



*Universidad Nacional de La Plata Facultad de Ciencias  
Naturales  
Y Museo*

***Lipoproteínas de Crustáceos.  
Metabolismo y efecto de xenobióticos***

***Tesis Doctoral  
Carlos Fernando Garcia***

***Director de Tesis  
Dr. Ricardo Pollero***

***Co-Directora de Tesis  
Dra. María del Rosario González-Baró  
-2003-***

***Lipoproteínas de Crustáceos.  
Metabolismo y efecto de xenobióticos***

*Tesis Doctoral  
Carlos Fernando Garcia*

*Director de Tesis  
Dr. Ricardo Pollero*

*Co-Directora de Tesis  
Dra. María del Rosario González-Baró  
-2003-*



*Universidad Nacional de La Plata  
Facultad de Ciencias Naturales  
Y Museo.*

El presente trabajo de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Naturales, fue realizado en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP), Facultad de Ciencias Médicas, UNLP, bajo la dirección del Prof. Dr. Pollero Ricardo J. y la Dra. González-Baró María del Rosario.

*Dedicado a Mabel, Lena y Yaco,  
por iluminar y llenar de alegría  
todos y cada uno de  
mis días.*

*Mi reconocimiento:*

*Al Doctor Rodolfo Brenner por haberme abierto las puertas de esta querida familia llamada INIBIOLP. Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por su apoyo financiero, que hizo posible este trabajo de investigación.*

*Mi agradecimiento:*

*Especialmente a mi Director de Tesis, Ricardo Pollero, por haberme dado esta oportunidad tan valiosa, por sus juicios de valor, por su guía constante, por ser como es; en definitiva por hacer que ser un "Pollero" sea un orgullo.*

*A mi Co-Directora de Tesis, María del Rosario González-Baró, por su paciencia, su empeño, su tiempo, su calidez humana, su tutela, su minuciosas y certeras correcciones, sus ideas y por este trabajo que es suyo.*

*A Horacio Heras, Sabrina, Horacio Garda y Ale porque me hicieron llegar su cariño, amistad y por mucho pero mucho más que las fotos y las figuras. A Monilicu y Marquitos por compartir tantos momentos de amistad, alegrías y tristezas. A los Polleros viejos (Laurita y la Garín), y a los Polleros nuevos (Magalí). A todos los Garda por ser como los Polleros, a todos los Inibiolp por ayudarme a realizar este sueño.*

*A Mabel por su apoyo en todos mis proyectos, por su tiempo, su amor y por darme esas dos almitas maravillosas llamadas Lena y Yaco. A ellos les debo, barriletes, chupetines y juegos. A mi madre le agradezco su calidez y su ternura. A mi madre política le agradezco por ser como es. A mi padre biológico y a mi padre político, les agradezco sus consejos. A mi hermano por estar cerca estando lejos.*

*A Miguel Reigosa por su hermandad y por conservar mi integridad en momentos difíciles, y a las sombras científicas del pasado por la cálida luz de este presente.*

*Simplemente gracias.....*



## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

AGL:	ácidos grasos libres
ARN:	ácido ribonucleico
ATP:	adenosintrifosfato
CDP:	citidindifosfato
Ci:	Curie ( $2.22 \times 10^{12}$ desintegraciones por minuto)
CoA:	Coenzima A
COL:	colesterol
$\Delta$ :	diferencia de polarización de fase
DDT:	diclorodifeniltricloroetano
DMSO:	dimetil sulfóxido
DPH:	1.6-difenil-1, 3, 5-hexatrieno
DPH-PA:	ácido 3-(4-(6-fenil)-1,3,5-hexatrienil) fenilpropiónico
dpm:	desintegraciones por minuto
DPPC:	dipalmitoil fosfatidilcolina
EDTA:	ácido etilendiaminotetracético
EMAG:	ésteres metílicos de ácidos grasos
FAD:	dinucleótido de flavina y adenosina
FMN:	mononucleótido de flavina
FS:	Fenitrotión (ácido O-O-dimetil o-(3-metil-4-nitrofenil)ester fosforotioico)
GLC:	cromatografía gas-líquido
HDL:	lipoproteína de alta densidad
HPLC:	cromatografía líquida de alta performance
HPTLC:	cromatografía en capa delgada de alta performance

KDa:	kilodalton
LDL:	lipoproteína de baja densidad
LP:	liposoma
LV:	lipovitelina
Mr:	relación molecular
NADH:	dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma reducida)
PAGE:	electroforesis en gel de poliacrilamida
PC:	fosfatidilcolina
PE:	fosfatidiletanolamina
POPC:	1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina
ppm:	partes por millón
rs:	anisotropía de fluorescencia en estado estacionario
$r_{\infty}$ :	anisotropía límite
Rf:	<hr/> distancia recorrida por el soluto distancia recorrida por el solvente
SDS:	dodecilsulfato de sodio
SM:	esfingomielina
$\tau_m$ :	tiempo de vida media de fluorescencia medido por modulación
$\tau_p$ :	tiempo de vida media de fluorescencia medido por fase
$\tau_r$ :	tiempo de correlación rotacional
TEMED:	tetrametilendiamina
TG:	triacilglicéridos
TLC:	cromatografía en capa delgada
TLC-FID:	cromatovarillas asociadas a un detector de ionización de llama

VG: vitelogenina

VHDL: lipoproteína de muy alta densidad

VLDL: lipoproteína de muy baja densidad



# **CONVENCIONES PARA NOMBRAR ÁCIDOS GRASOS**

Para designar a los ácidos grasos se pueden utilizar los siguientes sistemas de nomenclatura:

# Nomenclatura trivial: Ejemplo: ácido palmítico.

# Nomenclatura abreviada: Ejemplo 18:3 n-3. El primer número indica el número de carbonos del ácido graso. El número a continuación de los dos puntos indica el número de dobles ligaduras, y el número a continuación del n- indica el número de carbonos existentes desde la última doble ligadura hasta el grupo metilo terminal.

# Nomenclatura sistemática: Ejemplo 18:3  $\Delta^{9,12,15}$ . Como en la nomenclatura anterior, el primer número indica el número total de carbonos del ácido graso. El número a continuación de los dos puntos, indica el número de dobles ligaduras, y los superíndices de  $\Delta$  indican en forma explícita y en orden creciente la posición de las insaturaciones, comenzando desde el grupo carboxilo.

## **RESUMEN**

Las lipoproteínas, ya sean plasmáticas o vitelínicas, cumplen una función importante en el transporte y utilización de los lípidos en los organismos. Los estudios realizados hasta la actualidad sobre lipoproteínas de invertebrados son abundantes en algunos grupos taxonómicos y escasos en otros. Los grupos más estudiados dentro de los artrópodos son los insectos y los crustáceos, aunque en nuestro modelo de estudio (*Macrobrachium borellii*, camarón de agua dulce), las lipoproteínas no habían sido caracterizadas. Dado que la investigación sobre algunas funciones y comportamiento de las lipoproteínas plasmáticas y de vitelo de los crustáceos, fueron el objetivo general de este trabajo de tesis, fue necesario comenzar con una caracterización detallada de las lipoproteínas presentes en esta especie. Estos modelos lipoproteicos bien caracterizados, fueron luego utilizados para desarrollar la mayor parte de esta tesis y alcanzar los objetivos específicos. Uno de ellos fue aportar conocimientos acerca de la relación entre lipoproteínas circulantes y vitelínicas; otro fue analizar las modificaciones generadas en estas últimas a lo largo del desarrollo embrionario, como así también determinar la capacidad de intercambio de lípidos entre lipoproteínas y tejidos. Otro conjunto de objetivos específicos estuvo relacionado con los primeros estudios acerca del efecto que ejercen los plaguicidas sobre las estructuras y funciones de las lipoproteínas. Para esto se emplearon como modelos lipoproteinas de *M. borellii* con diferentes composiciones lipídicas y apoproteicas.

Mediante ultracentrifugaciones en gradientes de densidad, se pudieron detectar en el plasma de animales de ambos sexos una lipoproteína denominada HDL 1, en hembras vitelogénicas una lipoproteína llamada HDL 2, y en el citosol de huevos una tercera denominada LV. La composición lipídica fue determinada por microanálisis en TLC y GLC y la proteica por electroforesis. Las tres partículas resultaron ser de alta densidad (HDL), y en su composición lipídica predominaron los fosfolípidos. La composición apoproteica mostró la presencia de distinto número de subunidades, con distinto peso molecular. La HDL 1 posee similitudes en su composición general con HDLs de otros crustáceos, y es la encargada de transportar lípidos entre los diferentes órganos. La HDL 2 posee un alto contenido de esfingomielina, y es la lipoproteína hemolinfática relacionada con la formación de vitelo; por último la LV es la

lipoproteína que realiza el principal aporte de lípidos y proteínas para el desarrollo del embrión.

Como resultado del análisis comparativo de la LV y la HDL 2, se observó que no solo poseen similar densidad de hidratación, sino también igual masa de la partícula nativa (determinada por electroforesis) y similitud en las subunidades proteicas de mayor peso molecular. Por lo tanto, puede inferirse que estas partículas lipoproteicas se encuentran relacionadas funcional y estructuralmente, sugiriendo que la HDL 2 es precursora de la LV. Cabe destacar que la LV posee casi el doble de fosfolípidos que la HDL 2 y además posee una concentración algo mayor de triacilglicéridos, indicando la posible carga de estos lípidos en el ovario, para la posterior formación de la LV.

Han sido previamente reportadas variaciones en la composición bioquímica del vitelo completo durante la embriogénesis de *M. borellii*, pero nunca fueron estudiadas en la única lipovitelina presente en dicho vitelo. Nos propusimos entonces determinar las posibles modificaciones estructurales en la LV ocasionadas por su consumo a lo largo del desarrollo embrionario. Se pudieron caracterizar tres estados estructurales diferentes de la lipovitelina, uno temprano, otro medio, y finalmente uno tardío, que hemos llamado respectivamente LV 1, LV 2 y LV 3. Se observó que durante la embriogénesis se consumen de forma similar los lípidos y las proteínas de la LV, generando partículas de igual densidad y relación lípidos totales / proteínas totales. Los análisis de la porción proteica revelaron que ninguna subunidad en particular es selectivamente utilizada y que todas ellas se consumen en igual proporción. Contrariamente, los resultados del análisis de la composición lipídica de la LV, demostraron el consumo precisamente de los lípidos acumulados antes del desarrollo embrionario (fosfatidilcolina y triacilglicéridos).

Para dilucidar por primera vez el mecanismo de transferencia de lípidos entre lipoproteínas circulantes y tejidos en un grupo tan grande y diverso como los crustáceos, se determinó la transferencia de ácidos grasos libres y glicéridos, estudiando *in vitro* el intercambio de sustratos radiactivos entre la hemolinfa y el principal órgano metabólico de lípidos (hepatopáncreas). Para tal fin se inyectó a los animales ácido palmítico radiactivo. La disminución del ácido palmítico circulante en la hemolinfa a lo largo de la incubación, con un concomitante aumento de los glicerolípidos, sugirió que el precursor inyectado en la hemolinfa se incorpora en los tejidos, y que éstos, luego de sintetizar glicerolípidos, los devuelven a la circulación.

Se comprobó que los diferentes lípidos son captados por la lipoproteína HDL 1. La distribución de la radiactividad en los lípidos del hepatopáncreas luego de incorporado el ácido palmítico radiactivo mostró acumulación, a tiempos moderados, en triacilglicéridos y fosfatidilcolina, y a tiempos largos fue más activo en la síntesis de este último. Los resultados del estudio de transferencia de lípidos *in vitro* desde la hemolinfa (dadora de lípidos radiactivos) hacia el hepatopáncreas (aceptor de lípidos), mostraron una clara tendencia a transferir ácido graso libre, más que glicéridos. En la transferencia *in vitro* inversa en la que el hepatopáncreas fue dador y la hemolinfa aceptor, se observó la transferencia de fosfatidilcolina, triacilglicérido y ácido graso libre. Además, luego de realizar experimentos con hepatopáncreas dadores lavados (en los que se removieron los lípidos y ciertas proteínas de la superficie), se reveló la transferencia solo de ácidos grasos libres, y se pudo sugerir la existencia de algún factor de transferencia (probablemente proteico) necesario para la transferencia de la fosfatidilcolina desde el tejido a la hemolinfa, e innecesario para la transferencia de ácidos grasos libres.

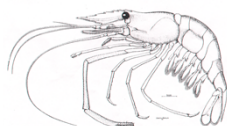
Debido a que las lipoproteínas hemolinfáticas descritas anteriormente (HDL 1 y HDL 2) poseen diferencias cuali y cuantitativas importantes en la porción lipídica, y además cumplen roles relevantes en la fisiología de los lípidos en este grupo, representan un excelente modelo para evaluar el efecto de xenobióticos en relación con sus composiciones y funciones. Asumiendo que las alteraciones en membranas observadas antes por acción de un plaguicida podrían ocurrir también en otros sistemas lipoproteicos, tales como las lipoproteínas, se hicieron ensayos en ese sentido. Se estudió el efecto de distintas concentraciones del plaguicida organofosforado fenitrotión (FS) sobre la dinámica de los lípidos de HDL 1 y HDL 2. Se realizaron para tal fin medidas de polarización de fluorescencia de los fluoróforos DPH y DPH-PA, los cuales se insertan respectivamente en interior hidrofóbico y en la región más externa de las lipoproteínas. Esto brindó información de la microviscosidad del entorno de dichas sondas. Se determinó así que el FS penetra en ambas lipoproteínas (HDL 1 y HDL 2) y modifica sus estructuras; generando aumentos en la rigidez del interior y de la periferia en forma proporcional a la concentración del tóxico adicionada. El grado de rigidización es distinto en cada lipoproteína, dependiendo de las diferencias en sus composiciones lipídicas, siendo la más notoria la rigidización diferencial debida a ausencia y presencia de esfingomiélinas en la HDL 1 y HDL 2, respectivamente. El agregado del tóxico generó

disminución en las medidas de los tiempos de vida media resueltos por fase y modulación de las sondas fluorescentes, hecho que fue atribuido principalmente a la penetración de agua en los diferentes sistemas ensayados, provocada por perturbaciones en las lipoproteínas. Para determinar si los cambios estructurales generados por la presencia de FS en la principal lipoproteína plasmática de *M. borellii* (HDL 1) ocasionaban también cambios funcionales, se estudió la capacidad de esta lipoproteína para ligar *in vitro* ácido graso libre. Para tal fin se trató la lipoproteína con diferentes concentraciones de FS, luego se incubaron lipoproteínas tratadas y no tratadas con ácido palmítico marcado isotópicamente, y por último, las proteínas fueron separadas por cromatografía líquida de alta performance (HPLC). Se demostró que el FS disminuye la capacidad de unión del ácido graso libre a la lipoproteína, en forma proporcional a la concentración de tóxico adicionada, modificando consecuentemente su función biológica.

Las lipovitelininas en las especies ovígeras son primordiales para la viabilidad del embrión. En el caso de *M. borellii* éstas pueden estar expuestas a los diferentes xenobióticos posiblemente por dos vías, por exposición directa agua-huevo, o por traslado al ovario vía HDL 2. En esta especie la lipovitelinina se modifica en su composición lipídica naturalmente a lo largo del desarrollo embrionario, generando de esta forma modelos lipoproteicos con idéntica apolipoproteína constituyente y diferente composición lipídica. Para los siguientes ensayos se aisló del citosol de huevos la LV en estado temprano y tardío (LV 1 y LV 3 respectivamente). La forma LV 2 no se utilizó por presentar características intermedias. Dado que el conjunto de variables lipídicas y proteicas determinan sistemas complejos y generan algunas dificultades en la interpretación de los resultados de la interacción FS-lipoproteínas, surgió la necesidad de utilizar también modelos menos complejos, con menor número de variables. Para conocer, por contraste, el rol de las proteínas sobre la interacción FS-lipoproteínas, se construyeron liposomas con los lípidos aislados de ambas formas de la lipovitelinina, generando de este modo modelos que prescinden totalmente de la influencia de la porción proteica, llamados respectivamente LP 1 y LP 3. Mediante las técnicas descritas anteriormente se evaluó esta vez el efecto del FS sobre los cuatro modelos de estudio (LV 1, LV 3, LP 1 y LP 3). De los resultados de las medidas de fluorescencia se observó que el FS también modifica las diferentes estructuras de la lipovitelinina, alterando el empaquetamiento de los lípidos del interior y de la zona más externa sondeada por el DPH-PA, siendo dicha alteración del mismo orden en los

liposomas correspondientes. En todos los casos, el efecto es proporcional a la concentración del tóxico empleado. Además, el plaguicida afecta el orden y la fluidez de los lípidos, sólo en la forma tardía de la lipovitulina (LV 3). De forma similar a lo que sucede en las lipoproteínas plasmáticas, el FS genera cambios estructurales que permiten el ingreso de agua a las regiones sondeadas por los fluoróforos. El estudio de los cambios funcionales generados por la adición de FS, se realizó en este caso, ligando ácido graso radiactivo a las LVs, y luego estudiando cómo se producía la liberación de éste, al ser tratadas las LVs con el tóxico. La técnica de aislamiento fue similar a la descrita anteriormente. De este estudio se puede concluir que en el estadio más temprano, la lipoproteína es afectada estructural y funcionalmente sólo con altas concentraciones de FS (20 ppm); en cambio la lipovitulina de estadio tardío es afectada aún a bajas concentraciones (1 y 20 ppm). Esta alteración diferencial determina no solo una correlación directa entre la estructura y la función, sino también la existencia de un estado estructural de la lipovitulina más sensible al tóxico.

## ***INDICE TEMATICO***



## RESÚMEN

### ÍNDICE TEMÁTICO

<b>INTRODUCCIÓN</b> -----	<b>1</b>
1 <i>Macrobrachium borellii</i> COMO MODELO EXPERIMENTAL-----	2
1-1 Generalidades-----	2
# Ubicación taxonómica-----	3
1-2 Breve descripción anatómo-fisiológica de los sistemas digestivo, circulatorio y reproductor-----	4
# Sistema digestivo-----	4
# Sistema circulatorio-----	5
# Sistema reproductor-----	6
1-3 Descripción y Distribución-----	7
1-4 Reproducción y desarrollo-----	8
1-5 Incubación de los huevos, nacimiento de las larvas y estadios postlarvales---	9
2 GENERALIDADES SOBRE LOS LÍPIDOS EN LOS CRUSTÁCEOS. COMPOSICIÓN Y METABOLISMO DE LÍPIDOS EN <i>M. borellii</i> .-----	10
2-1 Principales clases de lípidos constituyentes-----	10
2-2 Otros lípidos-----	11
2-3 Biosíntesis y degradación de lípidos. -----	12
# Digestión y absorción-----	12
# Metabolismo-----	13
2-4 Composición de lípidos y ácidos grasos en <i>M. borellii</i> -----	15
2-5 Variación estacional en las composiciones de lípidos y ácidos grasos de <i>M. borellii</i> -----	16
2-6 Metabolismo de lípidos en <i>M. borellii</i> -----	18
3 LIPOPROTEÍNAS-----	20
3-1 Lipoproteínas circulantes en invertebrados acuáticos-----	21



3-2	Lipoproteínas en crustáceos-----	22
3-3	Lipovitelinas y vitelogeninas-----	23
#	Lipovitelinas de crustáceos-----	24
#	Relación entre lipovitelinas y vitelogeninas-----	24
4	INFLUENCIA DE PESTICIDAS SOBRE SISTEMAS LIPOPROTEICOS-----	25
4-1	Efecto sobre propiedades de membranas naturales y liposomas-----	25
	<b>OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO-----</b>	<b>29</b>
	<b>MATERIALES Y MÉTODOS-----</b>	<b>31</b>
	REACTIVOS Y DROGAS UTILIZADAS-----	32
1	MUESTREO, MANTENIMIENTO Y DISECCIONES DE <i>Macrobrachium borellii</i> . -----	32
1-1	<b>UBICACIÓN Y DESCRIPCIÓN DE LA ZONA DE MUESTREO-----</b>	<b>32</b>
1-2	Captura, transporte y mantenimiento de los ejemplares-----	33
#	Captura-----	33
#	Transporte-----	33
#	Mantenimiento-----	33
1-3	Disecciones-----	34
#	Extracción de hemolinfa-----	34
#	Disección de hepatopáncreas-----	34
#	Colección de huevos-----	35
2	DETECCIÓN Y AISLAMIENTO DE LAS LIPOPROTEÍNAS HEMOLINFÁTICAS. -----	35
2-1	Ultracentrifugación en gradiente de densidad y fraccionamiento-----	35
2-2	Medidas efectuadas en las fracciones-----	36
#	Monitoreo de proteínas totales-----	36

# Medida de densidad de las fracciones-----	36
2-3           Aislamiento de las lipoproteínas-----	36
3 DETECCIÓN Y AISLAMIENTO DE LAS LIPOPROTEÍNAS VITELÍNICAS--	37
3-1        Obtención del citosol de huevos-----	37
3-2        Detección y aislamiento de lipovitelina-----	37
4 ANÁLISIS DE LÍPIDOS. -----	37
4-1            Obtención de lípidos totales-----	37
4-2            Análisis de lípidos por cromatografía en capa fina-----	38
4-3            Identificación-----	39
4-4        Microdeterminación de lípidos-----	39
# Confección de las curvas de calibración-----	40
# Desarrollo de la cromatografía-----	40
# Cuantificación-----	41
4-5        Análisis de ácidos grasos por cromatografía gas-líquido-----	43
# Saponificación de los lípidos-----	44
# Derivatización de ácidos grasos-----	44
# Identificación de ácidos grasos-----	44
5 ANÁLISIS DE APOPROTEÍNAS-----	45
5-1        Diálisis de las muestras-----	45
5-2        Cuantificación de proteínas totales-----	45
5-3        Separación electroforética de las muestras en geles de poliacrilamida (PAGE)	
-----	46
5-4        Preparación de geles en gradiente para sistema no disociante (PAGE)-----	46
5-5        Preparación de geles en gradiente para sistema desnaturalizante (SDS-	
PAGE)-----	48
5-6        Revelado de las proteínas y determinación de sus pesos moleculares-----	48
6 MEDIDAS DE FLUORESCENCIA-----	49
6-1        Fundamentos generales-----	49
6-2        Condiciones que deben tener los marcadores de fluorescencia-----	50
6-3        Anisotropía de fluorescencia-----	52

6-4	Fundamentos de las medidas de fluorescencia resueltas en el tiempo-----	53
-----	---	----

## 7 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DE LA TRANSFERENCIA DE LÍPIDOS ENTRE EL HEPATOPÁNCREAS Y LA HEMOLINFA-----57

7-1	Marcación <i>in vivo</i> con precursor radiactivo-----	57
7-2	Aislamiento de la lipoproteína plasmática común a ambos sexos (HDL 1)---	57
7-3	Extracción y análisis de lípidos-----	58
7-4	Transferencia lipídica-----	58
7-5	Preparación de liposomas e incubación con HDL 1-----	59

## 8 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DEL EFECTO DE UN XENOBIOTICO SOBRE LIPOPROTEÍNAS Y LIPOSOMAS. -----60

8-1	Preparación de las muestras-----	60
8-2	Medidas de fluorescencia realizadas en lípidos-----	61
8-3	Determinación de la captación y liberación de ácido graso por las lipoproteínas -----	62

### **CAPÍTULO 1:**

#### AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS, Y VITELÍNICAS DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO. -----

-----64

1-1	Introducción-----	65
1-2	Resultados	
#	Aislamiento de lipoproteínas circulantes y vitelínicas-----	66
#	Análisis de lípidos-----	66
#	Análisis de apoproteínas-----	67
#	Variaciones lipídicas y proteicas a lo largo del desarrollo embrionario-----	68
1-3	Discusión-----	76

### **CAPÍTULO 2:**

TRANSFERENCIA DE LÍPIDOS ENTRE HEMOLINFA Y HEPATOPÁNCREAS DE <i>Macrobrachium borellii</i> . -----	79
2-1      Introducción-----	80
2-2      Resultados	
# Incorporación del ácido palmítico al hepatopáncreas y a la hemolinfa-----	81
# Transferencia lipídica entre la hemolinfa y el hepatopáncreas-----	82
2-3      Discusión-----	89

### **CAPÍTULO 3:**

EFFECTO DE UN PLAGUICIDA ORGANOFOSFORADO SOBRE PROPIEDADES FÍSICAS DE LIPOPROTEÍNAS. -----	92
3-1      Introducción-----	93
3-2      Resultados	
# Aislamiento y análisis de lipoproteínas-----	94
# Anisotropía de fluorescencia en estado estacionario-----	94
# Medidas dinámicas de fluorescencia-----	95
# Capacidad de la HDL 1 para ligar ácido palmítico-----	96
3-3      Discusión-----	104

### **CAPÍTULO 4:**

EFFECTO DEL FENITROTIÓN SOBRE PROPIEDADES FÍSICAS Y FUNCIONALES DE LA LIPOPROTEÍNA VITELINICA EN DIFERENTES ESTADOS DE DESARROLLO EMBRIONARIO. -----	107
4-1      Introducción-----	108
4-2      Resultados	
# Caracterización de los sistemas lipoproteicos y lipídicos empleados-----	109
# Medidas estáticas de fluorescencia-----	110
# Medidas dinámicas de fluorescencia-----	111
# Aumento de la liberación de AGL por las lipovitelinas-----	112
4-3      Discusión-----	121

<b>CONCLUSIONES</b> -----	125
---------------------------	-----

<b>BIBLIOGRAFÍA</b> -----	129
---------------------------	-----



## ***INTRODUCCIÓN***

Los crustáceos son uno de los grupos de artrópodos con mayor diversidad, con un rol importante en las cadenas tróficas de ambientes dulceacuícolas y marinos. Muchas de sus especies están sujetas a explotación comercial, incluyendo el acuicultivo.

Los estudios bioquímico-fisiológicos, aportan información fundamental para el conocimiento de su biología reproductiva, nutrición, relaciones moleculares con el medio ambiente, etc. Entre los grupos moleculares constituyentes, los lípidos, por su doble rol estructural y energético, su composición cambiante con el sexo, edad, estado nutricional y reproductivo, ocupan una posición destacada. Son transportados en medios acuosos en forma de lipoproteínas las que, por sus características, también son vehículo de tóxicos y otras moléculas xenobióticas. Consecuentemente, un estudio del comportamiento de las lipoproteínas, como el realizado en este trabajo de tesis, puede resultar valioso para interpretar eventos fisiológicos y toxicológicos desde una óptica molecular.

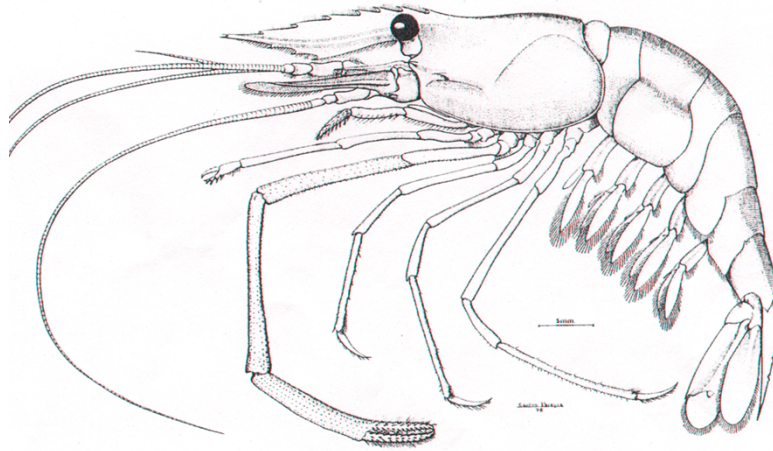
## 1 *Macrobrachium borellii* COMO MODELO EXPERIMENTAL.

### 1-1 Generalidades

El Crustáceo *Macrobrachium borellii* fue seleccionado como modelo por presentar todas las condiciones que se requieren para nuestro estudio, a saber: se encuentra en relativa abundancia durante todo el año; es fácilmente capturable; identificable macroscópicamente; es representante del ambiente rioplatense y de tamaño adecuado para realizar los estudios requeridos. Además es fácil de adaptar a las condiciones de laboratorio y se poseían conocimientos previos del comportamiento y la biología de la especie.

