los cuales representan la pérdida de grupos metileno ($-\text{CH}_2$). En esta tesis, se detectó al ácido oleico ($\text{C}_{18}:1$, Fig. 32) y el palmitoleico ($\text{C}_{16}:1$, Fig. 33)

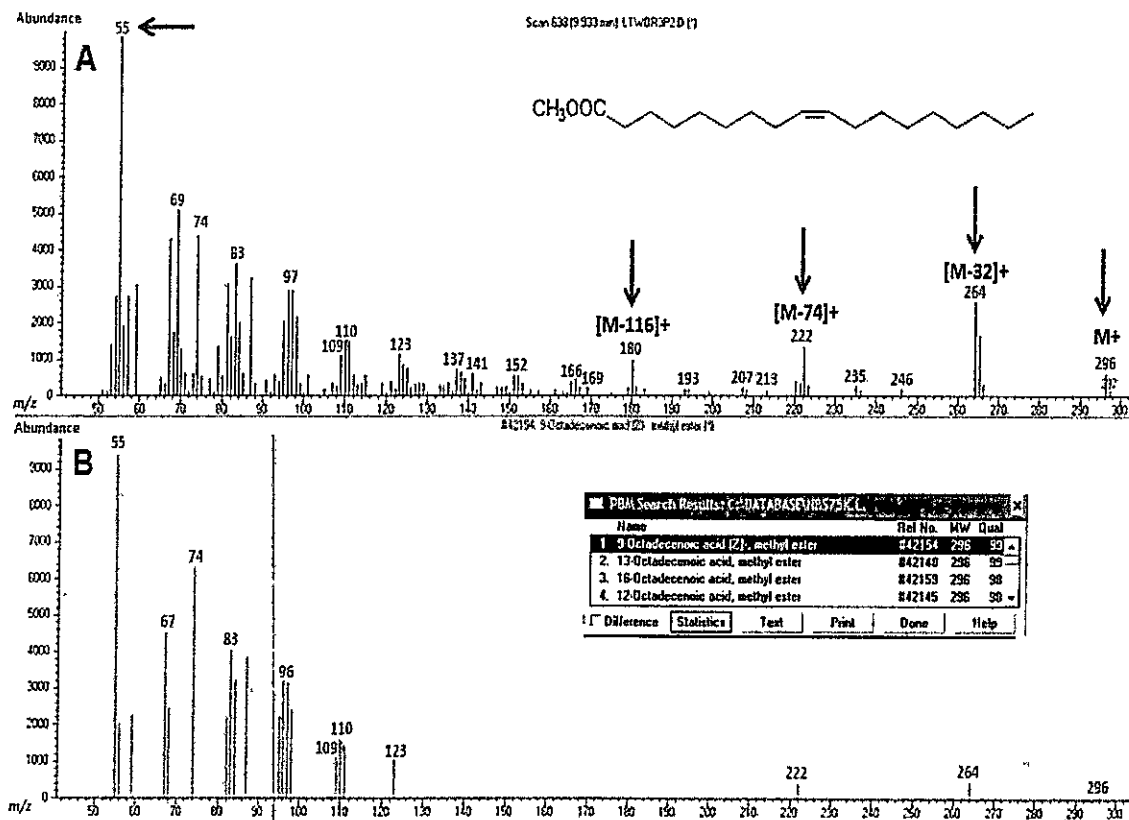


Figura 32. Identificación del metil-octadecenoico (me-C18:1, oleico) presente en la fracción P2 a partir de su espectro de masas. A, espectro de masas experimental. B, espectro de masas del metil-ácido octadecenoico en la biblioteca NBS75K.L. Las flechas indican los iones característicos en el espectro de masas, M^+ es el ión molecular ($m/z = 296$).

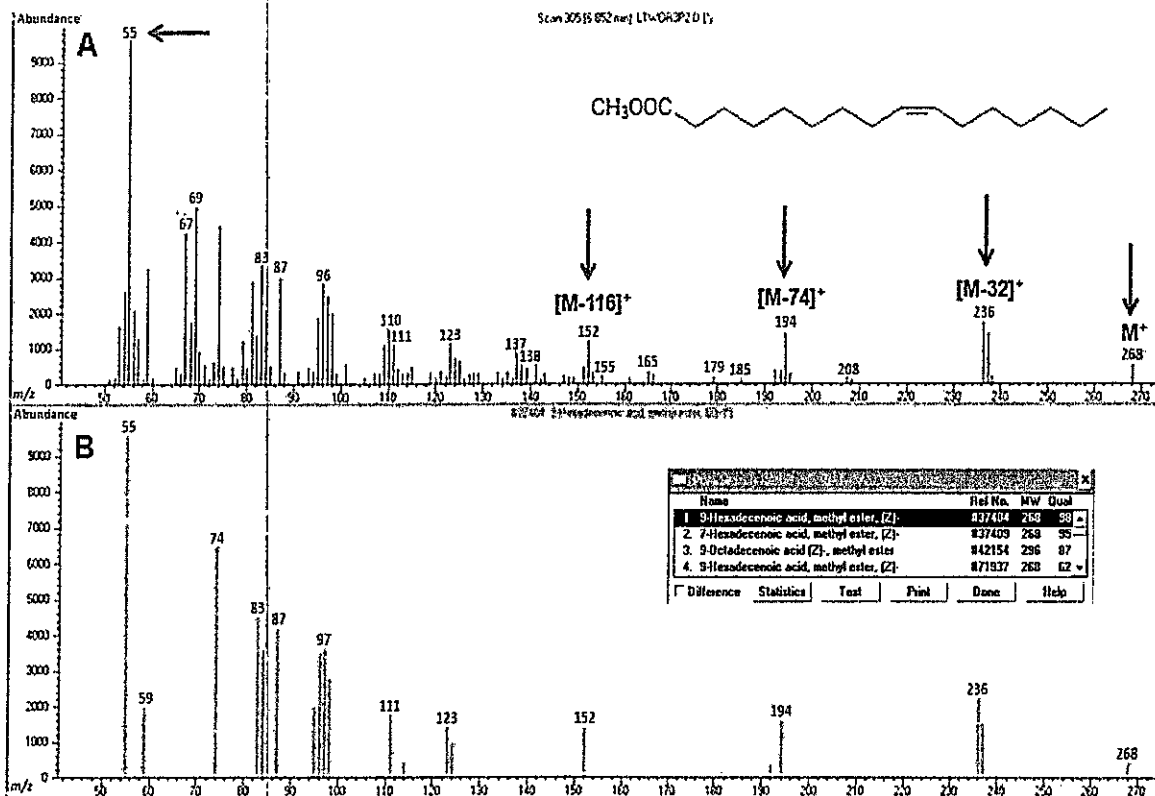


Figura 33. Identificación del metil-hexadecenoico (me-C16:1, palmitoleico) presente en la fracción P2 a partir de su espectro de masas. A, espectro de masas experimental. B, espectro de masas del metil-ácido hexadecaenoico en la biblioteca NBS75K.L. Las flechas indican los iones característicos en el espectro de masas, M^+ es el ión molecular ($m/z = 268$).

7.223. Ácidos graso poliinsaturados (PUFAs).

Los PUFAs son ácidos grasos esenciales, es decir, los organismos heterótrofos deben adquirirlos en la dieta, ya que los animales no tienen las enzimas que los producen. Estos ácidos grasos se dividen en dos grandes familias, denominadas ω -6 y ω -3, cuyos precursores son el ácido linoleico (C18:2) y α -linolénico (C18:3), respectivamente. Los ácidos grasos de la serie ω -

6 poseen su primer doble enlace en el carbono 6, contando desde extremo metilo al carboxilo. Lo mismo ocurre para los ácidos grasos de la serie ω -3, los cuales poseen su primer doble enlace en el carbono 3 de metilo a carboxilo.

Los espectros de dienos (2 dobles enlaces) y los trienos (3 dobles enlaces), presentan un ión molecular pronunciado, mientras que los iones que representan pérdidas de masas de 32, 74 y 116 uma son menos prominentes. Los metil-ésteres de diferentes ácidos grasos de la familia ω -6 tienen un fragmento característico prominente de $m/z = 150$, denominado "ión omega". El único ácido graso ω -6 identificado en esta tesis fue el ácido linoleico (C18:2). Éste presentó un abundante ión molecular ($m/z = 294$) y un ión producto de la pérdida de un ión McLafferty ($m/z = 220$), aunque este último ión *per se* ($m/z = 74$) fue escaso. El ión que representaba la pérdida de una masa de 31 uma $[M-31]^+$ fue mayor que $[M-32]^+$. Los iones prominentes en el rango bajo fueron $m/z = 81, 95, 109$ y 123 uma, mientras que el pico base correspondió al ión $m/z = 67$. La Figura 34, muestra el espectro de masa experimental y teórico del ácido linoleico (C18:2). Los metil-ésteres de los ácidos grasos de la familia ω -3 también presentan un ión omega característico, con $m/z = 108$. Además hay un pequeño ión formado por la ruptura del terminal carboxilo de la molécula que genera un fragmento que contiene los 2 primeros dobles enlaces y el segundo grupo metileno (menos un protón), el cual se denomina ión alfa (α). El ión α de la serie ω -3 tiene una $m/z = 236$. El único ácido graso ω -3 identificado en esta tesis fue el ácido α -linolénico (C18:3). Los iones más prominentes de este ácido graso son $m/z = 79$, el cual es el pico base del espectro, el ión α , el ión ω y el ión molecular 292 (Figura 35).