# Ubicación taxonómica:

Clase	Malacostraca
Subclase	Eumalacostraca
Superorden	Eucarida
Orden:	Decapoda
Suborden:	Natantia
Infraorden:	Caridea
Familia:	Palaemonidae
Género:	Macrobrachium
Especie:	Macrobrachium borellii



Esquema de un ejemplar adulto

1-2 Breve descripción anatómo-fisiológica de los sistemas digestivo, circulatorio y reproductor.

**# Sistema digestivo:**

**EL CONDUCTO DIGESTIVO DE LOS CRUSTÁCEOS NATANTIA SE INICIA EN POSICIÓN VENTRAL CON LA CAVIDAD BUCAL, FORMADA POR LAS MANDÍBULAS, MAXILAS, LABRO Y PARAGMATA, LUEGO UN CORTO ESÓFAGO, Y UN ESTÓMAGO.**

El estómago posee una estructura variable según los grupos taxonómicos. En los Caridae el estómago es sencillo, y está compuesto por una cámara cardíaca, que en ciertas especies en su pared anterior lleva algunos elementos de sostén levemente esclerosados y la cámara pilórica con aspecto de bolsa. Esta última con paredes blandas y con numerosos pliegues, con la presencia de un dispositivo con una superficie setosa, que presumiblemente podría tomar parte activa en el transporte de los alimentos al intestino. A continuación, dorsalmente y longitudinalmente sigue un delgado y recto intestino, que se ensancha en el sexto somito para formar el recto.

Sobre la región pilórica se encuentra un órgano anexo al sistema digestivo, denominado hepatopáncreas (divertículo digestivo), que universalmente en los crustáceos está presente como glándula de diferentes formas y tamaños. Histológicamente, está formado por túbulos simples con terminaciones ciegas o divertículos, que se abren en los llamados conductos secretores secundarios. Estos conductos, alternadamente, desembocan en el conducto primario o colector, a través del cual la secreción es volcada en el intestino medio, cerca del estómago. Esta glándula produce enzimas; absorbe, digiere y reserva nutrientes, y excreta el material de desecho (Al-Mohanna *et al.*, 1985). Específicamente contiene enzimas que actúan en el metabolismo de purinas, proteínas, glucógeno y lípidos, e incluye la secreción



de ácidos biliares. Así, el hepatopáncreas cumple en gran medida el rol que tiene el hígado en los vertebrados. Además, la función de secreción de enzimas digestivas se compara con la del páncreas. Las actividades amilasa y proteasa observadas en la secreción glandular sugieren que estas enzimas pueden originarse en diferentes tipos celulares del hepatopáncreas que presentan distintas formas de secreción.

Las enzimas digestivas poseen gran similitud con las de los vertebrados, pero actúan a pH más bajo (5.0-6.6). La diferencia más grande corresponde al sitio de secreción de estas enzimas, las cuales provienen de una sola glándula mientras que en los vertebrados se secretan a partir de varias glándulas.

La alimentación varía en las diferentes especies. Los Palemónidos, que son bentónicos, se alimentan de pequeños invertebrados y restos de animales muertos. Se ayudan con las maxilas, maxilípedos y pereiópodos quelados y trituran con sus poderosas mandíbulas

El hepatopáncreas también juega un papel importante en la absorción primaria del alimento, tarea que en los vertebrados es llevada a cabo por el intestino delgado (Vonk, 1960).

#### # Sistema circulatorio:

El corazón, pericardio, arterias, venas y capilares, determinan el sistema circulatorio abierto de los crustáceos. La hemolinfa cumple la función de transportar nutrientes entre los diferentes órganos y desde el tracto digestivo, y la de transportar en forma soluble, el pigmento respiratorio hemocianina. La circulación de la hemolinfa se produce por acción del corazón y de corazones accesorios y por el propio movimiento de los apéndices y del cuerpo. Las pulsaciones del corazón son veloces y mantienen la circulación continua de la hemolinfa.

De la región anterior del corazón surgen la arteria central y las arterias laterales que irrigan los ojos, anténulas, cerebro, antenas, glándula digestiva y otros tejidos. de las regiones laterales surgen las arterias hepáticas y de la parte posterior, la arteria abdominal que lleva la hemolinfa a los somitos abdominales, apéndices, telson y la arteria esternal que irriga la región ventral

del pereion. la circulación de la hemolinfa se efectúa de tal manera que ésta primero fluye desde el corazón por las aortas y las otras arterias hacia los distintos órganos del animal; luego la hemolinfa, con su hemocianina carboxigenada alcanza, a través de las lagunas, las branquias, y de ellas, después de oxigenarse, pasa por intermedio de los canales branquiopericárdicos, al pericardio.

#### # Sistema reproductor:

Los natantias poseen un par de ovarios y sus correspondientes conductos anexos en la hembra, o un par de testículos y conductos anexos en el macho.

Los ovarios se encuentran ubicados dorsalmente en el pereion con el oviporo en la región esternal, en el tercer somito contiguo al coxopodito de los pereiópodos. En los carideos, cuando el ovario se encuentra en plena madurez sexual, ocupa gran parte de la región dorsal anterior del cefalotórax. El ovario se distingue por transparencia del caparazón, cuando esta glándula se encuentra madura, adoptando un color verde oscuro. En las hembras de los Palaemonidae se observa el mayor tamaño de las placas tergo laterales del pleon y un mayor crecimiento de los precoxopoditos de los pleópodos, todo lo cual amplía la cámara que mantendrá los huevos. En la hembra, asimismo, se observan las sedas ovígeras, que aparecen solamente en la época de reproducción, destinadas a mantener los huevos sujetos a los pleópodos, denominado carácter de dimorfismo sexual periódico (Boschi, 1963).

Los testículos se encuentran en la misma región que los ovarios, formando un pequeño ovillo. Cada uno separado se continúa con el conducto deferente hasta la parte final, algo más ensanchada, que desemboca en la ampolla terminal. Como caracteres sexuales secundarios encontramos en los machos de Sergestidae, un petasma (modificaciones del endopodito), y un apendix masculino

### 1.3 Descripción y Distribución

En relación a otros representantes del género, *M. borellii* es una especie de pequeño porte. Posee caparazón liso y sin espinas ni sedas, se observa un surco branquiostegal originado en la parte anterior que se dirige a la región hepática. Existe una espina antenal en el margen anterior del caparazón y otra situada algo más atrás que es la espina hepática. El abdomen es liso, sin sedas ni carenas. En el borde posterior del cuarto y quinto segmento existe una muesca. El primer pereiópodo tiene la quela pequeña, cuyo dactilopodito es casi tan largo como la palma. El segundo pereiópodo es más grande y robusto que el resto de las patas, particularmente en los machos adultos, pero ambos de igual tamaño. La quela es alargada y cilíndrica; el dactilopodito está una vez y media aproximadamente en el largo de la palma. El borde posterior del dedo fijo tiene tres a cuatro dientes, de mayor tamaño los dos primeros. Ambos dedos no llevan espinas ni sedas.

Esta especie se encuentra en Paraguay, Uruguay y Argentina, de acuerdo con los datos de distribución disponibles en la actualidad. Habita exclusivamente ambientes de agua dulce. En la República Argentina se halla en todas las provincias del norte y centro del país hasta Mendoza, en cuencas cerradas, pequeños ríos, lagos, embalses, etc. En muchos ambientes ha sido introducida y ha prosperado con toda facilidad. En la provincia de Buenos Aires es una especie abundante.

Las tallas medidas entre el extremo del rostro al extremo del telson, oscilan en las hembras de 4-5.5 cm y en los machos entre 5.7-6.5 cm, hallándose ejemplares excepcionales de hasta 8 cm.

Esta especie tiene color pardo muy variable, desde más claro a más oscuro pasando por distintas tonalidades, dependiendo de muchas causas, por ejemplo el microambiente, la edad y la época del año.

#### 1.4. Reproducción y desarrollo

Esta especie, como en la mayoría de los crustáceos es ovípara (en este modelo el tipo de huevo es lecítico); por esa razón requieren grandes reserva de material nutritivo para poder soportar el desarrollo embrionario. En todos los animales estudiados la principal fuente de nutrientes se encuentra en el vitelo, que se acumula en los huevos regulado por un proceso endocrino llamado vitelogénesis. Se diferencia una vitelogénesis primaria con aporte proteico endógeno y una vitelogénesis secundaria con aporte exógeno de lípidos, carbohidratos y proteínas.

*M. borellii* se halla en reproducción en los meses de primavera y principios de verano, entre septiembre y enero en la provincia de Buenos Aires. El periodo de desarrollo embrionario de los huevos se extiende entre 49 y 50 días. En ese lapso la hembra transporta los huevos sujetos a los pleópodos protegidos en la cámara incubadora. Normalmente la hembra produce dos camadas de huevos por año, la primera más numerosa. El número de huevos oscila entre 50 y 120, y el tamaño entre 1.2 mm a 2.0 mm. Cuando comienza la época de la reproducción en primavera, las hembras desarrollan el ovario. Cuando alcanzan su total madurez, se produce sin excepción la muda del caparazón e inmediatamente el macho copula a la hembra y en las horas siguientes ésta traspasa los huevos a los pleópodos y se inicia el período de desarrollo de los mismos. Cuando se produce la muda de copulación, la hembra adquiere una serie de sedas ovígeras suplementarias que se hallan dispuestas en el basipodito y endopodito de los pleópodos (caracteres sexuales secundarios) (Boschi, 1963), destinadas a sujetar los huevos.

Se supone que el reconocimiento sexual en los camarones se realiza mediante el tacto o alguna sustancia tipo feromona, que libera la hembra luego de la muda, y que el macho reconoce por medio de receptores especiales. De acuerdo con Carlisle y Knowles (1959) y las observaciones de Boschi (1981), se comprueba una excitación particular del macho cerca de la hembra que ha mudado.

Si la muda de copulación corresponde al primer ciclo reproductivo del año, luego de la incubación de los huevos y el nacimiento de las larvas, continúa una segunda puesta, al menos en los ejemplares observados en la provincia de Buenos Aires, en razón de que el ovario habrá llegado nuevamente a la madurez y los pleópodos mantendrán los caracteres sexuales transitorios consistentes en las sedas ovígeras. Si el cambio corresponde a la segunda y última puesta del año, la hembra no desarrolla el ovario y en la siguiente muda perderá las sedas ovígeras. (Boschi, 1963).

#### 1.5. Incubación de los huevos, nacimiento de las larvas y estadios postlarvales

Las sedas ovígeras de los pleópodos secretan una sustancia adhesiva que sujeta los huevos a la cámara incubadora, formando de esta manera ramilletes de huevos. No se ha podido observar el momento en que la hembra desova, es decir cuando pasa los huevos a la cámara incubadora. Lo que se ha podido comprobar es que ese hecho ocurre entre dos y cuatro horas luego de la muda y apareamiento. En los casos normales que se produce el apareamiento y luego la conducción de los huevos a la cámara incubadora, se observa que estos se hallan fuertemente sujetos a los pleópodos y que se producen cambios internos propios del desarrollo, transparentándose y al mismo tiempo se pueden distinguir las estructuras internas del embrión. Recientemente se ha reportado detalladamente mediante estudios de morfometría, los cambios producidos durante el desarrollo embrionario en huevos de esta misma especie. En este trabajo no sólo se determinaron las variaciones del tamaño del embrión, sino también cambios en el saco vitelino, cascara, ojos y contenidos de agua (Lavarias *et al.*, 2002).

Transcurridos unos 48-50 días de desarrollo embrionario, en ambientes con temperatura entre 20 y 25 °C, comienza el nacimiento de las larvas, demandando entre 20 y 24 horas. Éstas nacen con caracteres

avanzados de postlarva (Boschi, 1981), pero manteniendo algunas estructuras primitivas. Una vez producido el nacimiento de todas las postlarvas, los restos de huevos y membranas son eliminados junto con la muda. Las postlarvas en un principio son nadadoras y luego de las primeras horas quedan casi permanentemente posadas en plantas y objetos sumergidos en el agua.

## 2 GENERALIDADES SOBRE LOS LÍPIDOS EN LOS CRUSTACEOS. COMPOSICION Y METABOLISMO EN *Macrobrachium borellii*.

### 2-1. Principales clases de lípidos constituyentes

La reserva de combustible metabólico más importante en la mayoría de las células, esta formada por los triacilglicéridos (ésteres de ácidos grasos y glicerol), mientras que los fosfolípidos son los principales lípidos estructurales, formando junto a esteroides y proteínas, las biomembranas. las cadenas de ácidos grasos forman parte de estas estructuras a través de enlaces éster, éter o amida con esqueletos de glicerol o esfingosina. los fosfolípidos son anfipáticos; contienen una zona de mayor polaridad (de cabeza polar) consistente en un residuo fosfato, el cual está esterificado (salvo en el ácido fosfatídico) por un alcohol nitrogenado o no. el resto de la molécula, con muy baja polaridad, está constituida por las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos. esta conformación particular de los fosfolípidos, les confiere la característica distintiva de autoensamblarse y autosellarse formando estructuras complejas.

se sostiene que los ciclos de almacenamiento y utilización de lípidos durante el desarrollo de un organismo están regidos por la cantidad de alimento disponible y las demandas energéticas para la reproducción (clarke, 1983). los carnívoros tienen la misma probabilidad de alimentarse a lo largo del año, de allí que no necesiten grandes depósitos lipídicos.

Los fosfolípidos mayoritarios en los crustáceos son fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina. En los crustáceos ambos contienen sus formas plasmalógenas (que contienen un enlace tipo éter) en proporción que varía estacionalmente. Investigaciones realizadas en la membrana del retículo sarcoplásmico de langosta mostraron que los plasmalógenos comprenden el 46% de las fosfatidiletanolaminas y el 7 % de las fosfatidilcolinas (Madeira *et al.*, 1976).

Los ácidos grasos de los decápodos han sido investigados, en algunos casos, en gran detalle y los resultados descriptos mostraron composiciones disímiles (Ackman *et al.*, 1967, Clarke, 1979, Burgos González y Fernandez Aguado, 1981, Allen, 1971, Van der Veen *et al.*, 1971, Addison *et al.*, 1972). Estudios realizados en los decápodos *Acarte phyra purpurea*, *Systellipsis debilis* y *Heterocarpus grimaldii* mostraron que las hembras, principalmente las grávidas, generalmente contenían mayores niveles de ácidos monoinsaturados, los que serían su principal reserva energética. Los porcentajes de ácidos grasos saturados no variaron de acuerdo al grado de maduración gonadal ni al sexo, mientras que la composición de ácidos grasos polinosaturados estaba afectada tanto por el sexo como por las diferencias en la maduración sexual; las hembras generalmente los presentaron en menor cantidad que los juveniles o los machos (Morris, 1972).

## **2-2. OTROS LÍPIDOS**

La composición y la cantidad de hidrocarburos son variables en los diferentes grupos de crustáceos. En copépodos existen mecanismos para la concentración y el almacenamiento del hidrocarburo pristano (Blumer *et al.*, 1963, Lee, 1974, Blumer y Thomas 1965). En hepatopáncreas de crustáceos bentónicos se determinó que la fracción hidrocarburo está constituida por mezclas de pristano (el mayoritario) y n-alcenos. Sólo se observaron trazas de hidrocarburos no saturados

El colesterol es el principal esteroide en los crustáceos. Aunque alcanza porcentajes menores que otros lípidos debido a que este grupo no lo sintetiza

*de novo*, es el lípido neutro principal en el tejido muscular (Idler y Wiseman, 1971, Zagalky *et al.*, 1967, Zandee, 1967)

En pequeñas cantidades se hallan presentes ceras en decápodos de fondo y de aguas superficiales, mientras que en especies de profundidad intermedia representan entre 30-80% (Morris, 1972). La existencia de ceras en decápodos es atribuida a síntesis hepatopancreática más que a un origen dietario.

Como otros organismos acuáticos, en los crustáceos se ha reportado la existencia de diacilgliceriléteres, aunque en cantidades variables (Isay *et al.*, 1975)

En los crustáceos, al igual que en otras formas de vida estudiadas, son hallados en menor proporción fosfolípidos tales como fosfatidilserina, fosfatidilinositol y esfingomielina.

A diferencia de otros invertebrados los fosfolípidos se encuentran en los crustáceos en pequeñas cantidades. Aunque en *Cyclograpsus punctatus* se los encontró en 1% de los lípidos totales, no fueron hallados en otros grupos de agua dulce (de Koning, 1970).

### 2-3. Biosíntesis y degradación de lípidos

#### # Digestión y absorción:

Una cantidad significativa de lípidos, tales como ésteres de ácidos grasos, alcoholes grasos e hidrocarburos, derivados fundamentalmente del fito y zooplancton, se encuentran en la superficie del agua, en asociación con material inerte. Si bien algunos anélidos y equinodermos pueden tomar y concentrar los ácidos grasos de su medio natural (testerman, 1972), éstos y otros lípidos son primero adsorbidos a partículas inertes, que luego son ingeridas por organismos filtradores. No obstante estos casos, poco importantes cuantitativamente, por lo menos desde cierto nivel trófico, los invertebrados acuáticos poseen una ingesta importante de lípidos, en forma de triacilglicéridos y ésteres de cera, y pobre en hidratos de carbono.



En los crustáceos, en la región pilórica ocurre la digestión de los lípidos. La principal enzima que actúa sobre los lípidos en el jugo gástrico es una lipasa que hidroliza los enlaces éster de los triacilglicéridos. Los mecanismos de digestión en los crustáceos parecen ser similares a los ya conocidos en los mamíferos e insectos (Brockerhoff, *et al.*, 1967, Gilbert, 1967). El mecanismo de absorción de los lípidos en los crustáceos ha sido moderadamente estudiado. Ya en 1955, Van Weel sugirió que el origen de las gotas lipídicas observadas en las células hepatopancreáticas de *Atya spinipes* no sería fagocitario, sino que serían resintetizadas a partir de los ácidos grasos y el glicerol producidos en la digestión gástrica (Van Weel, 1955). Posteriormente fue demostrado que los lípidos digeridos son absorbidos en forma de 2-monoglicéridos y ácidos grasos, para ser luego resintetizados los triacilglicéridos y así conformar los lípidos de reserva. La estructura de los 2-monoglicéridos original se mantiene constante a través de los procesos de digestión y absorción de los triacilglicéridos.

#### # Metabolismo:

La oxidación de sustratos lipídicos ha sido estudiada en el cangrejo *Carcinus maenas*, donde se demostró, por medida del consumo de oxígeno, la oxidación de ácidos grasos en mitocondrias. En esta misma especie, fue comprobada también la oxidación de ácidos grasos marcados con  $^{14}\text{C}$  en experimentos *in vivo* (Munday y Munn, 1962, 1965).

En organismos acuáticos en general se conoce poco sobre la biosíntesis de ácidos grasos, siendo el mayor volumen de la información disponible referente a animales terrestres. No obstante, se conoce que ciertos ácidos grasos y los alcoholes grasos de los copépodos calanoideos y otros crustáceos pueden ser sintetizados *de novo* a partir de carbonos aportados por glucosa, aminoácidos y acetato (Sargent y McIntosh 1974, Kayama y Nevenzel 1974, Farkas y Nevenzel 1973).

En estudios realizados por nuestro laboratorio en *M. borellii* se determinó el origen dietario de los ácidos 20:4 n-6 y 20:5 n-3 en ensayos *in vivo* e *in vitro*. No se pudo demostrar su capacidad de bioconvertir los ácidos 18:3 n-3 y 20:3 n-6 en 20:5 n-3 y 20:4 n-6, sino que estos últimos fueron

detectados en los contenidos estomacales, y detritos asociados con la dieta de estos animales. Finalmente se concluyó que estos crustáceos son incapaces de sintetizar 20:4 n-6 y 20:5 n-3 a partir de ácidos grasos precursores, y por lo tanto estos ácidos grasos son suministrados por la dieta (González-Baró y Pollero, 1998).

Como se mencionó antes, ciertas clases de lípidos son especialmente abundantes en algunos grupos. Tal es el caso de las ceras en los copépodos, cuyo metabolismo alcanza una importancia especial. Sargent y col. (1974) hallaron que en copépodos calanoideos la velocidad de síntesis de los ésteres de ceras estaba aparentemente gobernada por la velocidad de conversión de los ácidos grasos en alcoholes grasos. Luego se demostró indirectamente una biosíntesis *de novo* de las ceras (Morris y Sargent, 1973).

Con referencia a los triacilglicéridos, en general no existen grandes diferencias entre los mecanismos biosintéticos en los invertebrados acuáticos y en los invertebrados terrestres, salvo por la cantidad de ácidos grasos polinosaturados presentes en los primeros. En todos los casos conocidos son requeridos como cofactores ATP y CoA, y como sustrato glicerolfosfato y ácidos grasos (Malins y Sargent, 1972). La actividad esterasa se demostró en hepatopáncreas de *Astacus astacus* y *Cambarus affinis* (Kleine, 1967). El pH óptimo para la lipasa digestiva cae en el rango ácido, en todos los casos estudiados, (Kleine, 1967, Agrawall, 1964, Vonk, 1960). Sin embargo, en el caso de la lipasa celular hepatopancreática existe un corrimiento en el pH óptimo hacia el rango alcalino, entre pH 8 y 9 (Kleine, 1967).

La síntesis de fosfolípidos *in vivo* también fue estudiada en invertebrados acuáticos, en especial en crustáceos. Los estudios *in vivo* realizados por Farkas y Nevenzel en *Calanus plumehrus* (Farkas y Nevenzel, 1973) sugieren que la fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina son sintetizadas *de novo* como tales, y que sus lisoderivados serían originados por un clivaje enzimático de uno de sus dos radicales acilo-graso. En experimentos realizados en *Calanus helgolandicus*, se demostró que la radiactividad presente en los ácidos grasos precursores era incorporada en el orden, fosfatidilcolina > fosfatidiletanolamina > esfingomielina (Sargent, 1973). Se ha evidenciado que los fosfoglicéridos se convierten en 1,2-diacilglicéridos, los que son acilados y convertidos en triacilglicéridos (Lands y Hart, 1964, 1965,

Brockerhoff, 1966). En hepatopáncreas del cangrejo *Eirocheir sinensis* ha sido sugerida la síntesis de fosfatidilcolina vía metilación de fosfatidiletanolamina (Chapelle *et al.*, 1977). En *Carcinus maenas* la principal vía de biosíntesis de fosfatidilcolina utiliza CDP-colina, mientras que sólo un 4% se sintetiza por metilación de fosfatidiletanolamina (Brichon *et al.*, 1980).

Está establecido que los crustáceos son especies incapaces de sintetizar esteroides *de novo*. Sí son capaces de producir la desaminación de los 24-metil y 24-etil-esteroides, para rendir colesterol (Teshima y Kanazawa, 1971). Como en otros animales, es también necesaria la conversión de esteroides en hormonas esteroideas, y es por eso que estos compuestos son esenciales en las dietas de los crustáceos.

#### 2-4. Composición de lípidos y ácidos grasos en *Macrobrachium borellii*

El contenido de lípidos totales de diferentes órganos y tejidos de *M. borellii* es marcadamente distinto, sobresaliendo el alto porcentaje presente en las gónadas y el hepatopáncreas de ambos sexos. También es elevado el contenido total de lípidos en los huevos, en donde están cumpliendo un rol de reserva energética y aporte de carbonos para permitir el desarrollo embrionario. Esta reserva está principalmente concentrada en forma de triacilglicéridos.

La alta proporción de triacilglicéridos hallada en el hepatopáncreas, junto con el alto contenido de lípidos totales sugieren que éste posee una función importante como órgano acumulador de sustancias de reserva y de gran actividad metabólica. La imposibilidad de los crustáceos y algunos otros artrópodos de biosintetizar esteroides *de novo* (Zandee, 1967), sugiere que el origen de estos compuestos en *M. borellii* es dietario.

Los fosfolípidos son mayoritarios en el tejido muscular y muy abundantes en las branquias. Están representados mayoritariamente por fosfoglicéridos entre los cuales la fosfatidilcolina predomina sobre la

fosfatidiletanolamina. Los porcentajes relativos de estos últimos son similares en general a los de otros invertebrados acuáticos.

La composición cualitativa de los ácidos grasos de *M. borellii* muestra, en líneas generales, características similares a las de otros organismos acuáticos, con una amplia gama de ácidos saturados y etilénicos de distintas series. Con respecto a las composiciones cuantitativas, se observaron las siguientes tendencias: Los ácidos palmítico (16:0), oleico (18:1 n-9), palmitoleico (16:1 n-7), araquidónico (20:4 n-6) y eicosapentaenoico (20:5 n-3) son los mayoritarios en todos los tejidos estudiados (Gonzalez-Baró y Pollero 1988).

#### 2-5. Variación estacional en las composiciones de lípidos y ácidos grasos de *M. borellii*

El mayor contenido de lípidos totales de *M. borellii* fue observado en los ovarios, (Gonzalez-Baró y Pollero 1988) siendo más notorio en el mes de noviembre, cuando la gónada está bien madura, y contiene principalmente ovocitos en estado vitelogénico secundario. La vitelogénesis esta caracterizada por una acumulación de lípidos en el ovario (Charniaux-Cotton, 1978; Galois, 1984); en este estadio la masa ovárica es mucho mayor que en otros del ciclo reproductivo. En el periodo post-desove y durante el invierno, cuando el ovario permanece en reposo, el contenido de lípidos disminuye. Estos cambios son similares a los ocurridos en otros invertebrados acuáticos (de Moreno *et al.*, 1980; Pollero *et al.*, 1983; Ansell, 1974; Simoes y Lunetta, 1978). Como ocurre en otros crustáceos, (Clarke, 1984) el porcentaje promedio de lípidos en gónada masculina es menor que el encontrado en la femenina, y las variaciones encontradas durante el año no son significativas. Los hepatopáncreas de ambos sexos presentan un contenido lipídico que varía desde moderadamente alto hasta muy alto, dependiendo de la talla del animal y principalmente de la época del año. Con un máximo durante el invierno (junio-agosto), que llega a valores semejantes a los de los ovarios

más maduros. En el tejido muscular los lípidos totales son escasos y no poseen variación estacional ni existen diferencias entre sexos y tallas.

Los triacilglicéridos comienzan a acumularse en los ovarios en el periodo pre-vitelogénico, en el invierno, llegan a su máximo durante la madurez y luego caen a valores bajos en el periodo de reposo sexual post-desove, a principios del verano. Esto es muy notable en ejemplares de pequeña talla. Los triacilglicéridos son principalmente utilizados por las células como reserva energética. El incremento de estos durante la ovogénesis, podría indicar que esta acumulación en la gónada obedece a la necesidad de disponer de un material de reserva rico en energía. Este material será transferido a los ovocitos mientras éstos se desarrollan antes de la fecundación, y luego la reserva energética sería utilizada durante el desarrollo embrionario (Heras *et al.*, 2000). En los hepatopáncreas de ambos sexos y diferentes tallas, los triacilglicéridos también son los lípidos mayoritarios durante todo el ciclo anual. En este caso la variación estacional es similar a los cambios en el contenido de lípidos totales, con un aumento marcado durante el invierno.

Los diacilgliceriléteres en general son escasos, aunque en el invierno aparecen en porcentajes considerables, tanto en gónadas como en hepatopáncreas de ambos sexos y tallas.

La fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, fosfolípidos predominantes, se encuentran en forma minoritaria en el hepatopáncreas, muestran valores oscilantes en las gónadas según la estación del año, y son dominantes en el tejido muscular, en el cual no muestran variaciones cuantitativas estacionales (González-Baró y Pollero 1988).

En los lípidos de gónadas y hepatopáncreas existe una abundancia de ácido oleico, el cual no posee una variación estacional marcada. Sin embargo, en las gónadas y hepatopáncreas de las hembras de mayor tamaño se observa un máximo en junio. Su presencia en gónadas femeninas puede relacionarse con el aporte de material energético durante la maduración de los ovocitos, siendo este el principal ácido graso de los huevos. En todos los tejidos, sin diferencia de sexo o de talla, el ácido graso

esencial linoleico muestra una máxima concentración durante el invierno, vinculado posiblemente a la dieta abundante en detritos en esa época del año.

En tejidos con menor reserva energética y mayor contenido en fosfolípidos, como músculo y branquias, la proporción de ácidos poliénoicos 20:5 n-3, 20:4 n-6 y 22:6 n-3 es sensiblemente mayor. Además, en estos órganos no existen variaciones significativas a lo largo del año (González-Baró y Pollero 1988).