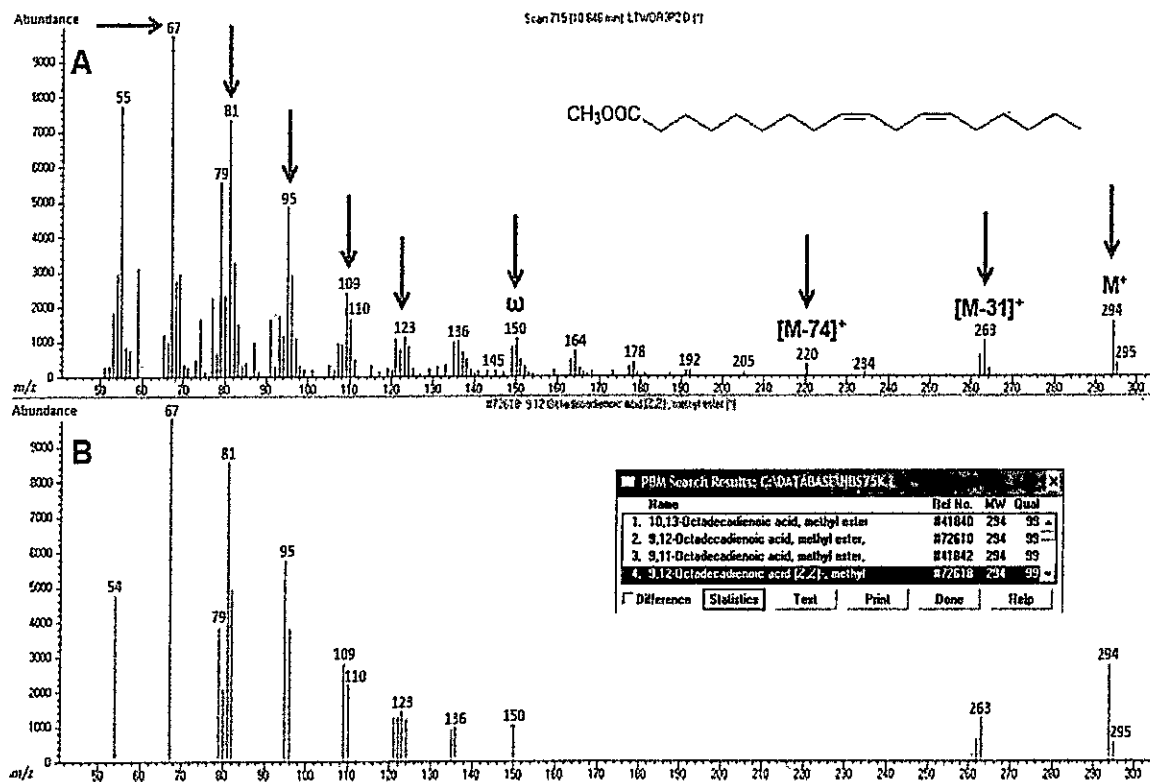


Figura 34. Identificación del metil-linoleato (C18:2) presente en la fracción P2 a partir de su espectro de masas. A, espectro de masas experimental. B, espectro de masas del metil-ácido octadecadienoico en la biblioteca NBS75K.L. Las flechas indican los iones característicos en el espectro de masas, M^+ es el ión molecular ($m/z = 294$).

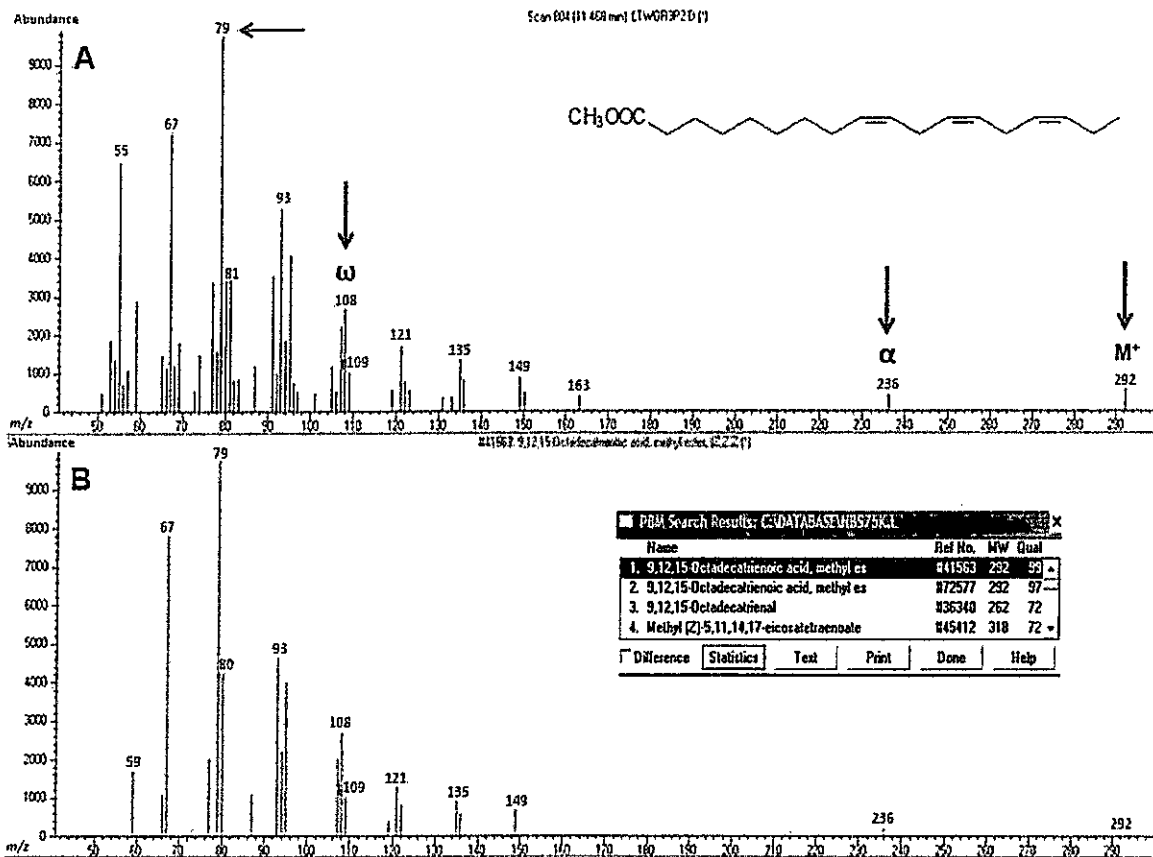


Figura 35. Identificación del metil-linolenato (C18:3) presente en la fracción P2 a partir de su espectro de masas. A, espectro de masas experimental. B, espectro de masas del metil-ácido octadecatrienoico en la biblioteca NBS75K.L. Las flechas indican los iones característicos, M⁺ es el ión molecular ($m/z = 292$).

7.3 SEPARACION DE LAS CLASES DE LÍPIDOS MEDIANTE HPLC-UV

La complejidad de los extractos lipídicos naturales es tan grande que es difícil encontrar un método que en un sólo paso, logre separar las distintas clases de lípidos. A menudo se aíslan los lípidos neutros, los fosfolípidos y los glicolípidos por separado. La técnica más sencilla para aislar pequeñas cantidades de clases de lípidos puros es la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). El HPLC ha reemplazado ampliamente a la cromatografía en capa fina (TLC) debido a que ofrece mejor resolución, una cuantificación más sencilla junto con un grado de automatización, fracciones más limpias y un trabajo más higiénico desde el punto de vista ambiental.

La mayoría de los lípidos carecen de cromóforos, un aspecto clave en la detección espectrofotométrica, sin embargo, los enlaces dobles y otros grupos funcionales absorben a una longitud de onda cercana a los 205 nm en el rango de la luz ultravioleta. La detección UV a bajas longitudes de onda tiene sus limitaciones y una de ellas es que los solventes de elución deben ser transparentes. Una de las aproximaciones más populares para separar las distintas clases de lípidos consiste en usar fases móviles transparentes al UV, se usan mezclas como Hexano-Isopropanol-Agua o Acetonitrilo-Metanol-Agua con detección cercana a los 200 nm.

En esta tesis se utilizó HPLC en fase normal; es decir, se usó una columna polar y una fase móvil apolar y la detección se realizó a los 205 nm en fase normal; para identificar y cuantificar los diacilgliceroles presentes en las muestras y ver si hay diferencias en las condiciones de luz y oscuridad.

-Estandarización de la detección con mezcla de estándares

Lo primero que se realizó fue la estandarización del método. Se inyectaron 200 µL de una mezcla de estándares que contenía 20 µg de trioleína (TAG-54:3), 27 µg de dioleína (DAG-36:2), 33 µg de monooleína (MAG-18:1), 54 µg de ácido oleico (C18:1) y 100 µg de 1,2-dioleína-

sn-glicero-fosfocolina (PC-di-18:1); todos ellos fueron resuspendidos en el solvente de carga Hexano:Cloroformo 1:1 (v/v). Todos los solventes y las mezclas de estándares fueron desgasificadas mediante sonicación antes de ser utilizadas, los solventes fueron sonicados por 10 minutos y los estándares por 2 minutos. Se fijó el flujo de la fase móvil en 1 mL/min. La figura 36 muestra el resultado de esta elución.

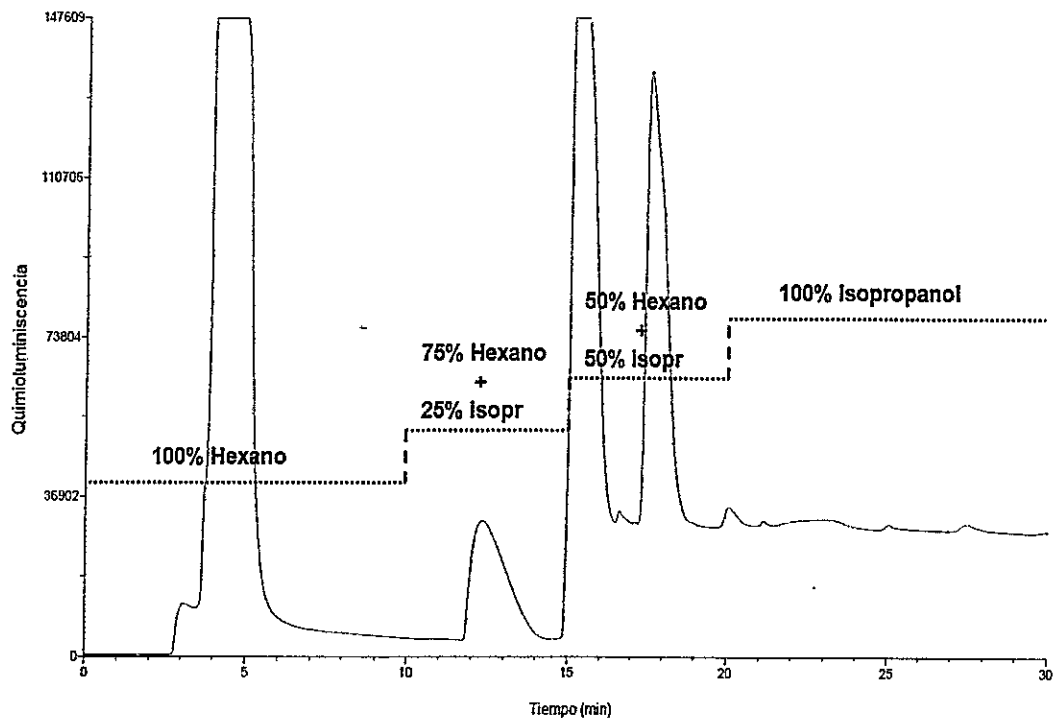


Figura 36. Estandarización de la detección de una mezcla de estándares lipídicos con un detector UV. Teóricamente, el hexano debería eluir los triacilgliceroles; la mezcla de 75% Hex+25% isopr debería eluir los mono y diacilgliceroles; la mezcla 50% Hex+50% isopr a los ácidos grasos libres y el isopropanol puro a los fosfolípidos (fosfatidilcolina, PC). Isopr, isopropanol.