#### 2-6. Metabolismo de lípidos en *M. borellii*

Gonzalez-Baró (González-Baró et al., 1990) determinó los parámetros cinéticos de la palmitoil-CoA ligasa en microsomas de hepatopáncreas y branquias de *M. borellii*. Esta enzima es la responsable de la activación de ácidos grasos, primer paso en la síntesis de glicerolípidos y degradación de ácidos grasos. Se observó que la temperatura óptima de acción de la enzima fue de 37 °C para las branquias y 30 °C para el hepatopáncreas. La actividad de la palmitoil-CoA ligasa es aparentemente mayor en los microsomas de hepatopáncreas que en los de branquias, y posiblemente a esto obedezca que el hepatopáncreas sea el órgano más activo en la utilización de ácidos grasos, tanto para la biosíntesis de glicerolípidos como para su elongación o desaturación (González-Baró et al., 1990).

Posteriormente fue estudiada la influencia del ayuno y la temperatura ambiente sobre la composición lipídica en *M. borellii*. Los animales sometidos a cuatro semanas de ayuno no sufrieron variaciones en sus contenidos lipídicos y de ácidos grasos, demostrando que una alimentación intermitente no afecta en forma apreciable a los lípidos en los tejidos de esta especie. Los autores sugirieron que este lapso de tiempo tal vez no es suficiente para provocar un verdadero estrés nutricional. La variación de temperatura del medio de 13 °C a 29 °C afectó al hepatopáncreas de los animales ayunados,

aumentando el consumo de lípidos de reserva energética (triacilglicéridos y ácidos grasos libres) en altas temperaturas, y no afectando los lípidos preferentemente estructurales (fosfolípidos y colesterol). El incremento de la temperatura provocó una disminución en la concentración de los ácidos palmítico, palmitoleico y linoleico, y un aumento en el nivel de ácido eicosapentaenoico. En el caso de animales alimentados el efecto fue similar, con la diferencia que los niveles de ácidos grasos linoleico y eicosapentaenoico se incrementaron (Pollero *et al.*, 1991).

Con la hipótesis de que el consumo de triacilglicéridos provocado por estrés térmico involucraba la oxidación de ácidos grasos, también fue estudiado el efecto de la temperatura sobre la  $\beta$ -oxidación mitocondrial de branquias y hepatopáncreas de *M. borellii*. Se observaron cambios significativos en la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, cuando los animales fueron aclimatados a 11°C y a 29°C. Fue comprobado que en las mitocondrias de hepatopáncreas y branquias la actividad  $\beta$ -oxidante es mucho mayor a mayor temperatura (Irazú *et al.*, 1992).

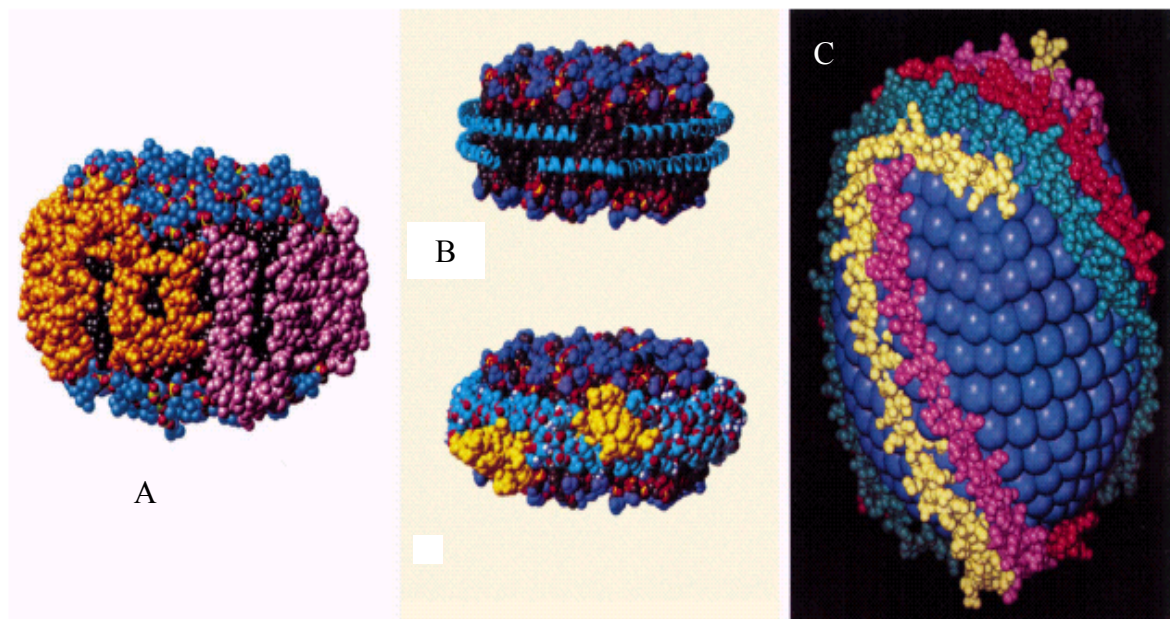
Mediante la inyección de ácido palmítico radiactivo en la hemolinfa de *M. borellii*, fue estudiado el metabolismo *in vivo* de este ácido graso en diferentes tejidos. (González-Baró y Pollero, 1993). Resultó en una gran acumulación de radiactividad principalmente en hepatopáncreas, luego en músculo, en menor grado en branquias y en mucha menor proporción en el resto de los tejidos. Fue observada la transformación de ácido palmítico en ácido palmitoleico, estearico y oleico en el hepatopáncreas y su incorporación en glicerolípidos. Paralelamente la síntesis de triacilglicéridos fue comprobada *in vitro*, siendo ésta más activa que en huevos, ovarios y branquias.

En línea general, los ácidos grasos son acumulados en los tejidos principalmente en forma de fosfoglicéridos y triacilglicéridos. Tanto las branquias como el hepatopáncreas demuestran una gran demanda metabólica, siendo el hepatopáncreas más activo en la síntesis de triacilglicéridos y las branquias en fosfoglicéridos. Cabe mencionar que en el músculo la síntesis de fosfolípidos es también activa. Todo demuestra que

existe una especialización de síntesis de determinados lípidos en los diferentes tejidos.

### 3 LIPOPROTEÍNAS.

Los lípidos deben ser transportados desde el tejido de origen hasta los tejidos donde son almacenados o metabolizados. Para poder hacerlo en un medio acuoso tal como la sangre o la hemolinfa, deben asociarse con proteínas transportadoras específicas formando lipoproteínas. Los componentes proteicos de estos agregados moleculares, llamados apolipoproteínas, cumplen dos funciones generales: solubilizar lípidos hidrofóbicos y contener señales para la célula diana. La mayor información disponible sobre el tema corresponde a lipoproteínas de vertebrados. Éstas en general son agregados esféricos con un núcleo formado por lípidos hidrofóbicos, rodeados por una envoltura formada por lípidos polares y apolipoproteínas. También existen las lipoproteínas discoidales que carecen de núcleo hidrofóbico. En los invertebrados, con la excepción de los insectos, las lipoproteínas son mucho menos conocidas, tanto en sus estructuras como en sus funciones.





La figura representa tres diferentes modelos de HDL de humano A) Modelo de "cerco", B) modelo de cinturón, C) modelo de HDL esférica (Brouillette *et al.*, 2001)

### 3-1 Lipoproteínas circulantes en invertebrados acuáticos

La hemolinfa libre de células y el líquido celómico de los invertebrados acuáticos, poseen generalmente muy bajas concentraciones de lípidos (entre 0.01 y 2.5 mg/ml). Sin embargo tal como ocurre en vertebrados, en los invertebrados también aparecen lípidos en forma de lipoproteínas hidrosolubles, donde los fosfolípidos, triacilglicéridos y esteroides se combinan con varias apoproteínas (Lee, 1991). Las lipoproteínas de invertebrados pueden separarse en diferentes clases, teniendo en cuenta sus densidades de flotación y la nomenclatura correspondiente a las lipoproteínas de vertebrados. Es decir, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, densidad menor a 1,006 g/ml), de baja densidad (LDL, entre 1,006 y 1,06 g/ml), de alta densidad (HDL, entre 1,06 y 1,21 g/ml) y de muy alta densidad (VHDL), con densidad mayor que 1,21 g/ml). Cuanto mayor es la densidad de flotación menor es el porcentaje de lípidos.

Ha sido descripta la existencia de lipoproteínas en la hemolinfa y líquido celómico de invertebrados acuáticos de los phyla Artropoda, Echinodermata, Annelida, Mollusca y Sipunculida. Especies de otros fila aún no han sido estudiadas. De estos grupos de invertebrados acuáticos, los más estudiados con respecto a sus lipoproteínas plasmáticas son los crustáceos. Con respecto a los moluscos, excepto por algunos trabajos en polioplacóforos, la información más completa sobre lipoproteínas proviene de resultados obtenidos en este laboratorio, estudiando la clase Bivalvia, Cephalopoda y Gasteropoda (Pollero *et al.*, 1985; Pollero, 1987; Pollero y Heras, 1989; Heras y Pollero, 1989, 1990, 1992; Garín y Pollero, 1995; Pollero *et al.*, 1992).

### 3-2. Lipoproteínas en crustáceos

Se ha reportado la presencia de lipoproteínas hemolinfáticas en numerosas especies de crustáceos, pertenecientes a diferentes ordenes, entre ellas *Uca pugilator*, *Cancer magister*, *Orchestia gammarella*, *Palaemon paucidens*, etc. La presencia de lipoproteínas en el xifosuro *Lymulus polyphemus* (grupo primitivo de artrópodos), sugiere que las lipoproteínas plasmáticas están presentes en los artrópodos más antiguos, que aparecieron en el Período Cámbrico, y cuyas evidencias fósiles sugieren, a su vez, un parentesco directo con los trilobites (Lee, 1991). En ciertos crustáceos como *Penaeus japonicus* y *Homarus americanus* la hemolinfa es capaz de transportar un total de lípidos plasmáticos alto de 2.5 y 2.3 mg/ml, respectivamente.

El plasma hemolinfático de los crustáceos contiene una lipoproteína con características de HDL, común a ambos sexos, que tiene fosfatidilcolina como lípido predominante, junto a cantidades menores de colesterol y triacilglicéridos. Generalmente contiene también carotenoides. Estudios de microscopía electrónica, revelaron que en *Palinurus interruptus* la forma de estas partículas sería discoidal, con diámetros de 122 a 170 Å (Lee y Puppione, 1978). Esta HDL, se supone transporta los lípidos desde el hepatopáncreas hacia otros tejidos, entre ellos el músculo. En el hepatopáncreas existe un tipo de células denominados "R", especializadas en el almacenamiento de triacilglicéridos, mientras que otro tipo celular, las células "F", se cree, serían las responsables del ensamblaje de las HDL, ricas en fosfolípidos (Lee, 1991).

La HDL presente en machos y hembras de *P. semisulcatus* fue también purificada por ultracentrifugación (Ton *et al.*, 1993; Khayat *et al.*, 1994). Posee una apolipoproteína de 110 kDa y un 50% de lípidos. También en *P. japonicus* se realizó la purificación de la HDL, encontrándose 71-77% p/p de fosfolípidos, 18% de colesterol, 5% de diacilglicéridos y concentraciones bajas de triacilglicéridos. Como en los casos anteriores, la

fosfatidilcolina fue el lípido más abundante, encontrándose menor cantidad de fosfatidiletanolamina. En general los ácidos grasos encontrados fueron 16:0, 16:1n-7, 18:0, 18:1, 18:2n-6, 20:5n-3 (Lubzens *et al.*, 1997)

En los crustáceos marinos *Charybdis feriata*, y *P. japonicus* las lipoproteínas poseen densidades de 1.16 y 1.18 g/ml, respectivamente siendo similares a la de otros crustáceos. Densidades del mismo orden fueron encontrados en el decápodo *Machobrachium rosenbergii* (1,13 g/ml), en el cangrejo *Eriocheir japonica*, (1.16 g/ml) y en *Pacifastacus leniusculus*, (1.145 g/ml) (Hall *et al.*, 1995). En todos estos casos los lípidos predominantes fueron los fosfolípidos (Komatsu *et al.*, 1993).

En el año 2000 Yepiz-Plascencia reportó una revisión bibliográfica sobre lipoproteínas de peneidos, en el cual compila los trabajos más representativos de la última década en relación al tema, algunos de ellos ya comentados. Su descripción contempla principalmente la parte proteica de estas partículas (Yepiz-Plascencia *et al.*, 2000).

### 3-3. Lipovitelinas y vitelogeninas

En las especies ovíparas, las proteínas, lípidos e hidratos de carbono presentes en el vitelo, son importantes fuentes de energía para el desarrollo del embrión, el crecimiento y la supervivencia de las larvas. Dentro de los huevos, los lípidos se distribuyen entre membranas, gotas de grasa y lipoproteínas hidrosolubles. Los lípidos de membrana cumplen una función estructural, y son principalmente fosfolípidos y esteroides del embrión. Las gotas se componen de triacilglicéridos y tienen función de reserva energética. Las mayores proteínas hidrosolubles de huevos de invertebrados, reciben el nombre de vitelinas (Vt). Las lipoproteínas de alta densidad encontradas en huevos de invertebrados fueron llamadas lipovitelinas (Wallace *et al.*, 1967). También reciben este nombre las lipoproteínas presentes en los ovarios de los mismos organismos. Las hembras en estado vitelogénico, suelen presentar en su sangre lipoproteínas específicas de hembra, cuya estructura

puede ser similar o idéntica a la de sus lipovitelininas. Estas lipoproteínas específicas de sexo se denominan vitelogeninas (VG) y se encontró que son también de alta densidad (HDL). Algunos autores las denominaron LP 2 o HDL 2, siendo su densidad algo más alta que la lipoproteína HDL no específica de sexo mencionada antes a la que denominaron LP 1.

#### # Lipovitelininas de crustáceos:

Los crustáceos decápodos presentan en sus huevos lipovitelininas de alta o muy alta densidad (HDL o VHDL, respectivamente), formadas por 27 a 32 % de lípidos. El anostraco *Artemia salina*, tiene un contenido lipídico relativamente bajo (9 %) en sus lipovitelininas, las que aparecen en forma de gránulos de vitelo dentro del oocito. A diferencia de las lipovitelininas de vertebrados, las de crustáceos no contienen fósforo ligado a la apoproteína. La clase lipídica predominante es la de los fosfolípidos, y dentro de éstos fosfatidilcolina. También contiene cantidades menores de triacilglicéridos y colesterol. Los ésteres de colesterol generalmente están ausentes o se presentan en trazas. Además de lípidos y proteínas, suele encontrarse un 3 a 4 % de carbohidratos (de Chafoy y Kondo, 1980). Chen y Chen (1993) determinaron en *P. monodon* que la lipovitelinina estaba formada por cuatro polipeptidos de 168, 104, 83 y 74 kDa. Los pesos moleculares de las lipovitelininas nativas de decápodos en general varían entre 325 kDa y 500 kDa. El número de péptidos y su peso molecular, para cada lipovitelinina, varía mucho entre las distintas especies.

#### # Relación entre lipovitelininas y vitelogeninas:

Las vitelogeninas (VG) y las lipovitelininas (LV) son lipoproteínas relacionadas entre sí (Lee, 1991). Las vitelogeninas en la circulación son consideradas precursoras de las lipovitelininas en el ovario. Lubzens y colaboradores (1997) determinaron empleando anticuerpos anti-lipovitelinina en

*P. semisulcatus*, que ambas lipoproteínas están compuestas por tres apolipoproteínas de 20, 120 y 80 kDa. El sitio de síntesis de la LV ha sido motivo de controversia durante los últimos años. También determinaron que la síntesis de VG-LV aparentemente ocurre en el ovario y en menor medida en el hepatopáncreas. La presencia de un transcripto de ARN de 1,0-1,1Kb en hepatopáncreas y en el ovario, condujo a los autores a sugerir que tanto la VG y la LV son productos del mismo gen (Lubzens *et al.*, 1995). Por otro lado Yano y Chinzei (1987), basados en estudios in vitro de maduración ovárica en *P. japonicus* y utilizando anticuerpos anti-LV, determinaron que la VG es sólo sintetizada en el ovario.

Basados en el reconocimiento por anticuerpos y mapeo proteolítico (Chen y Chen, 1993) se llegó a la conclusión que la VG de *P. monodon* tenía los mismos cuatro polipéptidos que la LV mencionada anteriormente. Se comprobó además que las subunidades de 104 y 83 kDa de las VG y LV son derivadas de otra subunidad presente en estas lipoproteínas, de un peso de 168 kDa. En un trabajo posterior, Chang y colaboradores (1994) determinaron que la VG de *P. monodon* estaba compuesta por dos subunidades de 170 y 82 kDa. Anteriormente habían determinado en la misma especie que la LV posee más subunidades que la VG (Chang *et al.*, 1993). Del análisis de la composición de aminoácidos de la VG y LV, se determinó que ambas eran similares y se sugirió que la VG es incorporada dentro de los oocitos y las subunidades mas largas son clivadas para producir las más pequeñas antes mencionadas (Chang *et al.*, 1994). Recientemente se demostró el procesamiento post-traducciona l de la vitelogenina de *M. rosenbergii*, mediante deducciones de su estructura primaria (Okuno *et al.*, 2002).

#### 4 INFLUENCIA DE PESTICIDAS SOBRE SISTEMAS LIPOPROTEICOS

##### 4-1. Efecto sobre propiedades de membranas naturales y liposomas

Los animales acuáticos, especialmente aquellos que habitan cerca de zonas agrícolas, están sujetos a peligros de contaminaciones por pesticidas. Varios autores han reportado que los pesticidas en general, aún en muy pequeñas concentraciones, interfieren con el metabolismo basal de los organismos (Litterst y Vanloon, 1972, Sanders *et al.*, 1974, Write *et al.*, 1977). Al ser muchos pesticidas de uso masivo liposolubles, se acumulan preferentemente en el tejido adiposo y provocan alteraciones en el metabolismo de lípidos (Eto, 1974, Purshottam y Srivastava, 1987). Si bien los estudios referentes a este tópico fueron realizados principalmente en mamíferos terrestres, algunos se realizaron en animales acuáticos, principalmente en peces (Lal y Singh, 1987), y se demostró que tanto los insecticidas clorados como los fosforados alteran el metabolismo de los lípidos (Sarojini *et al.*, 1986, Johnston y Corbett, 1986). Con respecto a los invertebrados terrestres, la mayor parte de los estudios sobre toxicidad y acción bioquímica de diversos plaguicidas fueron realizados en insectos.

Considerables esfuerzos han sido desarrollados para elucidar los mecanismos moleculares responsables del efecto tóxico de insecticidas (Eto 1974, Pushottam y Srivastava 1987), tales como el DDT, lindano, y paratión. Muchos pesticidas organofosforados son hidrofóbicos, y se acumulan preferencialmente en las membranas, modificando su movilidad y las propiedades fisicoquímicas y fisiológicas de los lípidos constituyentes de éstas. Numerosos estudios han sido reportados en relación a las variaciones de las propiedades fisicoquímicas de membranas por su interacción con insecticidas (Omann y Lakowicz 1982; Stelzer y Gordon 1985; Perez-Albarsanz *et al.*, 1991; Lopez-Aparicio *et al.*, 1991; Blasiak 1993; Sarkar *et al.*, 1993; Moya-Quiles *et al.*, 1994). En años anteriores Antunes-Madeira y colaboradores, han demostrado cómo diferentes insecticidas afectan las propiedades de distintos modelos de membranas naturales y artificiales (Antunes-Madeira y Madeira 1986, 1989, 1990, 1993; Antunes-Madeira *et al.*, 1990; 1993; 1994; Videira *et al.*, 1995).

Dentro de los insecticidas fosforados el fenitrotión (ácido, O, O-dimetil o-(3-metil-4-nitrofenil) ester fosforotioico) (estructura en página 60) es uno de

los más usados. Se caracteriza por ser hidrofóbico, y por afectar a muchos organismos que no son su blanco de acción. Se han realizado algunos estudios referentes a la toxicidad del insecticida en crustáceos (Sarojini *et al.*, 1986; Kobayashi *et al.* 1985). Johnston y Corbett (1986) realizaron ensayos en el cangrejo *Callinectes sapidus*, determinando que el fenitrotión es más rápidamente absorbido a mayores temperaturas, y que la salinidad afecta la absorción de igual manera. Los autores sugirieron que ese aumento en la absorción probablemente incrementa su toxicidad. El grupo de Kobayashi (Kobayashi *et al.*, 1985) también investigó in vivo cómo el fenitrotión era metabolizado en el camarón *Penaeus japonicus*. Las relaciones de los metabolitos encontrados fueron similares a las halladas en *Callinectes*. Todos estos estudios, sin embargo, no hacen referencia al efecto de este tipo de plaguicida sobre el metabolismo lipídico.

La acción inhibitoria ocasionada por los plaguicidas organofosforados sobre la acetilcolinesterasa, neuroreceptores y factores proteicos ligados a membranas, sugirió que su actividad tóxica podría ser influenciada por las composiciones y propiedades de las membranas. Esto motivó la investigación de las alteraciones producidas cuando estos plaguicidas, liposolubles, penetran en la bicapa fosfolipídica de una membrana biológica. Estudios en este sentido, fueron realizados con membranas naturales de vertebrados (Antunes-Madeira y Madeira 1984; Purshottam y Srivastava, 1987; Antunes-Madeira *et al.*, 1994), de invertebrados (González Baró *et al.*, 1997), y con membranas artificiales (Blasiak, 1993, González Baró *et al.*, 2000b), en los que se demostraron cambios en algunos parámetros de orden de los lípidos.

En nuestro laboratorio se determinó el efecto del fenitrotión sobre el estado físico de membranas microsomales de hepatopáncreas de *M. borellii*, utilizando técnicas de polarización de fluorescencia. Si bien no se observó un efecto medible en membranas microsomales de animales expuestos al insecticida *in vivo*, si ocurrió en ensayos *in vitro*, tanto en membranas liposomales como microsomales con la adición de concentraciones de fenitrotión del orden de  $10^{-6}$  M. El efecto fue notable en algunas propiedades físicas de estas membranas, aunque no se encontró que el pesticida

produzca cambios mensurables en la composición lipídica y de ácidos grasos de las membranas tratadas (González-Baró, *et al.*, 1997).

Por otro lado también se ha estudiado el efecto del fenitrotión sobre bicapas artificiales (liposomas) de dipalmitoil (DPPC) y 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina (POPC) a diferentes temperaturas, utilizando también medidas de fluorescencia. En este caso no solo se demostró la partición del fenitrotión en este tipo de modelos, sino que también se observó que este tóxico influye sobre la transición de fases gel-liquido cristalino en estas membranas y crea microdominios con diferentes propiedades físico-químicas en la membrana en su interfase lípido-agua (Gonzalez-Baró *et al.*, 2000b).



## OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO

La investigación del comportamiento de las lipoproteínas de crustáceos, tanto circulantes como vitelínicas, es un objetivo general en este trabajo de tesis. Pretende aportar conocimiento acerca del transporte de lípidos, su comportamiento durante el desarrollo y el efecto de xenobióticos sobre un grupo biológico que ha sido relativamente poco estudiado desde un punto de vista bioquímico y fisiológico.

Se aborda el tema desde dos aspectos originales:

# La investigación del rol que cumplen las lipoproteínas circulantes en cuanto al intercambio de lípidos con los tejidos, función metabólica que dentro de los Artrópodos es conocida sólo en insectos y arácnidos.

# La alteración en algunas propiedades físicas de las lipoproteínas en respuesta a la acción de xenobióticos, tema que nunca fue desarrollado en lipoproteínas de ningún grupo biológico.

Ambos están fundamentados en las siguientes hipótesis:

# El hepatopáncreas, por ser en los crustáceos el principal órgano metabólico tanto en la síntesis como en la degradación de lípidos, deberá intercambiar activamente glicerolípidos y ácidos grasos libres con las lipoproteínas circulantes.

# Los plaguicidas organofosforados, de acción comprobada sobre propiedades de membranas naturales y artificiales, podrían afectar de manera similar a sistemas lipoproteicos hidrosolubles, tales como las lipoproteínas plasmáticas y vitelínicas.

Si bien el conocimiento sobre la composición de lipoproteínas de crustáceos es relativamente profundo, no existen antecedentes sobre las lipoproteínas plasmáticas y vitelínicas del decápodo usado aquí como modelo experimental. Y es conocido que, dentro de ciertos límites, cada especie

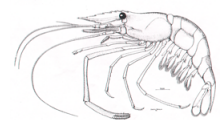
presenta sus propias características. En consecuencia, fue necesario iniciar este trabajo caracterizando detalladamente las lipoproteínas de esta especie, estudiando las clases de lípidos y apoproteínas constituyentes.

A lo anterior fue agregado un estudio de las variaciones en la composición de la lipovitelina a lo largo del desarrollo. Esto posibilitó el aislamiento de dos formas de una misma lipoproteína con diferentes composiciones en su componente lipídico, y su utilización como modelo en los estudios del efecto del plaguicida.

Sobre la base de lo antes mencionado, en este trabajo de tesis se propuso alcanzar los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterizar las lipoproteínas hemolinfáticas de *M. borellii*.
2. Caracterizar la lipovitelina en diferentes estadios del desarrollo embrionario, e inferir su relación con el metabolismo lipídico del embrión.
3. Determinar el rol del hepatopáncreas en su relación con las lipoproteínas plasmáticas, estudiando la capacidad de intercambio de lípidos entre ellos.
4. Determinar la influencia del fenitrotión (FS) sobre algunas propiedades fisicoquímicas de las lipoproteínas hemolinfáticas, su interior hidrofóbico y zona externa.
5. Determinar la influencia del FS sobre la fase lipídica de la lipovitelina en diferentes estados de desarrollo.
6. Determinar el efecto del FS sobre diferentes modelos lipídicos exentos de proteínas.
7. Verificar si los cambios en las propiedades fisicoquímicas de las lipoproteínas, se correlacionan con diferencias en la composición de lípidos, ácidos grasos y/o apolipoproteínas, de los diferentes sistemas ensayados.
8. Determinar el efecto *in vitro* del FS sobre la funcionalidad de las diferentes lipoproteínas estudiadas.

# ***MATERIALES Y MÉTODOS***



## REACTIVOS Y DROGAS UTILIZADAS.

Los precursores radiactivos, ácido palmítico 1-<sup>14</sup>C (57.0 mCi/mmol, pureza 99%) y L- $\alpha$ -dipalmitoil-1-<sup>14</sup>C fosfatidilcolina, (111 mCi/mmol, pureza 97%) fueron adquiridos de New England Nuclear Corp. (Boston, MA).

El Fenitrotión (ácido, O, O-dimetil o-(3-metil-4-nitrofenil) ester fosforotioico) grado técnico pureza mayor 75% fue provisto por el Laboratorio de desarrollo del Laboratorio Central de Salud Pública de la Provincia de Buenos Aires.

Los solventes utilizados fueron Méck (grado pro-análisis), Darmstadt, Alemania, y Carlo Erba (grado RPE), Milan, Italia.

Los estándares de lípidos fueron provistos por Serdari y Sigma Chemical Co. Todos los lípidos utilizados y demás drogas detalladas más adelante, fueron de alta pureza y grado analítico.

## 1- MUESTREO, MANTENIMIENTO Y DISECCIONES DE *Macrobrachium borellii*.

### **1-1. Ubicación y descripción de la zona de muestreo**

Los ejemplares de *M. borellii* fueron colectados en el Arroyo del Pescado, sobre la ruta provincial N°11 Km 15, partido de Magdalena, Provincia de Buenos Aires. La temperatura del curso de agua osciló desde un mínimo de 6 °C a un máximo de 27 °C. Dichas medidas extremas fueron registradas en los meses de julio y febrero respectivamente, siendo los promedios de temperatura invernal de 11 °C y estival 22 °C. El agua presentó valores medios de pH  $6.5 \pm 0.4$ . La velocidad de la corriente de agua fue variable, observándose corrientes de baja velocidad y de velocidad

moderada. Se observó abundante vegetación costera, escasa vegetación bentónica y un lecho barroso.