A los 5 minutos apareció un pico cromatográfico que probablemente correspondía a la TAG-54:3 ya que eluyó con el solvente más apolar utilizado, seguido de un segundo pico a los

12 minutos, el cual apareció tras el cambio de polaridad al eluir el gradiente 75% Hexano +.25% Isopropanol y cuya identidad debería ser MAG-18:1 o DAG-36:2, según la publicación Christie, 1986. Posteriormente, aparecieron 2 picos cromatográficos más, uno a los 15 y el otro a los 18 minutos, donde el último de ellos debería ser el C18:1. El primer pico apareció justo después de haber cambiado el sistema de elución a 50% Hexano y 50% Isopropanol y por lo tanto este estándar posiblemente era la MAG o DAG que se corrió de la elución esperada. También se observó un aumento en la línea base, asociado al cambio de solvente. Luego, entre los 20-30 minutos sólo se eluyó Isopropanol, con el objetivo de des-adsorber los lípidos altamente polares como la PC-di-C18:1; sin embargo, no apareció algún pico cromatográfico y la basal se mantuvo alta. Por lo tanto, la siguiente corrida tendría como objetivo eluir la PC-di-C18:1 que quedó adsorbida en la columna.

-Limpieza de la columna, elución de la fosfatidilcolina adsorbida:

El objetivo de esta corrida era limpiar la columna, retirando la PC-di-C18:1 que había quedado absorbida desde la corrida anterior. Para ello, se realizó la purga de la columna con Isopropanol:Agua (1:1 v/v), durante 2-3 minutos. El agua contenía serina ajustada con etilamina a pH 7,5 (1:1 v/v), lo que permitiría la elución de los compuestos altamente polares de la mezcla. Luego, se realizó una corrida con Isopropanol:Agua (1:1 v/v) por 15 minutos, para eluir el fosfolípido. La figura 37 muestra el resultado de esta elución.

Se observaron 2 picos agudos y rápidos a los 4 y 5 minutos, respectivamente, los cuales correspondían a burbujas de aire. A los 7 minutos apareció un pico pequeño y poco definido que podría ser la fosfatidilcolina.

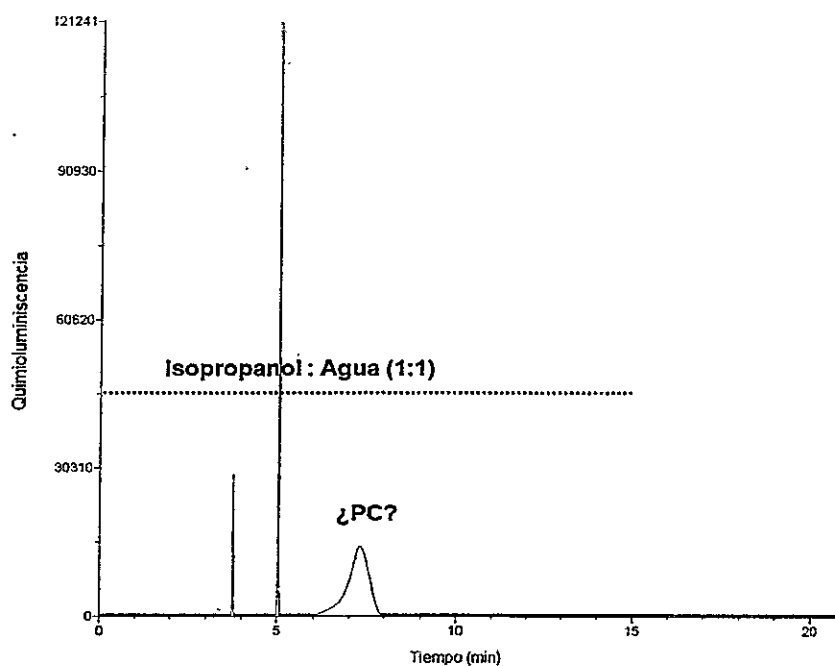


Figura 37. La limpieza de la columna de silica con Isopropanol:Agua (1:1 v/v) generó un pico cromatográfico cuya identidad pareciera ser la PC-di-C18:1. La alta polaridad de este solvente de elución debería haber retirado toda la PC-di-C18:1 que quedó adsorbida en la corrida anterior. El agua del solvente de elución contenía serina y etilamina, compuestos que ayudarían en la remoción del fosfolípido.

-Control de solventes y flujo de la fase móvil

En la primera corrida, hubo un aumento en línea basal después de haber cambiado el porcentaje de isopropanol en la fase móvil. Por esa razón, se calibró el detector UV con la mezcla Isopropanol:Agua (1:1 v/v), dejando ese valor como cero. Posteriormente, el flujo de la fase móvil fue disminuido a 0,5 mL/min y se agregó 200 µL de solvente de carga Hexano:Clorofomo (1:1 v/v), sin estándares. En la figura 38 se observa el resultado de esta elución.

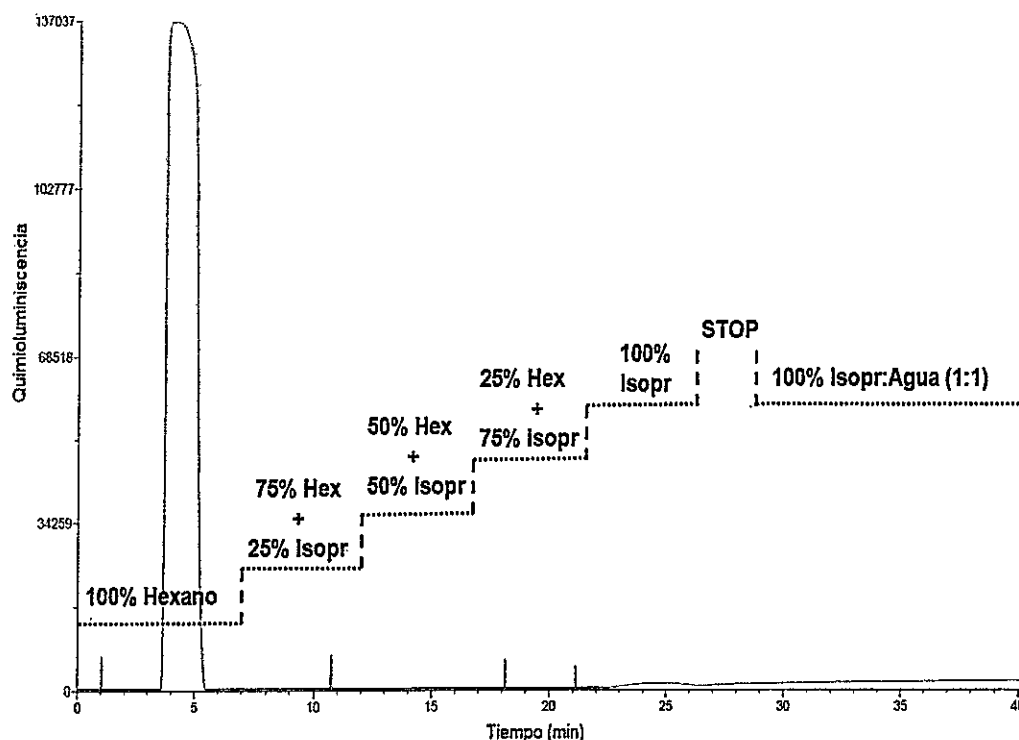


Figura 38. El control negativo sin lípidos reveló la presencia de un artefacto en la corrida cromatográfica producido por el solvente de carga. En STOP se realizó el cambio manual de isopropanol por la mezcla isopropanol:Agua (1:1 v/v). Los picos pequeños y agudos correspondieron a burbujas de aire que entran al sistema. Hex, hexano; Isopr, isopropanol. Todos los solventes usados son de grado HPLC.

En la corrida se observó un pico cromatográfico a los 5 minutos que coincidió con el pico observado en la corrida 1 (Fig. 36). Este pico correspondía al solvente de carga y no a un lípido, como se pensó en primera instancia. El solvente de carga posee cloroformo, el cual no es transparente a los 205 nm. Esto explicaría la aparición de este pico en las Fig. 36 y 38 y la ausencia en la Fig. 37, en donde no se inyectó la mezcla de lípidos en solvente de carga. La línea base fue relativamente constante hasta los 22 minutos de la corrida. A medida que se aumentó el porcentaje de Isopropanol en la mezcla (75% en adelante), la línea base varió ligeramente, contrario a lo observado en la Fig. 36. Después de los 40 minutos de elución, se realizaron pasos

que acondicionaron la columna para una siguiente corrida. El acondicionamiento consistió en disminuir gradualmente la polaridad del sistema de elución hasta terminar en hexano (solvente altamente apolar). Para ello, se cambió la solución de Isopropanol:Agua por isopropanol, la cual eluyó por 2 minutos. En los siguientes 5 minutos, el solvente de elución cambió a 50% Hexano + 50% isopropanol y finalmente en los últimos 12 minutos se aumentó el porcentaje de hexano, hasta que llegó al 100%. Ya que no se disponían de 3 bombas, como era sugerido en Christie, 1986, se realizó el siguiente arreglo: una misma bomba se utilizó para eluir por la columna el solvente Isopropanol HPLC y la mezcla Isopropanol:Agua (1:1 v/v), ya que la polaridad de estos dos sistemas de solventes es similar. Los cambios de solvente se realizaron de forma manual, deteniendo el sistema de HPLC.

-Aumento del flujo de la fase móvil

El artefacto observado cuando sólo hay hexano en la fase móvil permitía deducir que sólo estaban eluyendo 3 de los 5 lípidos de la mezcla de estándares, quedando 2 lípidos adsorbidos fuertemente en la columna. Si se aumenta el flujo de la fase móvil, se genera una menor interacción entre el analito y la fase estacionaria, por lo tanto, todos los lípidos de la mezcla deberían eluir con la fase móvil utilizada. En esta corrida, se inyectaron 200 μL de la mezcla de estándares mencionada anteriormente y se fijó el flujo de la fase móvil a 1,5 mL/min. En la figura 39 se muestra el resultado de esta elución.

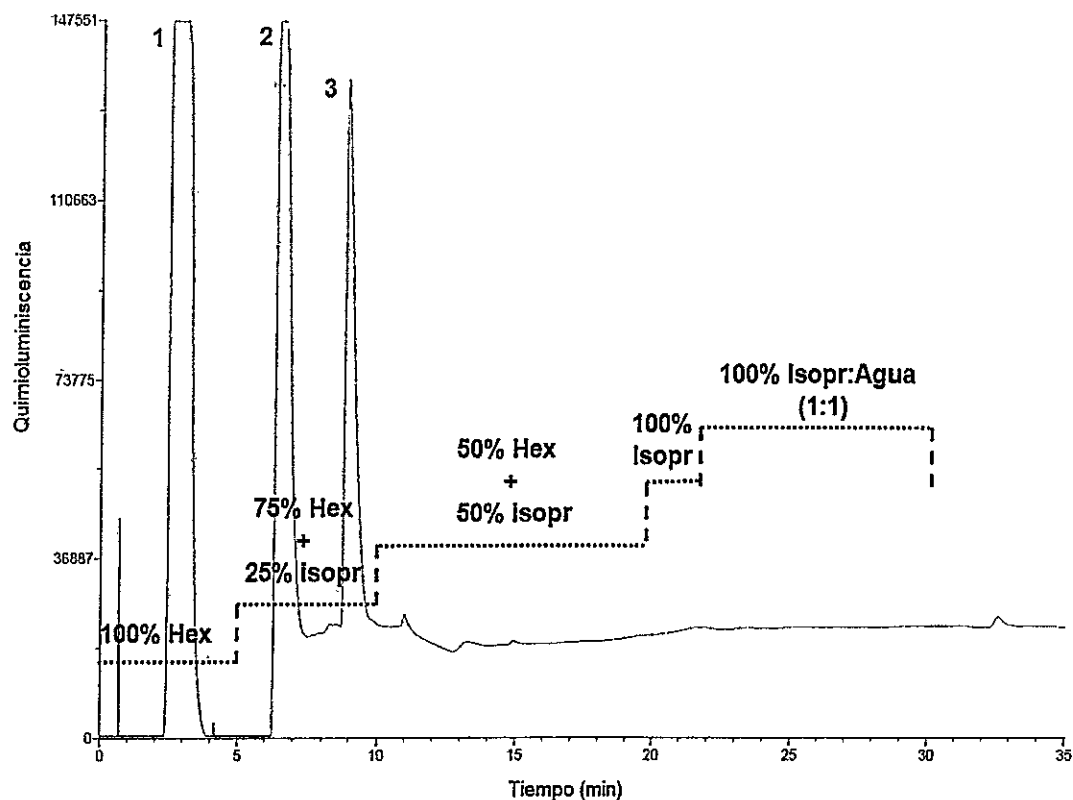


Figura 39. El aumento del flujo de la fase móvil a 1,5 mL/min sólo permitió eluir dos de los cinco estándares de la mezcla. El aumento del flujo generó menor interacción analito-columna. Se observaron sólo 3 picos cromatográficos, los cuales eluyeron con un bajo porcentaje del solvente polar. Se observó un desplazamiento de los picos cromatográficos hacia la izquierda (fase móvil más apolar), el primer pico corresponde al artefacto del solvente de carga.

Los dos picos cromatográficos detectados eluyeron en una fase móvil enriquecida en hexano. No se observó ningún pico cromatográfico con el sistema 50% + 50% isopropanol, el cual anteriormente había eluído dos compuestos. Sin embargo, los picos 2 y 3 fueron similares a los encontrados en la corrida 1, donde el pico 1 (T_R : 3,5 minutos) corresponde al artefacto producido por el solvente de carga (Fig. 36). Cuando el gradiente se estaba enriqueciendo en isopropanol (25%), se observó la aparición de 2 picos cromatográficos, uno a los 7,5 minutos y otro a los 9 minutos, además de un aumento en la línea base de forma similar a lo que ocurrió en

la corrida 1 (Fig. 36). Posteriormente, se fue aumentando progresivamente el porcentaje de Isopropanol para eluir la PC-di-C18:1, sin embargo, ésta última no apareció y la basal no volvió al nivel inicial.

Por lo tanto, de los 5 picos de lípidos que se esperaba que eluyeran (4 lípidos neutros y la PC-di-C18:1), sólo se observaron 2 picos cromatográficos. Surgieron dos posibles explicaciones para esta situación: 1) los lípidos estaban coeluyendo por el alto flujo de la fase móvil que estábamos utilizando (1,5 mL/min) o 2) la interacción entre la sílica y el analito era tan fuerte que el sistema de elución no estaba rompiendo esta interacción y los lípidos se estaban quedando adsorbidos en la columna (y por consiguiente, había que cambiar la fase móvil). Para verificar la primera idea se realizó la siguiente corrida.

-Disminución del flujo de la fase móvil

El flujo de las fases móviles fue disminuido a 0,75 mL/min, con el objetivo de obtener una mejor separación de los picos cromatográficos, debido a una mayor interacción columna-analito. En la figura 40 se muestra el resultado de esta elución.

A los 5 minutos se observó el artefacto del solvente de carga. Junto a él eluyó un segundo pico cromatográfico. Este pico poseía una dinámica de elución más lenta y requirió isopropanol para eluirlo completamente. Después de esto la línea basal volvió a su estado inicial hasta que a los 25 minutos apareció un pico definido seguido de 2 picos erráticos que, según la forma, correspondían a artefactos y no a lípidos. Mientras se eluía Isopropanol 100% por la columna, apareció un pico extendido y poco definido que demoró 18 minutos en eluir completamente. Se esperaba que con esa fase móvil eluyera un pico grande, proporcionalmente el doble del pico observado en la Fig. 37, el cual correspondería a la suma de la PC-di-C18:1 (fosfatidilcolina) de esta corrida y la anterior, la cual no eluyó la última vez.

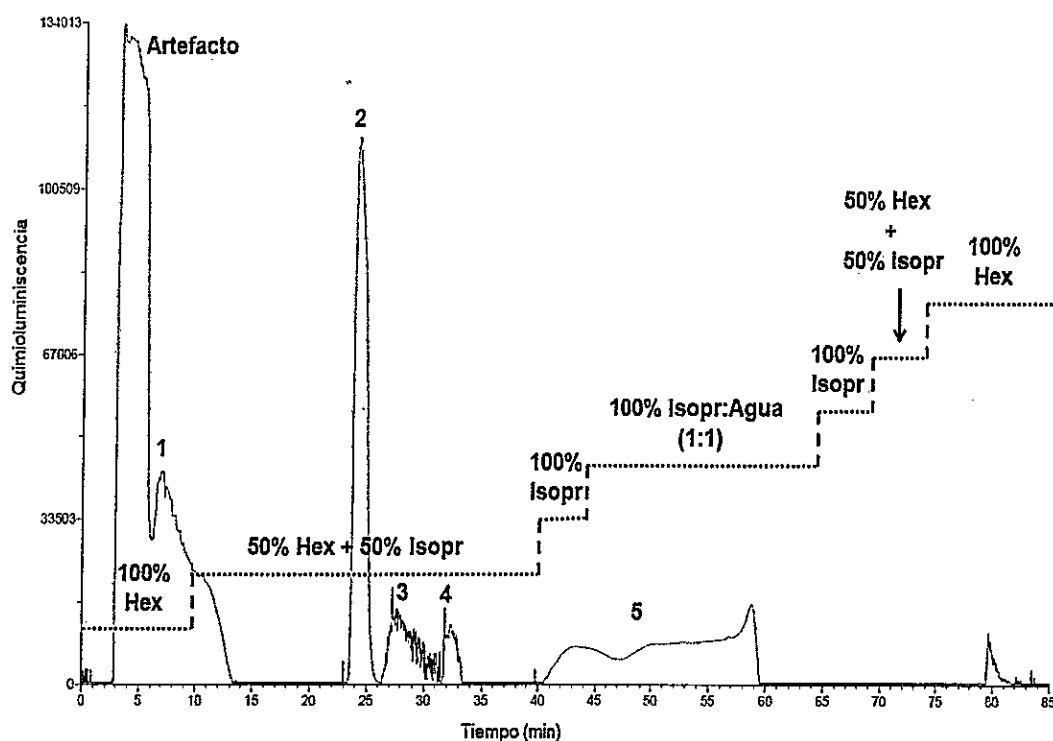


Figura 40. La disminución del flujo de la fase móvil a 0,75 mL/min no permitió la correcta separación de los estándares lipídicos de la mezcla. La disminución del flujo generó mayor interacción analito-columna. Se observaron sólo 2 picos cromatográficos (1 y 2), los picos 3, 4 y 5 fueron probablemente artefactos.

Debido a las dificultades experimentadas al seguir este protocolo, se decidió cambiar de detector.

7.4 SEPARACION DE LAS CLASES DE LÍPIDOS MEDIANTE HPLC-IR

Los detectores de índice de refracción (IR) tienen muchas aplicaciones en el análisis de lípidos. El detector IR puede identificar un amplio rango de compuestos, por lo que se le denomina un detector universal. Sin embargo, presenta baja sensibilidad comparado con los otros tipos de detectores, requiere condiciones de elución isocrática (sin gradiente) y es

extremadamente sensible a pequeñas fluctuaciones de temperatura.

En esta tesis se utilizó la misma columna de silica gel Inertsil SIL-100A (detalles en Materiales y Métodos) y un sistema de elución isocrático basado en la publicación de Greenspan y Schroeder, (1982): isooctano:tetrahidrofurano(THF):ácido fórmico (90:10:0,5 v/v). Se utilizó la mezcla de estándares descrita en los experimentos de HPLC-UV, en el solvente de carga Hexano:Clorofomo 1:1 (v/v). Todos los solventes y las mezclas de estándares fueron desgasificadas mediante sonicación antes de ser utilizadas.

Corrida mezcla de estándares

El flujo de la fase móvil se mantuvo a 1 mL/min y se agregó 200 µL de la mezcla de estándares. Se mantuvieron todas las condiciones descritas en la publicación. La figura 41 muestra la elución de la mezcla.

No se observó ninguno de los picos con los tiempos de retención descritos en la publicación. En toda la corrida la línea base se mantuvo alta. Se dedujeron 2 posibles dificultades: 1) la columna no estaba separando la muestra o 2) el detector no estaba funcionando de forma correcta. Para verificar la segunda idea se realizó la siguiente corrida.

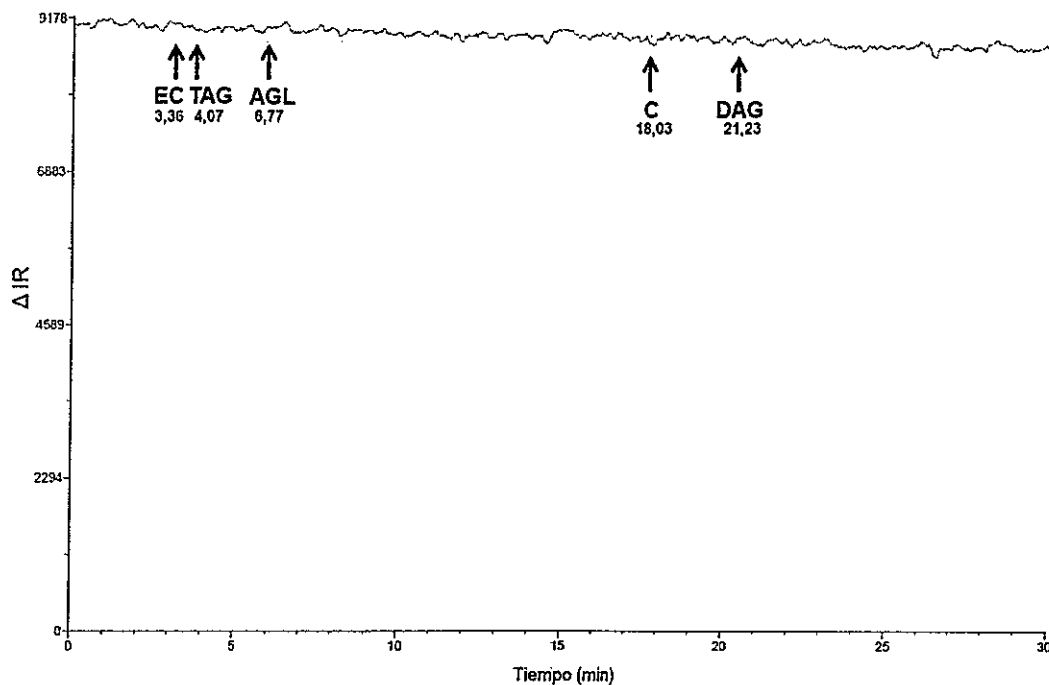


Figura 41. No se observó ningún pico cromatográfico usando el protocolo de separación de lípidos neutros utilizando un detector de índice de refracción. El sistema de elución consistió en isooctano:tetrahidrofurano:ácido fórmico (90:10:0,5 v/v), el flujo de la fase móvil fue 1 mL/min y la polaridad fue negativa. Las flechas señalan la identidad y los tiempos de retención de los estándares observados en Greenspan y Schroeder, 1982.