## 2 1-2. Captura, transporte y mantenimiento de los ejemplares

### # Captura:

*Macrobrachium borellii* es un crustáceo que vive asociado a la vegetación, no encontrándose en las regiones estancadas del cuerpo de agua. El uso de un copo de arrastre en el curso de agua antes descrito, fue la metodología empleada para la captura de los crustáceos. Para todos los estudios realizados se emplearon animales adultos en buen estado, con una talla promedio de longitud rostro-pleon de  $6 \pm 2$  cm. Los animales que fueron considerados malos reactivos biológicos, tales como por ejemplo mutilados, mal formados o en malas condiciones fueron descartados. Los adultos capturados fueron machos, hembras grávidas y hembras tanto en estado no-vitelogénico como vitelogénico.

### # Transporte:

Los animales fueron transportados vivos hasta el laboratorio, se tomaron las medidas necesarias para poder disminuir al máximo el estrés, como ser: evitar el exceso de calor, luz, ruidos y movimiento. Fueron transportados en el agua del arroyo.

### # Mantenimiento:

En el laboratorio los animales fueron aclimatados en acuarios con agua corriente declorinada evitando principalmente el shock térmico y la descompensación química. Se controló no solo el microambiente, sino también el macroambiente que los afectaba, aproximándose estos parámetros lo mas posible a su entorno natural. Se mantuvieron bajo

aireación controlada, se alimentaron diariamente y el agua se renovó cada cinco días hasta el momento de los experimentos.

### 1-3. Disecciones

Las disecciones se realizaron bajo lupa, utilizando instrumental de microcirugía.

De acuerdo con las medidas de la Asociación Americana de animales de laboratorio y no creando perturbaciones y/o distorsiones en los experimentos realizados, los animales previamente fueron anestesiados, sometiéndolos a una temperatura de 0 °C durante aproximadamente 2 minutos.

#### # Extracción de hemolinfa:

La hemolinfa fue extraída de animales de ambos sexos. Animales anestesiados fueron seccionados por la región del segundo somito del pleon y colocados sobre embudos de vidrio y dentro de tubos de centrifuga. Se realizó una primera centrifugación a 1575 g. durante 10 minutos en un centrifuga Sorvall RC-2 de alta velocidad con sistema de refrigeración, obteniéndose de esta manera la hemolinfa a la cual se le adicionó citrato de sodio 0.01 N (Karim-Malka *et al.*, 1983) como anticoagulante. Los hemocitos y restos de tejido se removieron por una segunda centrifugación a 7350 g. por 10 minutos. La hemolinfa se mantuvo a 4 °C para su utilización inmediata y el resto fue almacenado a -70°C. Se realizaron controles comparativos entre muestras frescas y almacenadas, los cuales no revelaron diferencia alguna en lo referente a la densidad de flotación y composición de las fracciones lipoproteicas.

#### # Disección de hepatopáncreas:

En el cefalopereion de los animales se realizaron dos hendiduras paralelas para poder retirar la región dorsal del exoesqueleto, y extraer el

hepatopáncreas. se tuvo especial cuidado con el manipuleo del órgano, evitando la ruptura del tejido. los hepatopáncreas enteros se colocaron en buffer fosfato 50mm, sacarosa 0.25m, ph 7.4, en presencia del inhibidor de proteasas de serina aprotinina (50unidades/ml) y fueron inmediatamente utilizados para los ensayos de transferencia de lípidos. los hepatopáncreas rotos fueron descartados.

#### # COLECCIÓN DE HUEVOS:

Las hembras grávidas poseen diferentes tiempos de postura, por consiguiente los huevos se encuentran normalmente en diferentes estadios del desarrollo embrionario. Estos estadios fueron identificados de acuerdo a observaciones previas de la embriogénesis completa (Lavarias *et al.*, 2002) (ver página 87). Se colectaron huevos en estadio temprano, medio y tardío del desarrollo embrionario. Dado que no existe una conexión hemolinfática entre la madre y los huevos fecundados es relativamente sencillo extraer ramilletes de huevos sanos con pinzas. Luego se colocaron con buffer fosfato 50mM, pH 7.4 y se utilizaron inmediatamente para la obtención de la fracción citosólica.

## **2 DETECCIÓN Y AISLAMIENTO DE LAS LIPOPROTEÍNAS HEMOLINFÁTICAS.**

### 2-1. Ultracentrifugación en gradiente de densidad y fraccionamiento

Las muestras de plasma hemolinfático se colocaron en tubos de centrifuga sobre soluciones de NaBr de densidades variables y fueron ultracentrifugadas para lograr separaciones en gradiente de densidad. Se optó por el uso de un colchón de NaBr de densidad 1.26 g/ml, conteniendo 0.01% de NaN<sub>3</sub> de volumen total 4.3 ml.

Las centrifugaciones se llevaron a cabo en una ultracentrifuga Beckman L8M, con un rotor de ángulo móvil SW60 Ti, a 178.000 g, y a 10 °C

durante 24 horas. En forma paralela se centrifugó, sobre el mismo colchón de NaBr, una solución salina de igual densidad que las muestras, para determinar las densidades relativas y controlar la correcta formación del gradiente. El contenido de cada tubo muestra y blanco fue fraccionado desde el tope hasta el fondo, en alícuotas de 200  $\mu$ l.

## 2-2. Medidas efectuadas en las fracciones

### # Monitoreo de proteínas totales:

Para cuantificar las proteínas totales presentes en las distintas fracciones, se midió la absorción de luz ultravioleta a 280 nm de cada alícuota, en un espectrofotómetro Zeiss PMQII. Con los valores obtenidos se construyeron perfiles (concentración relativa de proteínas vs fracción separada del gradiente), los que permitieron ubicar máximos proteicos correspondientes a las lipoproteínas y a la hemocianina.

### # Medida de densidad de las fracciones:

Las densidades de las diferentes fracciones se calcularon a partir de los índices de refracción de las alícuotas obtenidas del tubo testigo, que se midieron con un refractómetro Abbey (Bausch and Lomb), a 26 °C, los datos obtenidos se interpolaron con los datos tabulados por Lindgren (1975).

## 2-3. Aislamiento de las lipoproteínas

Las fracciones correspondientes a los máximos valores de absorción a 280 nm (lipoproteínas), fueron reunidas y utilizadas para los posteriores ensayos de transferencia de lípidos y para su caracterización.



### **3 DETECCION Y AISLAMIENTO DE LAS LIPOPROTEINAS VITELINICAS.**

#### 3-1. Obtención del citosol de huevos

Las lipoproteínas vitelínicas se localizan en la fracción citosólica. Huevos en diferentes estados de desarrollo fueron homogeneizados en una solución de sacarosa 0.25 M, conteniendo N-acetil-L-cisteína 1.4 mM, EDTA 0.4 mM, KCl 0.15 M, MgCl<sub>2</sub> 5 mM y buffer fosfato de potasio pH=7.4 62 mM. Los restos celulares, fracciones nucleares y mitocondrias fueron separados por centrifugación del homogenato a 10500 g durante 20 minutos en una centrífuga Sorvall RC-2 a 3 °C. El sobrenadante se utilizó para la obtención de la fracción citosólica por sedimentación de los microsomas a 110000 g, por 60 minutos. Se utilizó una ultracentrifuga Beckman L8M, con un rotor de ángulo fijo 70.1 Ti.

#### 3-2. Detección y aislamiento de lipovitelina

La lipovitelina se detectó por su absorbancia a 280 nm y se aisló empleando los métodos de ultracentrifugación en gradiente de NaBr y espectrofotométricos descritos en la sección 2. Con los datos obtenidos se construyeron perfiles (concentración relativa de proteínas versus fracción separada), que permitieron ubicarlas en el gradiente de densidad.

### **4. ANÁLISIS DE LÍPIDOS.**

#### 4-1. Obtención de lípidos totales

Los lípidos totales de tejidos y lipoproteínas fueron extraídos empleando el método de Folch y colaboradores (1957). Se utilizó una mezcla de solventes de extracción cloroformo/metanol (2:1 v/v), en una relación de 20:1 v/v respecto a la muestra. Se agitó vigorosamente y se mantuvo a 4°C por un tiempo mínimo de 1 hora. Luego se filtró por papel de filtro Whatman, al que se lavó posteriormente con solvente de extracción, para evitar pérdidas del extracto lipídico. Al filtrado se le agregó un 20% de su volumen de una solución NaCl 18 g/l, se agitó y se dejó decantar a 4°C para permitir la separación de las fases: una superior metanólica-acuosa y una inferior clorofórmica. La fase inferior se transfirió a otro tubo, donde se lavó nuevamente con una solución de NaCl 18 g/l-metanol (1:1 v/v), se dejaron separar las fases, y se descartó la fase acuosa metanólica. La fase clorofórmica se evaporó a sequedad mediante corriente de N<sub>2</sub>. El extracto lipídico redissuelto en un pequeño volumen de cloroformo/metanol 2:1, se guardó a -20°C en atmósfera de N<sub>2</sub> para su posterior análisis.

#### 4-2 Análisis de lípidos por cromatografía en capa fina (TLC)

La composición de lípidos tanto neutros como polares, se determinó por cromatografía en capa delgada utilizando placas preformadas de alta performance (HPTLC), sobre base de aluminio, con sílica gel 60 como soporte, de 20 x 20cm., (Merck), y placas sobre base de vidrio, con sílica gel 60, con indicador de fluorescencia F254, de 20 x 20 cm., (Riedel-de Haen). La cantidad de lípidos sembrados fue del orden de los 10 µg por calle.

La fase móvil para la separación de lípidos neutros estuvo constituida por hexano/éter etílico/ácido acético (80:20:1.5 v/v/v) y para los lípidos polares por cloroformo/metanol/ácido acético/agua (65:25:4:4 v/v/v/v). En ambos casos, las cubas de desarrollo conteniendo las mezclas de solventes se saturaron previamente con los vapores de éstos. En ciertos casos, en los que se contaba con muy poca cantidad de muestra, se hicieron siembras puntuales en placas de HPTLC, y se realizó una cromatografía de doble desarrollo. Primero se corrió la placa hasta la mitad con la mezcla de

solventes para separar lípidos polares, se secó bajo N<sub>2</sub> y luego se corrió la placa hasta el tope con la mezcla de solventes para separar lípidos neutros.

#### 4-3. Identificación

La identificación de las clases de lípidos se realizó rutinariamente sobre las placas cromatográficas utilizando diferentes estándares de lípidos conocidos corridos simultáneamente. Se revelaron los lípidos colocando las placas desarrolladas en una cuba saturada con vapores de yodo. Esto permitió comparar los R<sub>f</sub> de las distintas clases de lípidos de la muestra, con los de los estándares sembrados y desarrollados en la misma placa. En general, los lípidos detectados se corresponden con los identificados en esta especie por otros autores de nuestro grupo (González-Baró y Pollero 1988; Heras *et al.*, 2000) por lo que no fueron necesarias realizar posteriores reacciones de caracterización de lípidos.

#### 4-4. Microdeterminación de lípidos

La cuantificación de lípidos fue realizada mediante cromatografía en capa fina, acoplada a un detector de ionización de llama (TLC-FID). El equipo utilizado fue un aparato Iatroscan TH10 (Iatroscan Laboratories, Tokio), autoanalizador que combina la capacidad resolutive de la cromatografía en capa fina (TLC) con la sensibilidad de un detector de ionización de llama (FID).

La separación de los componentes se realizó sobre varillas Chromarod-SIII. Estas consisten en columnas compactas de cuarzo de 158 mm de largo y 1 mm de diámetro, revestidas de una capa adsorbente de 75 µm de espesor, compuesta de partículas de sílica gel de 5µm de diámetro. Las muestras se sembraron en un volumen de 1 µl, conteniendo de 1 a 10 µg de lípidos totales. La siembra se realizó en un extremo de las varillas, y se desarrollaron como en una TLC clásica. Una vez separados los componentes

individuales, la detección y cuantificación se realizó pasando, mediante un dispositivo mecánico, las varillas a través del FID. Luego de ser quemadas, las varillas pueden ser reutilizadas hasta 200 veces, sin perder la capacidad resolutive. Presenta además la ventaja de permitir sucesivos desarrollos en mezclas específicas de solventes y quemados posteriores, y de tal modo de poder obtener la separación de gran parte de las clases de lípidos existentes en una muestra, a partir de una sola siembra.

El registro se realizó dirigiendo la salida analógica a un integrador Hewlet-Packard 3396A, con memoria de 64 Kbytes que permitió almacenar y reanalizar los datos obtenidos en cada corrida. Para el análisis cuantitativo, se debieron realizar con anticipación, curvas de calibración, para cada clase de lípido en particular, detectados por el ionizador de llama, en un determinado juego de varillas.

#### # Confección de las curvas de calibración:

Las curvas se construyeron utilizando hidrocarburo como estándar interno, ya que no se encuentra naturalmente en la muestra a analizar (Ackman, 1990). Se sembraron cantidades constantes de este estándar en cada varilla, y cantidades crecientes de un estándar de una clase en particular de lípido. Luego de desarrollar y quemar las varillas, se obtuvo el cociente entre el área del estándar a analizar y el área del estándar interno. Varias veces se repitió, para cada clase de lípido, y se procedió a graficar la masa ( $\mu\text{g}$ ) de cada lípido sembrado versus el cociente área del lípido/área del estándar interno. Las curvas se ajustaron para cada lípido por análisis de regresión mediante ecuaciones lineales de la forma  $Y = a x + b$ , obteniéndose así sus parámetros.

#### # Desarrollo de la cromatografía:

Las cromatovarillas se limpiaron durante 12 horas en solución oxidante fuerte, se lavaron 5 veces con agua destilada, y 3 veces con agua bidestilada, se quemaron a 120 °C por una hora. Quemándolas en su totalidad con el FID

fueron activadas, e inmediatamente se sembraron con no más de 1  $\mu$ l de muestra (incluido el estándar interno), o mezcla de estándares.

Se siguió el siguiente protocolo:

1) Primer sistema de solventes: hexano/benceno 70:30 v/v. Se satura la cuba de desarrollo con este sistema durante 15 minutos, y luego se permite el desarrollo de las varillas hasta el tope. El tiempo de corrida varía según las condiciones ambientales, pero es del orden de los 20 minutos. Las varillas se retiran de la cuba, se secan y se queman en el FID desde el tope hacia abajo, sólo hasta los 4 ó 5 cm del punto de siembra. Esta distancia de quemado se determina en cada caso en particular, por quemado total de la/s primera/s varillas en las que se sembraron estándares individuales para determinar el  $R_f$  de los mismos.

2) La cuba se satura con el segundo sistema de solventes: benceno/cloroformo/ácido fórmico (70:25:0.8 v/v/v). Se introducen las varillas y se desarrollan hasta el tope (cerca de 30 minutos), luego se secan y queman hasta una altura determinada en el momento, aproximadamente hasta los 2 cm del punto de siembra.

3) Las varillas se colocan en la cuba, previamente saturada por el tercer sistema de solventes: cloroformo/metanol/agua (70:25:3 v/v/v), en este caso hasta el final de la varilla (aproximadamente 45 minutos). Se secan y queman, esta vez hasta el punto de siembra.

Mediante el uso de estos tres sistemas de solventes, es posible separar en el primer desarrollo lípidos de muy baja polaridad (hidrocarburos y ésteres de esteroides), en el segundo desarrollo lípidos neutros (triacilglicéridos, ácidos grasos libres y esteroides), y por último en el tercer desarrollo, lípidos polares (fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, esfingomielina).

## # Cuantificación:

En el registrador HP 3396A se integraron las áreas de los lípidos. Se obtuvieron los cocientes entre cada área de cada clase lipídica y el área del estándar interno en cada varilla. Utilizando los parámetros de la curva de calibración correspondiente, se obtuvo la masa de cada clase lipídica presente en cada varilla.

El equipo operó a una presión de H<sub>2</sub> de 0.5 Kg/cm<sup>2</sup>, un flujo de aire de 1200 ml/minuto y una velocidad de barrido de 32 segundos/varilla.

Los parámetros de las curvas de calibración obtenidos para cada clase de lípido fueron los siguientes:

Triacilglicérido/hidrocarburo:

$$a = 1.829$$

$$b = 0.937$$

$$r^2 = 0.96 \text{ hasta } 15 \mu\text{g}$$

Ácido graso libre/ hidrocarburo:

$$a = -0.75$$

$$b = 0.60$$

$$r^2 = 0.97 \text{ hasta } 15 \mu\text{g}$$

Colesterol/ hidrocarburo:

$$a = -3.28$$

$$b = 1.88$$

$$r^2 = 0.94 \text{ hasta } 15 \mu\text{g}$$

Fosfatidiletanolamina/ hidrocarburo:

$$a = -0.81$$

$$b = 0.47$$

$$r^2 = 0.91 \text{ hasta } 15 \mu\text{g}$$

Fosfatidilcolina/ hidrocarburo:

$$a = -1.39$$

$$b = 0.71$$

$$r^2 = 0.94 \text{ hasta } 15 \mu\text{g}$$

Esfingomielina/ hidrocarburo:

$$a = -1.33$$

$$b = 0.71$$

$$r^2 = 0.94 \text{ hasta } 15 \mu\text{g}$$

#### 4-5. Análisis de ácidos grasos por cromatografía gas-líquido

La cromatografía gas-líquido (GLC) es uno de los métodos generales más ampliamente usados en la separación, identificación y cuantificación de ácidos grasos y sustancias relacionadas, cuando éstas poseen una tensión de vapor apreciable a cualquier temperatura por debajo de la temperatura de descomposición.

Los ácidos grasos de cadena corta, a las temperaturas comunmente empleadas en las columnas de separación, se encuentran en forma gaseosa; esto es necesario para que la muestra se pueda analizar por GLC. En cambio, las muestras biológicas poseen en general ácidos grasos de mayor

longitud de cadena y además con distinto grado de insaturación, no encontrándose en la forma necesaria para su análisis. Por esta razón, los ácidos grasos deben ser derivatizados en sus ésteres metílicos para ser analizados por GLC (Burchfield y Storrs, 1970), ya que estos son más volátiles que sus respectivos ácidos grasos, debido a una reducción en la polaridad al formarse el éster, y además son relativamente más estables que los ácidos libres.

Los compuestos volatilizados se distribuyen entre la fase móvil gaseosa (gas portador), y la fase estacionaria líquida contenida en la columna cromatográfica. La fase líquida está sostenida por un material poroso inerte (soporte). Una corriente de gas portador pasa continuamente a través de la columna y la mezcla de compuestos a analizar se distribuye entre ambas fases. La diferencia entre las constantes de reparto de los distintos componentes de la muestra hace que se muevan a velocidades diferentes a través de la columna. Detectores apropiados miden las concentraciones de los componentes, que emergen de la columna junto al gas portador.

#### # Saponificación de los lípidos:

Mediante el proceso de saponificación los ácidos grasos son liberados de los lípidos que los contienen; ésto se logra sometiendo los extractos lipídicos a un álcali para hidrolizarlos y obtener los ácidos grasos de los ésteres de colesterol, acilglicéridos y fosfoglicéridos y convertirlos en jabones solubles en agua.

#### # Derivatización de ácidos grasos:

De los ácidos grasos libres obtenidos por saponificación se prepararon los ésteres metílicos de ácidos grasos (EMAG) de acuerdo a la metodología de Morrison y Smith desarrollada con BF<sub>3</sub>/metanol (Morrison y Smith, 1964).

#### # Identificación de ácidos grasos:



Los EMAG fueron analizados en un cromatógrafo gas-líquido sobre una columna capilar DB-23 (J y W Scientific) de 30m de largo, en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard modelo 6890 con detector de ionización de llama. Las condiciones de uso se indican en la siguiente tabla:

Fase fija	Megawax 250 (Supelco)
Gas portador	He
Flujo de gas	0.7 ml/min.
Temp. de la cabeza de inyeccion	260 °C
Temp. inicial del horno (T1)	175 °C
Tiempo inicial a T1	3 min.
Temp. final del horno (T2)	230 °C
Tiempo final de T2	19 min.
Incremento de temp.	3 °C/min.

El método de identificación de los EMAG se basó en el tiempo de retención relativo, que es característico de cada ácido graso, dependiente de la columna usada, de la fase móvil y la temperatura, e independiente de otras condiciones experimentales (Ackman, 1963). Los picos fueron identificados comparando sus tiempos de retención con los de una mezcla estándar de ésteres metílicos de ácidos grasos conocido.

## 5- ANALISIS DE APOPROTEÍNAS.

### 5-1. Diálisis de las muestras

Las lipoproteínas fueron dializadas con el objeto de eliminar el NaBr y cambiar la composición iónica del medio adecuándola a los diferentes requerimientos. Se las introdujo en un saco de diálisis de acetato de celulosa, luego se lo sumergió en un erlenmeyer con un buffer Tris-HCl 0.125 M, pH

6,8. Se sometió a agitación magnética durante 12 horas a 4 °C, con una relación buffer/muestra 1000 : 1 (v/v).

### 5-2. Cuantificación de proteínas totales

La cuantificación de proteínas en las fracciones se realizó mediante el método de Lowry et al. (1951). El primer paso implica la formación de un complejo cobre-proteína en una solución alcalina. Este complejo reduce posteriormente a un reactivo fosfomolibdico-fosfowolfrámico que da un color azul intenso. La reacción colorimétrica se midió a 750 nm en un espectrofotómetro PMQII (Zeiss), utilizando albúmina sérica bovina (0.4 mg/ml) como estándar.

### 5-3. Separación electroforética de las muestras en geles de poliacrilamida (PAGE)

En la separación de proteínas por electroforesis, el soporte utilizado fue el gel de poliacrilamida, una matriz polimerizada de acrilamida y N, N'-metilen-(bis-acrilamida). Este soporte combina el efecto de tamiz molecular y separación por movilidad electroforética. El efecto tamiz aumenta en gran medida la resolución y puede graduarse fácilmente el tamaño de poro con la sola modificación de las concentraciones de acril y bis-acrilamida.

El método más popular utilizado es el desarrollado por Laemmli (Laemmli, 1970). Se trata de un sistema discontinuo que consiste en dos geles contiguos pero distintos: el gel separador por debajo y el gel de siembra por encima. Ambos geles tienen diferentes diámetro de poro, pH y fuerza iónica. Esta discontinuidad actúa concentrando grandes volúmenes de muestra en el gel de siembra, resultando en una mayor resolución final. Las proteínas una vez concentradas en el gel de siembra, son separadas en el gel separador. El sistema de Laemmli utiliza SDS (dodecil sulfato sódico) que es un detergente aniónico que se une a las regiones hidrofóbicas de las

proteínas y separa la mayoría de ellas en sus subunidades componentes. La unión con SDS también imparte una gran carga negativa a la proteína desnaturalizada, logrando así la separación en el campo eléctrico por sus tamaños relativos.

#### 5-4. Preparación de geles en gradiente para sistema no disociante (PAGE)

Se produce la separación de las proteínas sobre la base de sus tamaños relativos. Se usó acrilamida al 4% p/v para el gel de siembra (malla con poro de diámetro no limitante). Se utilizó un gradiente lineal de tamaño de poro para el gel separador. Los gradientes se ajustaron en cada caso al tamaño de la muestra a analizar, siendo generalmente entre 4% y 23% p/v de acrilamida. Se utilizó un dispositivo compuesto por dos vasos de volúmenes equivalentes interconectados por medio de una llave para formar el gradiente. Uno de los reservorios posee una salida al exterior y un sistema de agitación. En este último vaso se colocó la mezcla de mayor concentración y en el otro recipiente la mezcla de menor concentración de forma tal, que la altura de la columna de líquido en ambos vasos fuera la misma. Luego se adicionó a ambas soluciones persulfato de amonio (2.5 ‰) y 2.5 µl de tetrametilendiamina (TEMED) (que actúan como iniciador y catalizador de la reacción, respectivamente) sólo al vaso que tenía la mezcla de menor concentración, abriéndose inmediatamente la llave que conecta los vasos y la salida al exterior. Así la mezcla contenida en el vaso con el dispositivo de agitación se vierte entre los vidrios donde se va a formar el gel, descendiendo la altura de la columna de líquido y se produce la entrada de la mezcla de menor concentración. La consecuencia es que la concentración de acrilamida de la mezcla en el vaso conectado al exterior disminuye en forma gradual y lineal. El gradiente de poro resultante actuará a modo de tamiz molecular durante el desarrollo de la electroforesis. Debido a que la velocidad de cada proteína depende de su relación carga-masa, el tamiz actuará imponiendo un límite por tamaño a cada proteína, más allá de la carga de ésta. Para asegurar que las proteínas migren hasta su poro límite, la corrida se realiza en un tiempo mucho más prolongado que lo habitual. En un gel de este tipo, se pueden sembrar estándares de peso molecular para poder

inferir el peso molecular aproximado de las diferentes proteínas de la muestra analizada.

Las soluciones empleadas fueron:

# Solucion A: Acrilamida/Bis-Acrilamida 30: 0.8 % P/V

# Solucion B: Buffer del gel concentrador (de siembra): Tris-HCl 0.125 M; pH = 6.8

# Solucion C: Buffer del gel de resolucion o separador: Tris-HCl 0.375 M; pH = 8.8

#Solucion D: Iniciador: Persulfato de amonio

# Solucion E: Catalizador: TEMED.

Se uso un buffer de desarrollo Tris-Glicina, 0.025 M Tris-0.192 M Glicina; pH= 8.3.

Se empleó una cuba electroforética Mini Protean 2, Bio Rad; con una fuente de poder Power 200-2.0, Bio Rad. Las electroforesis se realizaron a voltaje constante de 140 v, y el tiempo de corrida fue de aproximadamente 3 horas.

#### 5-5. Preparación de geles en gradiente para sistema desnaturalizante (SDS-PAGE)

Este tipo de electroforesis se realizó de acuerdo al método de Laemmli sobre geles con un gradiente de poro de 4%-23% P/V, en las mismas condiciones que la PAGE pero con el agregado de 0.1% de dodecil sulfato de sodio (SDS) a los geles y buffers de los reservorios electródicos. Para facilitar la desnaturalización de las muestras se calentaron durante 5 min. a 100 °C. Con este procedimiento se rompieron antes de la electroforesis los enlaces disulfuros, reduciéndolos a grupos sulfhidrilos por  $\beta$ -mercaptoetanol.

En estos geles, las movilidades electroforéticas resultantes serán una función de sus pesos moleculares. Así, la migración de las proteínas será a velocidades inversamente proporcionales a los logaritmos de sus pesos moleculares.

## 5-6. Revelado de las proteínas y determinación de sus pesos moleculares.

Una vez desarrolladas las electroforesis, los geles se separaron de los moldes de vidrio y se sumergieron en una solución fijadora conteniendo colorante Coomassie Brilliant Blue (Sigma Chemical Co) G-250 (0.04% P/V) y ácido tricloroacético (10% P/V) disueltos en una mezcla de metanol/agua (40:60 v/v) y se colocaron en estufa a 60 °C durante una hora (Merril, 1990) o se mantuvieron a temperatura ambiente toda una noche. La decoloración se realizó utilizando una solución de ácido acético/metanol/agua (5:20:75 v/v/v). Con esta técnica se detectaron hasta un mínimo de 10 µg de proteínas por banda en geles de 1.5 mm.

Los pesos moleculares de las bandas proteicas de interés se determinaron utilizando mezclas de estándares de proteínas de alto y bajo peso molecular (Pharmacia) y en algunos casos estándares para SDS-PAGE (Sigma Chemical Co.). Graficando los logaritmos decimales del peso molecular de las proteínas en función de sus valores de migración relativos al colorante trazador (Rf) se obtuvo una recta de calibración que fue ajustada mediante análisis de regresión lineal. En base a la curva ajustada, se calculó el peso molecular de las muestras. Tanto en las curvas de los geles en condiciones nativas como disociante se observaron coeficientes de correlación superiores a 0.95.

## 6- MEDIDAS DE FLUORESCENCIA

### 6-1. Fundamentos generales.

Todas las moléculas poseen un juego de niveles de energía electrónicos, que desempeñan un rol preponderante en los procesos fotofísicos ( $S_0$  estado singlete del nivel fundamental,  $S_1$ , estado singlete del

primer estado excitado y  $T_1$ , estado triplete del primer estado excitado). A su vez, cada uno de estos niveles electrónicos presenta subniveles vibracionales. Los procesos fotofísicos se definen como transiciones que interconvierten estados excitados entre sí o estados excitados con el nivel fundamental. Estos procesos pueden ser clasificados en radiativos y no radiativos.

De acuerdo al principio de Franck-Condon, la transición del estado fundamental al estado excitado es esencialmente instantánea, comparada con el tiempo necesario para que cambien las coordenadas nucleares. Así el proceso de excitación es extremadamente rápido, aproximadamente de  $10^{-15}$  segundos. Como los diagramas de energía potencial para el estado excitado y para el nivel fundamental no son simétricos, el proceso de excitación no conduce necesariamente al nivel vibracional más bajo del primer estado excitado.