-Prueba sin columna de sílica, unión directa entre el inyector y el detector

Para corroborar el funcionamiento del detector, se realizó una prueba donde el inyector del HPLC fue conectado directamente al detector. De esta forma la mezcla de lípidos inyectados pasaría directamente al detector y se debería observar un único pico cromatográfico. La figura 42 muestra la elución de la mezcla.

En los primeros 3 minutos se hizo la calibración del equipo (se ajustó el cero). A los 6 minutos (1) se agregó 200 µL del solvente de elución isooctano:tetrahidrofurano:ácido fórmico (90:10:0,5 v/v) y no se observó pico cromatográfico ni cambios en la línea base. A los 9 minutos (2) se agregó 200 µL de la mezcla de estándares y no se observó pico cromatográfico, a pesar

que se esperaba que eluyera un pico cromatográfico de gran amplitud, correspondiente a la elución de todos los estándares juntos. A los 15 minutos (3) se agregó 200 μL de hexano (control), el cual debería cambiar la línea base y no debería producir pico cromatográfico, sin embargo, no hubo un cambio inmediato en la línea base como se esperaba y no se observó pico cromatográfico. El cambio en la basal ocurrió tardíamente, a los 16,5 minutos. A los 18 minutos (4) se inyectó nuevamente 200 μL de hexano y se observó la aparición inesperada de dos picos agudos a los 19 minutos. A los 20 minutos (5) se cambió la polaridad del detector, con el objetivo de verificar el funcionamiento del detector y se observó un aumento de la línea base.

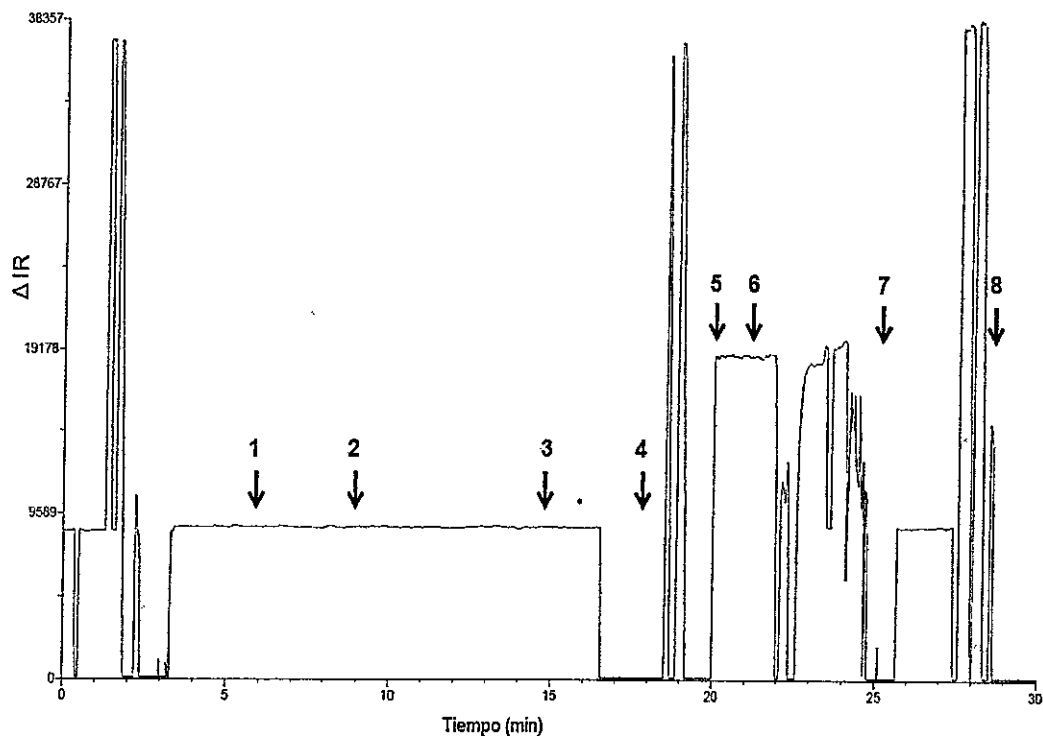


Figura 42. La conexión directa entre el inyector y el detector IR (sin el uso de columna) demostró que el detector IR no estaba funcionando adecuadamente. La mezcla de estándares fue agregada en el punto 2 y no se observó pico cromatográfico. Al cambiar la polaridad sólo se observa un aumento en la línea base. (1) inyección de 200 μL solvente elución; (2) inyección de 200 μL de mezcla de estándares lipídicos; (3) inyección de 200 μL de hexano; (4) inyección de 200 μL de hexano; (5) cambio de polaridad; (6) inyección de 200 μL de

hexano; (7) ajuste del cero y (8) inyección de 200 μ L de isopropanol.

A los 21,5 minutos (6) se agregó 200 μ L de hexano y no se observó un cambio inmediato, sino que la basal se volvió errática después de 3 minutos. A los 25,5 minutos (7) se ajustó nuevamente el cero y a los 28,5 minutos (8) se agregó 200 μ L de isopropanol, como un control, observándose un cambio en forma de pico cromatográfico.

Esta prueba evidenció que el detector IR no estaba funcionando de forma correcta. Como no se pudo observar la correcta separación de los estándares lipídicos, no se corrieron las muestras de rabdomeros en este sistema de HPLC, independiente del detector utilizado. Tras los experimentos fallidos en el HPLC, se decidió cambiar de estrategia y se probó la cromatografía en capa fina (TLC). Publicaciones antiguas han descrito buenas separaciones de lípidos con esta técnica.

7.5 SEPARACION DE LOS LÍPIDOS NEUTROS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN (TLC)

7.51. El vapor de Yodo es el mejor método de detección de lípidos

Se probaron dos métodos descritos en la literatura para identificar las bandas de lípidos en una placa de sílica gel. En el primer método se utilizó una solución de 2',7'-diclorofluoresceína al 0,1% (p/v) en Metanol 95%. Esta solución peroxida los lípidos produciendo una banda fluorescente amarilla bajo la luz ultravioleta (Stark y cols, 1993). El spray fue esparcido sobre la placa hasta que estuvo completamente cubierta por solución y fue secado a temperatura ambiente. Posteriormente, la placa fue visualizada bajo luz ultravioleta, detectando los lípidos como bandas amarillas en un fondo color ocre. Las bandas fueron marcadas con un lápiz mina.

En el segundo método se usó vapores de yodo como método de revelado (Rietveld y

cols, 1999), el cual es un método general de visualización. El yodo se intercala en los dobles enlaces de los lípidos produciendo una mancha amarilla-café dependiendo de la cantidad de lípido identificado. Es un método simple y reversible de detección de lípidos, donde el escaneo de la placa debe ser realizado rápidamente.

En una placa de 20x20 cm se sembraron tres mezclas de los siguientes estándares lipídicos: Fosfolípidos (F. PC-di-C18:1), Monoleína (MAG-18:1), Dioleína (DAG-36:2), Colesterol (C), Ácido oleico (AGL, C18:1), Trioleína (TAG-54:3) y Colesterol oleato (EC-18:1), en forma sucesiva, además de cada estándar por separado. El objetivo de este experimento era estudiar la sensibilidad de ambas técnicas de detección e identificar cada banda de la mezcla con el estándar lipídico independiente. En la figura 43, se muestra la separación cromatográfica de los lípidos neutros de una mezcla de estándares y la comparación de las dos técnicas de detección realizadas. Las muestras de los carriles 1-3 fueron reveladas con vapores de yodo y desde el carril 5-12 fueron reveladas con 2',7'-diclorofluoresceína al 0,1% y luz UV.

Tal como se describe en Kupke I. y Zeugner S, 1978, las diferentes clases de lípidos neutros de un tejido animal fueron fácilmente separadas en una placa TLC en un sólo paso. Cada lípido en la mezcla fue identificado en base a la posición obtenida por el estándar individual después de la corrida (Rf).

La fase móvil compuesta de hexano y dietiléter permitió una excelente separación de los "lípidos neutros" de una mezcla. Los lípidos apolares (EC y TAG) migraron rápidamente y llegaron hasta el límite superior de placa, separándose plenamente, mientras que los lípidos medianamente apolares fueron adsorbidos en la mitad de la placa. La separación de los ésteres de colesterol (EC) y triacilgliceroles (TAG) no es un proceso trivial, ya que estos lípidos comparten características hidrofóbicas muy similares.

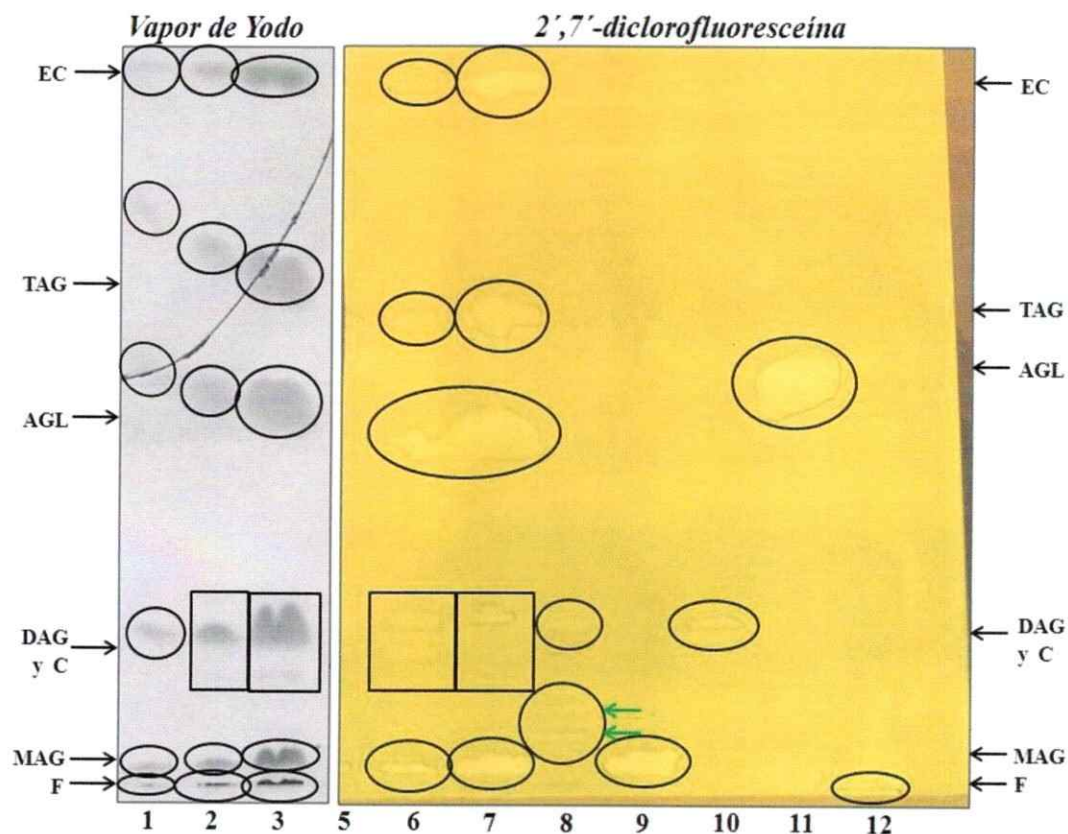


Figura 43. Comparación de los métodos de detección de los lípidos en las placas de TLC usando estándares comerciales. Se utilizaron mezclas de estándares de lípidos neutros y se sembraron a distintas concentraciones (0,5, 12,5 y 25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) en la placa de TLC. Se utilizó Hexano/Dietiléter/ácido fórmico (80:20:2 v/v) como sistema de elución. Después del desarrollo, los lípidos fueron detectados con vapor de yodo o con 2',7'-diclorofluoresceína. **Carril 1:** mezcla de estándares con 5 μg de cada uno. **Carril 2:** mezcla de estándares con 25 μg de cada uno. **Carril 3:** mezcla de estándares con 125 μg de cada uno. **Carril 4:** vacío. **Carril 5:** idéntico al carril 1 (sólo se observa la mitad del carril). **Carril 6:** mezcla idéntico al carril 2. **Carril 7:** idéntico al carril 3. **Carril 8:** 125 μg de colesterol (C). **Carril 9:** 125 μg de monoleína (MAG). **Carril 10:** 125 μg de dioleína (DAG). **Carril 11:** 125 μg de ácido oleico (AGL). **Carril 12:** 125 μg de di-oleil-fosfolina (F). Las flechas verdes indican dos bandas de colesterol con un Rf distinto al esperado, con los círculos se destacan los lípidos identificados.

Por su parte, el ácido fórmico agregado a la fase móvil aseguró que los ácidos grasos libres pudieran migrar de forma exitosa. Los lípidos complejos como los fosfolípidos y los glicoesfingolípidos permanecieron en el origen o lugar de siembra de la muestra y se cuantifican como una única clase lipídica.

Una dificultad imprevista fue la separación de diacilgliceroles y colesterol. Según Kupke I. y Zaugner S., 1978 se debía observar dos bandas separadas, donde la banda del colesterol migra sobre la banda del DAG. Sin embargo, sólo en la mezcla que contiene 125 µg de cada estándar se visualizó una segunda banda leve, la cual no corresponde a DAG ya que no posee el mismo Rf que el DAG que fue corrido de forma independiente. Por el contrario, cuando se corrieron DAG y colesterol en carriles independientes tuvieron el mismo Rf. (Figura 43, carril 8 y 10).

Las bandas correspondieron a los dobles enlaces de los estándares, sin embargo, el colesterol sólo posee un doble enlace en el esterano y posiblemente el yodo no tuvo acceso a este doble enlace, debido a un impedimento estérico. Esto podría explicar la débil tinción de éste estándar. En la tabla 13 se expresan los Rf obtenidos para cada lípido identificado.

Se detectaron todos los lípidos de la mezcla utilizando los dos métodos. El patrón de migración fue similar al esperado según Kupke I. y Zeugner S, 1978. El método de detección más efectivo fue el vapor de Yodo.

Con el vapor de yodo se observó, en la mayoría de los casos, una banda "pronunciada y definida" en las distintas cantidades de muestra cargadas, la cual permaneció café por un breve tiempo antes de desaparecer. Esto obligó a que los escaneos de la placa fuesen rápidos. Las bandas de las mezclas de lípidos fueron proporcionales a la cantidad de muestra sembrada en la placa y no generaron bandas irregulares que sobrepasaran el carril de siembra como ocurrió con la 2',7'-diclofluoresceína.

Tabla 13. Valores Rf obtenidos para cada clase de lípido.

Lípido	Distancia recorrida [cm]	Rf
EC	15,5	0,92
TAG	10,4	0,62
AGL	7,8	0,46
Colesterol	4,3	0,26
DAG	4,3	0,26
doblete ^a	3,6	0,21
MAG	1,3	0,077
Fosfolípidos	0,7	0,042
Colesterol:		
banda 1	4,3	0,26
banda 2 ^b	2,3	0,14
banda 3 ^b	1,7	0,10
Distancia solvente de frente: 16,8 cm		

^a: Esta segunda banda se observó claramente en la placa teñida con vapor de yodo.

^b: Estas bandas fueron indicadas con flechas verdes en la placa teñida con 2',7'-diclorofluoresceína.

La desviación de los estándares (tipo sonrisa) de los AGL (C18:1) y TAG (TAG-54:3) en el revelado con yodo, se debió a una perturbación de la corrida producida por el ángulo en que fue colocada la placa de TLC en la cámara. Si la inclinación de la placa es mayor en uno de sus lados, el solvente subirá más rápidamente por los bordes que por el centro, generando una Rf distinto del mismo compuesto cargado, dependiendo de su ubicación en la placa.

En el revelado con vapores de yodo se pudo visualizar todos los estándares de lípidos de las mezclas de 25 y 125 µg, incluidos los diacilgliceroles. Por su parte, la 2',7'-diclorofluoresceína tiñe los lípidos, visualizándolos como bandas amarillas difusas (sin contornos definidos) en un fondo amarillo. Esto dificultó la identificación de aquellos lípidos que se encontraban en baja cantidad, los cuales no aparecieron teñidos en la placa. En las mezclas que contienen 5 y 25 µg de cada estándar se observaron bandas poco intensas y difusas entre los monoacilgliceroles y los diacilgliceroles. Sin un estándar conocido no se puede deducir

con certeza la naturaleza del compuesto identificado.

El principal problema que surgió al revelar con 2',7'-diclorofluoresceína fue la difícil visualización de las bandas en un trans-iluminador tradicional, ya que la placa es blanca, por lo que es necesario utilizar dos instrumentos accesorios: una lámpara UV que pueda ser dirigida y una cámara con filtro UV para poder obtener la imagen.

La limitante de ambas técnicas es la presencia de dobles enlaces en los ácidos grasos constituyentes de los diferentes lípidos. Si los lípidos de las muestras sólo poseen ácidos grasos saturados, éstos no serán teñidos ni visualizados. Esto a su vez, dificulta la cuantificación de los lípidos, ya que hay un cierto porcentaje de ellos que no son identificados y ese porcentaje sólo puede ser deducido por lo perfiles de ácidos grasos obtenidos anteriormente. Esto limita la identificación de una forma directa a una forma indirecta.

7.52. La baja abundancia de los DAGs dificulta su identificación en las muestras de rabdómeros mediante TLC

Una muestra de rabdómeros provenientes de 1000 ojos de moscas silvestres adaptadas a luz, fue resuspendida en 20 μ L de Hexano:Cloroformo (1:1 v/v), sonicadas y sembradas en la placa. La Figura 44 muestra el desarrollo de la placa con un sistema de elución Hexano/Dietiléter/ácido fórmico (80:20:2 v/v).

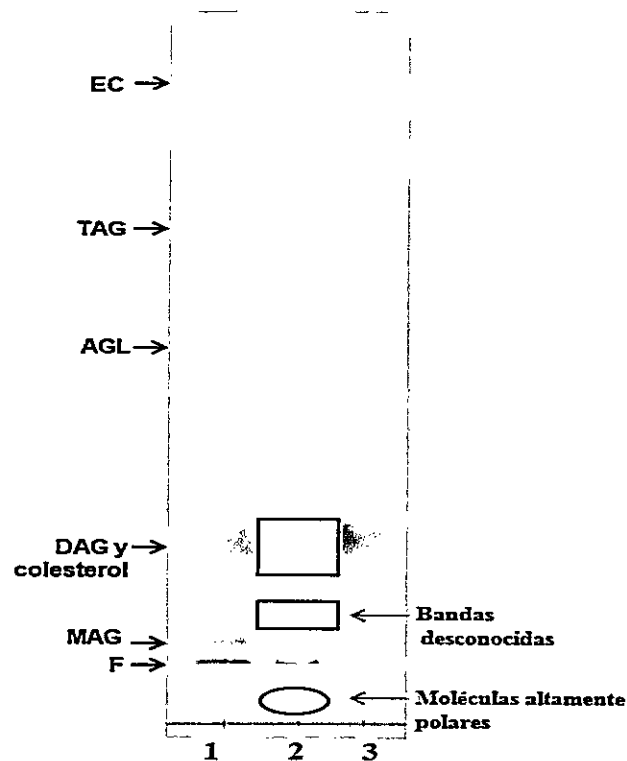


Figura 44. Separación de lípidos neutros de una muestra de rabdómeros de ojos de moscas silvestres adaptadas a luz mediante TLC. Estándares de lípidos neutros: Monolefina, MAG; Dioléfina, DAG; Colesterol; ácido oleico, AGL; Trioléfina, TAG; Colesterol oleato, CE; y fosfolípidos, F; fueron mezclados (125 μg de cada uno) y aplicados en la placa de TLC. Después del desarrollo, los lípidos fueron detectados con vapores de yodo. Se agregó 125 μg de dioléfina para la identificación de los diacilgliceroles de las muestras biológicas. *Carril 1*: mezcla de estándares con 125 μg de cada uno. *Carril 2*: muestra de ojos silvestres, fracción P2 adaptada a luz. *Carril 3*: 125 μg del estándar dioléfina (DAG).

Se logró identificar de forma clara gran parte de los lípidos neutros que estaban presentes en las muestras de rabdómeros: los ésteres de esterol (como un doblete), triacilgliceroles y ácidos grasos libres. Sin embargo, los diacilgliceroles, los cuales son lípidos de interés en esta prueba, presentaron una marca débil en forma de doblete que no fue observado en la mezcla de estándares. Este doblete evidencia que habían dos compuestos que poseían una

polaridad similar y que no podían ser resueltos con este sistema de elución. Una de esas bandas era DAG y la otra posiblemente colesterol o ergosterol. Se ha descrito que en las membranas de *Drosophila* existe una predominancia de ergosterol (69%) sobre el colesterol (3%), Rietveld y cols, (1999). No obstante, no existe ergosterol comercial para hacer pruebas y sin ello, es difícil asegurar la identidad de ese compuesto. La banda de los MAGs en la muestra de rabdómeros fue débil y esto probablemente se debió a una baja abundancia de este compuesto en la muestra (traza). Además se observó una banda desconocida entre los DAG y MAG. Los fosfolípidos se visualizaron en la línea de concentración de la muestra y no migraron en la placa. Esto se debió a la baja polaridad del solvente de elución.