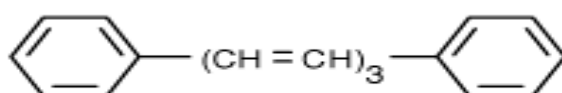
Las transiciones no radiativas desde cualquier nivel vibracional de  $S_1$  hasta el nivel vibracional más bajo de  $S_1$  son más rápidas que cualquier proceso de emisión que pudiera ocurrir. Vale decir que independientemente del nivel vibracional alcanzado durante la excitación, la molécula decae rápidamente al nivel más bajo de energía de  $S_1$ , que representa un estado semiestable, comparado con el estado de absorción inicial. Una vez alcanzado dicho estado, existen varias posibilidades. La energía puede ser disipada por interconversiones internas a niveles vibracionales o rotacionales o por intercambio de calor con las moléculas del solvente, sin que ocurra emisión. También puede disiparse por cruzamientos intersistema con el estado  $T_1$  y por colisión con otras moléculas. Este último proceso de extinción o quenching, tiene numerosas aplicaciones en diferentes sistemas biológicos. Todos los procesos reseñados son transiciones no radiativas. En cambio se denomina fluorescencia a la transición radiativa desde el nivel más bajo de energía de  $S_1$  hasta el nivel fundamental  $S_0$  y fosforescencia a la transición radiativa desde  $T_1$  hasta el nivel fundamental  $S_0$ .

## 6-2. Condiciones que deben tener los marcadores de fluorescencia

Los fluoróforos son sustancias fluorescentes, que pueden ser utilizados como marcadores. Existen relativamente pocos fluoróforos intrínsecos (naturales). Dentro de éstos podemos mencionar los aminoácidos triptofano, tirosina, y a los nucleótidos NADH, FAD, FMN. Se han desarrollado una gran cantidad de fluoróforos extrínsecos, como ser derivados de fluoresceína (marcador covalente de proteína), ácido 6-anilino-naftaleno-2-sulfónico (ANS), ácido 6-(p-toluedinil)naftaleno-2-sulfónico (TNS) (marcadores no covalentes de proteínas y membranas), y pireno, 1,6-difenil-1, 3, 5-hexatrieno (DPH), y su derivado de ácido propínico (DPH-PA) (marcadores hidrofóbicos de membranas).

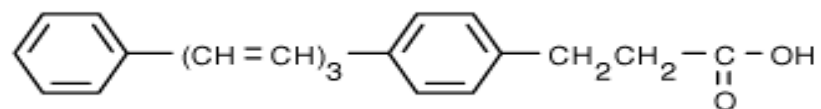
Durante años los marcadores fluorescentes han contribuido al conocimiento de la estructura y dinámica de las biomembranas. El marcador ideal es sensible a los movimientos de las moléculas individuales en la escala de tiempo (nanosegundos) de las mediciones de fluorescencia; tiene alto coeficiente de extinción y rendimiento cuántico; no interfiere con el empaquetamiento natural de la bicapa; tiene una orientación fija en la membrana. Estas características permiten obtener intensidades de fluorescencia altas con pequeñas cantidades de marcador; evitar las mediciones de artefactos en la bicapa, debido a marcadores de gran tamaño y finalmente definir el entorno del fluoróforo.

El DPH es un marcador que reúne muchas de las condiciones enumeradas anteriormente, siendo uno de los marcadores más eficientes para la región hidrocarbonada de las bicapas lipídicas, por su estructura todo trans que se adapta bien al interior hidrofóbico de las cadenas hidrocarbonadas. Posee además un alto rendimiento cuántico en bicapas lipídicas y un bajo rendimiento cuántico en solución acuosa.

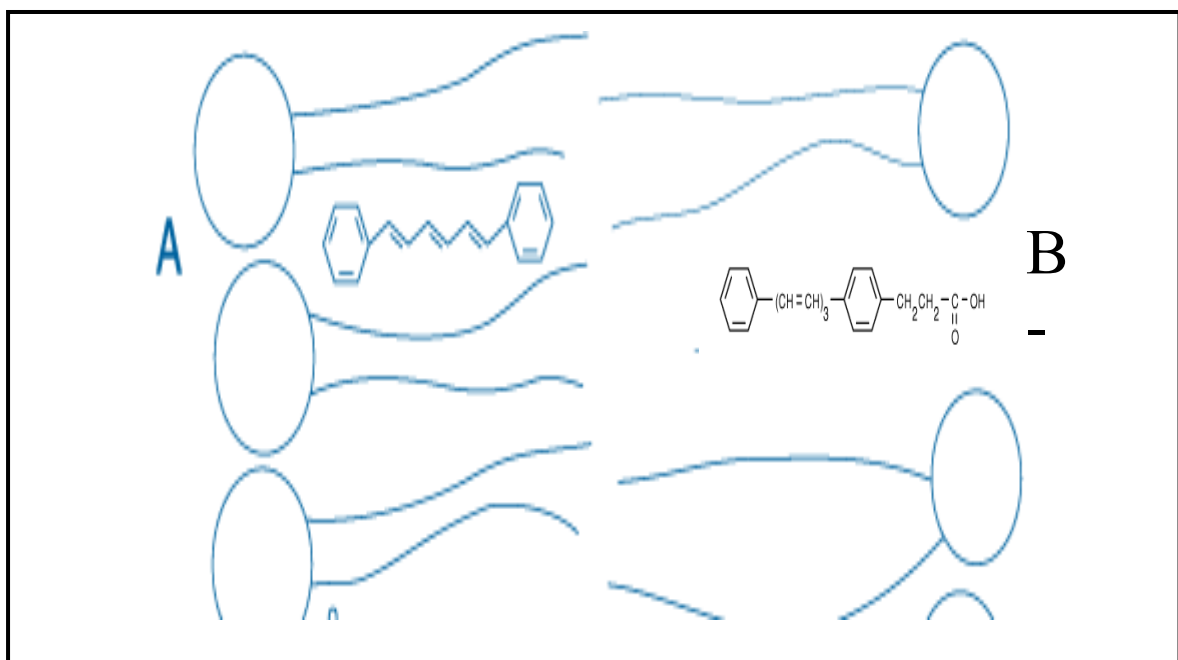


Estructura del DPH

El DPH-PA, se caracteriza por cumplir con todos los requerimientos necesarios para poder marcar las regiones más externas que la región marcada por el fluoróforo anterior. Esto es dado por su carboxilo que se ubica más cerca de la interfase polar, a diferencia del DPH que se ubica enteramente en la región hidrofóbica.



Estructura del DPH-PA



Representación esquemática de la ubicación del DPH (A), y del DPH-PA (B) en una membrana lipídica.

### 6-3. Anisotropía de fluorescencia



Las medidas de anisotropía son comunmente usadas en aplicaciones bioquímicas de fluorescencia. Este tipo de medidas nos provee información de la rigidez de varios ambientes moleculares, siendo usados para medir fluidez de membranas y en inmuno ensayos de numerosas sustancias.

Los fluoróforos absorben generalmente fotones, cuyos vectores eléctricos están paralelos al momento de transición del fluoróforo. En una solución isotrópica los fluoróforos son moléculas orientadas al azar. Luego de la excitación con luz polarizada, se excitan selectivamente aquellas moléculas del fluoróforo cuyos dipolos están orientados paralelamente al vector eléctrico de la excitación. Esta excitación selectiva de una población parcialmente orientada de fluoróforo, resulta en una emisión de fluorescencia polarizada parcialmente. Los momentos de transición para la absorción y emisión, tienen orientaciones fijas en cada fluoróforo, y el ángulo relativo entre estos momentos, determina la máxima anisotropía medida ( $r_0$ ). La anisotropía de fluorescencia es definida como:

$$r_s = \frac{I_V - I_H}{I_V + 2I_H}$$

donde:

$r_s$ : anisotropía de fluorescencia en estado estacionario.

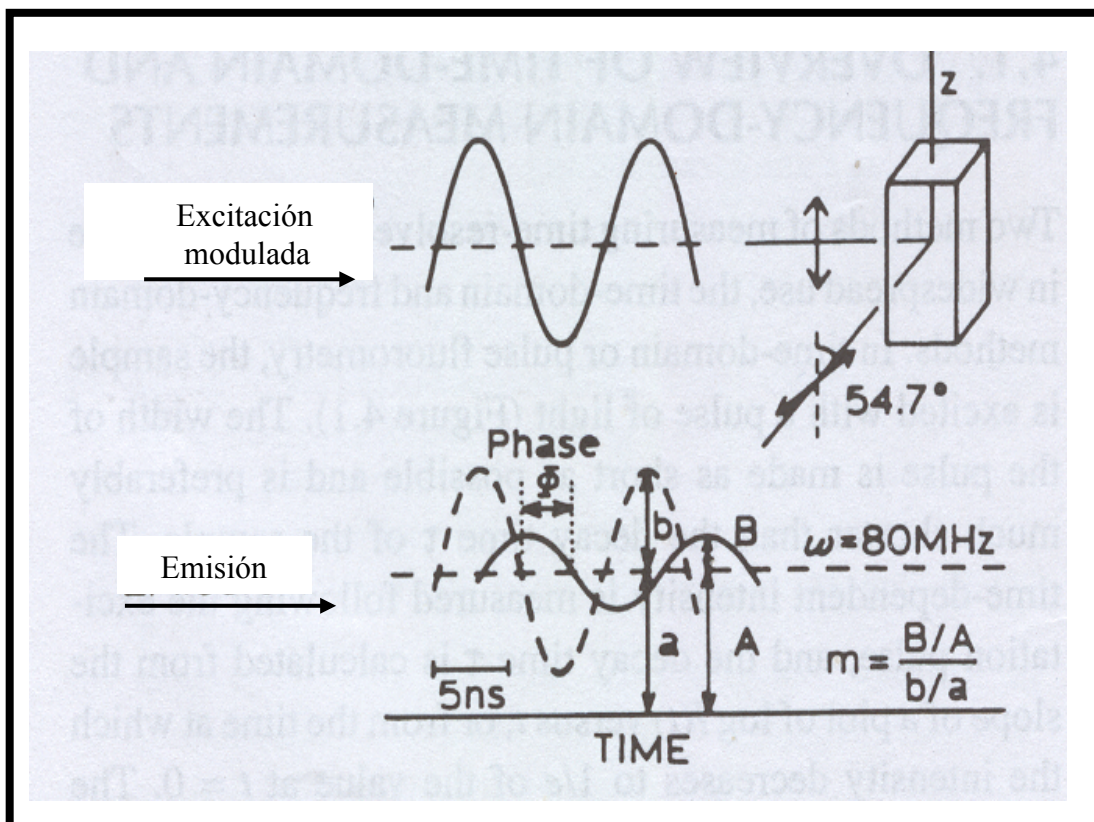
$I_V$ : Intensidad del componente vertical de la emisión.

$I_H$ : Intensidad del componente horizontal de la emisión.

El fenómeno más común de disminución de la anisotropía por debajo del máximo, es la difusión rotacional. Tal difusión ocurre durante la vida media del estado excitado, y desplaza el dipolo de emisión del fluoróforo. La medición de este parámetro da información acerca del desplazamiento angular del fluoróforo entre absorción y su posterior emisión. Los movimientos difusivos dependen de la viscosidad del solvente, del tamaño, y de la forma de las especies difusoras; así, un cambio en la viscosidad del entorno del fluoróforo resultará en un cambio en su anisotropía.

6-4. Fundamentos de las medidas de fluorescencia resueltas en el tiempo.

Las medidas resueltas en el tiempo son muy usadas en espectroscopia de fluorescencia, particularmente en estudios de macromoléculas. Esto está basado en que los datos resueltos en el tiempo, generalmente contienen más información que las medidas en estado estacionario descritas en 6-3. Una manera de medir el decaimiento de la emisión del fluoróforo, es por el método de modulación-fase. En este caso la muestra es excitada con luz polarizada verticalmente y modulada sinusoidalmente. Cuando una muestra fluorescente es excitada de esta forma, la emisión es forzada a estar modulada con la misma frecuencia de la excitación, pero estará con una diferencia de fase (desfasada) en un ángulo  $\theta$  en relación a la excitación. También se producirá una demodulación en relación a la excitación.



El ángulo de fase ( $\theta$ ) y la demodulación ( $m$ ) están relacionados con los tiempos de vida media (lifetime,  $\tau$ ) de la siguiente manera:

$$\tan \theta = w \tau_p$$

$$m = (1 + w^2 \tau_m^2)^{-1/2}$$

Donde:

$m$  = relación de demodulación

$W = 2\pi \times$  frecuencia en Mhz

$\tau_p$  = tiempo de vida media resuelto por fase

$\tau_m$  = tiempo de vida media resuelto por modulación

por lo tanto se puede resolver:

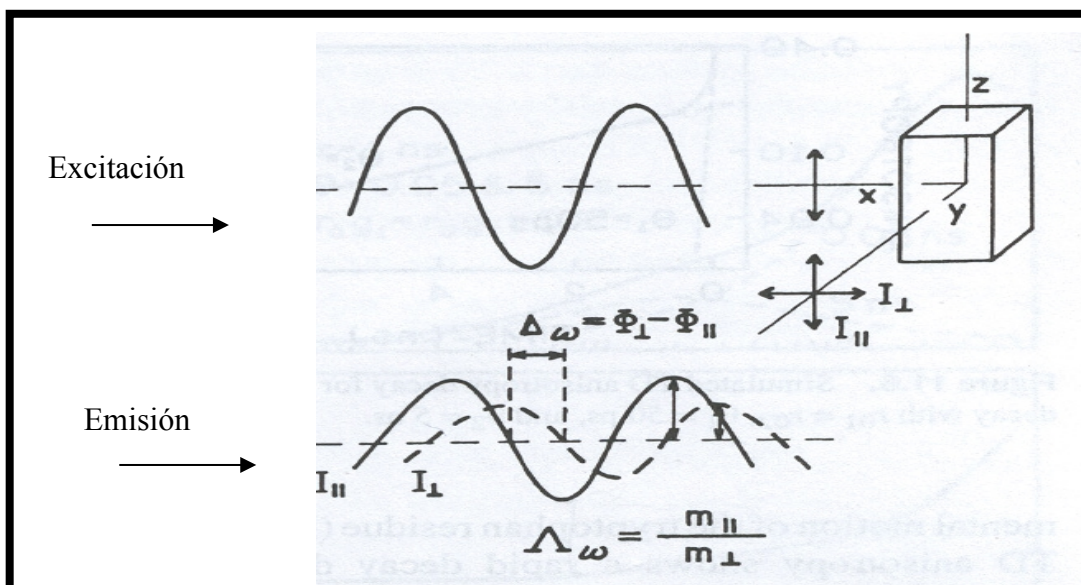
$$\tau_p = \tan \theta / w$$

$$\tau_m = (1/w) [(1/m^2) - 1]^{1/2}$$

Para un decaimiento monoexponencial simple:  $\tau_p = \tau_m$ , lo que indica homogeneidad en la población de fluoróforos. Si existe heterogeneidad

$$\tau_p \neq \tau_m.$$

Otra medida resuelta en el tiempo es la diferencia de fase entre los componentes vertical y horizontal de la emisión. En este caso se excita con luz polarizada verticalmente y modulada sinusoidalmente; y se mide la diferencia de fase entre los componentes paralelos y perpendiculares de la emisión ( $\Delta = \theta_{\text{paralelo}} - \theta_{\text{perpendicular}}$ ).



Para una rotación isotrópica,  $\tan \Delta$  es función de la velocidad de rotación:  $R$ ,  $r_0$ ,  $\tau$  y  $\omega$

$$\tan \Delta = \frac{(2 R \tau) \omega \tau r_0}{1/9 m_0 (1 + \omega^2 \tau^2) + [(2 R \tau)/3] (2 + r_0) + (2 R \tau)^2}$$

Para el caso de rotación obstaculizada, donde  $r_0$  decae monoexponencialmente hasta un valor límite  $r_\infty$ . Se obtiene de esta manera:

$$\tan \Delta = \frac{(2 R \tau) \omega \tau (r_0 - r_\infty)}{1/9 m_0 (1 + \omega^2 \tau^2) + 1/3 S (2 R \tau) + m_\infty (2 R \tau)^2}$$

donde:

$$m_0 = (1 + 2 r_0) (1 - r_0)$$

$$m_\infty = (1 + 2 r_\infty) (1 - r_\infty)$$

$$S = 2 + r_0 - r_\infty (4 r_0 - 1)$$

$R$  = velocidad de rotación

$\omega = 2\pi \times$  frecuencia en Mhz

$r_0$  = anisotropía fundamental

$\tau$  = tiempo de vida media de fluorescencia

Los valores de  $\tan \Delta$  a una única frecuencia no alcanzan para determinar  $R$  y  $r_\infty$ . Sin embargo, la anisotropía en estado estacionario ( $r_s$ ) esta relacionado con  $R$  y  $r_\infty$  de la siguiente forma:

$$r_s = r_\infty + [(r_0 - r_\infty) / (1 + 6 R \tau)]$$

Por lo que si  $r_s$  se mide de forma independiente,  $R$  y  $r_\infty$  pueden ser calculados resolviendo la siguiente ecuación cuadrática:

$$(m \tan \Delta) (2R \tau)^2 + (C \tan \Delta - A) (2R\tau) + (D \tan \Delta - B) = 0$$

donde

$$A = 3B = \omega \tau (r_0 - rs)$$

$$C = 1/3 (2 rs - 4 rs^2 + 2)$$

$$D = 1/9 (m + m_0 \omega^2 t^2)$$

$$M = (1 + 2 rs) (1 - rs)$$

y finalmente de esta manera poder calcular el tiempo de correlación rotacional ( $\tau_r$ ).  $\tau_r = 1/(6R)$ .

En síntesis las medidas de fluorescencia mencionadas son de utilidad para:

$r_\infty$  determinar el orden

$\tau_r$  determinar la fluidez o viscosidad

$\tau_p$  y  $\tau_m$  para determinar la polaridad del entorno lipidico (en un fluoróforo donde el tiempo de vida media sea sensible a la polaridad del entorno).

## 7- DISEÑO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DE LA TRANSFERENCIA DE LÍPIDOS ENTRE EL HEPATOPANCREAS Y LA HEMOLINFA.

### 7-1. Marcación in vivo con precursor radiactivo

Los crustáceos adultos en grupos de 4-8 animales fueron inyectados con jeringas de punta biselada con 2 $\mu$ Ci de ácido palmítico marcado con <sup>14</sup>C, en forma de sal de amonio en el seno cefálico. Los animales fueron mantenidos en peceras aireadas por periodos de 1, 4, 7 y 16 horas a temperatura ambiente. Luego del transcurso de estos tiempos, fue extraída la hemolinfa, en este caso mediante punción de los animales en el seno hemolinfático dorsal, usando jeringa biselada con citrato de sodio 0.1N como anticoagulante. Las células hemolinfáticas fueron separadas por centrifugación a 7350 g por 10 minutos. El plasma marcado fue usado para los experimentos de transferencia hacia el hepatopáncreas, así como también para el aislamiento de la lipoproteína HDL 1. Los hepatopáncreas marcados fueron

disectados como se detalla en el punto 1.5, y empleados de igual manera para el análisis de lípidos y para los estudios de transferencia hacia la hemolinfa.

Estos datos fueron empleados para la construcción de curvas de la distribución de la radiactividad (de las diferentes clases de lípidos) en la hemolinfa y en el hepatopáncreas a lo largo del tiempo.

### 7-2. Aislamiento de la lipoproteína plasmática común a ambos sexos (HDL 1)

Esta lipoproteína fue aislada por ultracentrifugación del plasma en un gradiente de densidad de NaBr (densidad 1.26 g/ml), siguiendo el procedimiento descrito en el punto 2. La presencia de proteínas fue monitoreada por absorción de luz a 280 nm. La radiactividad contenida en cada alicuota fue cuantificada por conteo de centelleo líquido en un contador Beta Pharmacia LKB Wallac 1214 Rack usando Ultima Gold (Downers Grove IL). Paralelamente se centrifugó una solución salina de igual densidad que las muestras, para determinar las densidades relativas y controlar la correcta formación del gradiente. Con los valores obtenidos se construyeron perfiles [Absorbancia a 280 nm y radiactividad (dpm)] que permitieron ubicar la HDL 1 en el gradiente y aislar la lipoproteína radiactiva.

### 7-3. Extracción y análisis de lípidos

Los lípidos contenidos en el hepatopáncreas al igual que los de las hemolinfa fueron extraídos mediante la técnica de Folch et al (1957). Los lípidos fueron separados por TLC como se describió en 4.2.

Se cuantificó la radiactividad presente en cada una de las clases de lípidos por conteo proporcional de barrido con un aparato Berthold L. B. 2723 Dunn Schicht Scanner. Estándares apropiados fueron corridos simultáneamente y visualizados con vapores de yodo. Los valores cuantitativos de radiactividad distribuída en las clases de lípidos, fueron calculados por integración de las áreas bajo los picos.

#### 7-4 Transferencia lipidica

Para determinar la transferencia de lípidos del hepatopáncreas a la hemolinfa, los hepatopáncreas marcados con el ácido palmítico radiactivo (dador) fueron incubados con la hemolinfa no marcada (aceptor). la incubación se realizó en buffer fosfato de potasio 50mm ph 7.4, sacarosa 0.25 m, y en presencia de inhibidores de proteasas (5 u/ml de aprotinina) en un volumen final de 330  $\mu$ l. el ensayo de transferencia se realizó a 27 °c, durante 30 minutos, con agitación suave para evitar la ruptura del hepatopáncreas. la relación dador/aceptor fue de 1 hepatopáncreas (70-90 mg) / 125  $\mu$ l de hemolinfa. por otro lado, la hemolinfa marcada con el ácido palmítico <sup>14</sup>c (dador) fue incubada en condiciones similares a la anterior, con hepatopáncreas no marcados (aceptor). en otra serie de experimentos los hepatopáncreas marcados fueron lavados con buffer fosfato potasio 50 mm y albúmina al 3% con el objetivo de remover los ácidos grasos asociados a las membranas del hepatopáncreas, e incubados con hemolinfa no marcada.

Todos los ensayos de transferencia se realizaron por triplicado, teniendo en cuenta que coincidiera aproximadamente la talla de los animales y la época del año en que se efectúo la recolección.

Luego de las incubaciones los tejidos fueron removidos y los lípidos contenidos en hemolinfa y hepatopáncreas fueron aislados y analizados como se detalla en el punto 7-2 y 7-3.

#### 3 7-5. Preparación de liposomas e incubación con HDL 1

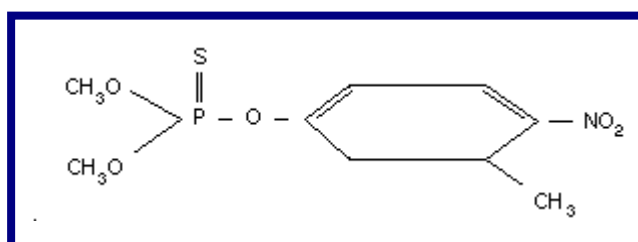
Los liposomas (vesículas multilamelares) básicamente fueron preparados como fue descrito por Gonzalez-Baró y colaboradores (2000b), donde 1 mg de fosfatidilcolina (PC) no radiactiva y 45 nCi de PC marcada con <sup>14</sup>C, fueron disueltos en cloroformo-metanol (2:1 v/v) y completamente evaporados con nitrógeno. El residuo fue tomado con 1 ml de buffer tris-HCl

50 mM, pH 8.4 y sometido a 10 ciclos de mezclado en baño de agua a 60°C, con el agregado de bolitas de vidrio de mezcla, usando un agitador vortex por 30 segundos en cada ciclo.

Los liposomas (dadores) de fosfatidilcolina marcada y las lipoproteínas (aceptores) en una relación de 500 µg de fosfolípidos/ 450 µg de proteínas, fueron incubados en un volumen final de 1 ml a 27 °C por 2 horas. Después de la incubación los liposomas fueron sedimentados por centrifugación a 167,000 g por 90 minutos, en un rotor 70.1 Ti, quedando la lipoproteína como remanente en el sobrenadante. Un tubo conteniendo liposomas marcados y buffer fue centrifugado simultáneamente como blanco.

## DISEÑO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DEL EFECTO DE UN XENOBIOTICO SOBRE LIPOPROTEINAS Y LIPOSOMAS.

Se utilizó el insecticida organofosforado fenitrotión (ácido O, O-dimetil o-(3-metil-4-nitrofenil) ester fosforotioico) (FS) como ejemplo de un xenobiótico presente en los ambientes limnológicos locales. Para estudiar el efecto que produce sobre ciertas propiedades físicas de lipoproteínas y liposomas, se diseñaron los experimentos que se detallan a continuación:



Estructura del fenitrotión

### 8-1 Preparación de las muestras



Las lipoproteínas plasmáticas (HDL 1 y HDL 2) y del vitelo (LV 1 y LV 3) fueron aisladas y caracterizadas, como se detalló anteriormente.

Los lípidos de las LV 1 y LV 3 fueron extraídos por la técnica de Folch (1957), y utilizados para formar los respectivos liposomas. El solvente fue completamente evaporado con nitrógeno, se hidrató cada muestra con 3 ml de buffer fosfato de potasio 50 mM pH 7.4 y se procedió como fue indicado en 7.5. Una sonicación de 5 minutos en baño sonicador fue realizada para la formación de los liposomas hasta llegar a una muestra homogénea y obtener los respectivos LP 1 y LP 3 (liposomas unilamelares).

Las lipoproteínas y liposomas, tratados con fenitrotión, se utilizaron para realizar medidas fluorescentes.

#### 8-2. Medidas de fluorescencia realizadas en lípidos

Las medidas de fluorescencia fueron realizadas en un espectrofluorómetro de modulación de fase SLM 4800C (SLM Instrumentos, Urbana, IL), usando como fluoróforos DPH y DPH-PA. Ambos fueron adicionados a las muestras en buffer fosfato de potasio, en pequeños volúmenes de dimetil sulfóxido (DMSO), con una concentración final de 4  $\mu$ M. Los blancos fueron preparados de la misma forma que las muestras, sin los marcadores fluorescentes, pero adicionando el mismo volumen de DMSO, para corregir las intensidades fluorescentes de la dispersión de luz no específica (light-scattering). El fenitrotión en solución etanólica concentrada se le agregó a las muestras, en concentraciones finales de 1 ppm, 10 ppm y 20 ppm. La cantidad de lipoproteína y lipovitelina empleada en cada ensayo fue equivalente a 100  $\mu$ g de proteína/ml. Para los ensayos en los que se utilizaron liposomas, la cantidad de lípidos fue de 90  $\mu$ g/ml. El volumen final empleado en todos los casos fue de 4 ml de buffer fosfato de potasio. Tanto el blanco como las muestras se agitaron suavemente durante 2 horas en oscuridad, en tubos tapados bajo atmósfera de nitrógeno, a temperatura ambiente, para promover la incorporación y el equilibrio de los fluoróforos y el FS a los diferentes sistemas de ensayo.

La anisotropía de fluorescencia ( $r_s$ ), la diferencia de polarización de fase ( $\Delta$ ) y los tiempos de vida media ( $\tau_p$  y  $\tau_m$ ), fueron medidos de acuerdo a Lakowicz *et al.*, 1979, Lakowicz, 1983 (como se mencionó en fundamentos de fluorescencia), con modificaciones (Tricerri, *et al.*, 1994, Garda, *et al.*, 1994a y b). La longitud de onda ( $\lambda$ ) de excitación empleada fue de 361 nm, pasando la luz emitida por un filtro de corte (Schott KV 389) para eliminar la luz  $\lambda$  menor a 389 nm. Las medidas de  $\tau$  se realizaron con una amplitud de luz de excitación modulada a 18 y 30 MHz por un modulador Debye-Sears y polarizado por un polarizador Glan-Thompson. La luz emitida pasa a través del filtro y cuando atraviesa el polarizador orientado verticalmente a 55 grados se elimina el efecto Browniano (Spencer y Weber, 1970). El cambio de fase y la demodulación de la luz emitida relativa a una referencia con  $\tau$  conocido se determinó y usó para computar el tiempo de vida media por fase ( $\tau_p$ ) y modulación ( $\tau_m$ ) de la muestra (Lakowicz, J. y Cherek, H., 1980). Como referencia, se utilizó POPOP [1-4bis(5 feniloxazol-2-il) benceno] en solución etanólica, que posee un  $\tau$  de 1.35 ns (Lakowicz *et al.*, 1980, Lakowicz, 1983; Tricerri *et al.*, 1994; Garda, *et al.* 1994 a; Spencer y Weber, 1970). La diferencia de polarización de fase fue determinada de acuerdo a Lakowicz (Lakowicz *et al.*, 1979 y Lakowicz, 1983). Los valores de anisotropía fundamental  $r_0$ , previamente estimado en 0.390 (Garda *et al.*, 1994b),  $r_s$ ,  $\tau$  y  $\Delta$  fueron utilizados para calcular el  $r_\infty$  y  $\tau_r$  (Tricerri *et al.*, 1994; Garda *et al.*, 1994b) de acuerdo con la teoría de Weber (Weber, 1978).

### 8-3. Determinación de la captación y liberación de ácido graso por las lipoproteínas

#### A) Captación de ácido palmítico por la HDL 1

Suero total de ejemplares machos y hembras no vitelogénicas de *M. borellii* fue incubado con 0, 20 y 40 ppm de FS por 2 horas, posteriormente se determinó la capacidad de pegado de ácido palmítico, incubando las muestras con ácido palmítico ( $1\text{-}^{14}\text{C}$ ) ( $0.5 \mu\text{Ci}$ ,  $9\text{nmol}$ ) (NEN, Boston, MA) como sal de amonio por 30 minutos.

## B) Liberación de ácido palmítico por las LVs

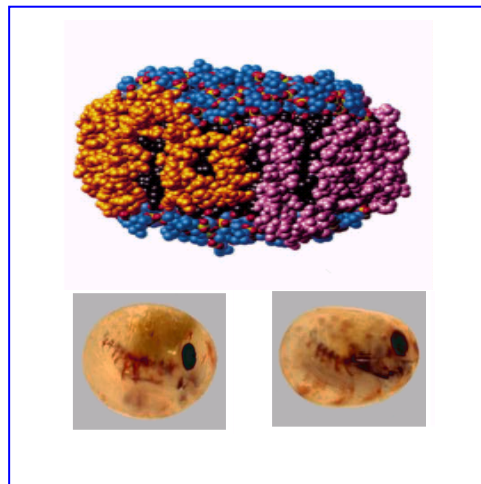
En esta serie de experimentos se utilizó LV 1 y LV 3 marcadas como dadoras de ácido graso y albúmina libre de ácido graso como aceptora. Para ello LV 1 y LV 3 (30 mg de proteína) fueron incubados por 30 minutos con ácido palmítico ( $1\text{-}^{14}\text{C}$ ) (57 mCi/mmol) (NEN, Boston, MA) como sal de amonio. Con el objeto de descartar el ácido graso que no fue pegado, las muestras se dializaron por 24 horas usando buffer tris-HCl 0.1 M pH 8.0. Posteriormente las LVs radiactivas fueron incubadas con 0, 1 y 20 ppm de FS por 1 hora. Las muestras control (sin FS) y tratadas con FS finalmente fueron incubadas con albúmina en iguales concentraciones (5 mg/250 ul) por 30 minutos.

Al concluir las incubaciones las proteínas en condiciones nativas fueron separadas por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) sobre una columna de exclusión molecular Superdex 200 HR 10/30 (Amersham-Pharmacia, Upssala, Sweden) utilizando como fase móvil, buffer Tris-HCl (0.1 M) pH 8.0 (prácticamente el mismo pH de la hemolinfa *in vivo*), y a una tasa de flujo de 0.4 ml/min. Las proteínas fueron detectadas a 280 nm (lámpara UV). La resolución de la columna fue determinada mediante calibración con tiroglobulina, ferritina, ribonucleasa A y albúmina sérica bovina (Pharmacia) como patrones proteicos de peso molecular conocido.

Las diferentes proteínas (HDL 1, LV 1, LV 3 y albúmina) fueron colectadas separadamente sobre la base de los tiempos de retención y la masa relativa. La radiactividad presente en cada una de las subfracciones obtenidas del HPLC fue cuantificada por conteo de centelleo líquido. El líquido de centelleo se eligió de acuerdo a su capacidad para formar sistemas monofásicos con soluciones acuosas. Fue utilizado Aquasol (New England Nuclear) por su capacidad para tolerar volúmenes acuosos apreciables, con alta fuerza iónica. De esta manera se cuantificó la captación total de radiactividad en las subfracciones correspondientes. La eficiencia del contador se determinó con un estándar externo  $^{14}\text{C}$ . Las proteínas aisladas se cuantificaron por la técnica de Lowry (1951).

# **CAPÍTULO 1**

## ***AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS, Y VITELÍNICA DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO***



## *INTRODUCCIÓN:*

Las lipoproteínas de crustáceos, tanto plasmáticas como vitelínicas, han sido caracterizadas en un considerable número de especies, como fue mencionado en la Introducción general. Recientemente ha sido claramente reportado el procesamiento de una vitelogenina en una especie del mismo género que nuestro modelo de estudio, en donde se detalla su metabolismo: la vitelogenina de *M. rosebergii* es sintetizada y clivada en el hepatopáncreas, liberada a la hemolinfa y finalmente incorporada en el ovario (Okuno, 2002). En nuestro modelo, *M. borellii*, si bien las lipoproteínas, tanto plasmáticas como vitelínicas no han sido aún descritas, estudios realizados por nuestro grupo de trabajo durante la embriogénesis, sugirieron un consumo de lipovitelinas por el embrión basándose en la composición lipídica de los huevos (Heras *et al.*, 2000) y en la actividad de las enzimas involucradas en el metabolismo lipídico (González-Baró *et al.*, 2000a). Sin embargo, la naturaleza de ese consumo, y cómo afecta la estructura y composición de la lipovitelina no fue descrito.

Conocer en detalle las composiciones de las lipoproteínas resulta fundamental para llevar a cabo los objetivos de esta tesis. Esto nos indujo a determinar las composiciones lipídicas y apoproteicas de las dos lipoproteínas presentes en el plasma hemolinfático, y de la única lipovitelina detectada en huevos de *M. borellii*. Esta última puede sufrir modificaciones a lo largo del desarrollo embrionario, pudiéndose distinguir tres diferentes estados estructurales: uno temprano, otro medio y uno tardío. Adicionalmente a las composiciones lipídicas en esos tres estadios, también se determinaron las composiciones en ácidos grasos, un aspecto muy poco conocido en lipoproteínas de crustáceos.

## *RESULTADOS:*

### # Aislamiento de lipoproteínas circulantes y vitelínicas

Las lipoproteínas contenidas en el plasma hemolinfático y en el citosol de huevos fueron separadas por ultracentrifugación en gradientes de densidad y fraccionadas. Las concentraciones relativas de proteínas en las fracciones se cuantificaron espectrofotométricamente, y las densidades mediante refractometría.

Con los valores de proteínas totales y densidades obtenidas de cada una de las fracciones se construyeron los perfiles que se muestran en la Figura 1.1.

El perfil de lipoproteínas plasmáticas corresponde al de hembras en estado vitelogénico. En consecuencia, de ese plasma pudieron aislarse dos fracciones lipoproteicas; una de  $\delta$  1.13 g/ml que hemos denominado HDL 1, y otra de  $\delta$  1.18 g/ml que denominamos HDL 2. En el perfil proteico obtenido de citosol de huevos, sin discriminar los diferentes estados de desarrollo embrionario se observó un máximo correspondiente a una lipovitelina de  $\delta$  1.18-1.19 g/ml que se denominó LV. Esta lipovitelina, aislada de huevos en estadios de desarrollo tempranos, medios y tardíos mantuvo la misma densidad, aunque presentó diferentes composiciones lipídicas (ver mas adelante); fue designada como LV 1, LV 2 y LV 3, respectivamente. En la Figura 1.2, cedida por la Lic. Sabrina Lavarías y colaboradores, se muestran huevos de *M. borellii* con diferentes estados de desarrollo del embrión.

Las cinco fracciones lipoproteicas mencionadas (HDL 1, HDL 2, LV 1, LV 2 y LV 3) fueron caracterizadas en sus composiciones lipídicas y proteicas.

### # Análisis de lípidos

Las dos lipoproteínas circulantes HDL 1 y HDL 2, alcanzan concentraciones plasmáticas aproximadamente equivalentes, de alrededor de 5 mg/ml de hemolinfa,

con mayor proporción de lípidos totales en HDL 1. Las composiciones cuali-cuantitativas de las clases de lípidos, determinadas por TLC y TLC-FID, de las dos lipoproteínas plasmáticas, son mostradas en la Tabla 1. Los fosfátidos de colina y etanolamina fueron las clases de lípidos predominantes en ambas lipoproteínas. Cantidades algo menores de triacilglicéridos, colesterol y ácidos grasos libres también fueron detectadas en ambas lipoproteínas. La HDL 2 contiene además una notable concentración de esfingomielina, lípido que no fue detectado en la HDL 1. En la tabla también se muestran los ácidos saturados palmítico y esteárico, y los insaturados oleico y linoleico, fueron los ácidos grasos predominantes al estudiar los valores porcentuales de los principales ácidos grasos extraídos de los lípidos totales

Las composiciones de las clases de lípidos y de los principales ácidos grasos componentes de la lipovitelina aislada durante el estadio temprano del desarrollo embrionario mostraron que los lípidos totales representaron algo más de un 20% de la masa de lipoproteína total (Tabla 1). Fosfatidilcolina, seguida de triacilglicéridos y fosfatidiletanolamina fueron las principales clases de lípidos. Esfingomielina, colesterol y ácidos grasos libres, en concentraciones no mayores al 10% de los lípidos totales, completaron el espectro total de las clases de lípidos presentes. Los ácidos palmítico y oleico, seguidos de palmitoleico y algunos poliénoicos, mostraron mayores porcentajes que otros ácidos grasos (Tabla 1).

#### # Análisis de las apoproteínas

Las lipoproteínas plasmáticas y vitelínicas fueron analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida. En condiciones nativas (Figura 1.3) todas ellas mostraron una única banda proteica; la HDL 2 y la lipovitelina de Mr 440 kDa, y la HDL 1 de Mr 290 kDa. Cuando fueron separadas en condiciones desnaturizantes, se revelaron las proteínas que se muestran en la Figura 1.4. La HDL 1 se disoció en polipéptidos de 124, 26, 23 y 16 kDa, mientras que tanto la lipoproteína plasmática HDL 2 como la vitelínica LV 1 se disociaron en un polipeptido principal de 94 y otro de 112kDa. Además, en la HDL 2 se destaca la existencia de polipéptidos de menor peso molecular (cerca de los 20 kDa) en concentraciones significativas.

## # Variaciones lipídicas y proteicas a lo largo del desarrollo embrionario

Teniendo en cuenta la relación de masa de proteínas y lípidos contenidos en la lipovitelina aislada de 150 huevos en los tres estadios de desarrollo embrionario (Figura 1.5 A), se evidencia una clara disminución de proteínas y lípidos a medida que transcurre el desarrollo embrionario. Dicha disminución es de un 35% y 41% respectivamente, desde la etapa temprana a la intermedia (LV 1 a LV 2), y de 55% y 58%, desde esta última a la tardía (LV 2 a LV 3). En la misma Figura 1.5 (parte B) se representan las variaciones porcentuales de la composición lipídica, resultando en una disminución principalmente de fosfatidilcolina y en menor medida de los triacilglicéridos, con el consecuente aumento relativo de otros lípidos, a medida que transcurre el desarrollo embrionario.

Las variaciones de los porcentajes relativos de los ácidos grasos totales mayoritarios, presentes en la lipovitelina en diferentes estados de desarrollo son mostradas en la Figura 1.6. Como se observa, los ácidos grasos 16:0 y 16:1n-7 presentaron una disminución a lo largo del desarrollo, mientras que los ácidos 20:4n-6, 20:5n-3 y 18:1n-9 mostraron un aumento relativo en los estadios más tardíos.

De la electroforesis en condiciones nativas se observa que, la lipovitelina no muestra variaciones en relación a su composición proteica en los diferentes estadios. Su única banda proteica de 440 kDa se conserva a lo largo del desarrollo embrionario (Figura 1.3). De igual manera, en condiciones desnaturalizantes (Figura 1.4), la subunidad mayoritaria de 94 kDa y otra de 112 kDa se mantienen en la misma proporción en los tres estadios de desarrollo.



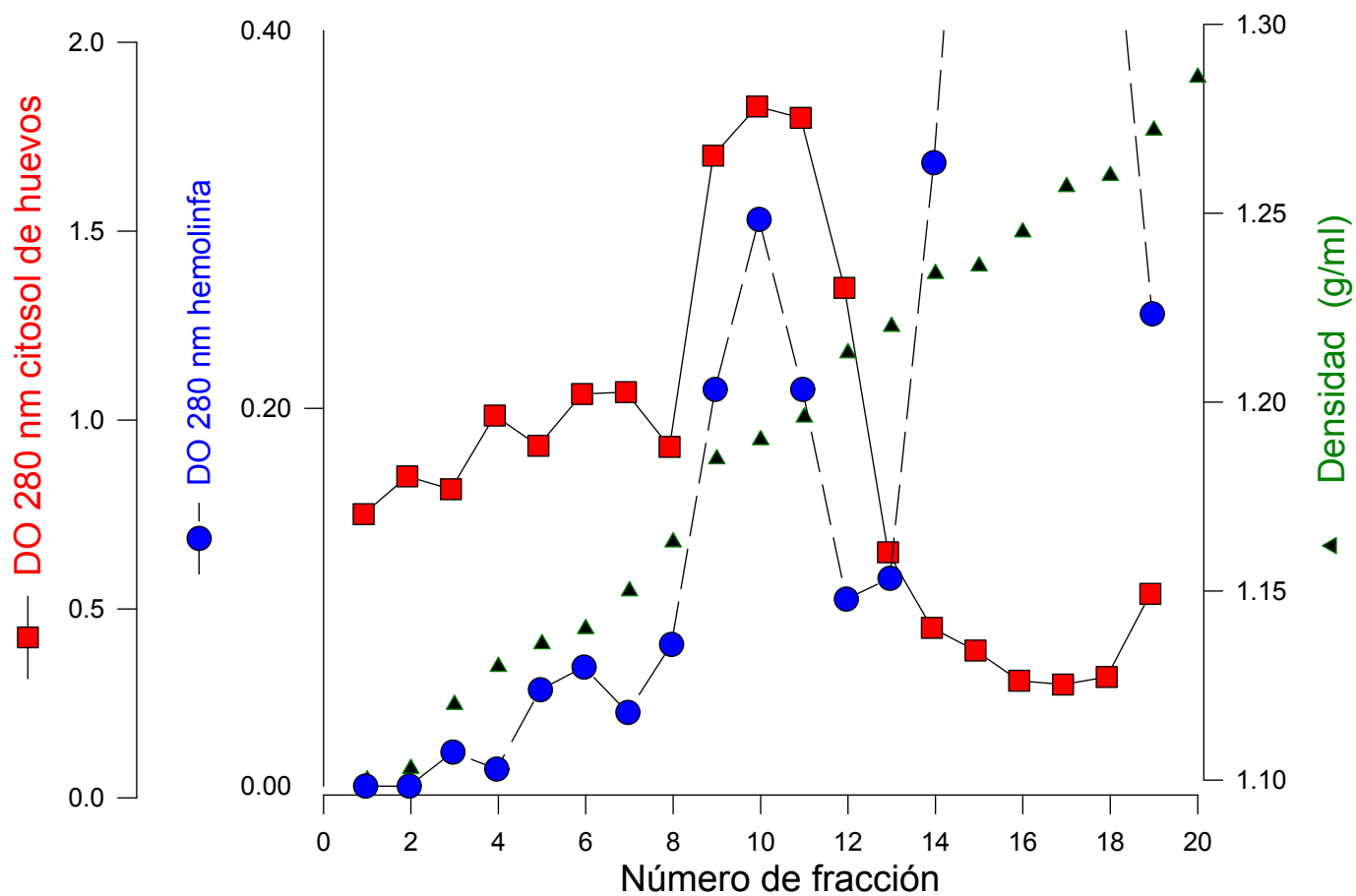
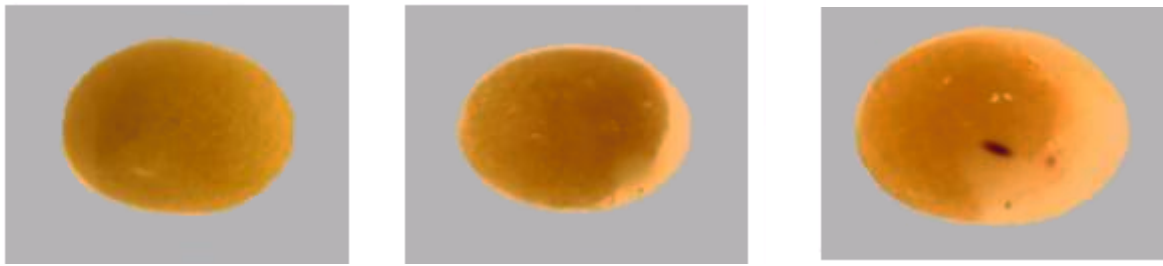


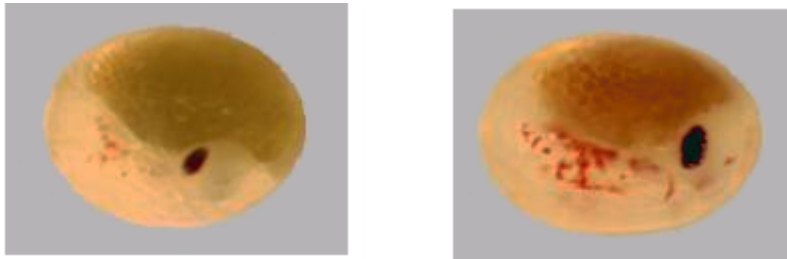
Figura 1.1: Perfiles de densidad y absorbancia a 280 nm, obtenidos a lo largo del gradiente, luego de ultracentrifugar plasma y citosol de huevos de *M. borellii* en NaBr de densidad 1.26 g/ml. El perfil correspondiente al citosol de huevos es representativo de los tres estadios estudiados.

<b>Clase de lípidos</b>	<b>Fracción</b>		
	HDL 1	HDL 2	LV 1
Triacilglicerol (%)	15.2 ± 2.3	16.3 ± 0.8	20,5 ± ,8
Ácidos grasos libres (%)	11.7 ± 0.5	12.3 ± 0.6	5,9 ± ,6
Colesterol (%)	14.6 ± 2.0	12.3 ± 2.0	7,9 ± ,6
Fosfatidiletanolamina (%)	19.5 ± 0.3	16.9 ± 1.9	15,8 ± 1,2
Fosfatidilcolina (%)	38.8 ± 4.5	22.1 ± 2.2	41,9 ± 3,6
Esfingomielina (%)	-----	18.8 ± 1.6	7,6 ± 0,5
Acidos grasos (%)			
14:0	1.2	2.4	3,7
16:0	22.7	23.5	22,3
16:1n-7	5.5	6.9	14,0
18:0	12.5	12.5	9,0
18:1n-9	21.7	23.4	20,1
18:1n-7	7.6	8.0	10,6
18:2n-6	12.4	9.9	7,0
20:4n-6	7.1	5.1	4,1
20:5n-3	8.8	7.7	7,8
Lípidos totales (%)	36	18	23
Proteínas totales (%)	64	82	77
Densidad de hidratación (g/ml)	1.13	1.18	1.18

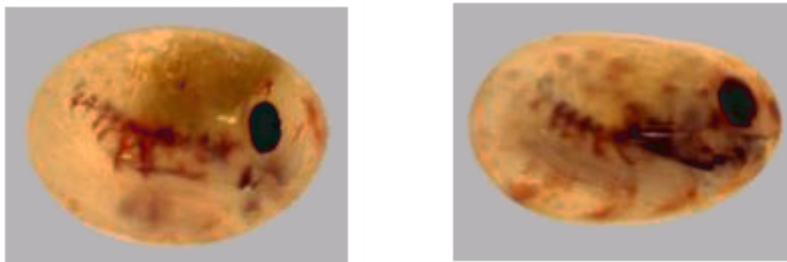
Tabla 1: Composición de lípidos y ácidos grasos mayoritarios de lipoproteínas aisladas del plasma y de huevos en estado de desarrollo temprano de *M. borellii*.



**LV 1**



**LV 2**



**LV 3**

Figura 1.2: Huevos en diferentes estadios de desarrollo embrionario del crustáceo *M. borellii* de los que se aislaron las lipovitelinas (LVs). Estadios tempranos (LV 1), medios (LV 2) y tardíos (LV 3). (Fotos cedidas por la Lic. S. Lavarias y col.)

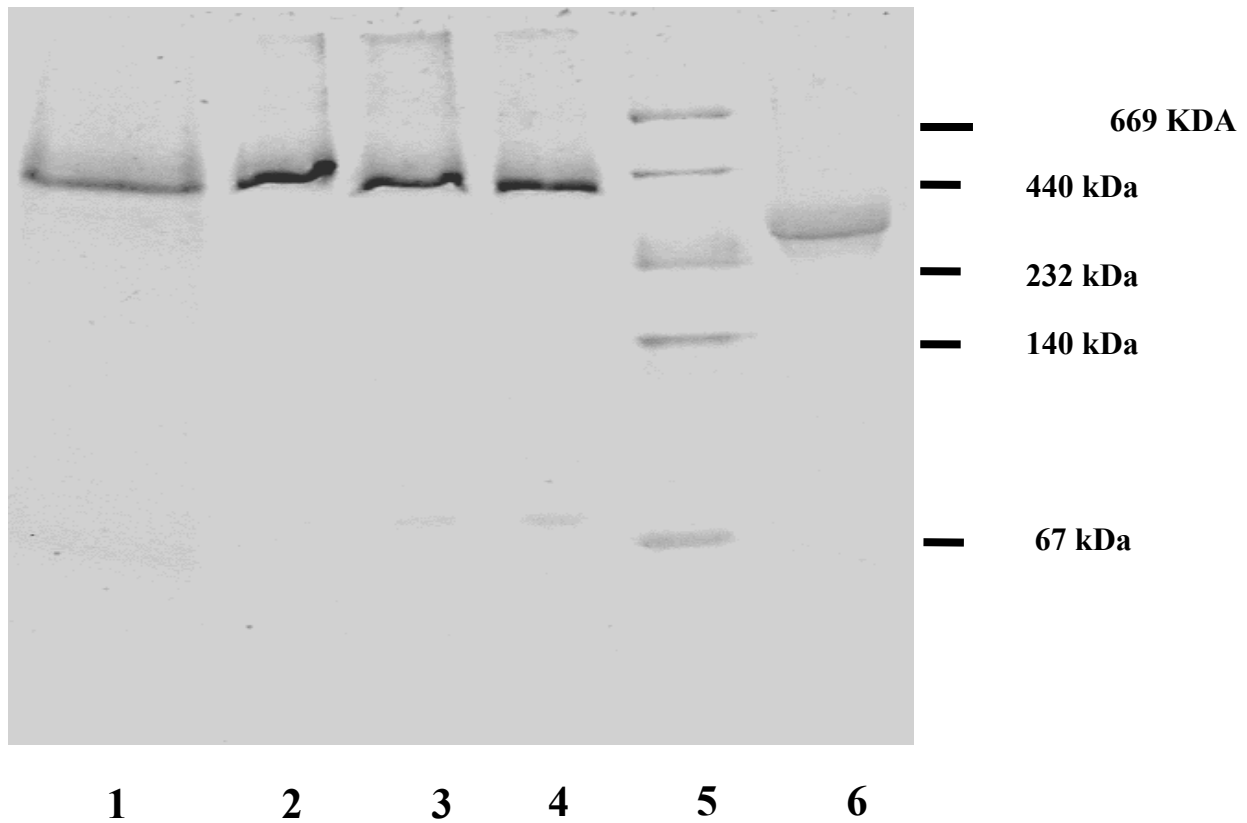


Figura 1.3: PAGE nativo de las lipoproteínas hemolinfáticas HDL 1 (6), HDL 2 (1) y la lipovitelina aislada del citosol de huevos en estado de desarrollo temprano (2), medio (3) y tardío (4) de *M. borellii*. Estándares de peso molecular (5). Gradiente del poro en el gel separador (4%-23% acrilamida).

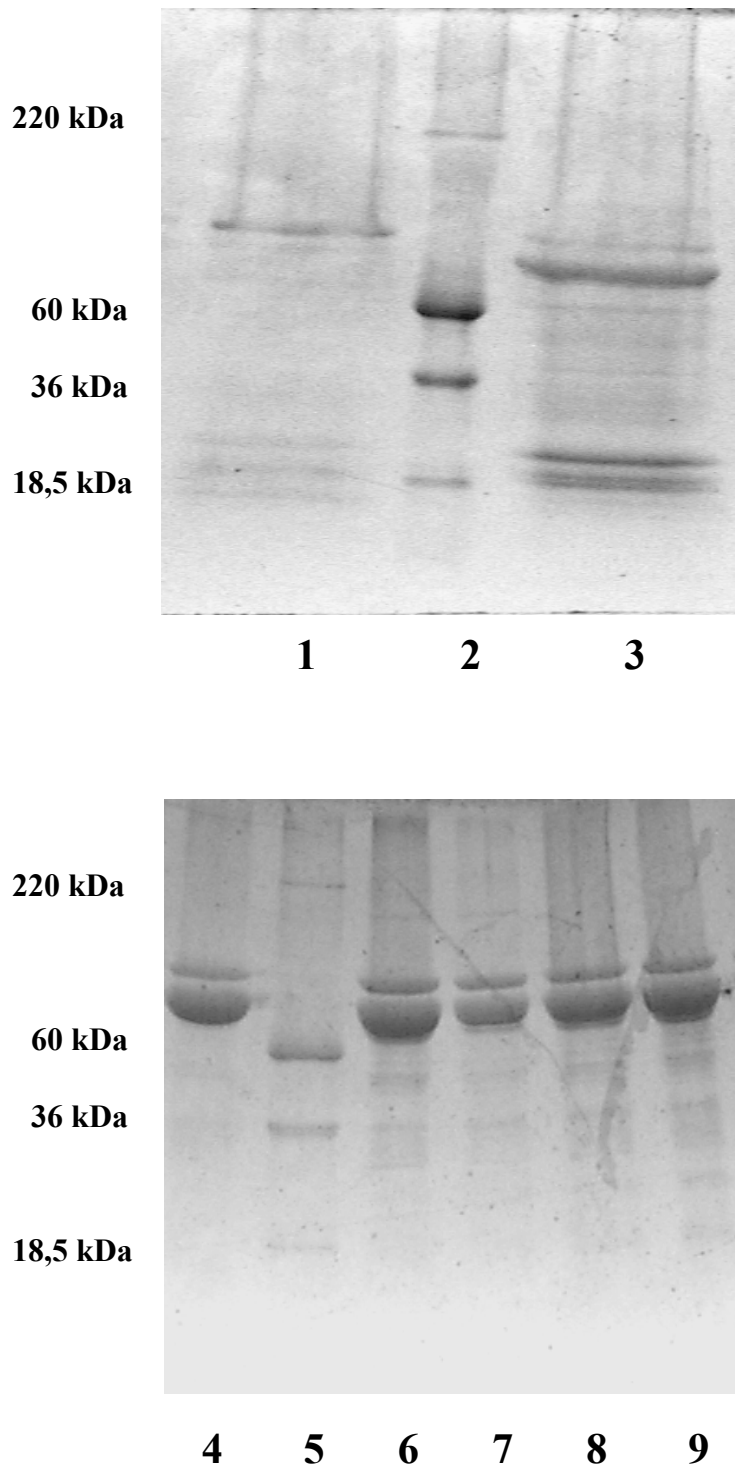


Figura 1.4: PAGE SDS de las lipoproteínas hemolinfáticas HDL 1 (1), HDL 2 (3) aisladas del plasma, y de la lipovitelina del citosol de huevos en estado de desarrollo temprano (4), medio [65µg (6), 130 µg (7), 260 µg (8)] y tardío (9). Estándares de peso molecular (2 y 5). Gradiente del poro en el gel separador (4%-23% acrilamida).