Posteriormente, dos muestras de 1000 ojos cada una (de moscas silvestres adaptadas a oscuridad y luz), que estaban almacenadas en cloroformo y en frío, fueron secadas bajo corriente de nitrógeno, resuspendidas en 20 μ L de Hexano:Cloroformo (1:1 v/v), sonicadas y sembradas en la placa. La figura 45 muestra el desarrollo de la placa.

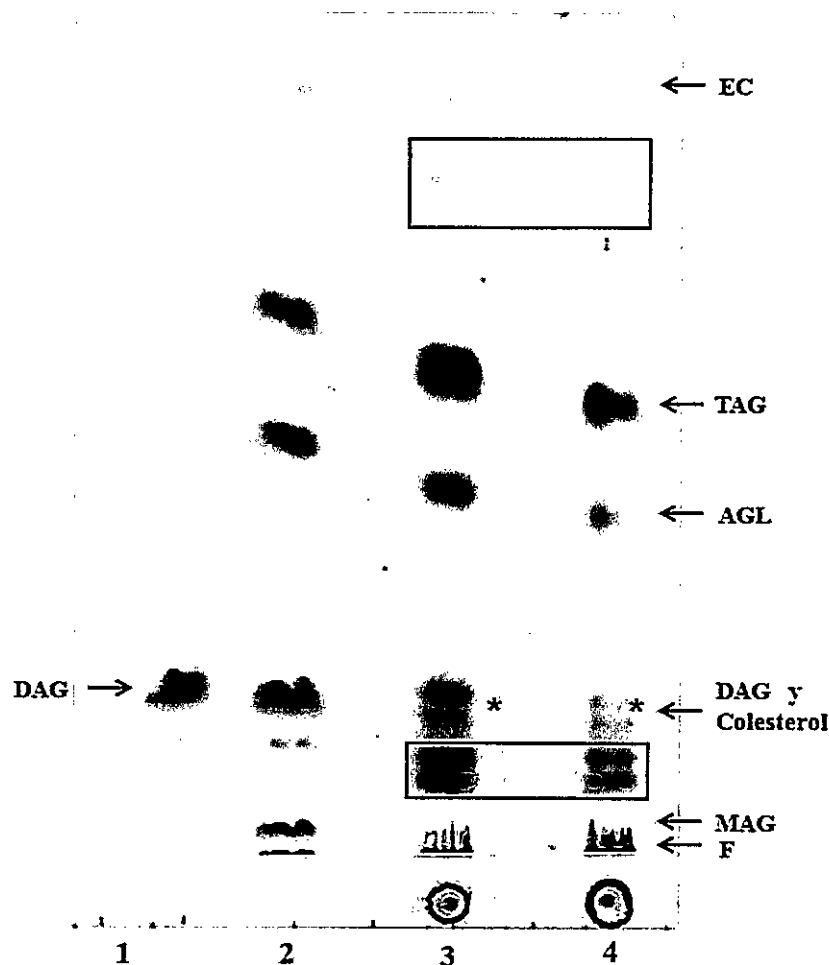


Figura 45. Composición lipídica de la muestra de rabdómeros de ojos silvestres adaptados a la oscuridad y a la luz no presenta diferencias. Se aplicaron los pellets de ambas condiciones en una placa de silica gel. El desarrollo de la cromatografía se realizó según Materiales y Métodos. *Carril 1:* 62,5 μg del estándar dioléina (DAG). *Carril 2:* mezcla de estándares con 62,5 μg de cada uno. *Carril 3:* muestra de ojos silvestres, fracción P2 adaptada a oscuridad. *Carril 4:* muestra de ojos silvestres, fracción P2 adaptada a luz. Los rectángulos indican compuestos desconocidos y el asterisco indica las bandas difusas de DAG y colesterol. Los compuestos altamente polares, que no migran con el sistema de elución utilizado, se visualizan como una aureola en la zona de siembra.

En las muestras de rabdomeros de ojos silvestres adaptados a la oscuridad y a la luz, la banda de los diacilgliceroles se observa como un doblete débil que desaparece rápidamente al ser revelada con vapor de yodo. En este experimento, al igual que en anterior, se utilizó el doble de muestra (1000 ojos) y a pesar de eso, los DAGs no se logran identificar de forma clara con esta técnica cromatográfica. La obtención de una muestra de 250 ojos es laboriosa, requiere 125 moscas y hartas horas de disección; este hecho dificultó fuertemente la continuación de experimentos con esta técnica cromatográfica. Por lo tanto, la baja abundancia de los DAGs en las muestras de rabdomeros hizo extremadamente compleja su identificación de estos lípidos con esta técnica cromatográfica de baja sensibilidad. Además, se sumó la dificultad de diferenciar los diacilgliceroles del colesterol, los cuales coeluyeron en estos experimentos.

Además se observó una banda entre los esteres de colesterol y los triacilglicéridos que no estaba descrita en Kupke y Zeugner, 1978. Como no se disponía de un estándar lipídico que tuviera ese Rf, no se pudo determinar la identidad de ese compuesto. Lo mismo ocurrió con las bandas que se visualizaron entre los diacilgliceroles (DAG) y los monoacilgliceroles (MAG).

Debido a las dificultades observadas con estas dos técnicas analíticas (HPLC y TLC), se decidió hacer el análisis de los diacilgliceroles con una técnica más sensible (con una capacidad de detección $>10^3$ veces que el espectrómetro de masas utilizado en el análisis de los ácidos grasos), que involucraba a un moderno sistema HPLC llamado UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) acoplado a espectrometría de masas de última generación (FT-MS).

REFERENCIAS

- Acharya J., Jalink K., Hardy R., Hartenstein V. y Zuker C. 1997. InsP3 receptor is essential for growth and differentiation but not for vision in *Drosophila*. *Neuron* 18: 881-887.
- Agreen J., Julkunen A. y Penttilä I. 1992. Rapid Separation of Serum Lipids for Fatty Acid Analysis by a Single Aminopropyl Column. *Journal of Lipid Research* 33: 1871-1876.
- Asher G., Lotem J., Kama R., Sachs L. y Shaul Y. 2002. NQO1 stabilizes p53 through a distinct pathway. *Proceedings of the National Academy Sciences USA* 99(5): 3099-3104.
- Astorga G., Härtel S., Sanhueza M. y Bacigalupo J. (2012). TRP y TRPL and cacophony channels mediate Ca²⁺ influx and exocytosis in photoreceptors axons in *Drosophila*. *Plos One* 7(8): e44182.
- Bacigalupo J. y Lisman J. 1983. Single-channel currents activated by light in *Limulus* ventral photoreceptors. *Nature* 304: 268-270.
- Barlow J. 1964. Fatty Acids in Some Insect and Spider Fats. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 42:1365-1374.
- Bennett V., Pruitt N., y Lee R. 1997. Seasonal Changes in Fatty Acid Composition Associated with Cold-Hardening in Third Instar Larvae of *Eurosta solidaginis*. *Journal of Comparative Physiology B* 167: 249-255.
- Bentrop J. y Paulsen R. 1986. Light-Modulated ADP-Ribosylation, Protein Phosphorylation and Protein Binding in Isolated Fly Photoreceptor Membranes. *European Journal of Biochemistry* 161, 61-67.
- Bloomquist B., Shortridge R., Schneuwly S., Perdew M., Montell C., Steller H., Rubin G. y Pak W. 1988. Isolation of a Putative Phospholipase C Gene of *Drosophila*, *norpA*, and its Role in Phototransduction. *Cell* 54: 723-733.
- Boesze-Battaglia K. y Albert A. 1989. Fatty Acid Composition of Bovine Rod Outer Segment Plasma Membrane. *Experimental Eye Research* 49: 699-701.
- Boesze-Battaglia K. y Schimmel R. 1997. Review: Cell Membrane Lipid Composition and Distribution: Implications for Cell Function and Lessons Learned from Photoreceptors and Platelets. *The Journal of Experimental Biology* 200: 2927-2936.
- Boyd R., Jukes-Jones R., Walewska R., Brown D., Dyer M. y Cain K. 2009. Protein Profiling of Plasma Membranes Defines Aberrant Signaling Pathways in Mantle Cell Lymphoma. *Molecular and Cellular Proteomics* 8(7): 1501-1515.

- Christie W. 1986. Separation of Lipid Classes by High-Performance Liquid Chromatography with the Mass Detector. *Journal of Chromatography* 361: 396-399.
- Chyb S., Raghu P. y Hardie R. 1999. Polyunsaturated Fatty Acids Activate the *Drosophila* Light-Sensitive Channels TRP and TRPL. *Nature* 397: 255-259.
- Delgado R. y Bacigalupo J. 2009. Unitary Recordings of TRP and TRPL Channels From Isolated *Drosophila* Retinal Photoreceptor Rhabdomeres: Activation by Light and Lipids. *Journal of Neurophysiology* 101: 2372-2379.
- Dolph P., Man-Son-H., Yarfitz S., Colley N., Deer J., Spencer M., Hurley J. y Zuker C. 1994 An eye-specific G beta subunit essential for termination of the phototransduction cascade. *Nature* 370 (6484):59-61.
- Estacion M., Sinkins W. y Schilling W. 2001. Regulation of *Drosophila* Transient Receptor Potential Like (TrpL) Channels by Phospholipase C-dependent Mechanisms. *The Journal of Physiology* 530: 1-19.
- Fast P. 1966. A Comparative Study of the Phospholipids and Fatty Acids of some insects. *Lipids* 1(3); 209-215.
- Fenn J., Mann M., Meng C., Wong S. y Whitehouse C. 1989. Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules. *Science* 246(4926): 64-71.
- Folch J., Lees M. y Sloane S. 1957. A Simple Method for the Isolation and Purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry* 226: 497-509.
- Furukawa K., Ishida K., Tsunoyama T., Toda S., Osoda S., Horigome T., Fisher P. y Sugiyama S. 2009. A-type and B-type Lamins Initiate Layer Assembly at Distinct Areas of the Nuclear Envelope in Living Cells. *Experimental Cell Research* 315(7): 1181-1189.
- Garcia-Murillas I., Pettitt T., Macdonald E., Okkenhaug H., Georgiev P., Trivedi D., Hassan B., Wakelam M. Y Raghu P. 2006. *Lazaro* Encodes a Lipid Phosphate Phosphohydrolase that Regulates Phosphatidylinositol Turnover during *Drosophila* Phototransduction. *Neuron* 49, 533-546.
- Gilbert L. 1967. Lipid metabolism and function in insects. *Advances in Insect Physiology* 4; 69-211.
- Gillo B., Chorna I., Chen H., Cook B., Manistersky I., Chorev M., Arnon A., Pollock J., Selinger Z. y Minke B. 1996. Coexpression of *Drosophila* TRP and TRP-like proteins in *Xenopus* oocytes reconstitutes capacitative Ca²⁺ entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93: 14146-14151.
- Greenspan M. y Schroeder E. 1982. Separation and Detection of Neutral Lipids and Free Fatty Acids in a Liver Extract by High-Performance Liquid Chromatography. *Analytical Biochemistry* 127, 441-448.