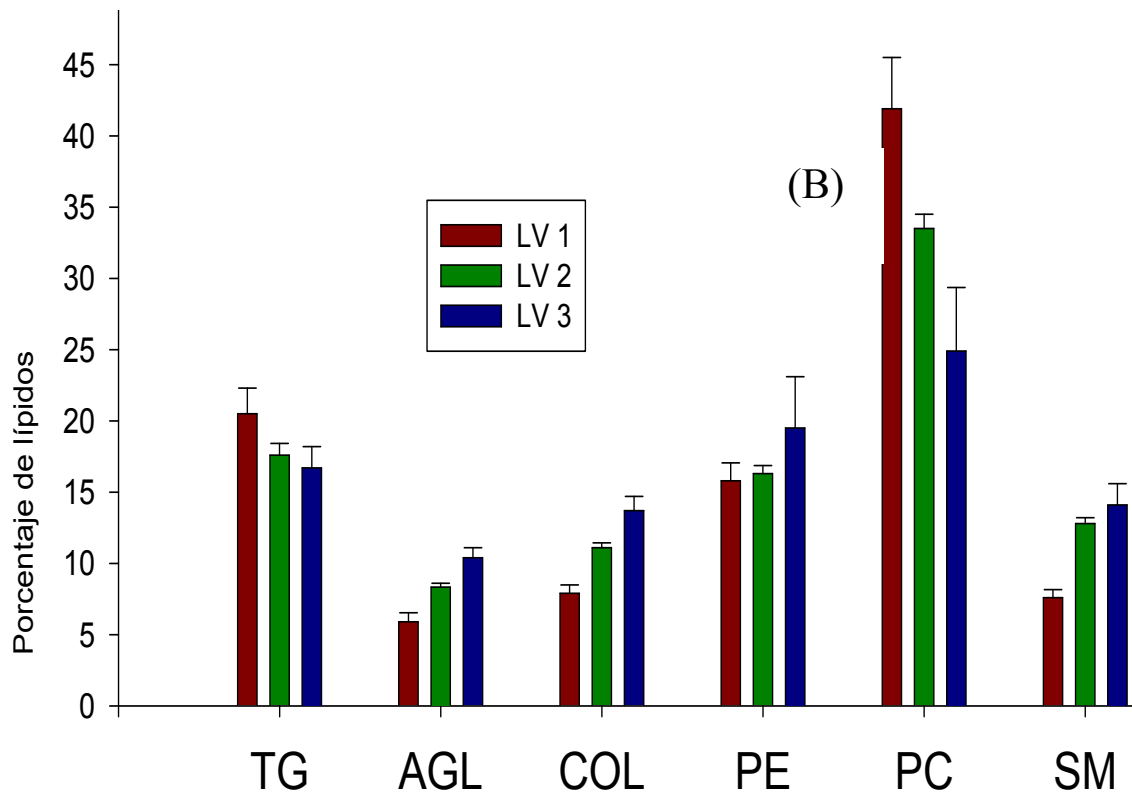
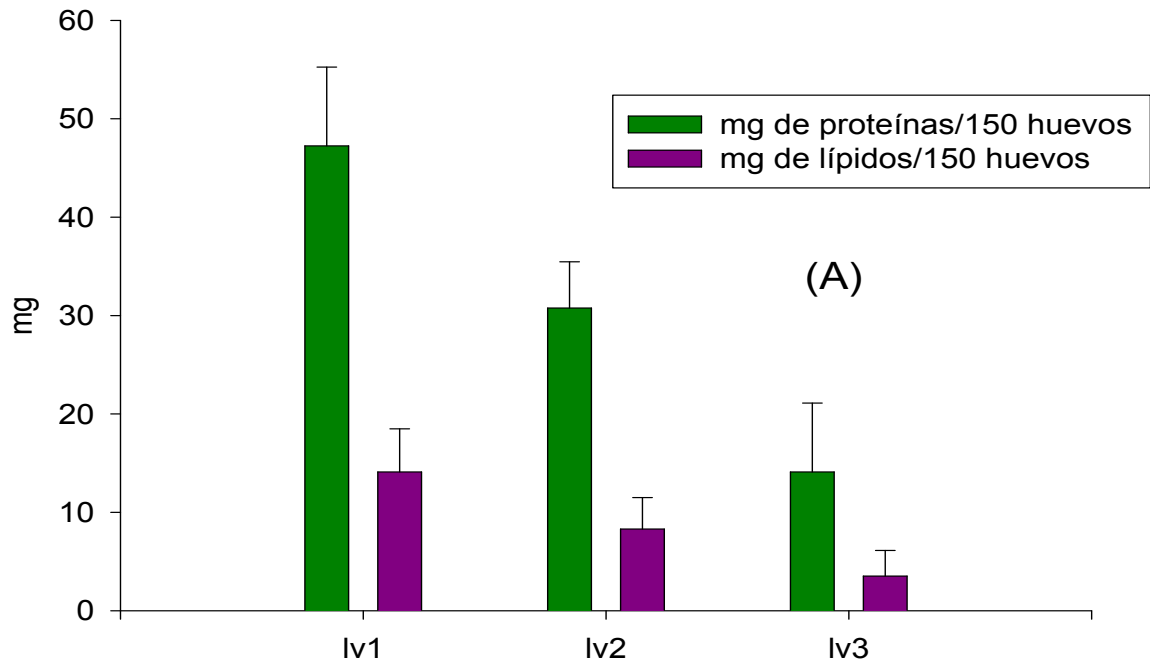


Figura 1.5: Variación de la cantidad de lípidos y proteínas totales (A) y de la composición lipídica (B), en la lipovitelina en estados temprano (LV 1), medio (LV 2) y tardío (LV 3) del desarrollo embrionario.

TG: triacilglicéridos, AGL: ácidos grasos libres, COL: colesterol, PE: fosfatidiletanolamina, PC: fosfatidilcolina, SM: esfingomielina.

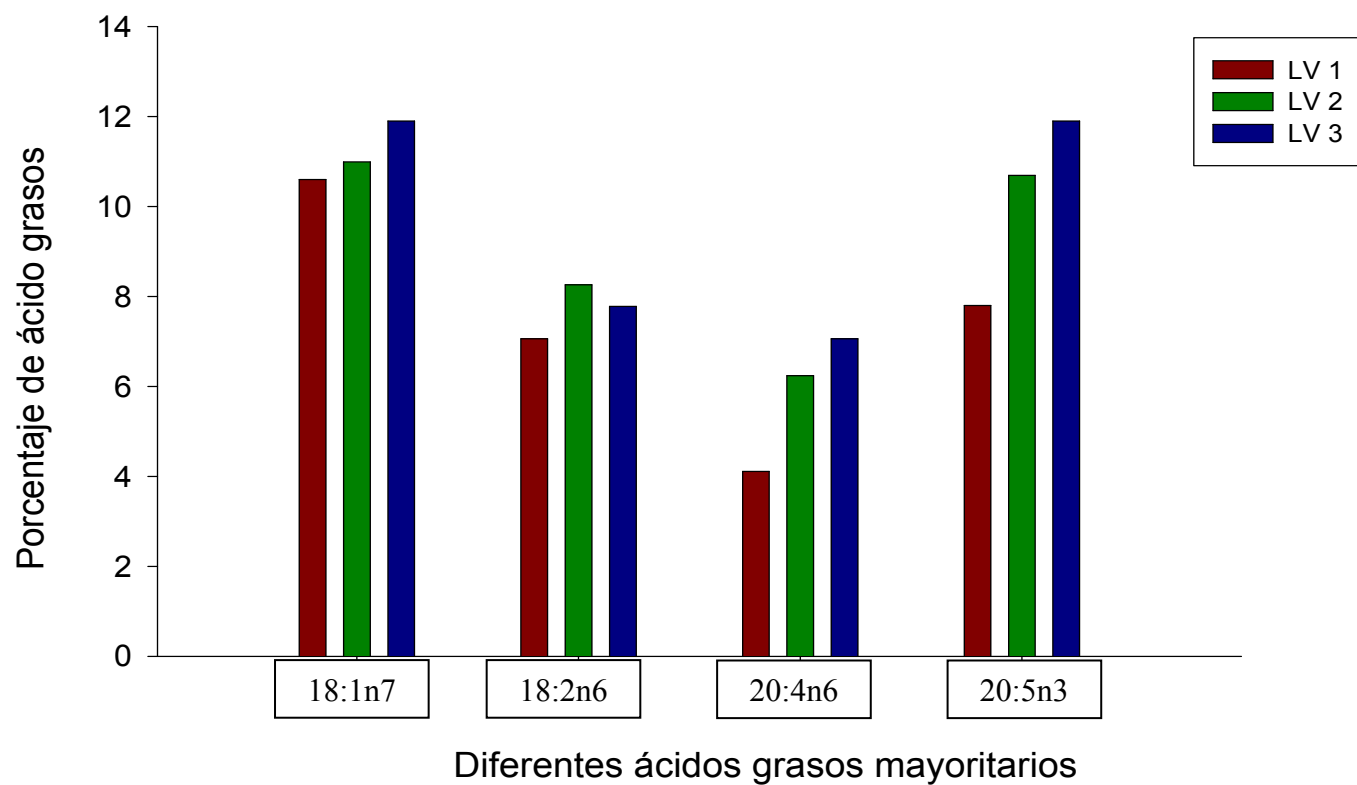
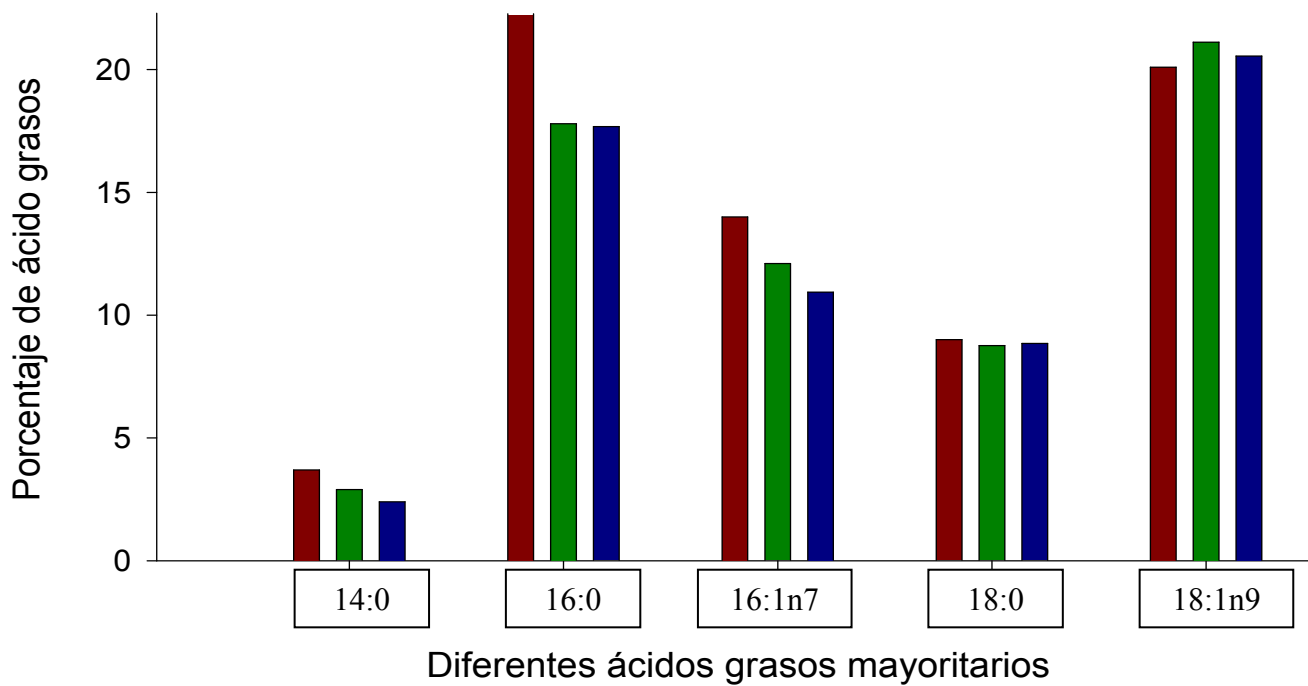


Figura 1.6: Variación de los porcentajes relativos de los ácidos grasos mayoritarios, provenientes de los lípidos totales de la lipovitelina en estados temprano (LV 1), medio (LV 2) y tardío (LV 3) del desarrollo embrionario.

## DISCUSIÓN:

Con las técnicas utilizadas en este trabajo, se han podido detectar en *M. borellii* dos lipoproteínas circulantes en la hemolinfa y una lipovitelina. Las tres fueron aisladas y caracterizadas en cuanto a sus densidades y a sus composiciones en clases de lípidos y apoproteínas. El hecho de haber detectado diferentes composiciones de la lipovitelina a lo largo del desarrollo embrionario, llevó a enfocar específicamente esta lipoproteína de huevo, y estudiar con detalle las variaciones en su composición en diferentes etapas del desarrollo. Esto permitió explicar los cambios observados previamente por Heras y colaboradores (2000) en el vitelo.

Como era de esperar en crustáceos, las dos lipoproteínas plasmáticas resultaron ser de alta densidad (HDL) y con un alto contenido en fosfolípidos (Lee, 1991, Yepiz-Plascencia *et al.*, 2000). Una de ellas, la que denominamos HDL 1, muestra en su composición lipídica un predominio de fosfatidilcolina y carencia de esfingomielina. Fue utilizada como modelo en este trabajo de tesis para demostrar su rol de transportador de lípidos entre los tejidos (ver Capítulo 2). La masa de esta partícula lipoproteica (290 kDa) coincide con la reportada para una lipoproteína de función similar en el cangrejo *Calinectes sapidus* (Lee y Puppione, 1988) y duplica a la de algunos peneidos tales como *P. semisulcatus* (Lubzen *et al.*, 1997) y *P. vanamei* (Yepiz-Plascencia *et al.*, 1995). Las subunidades lipoproteicas constituyentes, caen dentro del amplio rango de pesos moleculares reportados para los crustáceos. La otra lipoproteína plasmática, la que denominamos HDL 2, resultó ser una vitelogenina, presente en la hemolinfa de hembras sólo durante el período de ovogénesis. En la composición lipídica resalta el alto contenido de esfingomielina. Esto contrasta con la carencia de esfingomielina en la HDL 1, e indujo a la utilización de ambas lipoproteínas plasmáticas de *M. borellii* en el primer estudio sobre la influencia de un xenobiotico en relación al ordenamiento de los lípidos en una lipoproteína (ver Capítulo 3). El estudio de las apoproteínas reveló una subunidad mayoritaria de 94 kDa, otras de menor tamaño y una de menor concentración de 112 kDa que, en conjunto, quedan dentro del rango reportado para crustáceos en general (Lee, 1991) y para peneidos en particular (Yepiz-Plascencia *et al.*, 2000).



Los resultados de la caracterización de la lipovitelina (LV) mostraron similitudes entre esta lipoproteína de huevo y la vitelogenina (HDL 2). Ambas coinciden en sus densidades de hidratación (1.18 g/ml) y en la masa de la partícula nativa (440 kDa) determinada por electroforesis, y también en las subunidades proteicas de mayor peso molecular (94 y 112 kDa, respectivamente). Solo difieren en cuanto a dos subunidades proteicas de bajo peso molecular presentes en la HDL 2 y no en la lipovitelina. Diferencias similares entre vitelogeninas y lipovitelinas, con referencia al número de subunidades proteicas que conforman la partícula, fueron reportadas por Chen y Chen (1993) en *P. monodon*, y por Lee y colaboradores (1997) en *M. rosenbergii*. Estos últimos autores corroboraron la misma identidad de dos subunidades presentes en ambas lipoproteínas mediante análisis secuencial de aminoácidos en el extremo N-terminal. Recientemente, en un estudio muy completo realizado en *M. rosenbergii*, Okuno y colaboradores (2002), propusieron un mecanismo para el procesamiento de la vitelogenina, que incluye un clivaje inicial de una única apoproteína precursora en el hepatopáncreas (órgano de síntesis), otro posterior posiblemente en la hemolinfa y la incorporación final de las tres subunidades producto de dichos clivajes al ovario, para constituir la lipovitelina. Puede pensarse que en *M. borellii* ocurra algo similar; que se produzca un procesamiento de la HDL 2 plasmática y que sólo las dos subunidades principales pasen a formar la lipovitelina en el ovario.

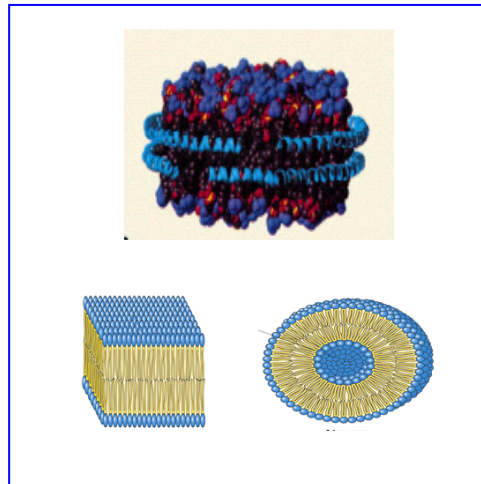
La vitelogenina (HDL 2) y la lipovitelina de *M. borellii* no difieren sólo en las subunidades apoproteicas más pequeñas, sino también en las composiciones cuantitativas de sus lípidos. Si bien ambas poseen concentraciones de fosfolípidos totales del mismo orden (alrededor de un 60%), la lipovitelina casi duplica a la HDL 2 en su contenido en fosfatidilcolina, tiene una concentración algo mayor de triacilglicéridos y, por el contrario, contiene aproximadamente la mitad de ácidos grasos libres y de colesterol que la vitelogenina. Esto sugiere la presencia de dominios lipídicos estructuralmente diferentes y sugiere que el cambio que significa la mayor carga de fosfatidilcolina y triacilglicéridos en la lipovitelina posiblemente ocurra en el ovario, y obedezca a una necesidad funcional de la lipoproteína. Esta última hipótesis fue confirmada y se discute a continuación.

Analizando la lipovitelina en muestras tomadas en tres estadios del desarrollo del embrión, pudo demostrarse que tanto los lípidos totales como las proteínas son consumidos, aproximadamente en la misma proporción. Los resultados de los análisis

de composición lipídica de la lipovitelina en los tres estadios, evidenciaron el consumo de fosfatidilcolina y triacilglicéridos, precisamente los lípidos que se habían acumulado durante el procesamiento de la lipoproteína de vitelogenina a lipovitelina. Heras y colaboradores en el año 2000 trabajando con vitelo completo, demostraron que el desarrollo del embrión se produce a expensas de triacilglicéridos, fosfatidilcolina y proteínas. De forma similar, los resultados de los análisis de la composición proteica revelaron que ninguna subunidad proteica en particular es selectivamente utilizada y que todas ellas se consumen en igual proporción.

## CAPÍTULO 2

### TRANSFERENCIA DE LÍPIDOS ENTRE HEMOLINFA Y HEPATOPÁNCREAS DE *Macrobrachium borellii*



## **INTRODUCCIÓN:**

En el sistema de transporte plasmático de lípidos en crustáceos está involucrada la lipoproteína de alta densidad HDL 1, presente en animales de ambos sexos y presumiblemente encargada de transferir lípidos entre el hepatopáncreas y otros tejidos. Su caracterización ya ha sido detallada en el Capítulo 1. Por otra parte, el hepatopáncreas de los crustáceos es el principal órgano metabólico de lípidos, activo tanto en la síntesis como en la degradación de acilglicéridos, análogo al hígado de los vertebrados y al cuerpo graso de los insectos. Posee función digestiva de secreción de enzimas y excreción de materiales de desecho (O'Connor y Gilbert, 1968, Al-Mohanna y Nott, 1986). Para determinar la importancia del hepatopáncreas de *M. borellii* en el metabolismo de lípidos, se han realizado anteriormente en nuestro laboratorio una serie de estudios metabólicos, en los que se ha demostrado el consumo de lípidos en hepatopáncreas en situaciones de stress (Pollero *et al.*, 1991), que ese consumo era producido por  $\beta$ -oxidación (Irazú *et al.*, 1992), y la importancia del ácido palmítico como precursor de glicerolípidos (González Baró *et al.*, 1993).

El estudio descrito en este Capítulo se basó en la siguiente hipótesis: El hepatopáncreas, por ser un órgano biosintético, debe transferir los lípidos que sintetiza a la HDL hemolinfática, y ella, a su vez, debe transferir los lípidos sintetizados por el hepatopáncreas a otros tejidos, que los utilizarán como fuente energética. Ya se ha demostrado que en órganos activos altamente oxigenados como las branquias, la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos contribuyen a la energética celular (Irazú *et al.*, 1992). Dado que en decápodos se ha evidenciado la presencia de una sola lipoproteína (HDL 1) común a ambos sexos, es razonable inferir que la HDL 1 será la responsable de realizar la transferencia de lípidos entre los tejidos en condiciones normales. No obstante, el hepatopáncreas sintetiza triacilglicéridos como la clase de lípido mayoritario y los fosfoglicéridos de fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina comprenden cerca del 60% de los lípidos de HDL 1. Por lo tanto, los posibles mecanismos de transferencia de lípidos entre el hepatopáncreas y la hemolinfa deben involucrar principalmente a fosfoglicéridos o a ácidos grasos

productos de la lipólisis que luego serán re-esterificados. El mecanismo de transferencia de lípidos aún no ha sido descrito para el grupo de los crustáceos. El objetivo de este trabajo fue determinar la transferencia de ácidos grasos libres y glicéridos, estudiando *in vitro* el intercambio de sustratos marcados entre la HDL plasmática de *M. borellii* y el hepatopáncreas, y entre membranas artificiales y dicha lipoproteína.

## RESULTADOS:

### # Incorporación del ácido palmítico al hepatopáncreas y a la hemolinfa.

#### Marcación de hemolinfa:

Luego de inyectar el ácido palmítico  $^{14}\text{C}$  en el seno cefálico, y de incubarlo *in vivo* durante diferentes tiempos, los lípidos totales fueron extraídos de la hemolinfa aislada. Posteriormente se analizaron en las distintas clases de lípidos radiactivos circulantes (Figura 2.1). Se observó una clara disminución de la radiactividad en el ácido graso libre a lo largo del tiempo de incubación, hasta alcanzar al cabo de 16 horas, sólo un 20% de la marcación inicial. Paralelamente se produjo un aumento en la radiactividad presente en fosfatidilcolina, y no se observaron variaciones significativas en la marcación de glicéridos neutros en función del tiempo de incubación del ácido graso.

Con la intención de conocer la participación de la HDL 1 en la captación y transporte de los lípidos, el plasma fue ultracentrifugado en gradiente de densidad, fraccionado, y en cada fracción fue medida la radiactividad (Figura 2.2). Los máximos valores de radiactividad se correspondieron a la única lipoproteína plasmática presente en la hemolinfa de *M. borellii* en ese periodo del año (periodo no reproductivo en donde la vitelogénesis no se lleva a cabo). El máximo valor en la concentración de proteínas, medida como absorbancia a 280 nm, corresponde a la hemocianina, pigmento respiratorio de estos animales.

Marcación de hepatopáncreas:

El ácido palmítico radiactivo inyectado en la hemolinfa, fue captado rápidamente por el hepatopáncreas e incorporado en acilglicéridos neutros (triacilglicéridos y diacilglicéridos) y en un fosfoglicérido (fosfatidilcolina). La Figura 2.3 muestra los porcentajes de incorporación de la marca en diferentes clases de lípidos en función del tiempo de incubación. Se observó una distribución homogénea de la radiactividad entre los dos tipos de glicerolípidos, a tiempos de incubación cortos, mientras que a tiempos de incubación largos la marcación se acumuló principalmente en fosfatidilcolina y en menor medida en los glicéridos neutros. Como en el caso anterior, la concentración de la marcación en los diacilglicéridos fue mínima, reflejando su carácter de intermediarios en la síntesis de triacilglicéridos.

#### # Transferencia lipídica entre la hemolinfa y el hepatopáncreas

Basados en la marcación diferencial producida a diferentes tiempos de incubación en los lípidos de la hemolinfa, se diseñaron dos diferentes sistemas para estudiar la transferencia de lípidos entre la hemolinfa y el hepatopáncreas. Con la hemolinfa marcada a tiempos cortos de incubación, principalmente en el ácido graso libre, aproximadamente la mitad de la marcación fue transferida al hepatopáncreas (Figura 2.4 A). Luego se utilizó como dador hemolinfa con marcación distribuida tanto en ácido graso libre como en fosfo y triglicéridos, obtenida a mayores tiempos de incubación *in vivo*. En este caso, solo se observó la transferencia de fosfatidilcolina hacia el hepatopáncreas (Figura 2.4 B).

La figura 2.5 muestra los resultados de los experimentos en los que los hepatopáncreas marcados *in vivo* fueron incubados *in vitro* con hemolinfa no radiactiva, en dos diferentes condiciones experimentales. En la primera condición experimental se utilizaron hepatopáncreas recientemente disectados, sin ningún tipo de tratamiento posterior. Se observó que al cabo de 30 minutos de incubación los hepatopáncreas le transfirieron a la hemolinfa una considerable cantidad (20% de la radiactividad) de

fosfatidilcolina, la mayor parte (65%) de su marcación en el ácido graso libre y, proporcionalmente, una escasa cantidad de triacilglicéridos (Figura 2.5 A).

Otra serie de experimentos similares fue realizada previo lavado de los hepatopáncreas marcados con una solución de albúmina, con la intención de remover los ácidos grasos que se ubican en la faz externa de las membranas de las células del hepatopáncreas. La Figura 2.5 B muestra que, en este caso, el ácido graso libre es el único lípido transferido a la hemolinfa, permaneciendo en el tejido la totalidad de la marcación del fosfolípido y de los glicéridos neutros.

Para determinar si la HDL 1 era capaz de aceptar fosfatidilcolina desde una membrana artificial sin proteínas, se utilizaron liposomas conteniendo <sup>14</sup>C- fosfatidilcolina como dadoras de lípidos y hemolinfa como aceptora. Bajo estas condiciones, no se observó transferencia de fosfatidilcolina hacia la HDL 1.

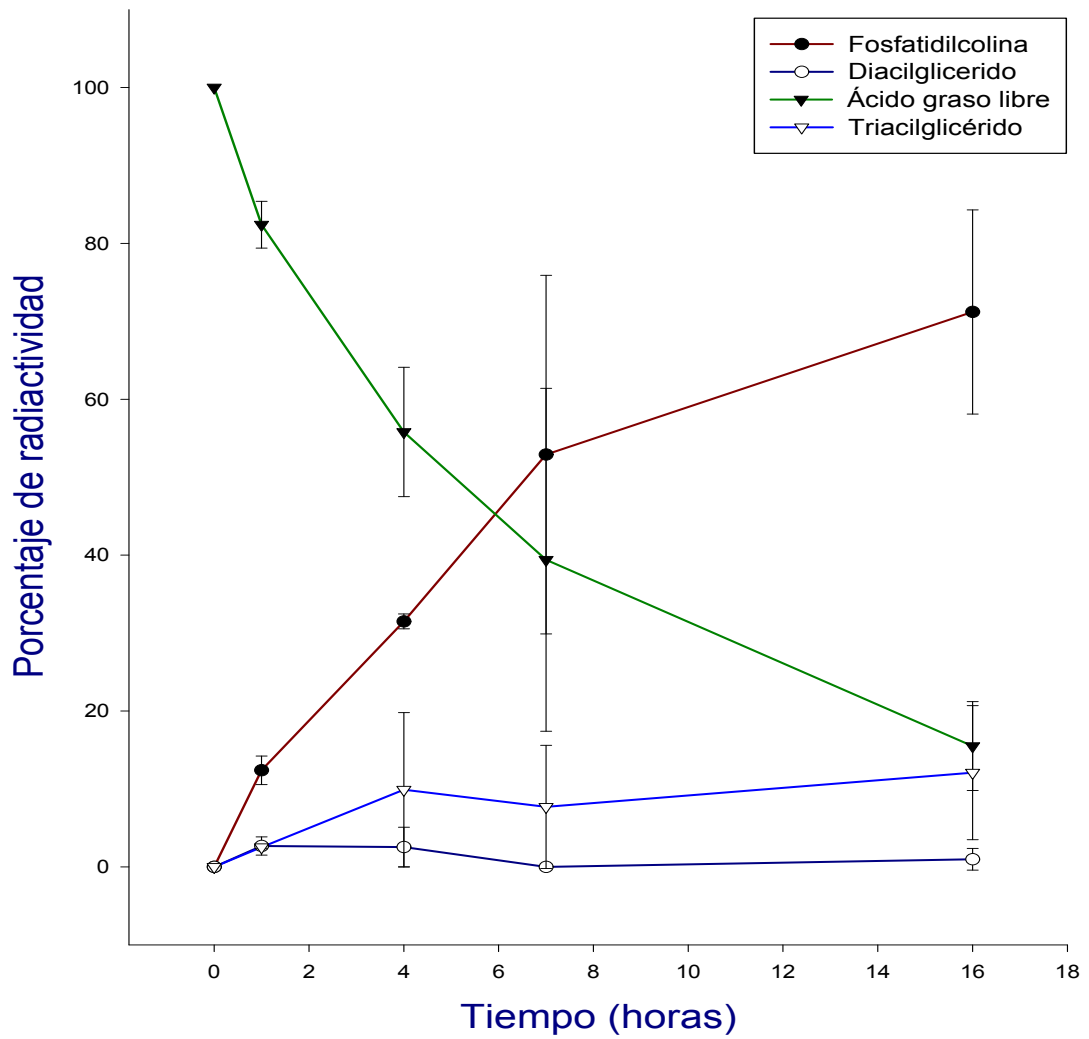


FIGURA 2.1: INCORPORACIÓN DE LÍPIDOS MARCADOS EN LA HEMOLINFA DE *M. BORELLII*. EL ÁCIDO PALMÍTICO-<sup>14</sup>C FUE INYECTADO EN EL SENO CEFÁLICO E INCUBADO *IN VIVO* A DISTINTOS TIEMPOS. LOS VALORES REPRESENTAN LA MEDIA +/- ERROR ESTÁNDAR DE TRES EXPERIMENTOS INDEPENDIENTES. LAS BARRAS INDICAN EL ERROR ESTÁNDAR DE LAS MEDIDAS.