- Hammad L., Cooper B., Fisher N., Montooth K. y Karty J. 2011. Profiling and quantification of *Drosophila melanogaster* lipids using liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 25: 2959-2968.
- Harada M., Hanada S., Toivola D., Ghorri N. y Omary M. 2008. Autophagy Activation by Rapamycin Eliminates Mouse Mallory-Denk Bodies and Blocks their Proteasome Inhibitor-Mediated Formation. *Hepatology* 47:2026-2035.
- Hardie R. y Postma M. 2008. Phototransduction in Microvillar of Photoreceptors of *Drosophila* and Other Invertebrates. *The Senses: A comprehensive Reference, Vol 1, Vision 1*, Richard Masland and Thomas D. Albright. San Diego: Academic Press; p. 77-130.
- Hardie R. 2007. TRP channels and lipids: from *Drosophila* to mammalian physiology. *Journal of Physiology* 578.1: 9-24.
- Hardie R., Gu Y., Martin F., Sweeney S. y Raghu P. 2004. In vivo light-induced and basal phospholipase C activity in *Drosophila* photoreceptors measured with genetically targeted phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-sensitive ion channels (Kir2.1). *Journal Biological Chemistry* 279: 47773-47782.
- Hardie R., Martin F., Cochrane G., Juusola M., Georgiev P. y Raghu P. 2002. Molecular basis of amplification in *Drosophila* phototransduction: roles for G protein, phospholipase C, and diacylglycerol kinase. *Neuron* 36: 689-701.
- Hardie R. y Raghu P. 2001. Visual transduction in *Drosophila*. *Nature* 413: 186-193.
- Hardie R., Raghu P., Moore S., Juusola M., Baines R. y Sweeney S. 2001 Calcium Influx via TRP Channels is Required to Maintain PIP₂ Levels in *Drosophila* Photoreceptors. *Neuron* 30: 149-159.
- Hardie R. y Raghu P. 1998. Activation of heterologous expressed *Drosophila* TRPL channels: Ca²⁺ is not required and InsP₃ is not sufficient. *Cell Calcium* 24(3): 153-163.
- Hardie R. 1995. Photolysis of caged Ca²⁺ facilitates and inactivates but does not directly excite light-sensitive channels in *Drosophila* photoreceptors. *The Journal of Neuroscience* 15:889-902.
- Hardie R., Peretz A., Suss-Toby E., Rom-Glas A., Bishop S., Selinger Z. y Minke B. 1993. Protein kinase C is required for light adaptation in *Drosophila* photoreceptors. *Nature* 363: 634-637.
- Hardie R. 1991. Whole Cell-Recordings of the light-induced currents in *Drosophila* photoreceptor: evidence for feedback by calcium permeating the light sensitive channels. *Proceedings of the Royal Society B* 245:203-210.
- Hartree E. 1972. Determination of protein: A modification of the Lowry Method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry* 48, 422-427.
- Hofmann T., Obukhov A., Schaefer M., Harteneck C., Gudermann T. y Schultz G. 1999. Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* 397, 259-263.

- Hu Y. y Schilling W. 1995. Receptor-mediated activation of recombinant Trp1 expressed in Sf9 insect cells. *Biochemical Journal* 305: 605-611.
- Huang F., Matthies H., Speese S., Smith M. y Broadie K. 2004. Rolling blackout, a newly identified PIP₂-DAG pathway lipase required for *Drosophila* phototransduction. *Nature Neuroscience* 7: 1070-1078.
- Hummel J., Segu S., Li Y., Irgang S., Jueppner J. y Giavalisco P. 2011. Ultra performance liquid chromatography and high resolution mass spectrometry for the analysis of plant lipids. *Frontiers in Plant Science* 2(54): 1-17.
- Jones H., Harwood J., Bowen I. y Griffiths G. 1992. Lipid composition of subcellular membranes from larvae and prepupae of *Drosophila melanogaster*. *Lipids* 27 (12): 984-987.
- Jors S., Kazanski V., Foik A., Krautwurst D., y Harteneck C. 2006. Receptor-induced Activation of *Drosophila* TRP γ by Polyunsaturated Fatty Acids. *The Journal of Biological Chemistry* 281 (40): 29693-29702.
- Lucas P., Uhkhanov K., Leinders-Zufall T. y Zufall F. A Diacylglycerol-Gated Cation Channel in Vomeronasal Neuron Dendrites Is Impaired in TRPC2 Mutant Mice: Mechanism of Pheromone Transduction. *Neuron* 40, 551-561.
- Katz B. y Minke B. 2009. *Drosophila* photoreceptors and signaling mechanisms. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 3: 1-18.
- Klenk H. y Choppin P. 1970. Plasma membrane lipids and parainfluenza virus assembly. *Virology* 40: 939-947.
- Kwon Y. y Montell C. 2006. Dependence on the *Lazaro* Phosphatidic Acid Phosphatase for the Maximun Light Response. *Current Biology* 16, 723-729.
- Leung H., Tseng-Crank J., Kim E., Mahapatra C., Shino S., Zhou Y., An L., Doerge R. y Pak W. 2008. DAG Lipase Activity Is Necessary for TRP Channel Regulation in *Drosophila* Photoreceptors. *Neuron* 58(6): 884-896.
- Lev S., Katz B. y Minke B. 2012. The activity of the TRP-like channel depends on its expression system. *Channels* 6(2), 86-93.
- Maples C., Ruiz W. y Apodaca G. 1997. Both microtubules and actin filaments are required for the efficient postendocytotic traffic of the polymeric immunoglobulin receptor in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *The Journal of Biological Chemistry* 272(10): 6741-6751.
- Matyash V., Liebisch G., Kurzchalia T., Shevchenko A. y Schwudke. 2008. Lipid extraction by methyl-tert-butyl-ether for high-throughput lipidomics. *Journal of Lipid Research* 49(5): 1137-1146.
- Minke B. y Cook B. (2002). TRP channel proteins and signal transduction. *Physiological Reviews* 82, 429-472.

- Okada T., Inoue R., Yamazaki K., Maeda A., Kurosaki T., Yamakuni T., Tanaka I., Shimizu S., Ikenaka K., Imoto K. y Mori Y. (1999). Molecular and Functional Characterization of a Novel Mouse Transient Receptor Potential Protein Homologue TRP7. *The Journal of Biological Chemistry* 274 (39), 27359-27370.
- Parisi M., Li R. and Oliver B. (2011). Lipid profiles of female and male *Drosophila*. *BMC Research Notes* 4:198.
- Pollock J., Assaf A., Perets A., Nichols C., Mojet M., Hardie R. y Minke B. 1995. TRP, a Protein Essential for Inositide-Mediated Ca²⁺ Influx is Localized Adjacent to the Calcium Stores in *Drosophila* Photoreceptors. *The Journal of Neuroscience* 15(5): 3747-3760.
- Ranganathan R., Bacskai B., Tsien R. y Zuker C. 1994. Cytosolic calcium transients: spatial localization and role in *Drosophila* photoreceptor cell function. *Neuron* 13(4): 837-848.
- Raghu P., Usher K., Jonas S., Chyb S., Polyanovsky A. y Hardie R. 2000a. Constitutive activity of the light-sensitive channels TRP and TRPL in the diacylglycerol kinase mutant, *rdgA*. *Neuron* 26(1): 169-179.
- Raghu P., Colley N., Webel R., James T., Hasan G., Danin M., Selinger Z. y Hardie R. 2000b. Normal phototransduction in *Drosophila* photoreceptors lacking an InsP(3) receptor gene. *Molecular and Cellular Neurosciences* 15: 429-445.
- Rapport E., Stanley-Samuelson D. y Dadd R. 1984. Ten generations of *Drosophila melanogaster* reared axenically on a fatty acid-free holidic diet. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 1:243-250.
- Rietveld A., Neutz S., Simons K. y Eaton S. 1999. Association of Sterol-and Glycosylphosphatidylinositol-linked Proteins with *Drosophila* Raft Lipid Domains. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 12049-12054.
- Sanxaridis P., Cronin M., Rawat S., Waro G., Acharya U. y Tsunoda S. (2007). Light-induced recruitment of INAD-signaling complexes to detergent-resistant lipid rafts in *Drosophila* photoreceptors. *Molecular and Cellular Neuroscience* 36: 36-46.
- Scott K., Becker A., Sun Y., Hardy R. y Zuker C. 1995. Gq alpha protein function in vivo: genetic dissection of its role in photoreceptor cell physiology. *Neuron*. 15(4):919-927.
- Shen L., Qiang Lai C., Feng X., Parnell L., Wan J., Wang J., Li D., Ordovas J. y Kang J. 2010. *Drosophila* lacks C20 and C22 PUFAs. *Journal of Lipid Research* 51: 2985-2992.
- Smith D., Ranganathan R., Hardy R., Marx J., Tsuchida T. y Zuker C. 1991. Photoreceptor deactivation and retinal degeneration mediated by a photoreceptor-specific protein kinase C. *Science* 254: 1478-1484.
- Stanley-Samuelson D., Jurenka R., Crips C., Blomquist G. y de Renobales M. 1988. Fatty acids in insects: Composition, Metabolism, and Biological Significance. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 9:1-33-

Stark W., Lin T., Brackhahm D., Christianson J. y Sun G. 1993. Fatty acids in lipids of *Drosophila* heads: Effects of visual mutants, carotenoid deprivation and dietary fatty acids. *Lipids* 28: 345-350.

Stuurman N., Maus N y Fisher P. 1995. Interphase phosphorylation of the *Drosophila* nuclear lamin: site-mapping using a monoclonal antibody *Journal of Cell Science* 108: 3137-3144.

Stuurman N., Sasse B. y Fisher P. 1996. Intermediate filament protein polymerization: molecular analysis of *Drosophila* nuclear lamin head-to-tail binding. *Journal of Structural Biology* 117(1): 1-15.

Venkatachalam K. y Montell C. 2007. TRP Channels. *Annual Review of Biochemistry* 76:387-417.

Wang T. y Montell C. 2006. A Phosphoinositide Syntase Required for a Sustained Light Response. *The Journal of Neuroscience* 26(49): 12816-12825.

Wang T. y Montell C. 2007. Phototransduction and retinal degeneration in *Drosophila*. *Pflugers Archiv – European Journal of Physiology* 454: 821-847.

Xu Y., Heillier J., Madalinski G., Genin E., Ezan E., Tabet J. y Junot C. 2010. Evaluation of accurate mass and relative isotopic abundance measurements in the LTQ-orbitrap mass spectrometer for further metabolomics database building. *Analytical Chemistry*. 82: 5490-5501.

Yau K. y Hardie H. 2009. Phototransduction motifs and variations. *Cell* 139: 246-264.

Yoshioka T., Inoue H., Kasama T., Seyama Y., Nakashima S., Nozawa Y. y Hotta Y. 1985. Evidence that arachidonic acid is deficient in phosphatidylinositol of *Drosophila* heads. *Journal of Biochemistry* 98: 657-662.