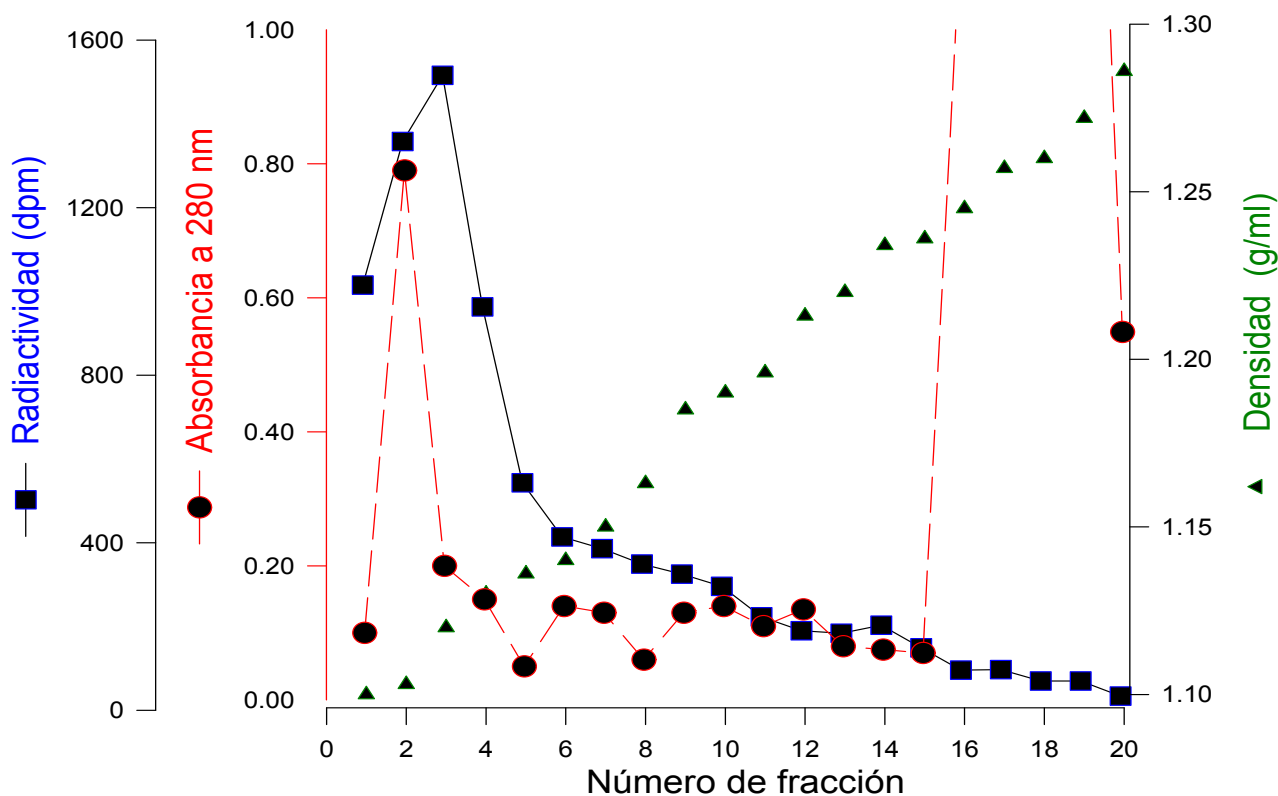


FIGURA 2.2: DISTRIBUCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES (ABSORBANCIA A 280 NM), RADIATIVIDAD Y DENSIDAD EN FRACCIONES PLASMÁTICAS DE *M. BORELLII*. LOS CAMARONES FUERON INCUBADOS *IN VIVO* CON ÁCIDO PALMÍTICO-<sup>14</sup>C POR 5 HS. EL PLASMA MARCADO FUE ULTRACENTRIFUGADO EN GRADIENTE DE NABR Y FRACCIONADO.

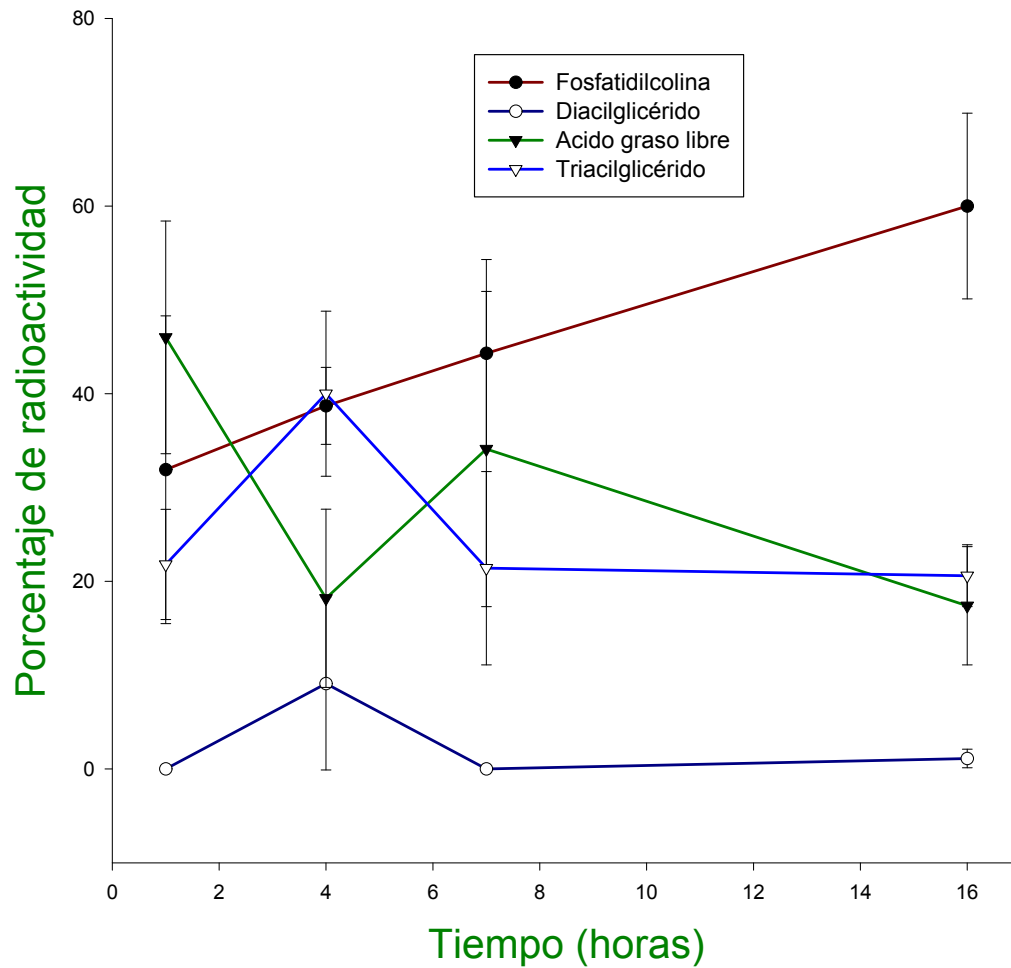


FIGURA 2.3: INCORPORACIÓN DE LÍPIDOS MARCADOS EN EL HEPATOPÁNCREAS *DE M. BORELLII*. EL ÁCIDO PALMÍTICO RADIOACTIVO FUE INYECTADO EN EL SENO CEFÁLICO E INCUBADO *IN VIVO* DURANTE DISTINTOS TIEMPOS. LOS VALORES REPRESENTADOS SON PROMEDIO DE TRES EXPERIMENTOS INDEPENDIENTES. LAS BARRAS INDICAN EL ERROR ESTÁNDAR DE LAS MEDIDAS.

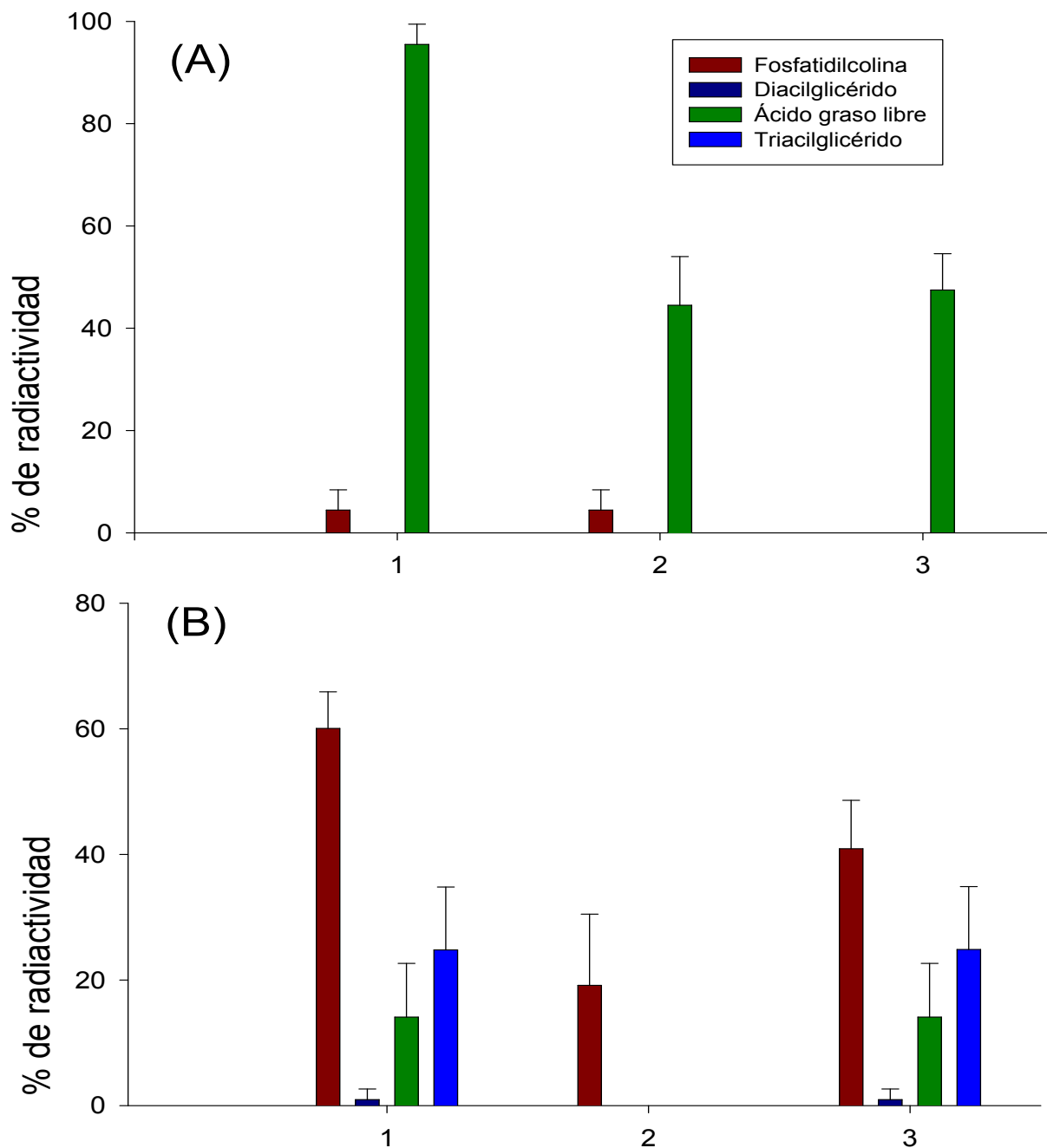


FIGURA 2.4: TRANSFERENCIA *IN VITRO* DE LÍPIDOS MARCADOS DESDE LA HEMOLINFA AL HEPATOPÁNCREAS. A: TRANSFERENCIA DESDE HEMOLINFA MARCADA PRINCIPALMENTE CON ÁCIDO GRASO LIBRE. B: TRANSFERENCIA DESDE HEMOLINFA MARCADA EN ÁCIDO GRASO LIBRE Y GLICEROLÍPIDOS. 1: LÍPIDOS MARCADOS EN LA HEMOLÍNFA ORIGINAL. 2: LÍPIDOS MARCADOS TRANSFERIDOS AL HEPATOPÁNCREAS. 3: REMANENTE DE LÍPIDOS MARCADOS EN LA HEMOLINFA. LOS VALORES DE (2 + 3) SUMAN EL 100 % DE LA MARCA EXPRESADA EN 1.

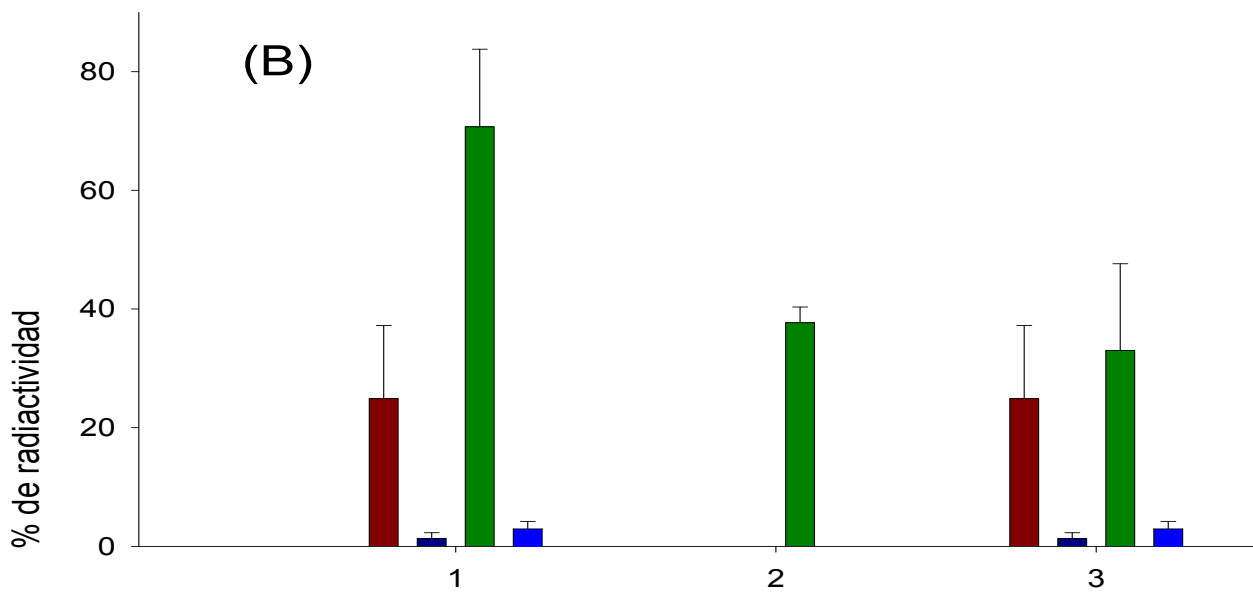
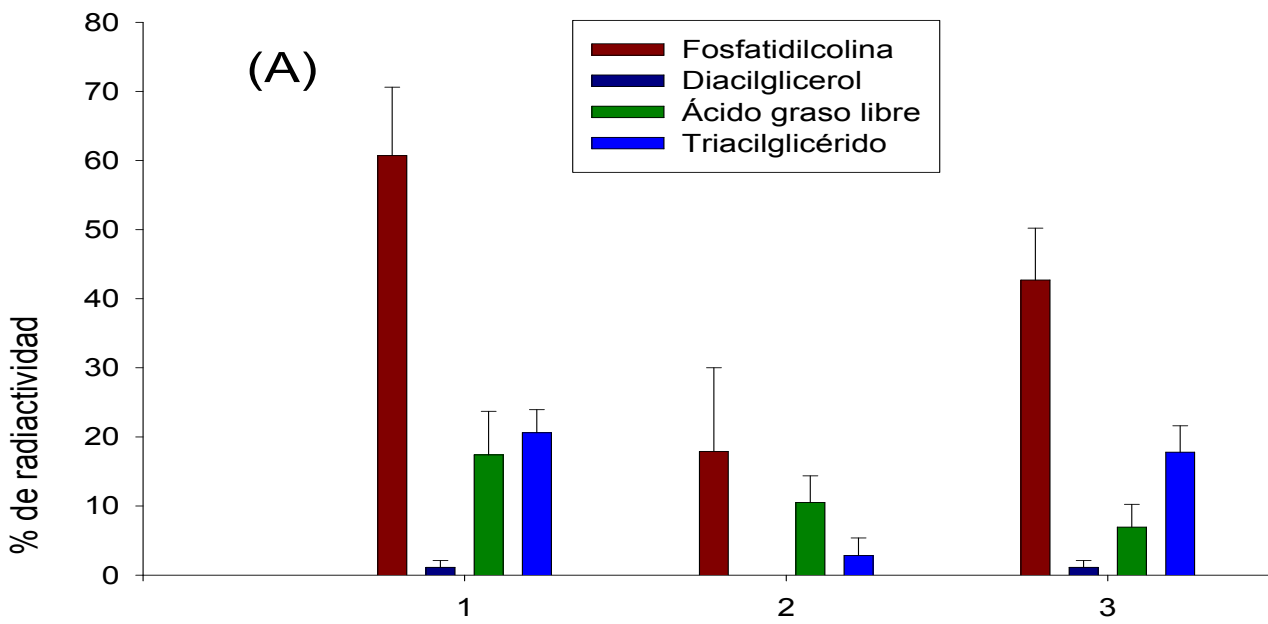


FIGURA 2.5: TRANSFERENCIA *IN VITRO* DE LÍPIDOS MARCADOS DESDE EL HEPATOPÁNCREAS A LA HEMOLINFIA. A: TRANSFERENCIA DESDE EL HEPATOPÁNCREAS SIN TRATAMIENTO. B: TRANSFERENCIA DESDE EL HEPATOPÁNCREAS LAVADO CON BUFFER-ALBÚMINA. 1: LÍPIDOS MARCADOS EN EL HEPATOPÁNCREAS ORIGINAL. 2: LÍPIDOS MARCADOS TRANSFERIDOS A LA HEMOLINFIA. 3: REMANENTE DE LÍPIDOS MARCADOS EN EL HEPATOPÁNCREAS. LOS VALORES DE (2 + 3) SUMAN EL 100 % DE LA MARCA EXPRESADA EN 1.

## *DISCUSIÓN:*

Hemos utilizado técnicas de marcado isotópico de *M. borellii*, inyectando un ácido graso radiactivo en la hemolinfa y midiendo la marcación a lo largo del tiempo. En este estudio, el marcado isotópico de los lípidos se realizó a fin de obtener hemolinfa y hepatopáncreas marcados y utilizarlos como dadores de lípidos en un sistema binario de incubación *in vitro* compuesto por hemolinfa-hepatopáncreas.

La declinación de la marca presente en la fracción de los ácidos grasos libres circulante en hemolinfa a lo largo de la incubación, con un aumento concomitante de los glicerolípidos, indica claramente que el precursor inyectado en la hemolinfa se incorpora rápidamente en los tejidos, y que éstos sintetizan glicerolípidos y los devuelven a la circulación. Se considera que después de 16 horas de incubación la radiactividad en los lípidos de la hemolinfa no presentará una marcada variación porcentual, teniendo en cuenta que la variación en el porcentaje de glicerolípidos marcados en función del tiempo tiene un comportamiento de tipo hiperbólico para la fosfatidilcolina (Figura 2.1) y a ese tiempo ya alcanzó el valor asintótico. A tiempos mayores de 16 horas la cantidad de radiactividad presente en hemolinfa disminuyó considerablemente, dificultando su uso como dadora de lípidos debido a su baja actividad específica (5.600 dpm/mg proteína). Por lo tanto puede considerarse entre 14 y 16 horas de incubación como un valor estable en la marcación *in vivo* de hemolinfa en fosfatidilcolina con ácido palmítico.

El incremento de la radiactividad en los glicéridos totales circulantes se produce principalmente debido al aumento de radiactividad en fosfatidilcolina, mientras que permanece a lo largo del tiempo prácticamente constante el porcentaje de triacilglicéridos y diacilglicéridos. Podría inferirse que el mecanismo de síntesis de fosfolípidos en los tejidos es considerablemente más activo que el de los glicéridos neutros. Sin embargo, no ocurre esto en el

hepatopáncreas. La distribución de la radiactividad entre los lípidos del hepatopáncreas, luego de incorporado el ácido palmítico radiactivo *in vivo*, sugiere que, aunque este órgano se vea activo en la síntesis de fosfatidilcolina a tiempos largos, en tiempos moderados tiene capacidad para sintetizar ambos glicéridos. Un hecho similar había sido observado anteriormente (González Baró y Pollero, 1993) en un estudio del metabolismo del ácido palmítico. La mayor radiactividad presente en la fracción de fosfatidilcolina cuando se usó hemolinfa fría como la aceptora de lípidos puede deberse a que los triacilglicéridos sintetizados tiendan a permanecer en el hepatopáncreas, transfiriendo a la hemolinfa preferentemente la fosfatidilcolina. Esto es coincidente con los resultados de estudios de composición lípida realizados en éstos y otros crustáceos, en los que se observó que la fosfatidilcolina es el lípido circulante que predomina (Lee y Puppione, 1988), y que el hepatopáncreas acumula triacilglicéridos (González Baró y Pollero, 1988). Por lo cual, en un principio nuestra suposición fue que los fosfolípidos sintetizados en el hepatopáncreas podrían ser transferidos a la hemolinfa o que los triglicéridos hepatopancreáticos serían hidrolizados a nivel de membrana plasmática por una lipasa, y por un proceso denominado remodelación de lípidos transformarse en fosfatidilcolina (Lands y Hart 1964, 1965; Brockerhoff 1966). Este proceso de remodelación no se evidencia a partir de nuestros resultados experimentales, por lo menos en los tiempos de incubación ensayados. El hecho que la marcación circulante solo fuese hallada en una fracción plasmática de alta densidad, demostró el rol que cumple la HDL 1 en la captación de los lípidos cedidos por los tejidos, y en el transporte de éstos. Debe destacarse que los animales utilizados en estos experimentos fueron machos y hembras no vitelogénicas, por lo que el plasma carecía de vitelogenina (HDL 2) y solo contenía la HDL 1 común a ambos sexos.

Los resultados del estudio de transferencia *in vitro* de lípidos desde la hemolinfa hacia el hepatopáncreas, mostraron una clara tendencia de la hemolinfa a ceder al tejido ácidos grasos libres y glicéridos. Esto corrobora las consideraciones anteriores sobre la relación *in vivo* entre los componentes del sistema hemolinfa-hepatopáncreas, en el que se supuso que la primera aporta, por medio de su lipoproteína, los ácidos grasos necesarios para que

el tejido de mayor actividad metabólica sintetice glicerolípidos. Los experimentos *in vitro* fueron realizados a tiempos cortos para evitar que la síntesis y remodelación de glicéridos en el hepatopáncreas enmascarara los resultados de transferencia.

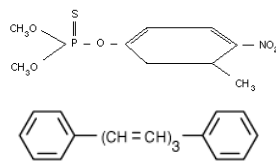
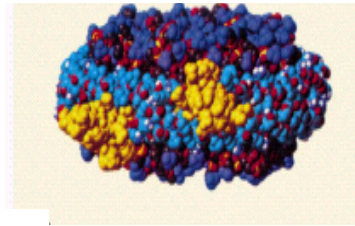
Utilizando hepatopáncreas marcados *in vivo* a tiempos largos y, consecuentemente, con la radiactividad acumulada principalmente en fosfatidilcolina, aunque también en triacilglicéridos y ácidos grasos libres, se realizaron experimentos *in vitro* en los que se demostró la transferencia de estos lípidos hacia la hemolinfa. el lípido comparativamente mejor transferido (teniendo en cuenta el porcentaje de marca cedido) fue el ácido graso libre, seguido de la fosfatidilcolina y de triacilglicéridos. esto último marca un comportamiento distintivo entre el fosfoglicérido y los glicéridos neutros, coincidente con la observación de que, en condiciones naturales, existe una alta carga de fosfatidilcolina en la lipoproteína circulante y una acumulación de triacilglicéridos en el hepatopáncreas. la situación cambia cuando se experimenta *in vitro* con hepatopáncreas lavados con buffer-albúmina ya que sólo se transfieren ácidos grasos libres. la albúmina remueve los ácidos grasos que están asociados a la membrana plasmática y tiene a su vez capacidad de unión a los fosfolípidos de la membrana plasmática, pudiendo así impedir estéricamente la interacción de componentes de la membrana plasmática con otras proteínas, que estarían involucradas en el proceso de transferencia de lípidos. en consecuencia, puede pensarse que la transferencia de ácidos grasos libres quizás se produzca directamente sin la participación de un transportador, y que la de los fosfoglicéridos, por el contrario, deba ser mediada por algún factor de transferencia, que pueden ser las enzimas que catalizan el remodelado de glicerolípidos o un carrier. de existir tal factor de transferencia estaría posiblemente asociado a la membrana del hepatopáncreas, y sería removible por el buffer-albúmina usado en el lavado del tejido. esto motivó un último experimento utilizando como donador una membrana artificial compuesta únicamente por fosfatidilcolina, sin agregado de proteínas. cuando se pretendió transferir fosfatidilcolina marcada desde esos liposomas hacia la hemolinfa, se comprobó que la hdl 1 plasmática no captaba al fosfolípido, en esas condiciones experimentales. tal resultado negativo, refuerza la hipótesis de la

existencia, en condiciones naturales, de algún carrier que haga posible el transporte de glicéridos desde la membrana del tejido a la circulación.



## CAPÍTULO 3

### ***EFFECTO DE UN PLAGUICIDA ORGANOFOSFORADO SOBRE PROPIEDADES FÍSICAS DE LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS***



## INTRODUCCIÓN:

Muchos xenobióticos, incorporados por diferentes vías a la hemolinfa y circulando por ella, pueden ejercer una acción tóxica cuando alcanzan algún tejido. También podrían afectar a su propio medio de transporte hemolinfático que, en el caso de sustancias liposolubles, podrían ser las partículas lipoproteicas circulantes. Basados en la hipótesis de que un xenobiótico liposoluble podría modificar el comportamiento de las lipoproteínas plasmáticas, del mismo modo que afecta a otros sistemas lipoproteicos tales como las membranas biológicas, se realizaron ensayos usando como modelos al plaguicida organofosforado fenitrotión (FS) y a las dos lipoproteínas hemolinfáticas de *M. borellii* (HDL 1 y HDL 2). Estas últimas son lipoproteínas de alta densidad caracterizadas con detalle en el Capítulo 1 y, aunque ambas contienen alta concentración de fosfolípidos, difieren en sus composiciones lipídicas. La primera está presente en el plasma de ambos sexos y la segunda es exclusiva de hembras en estado vitelogénico, y esta relacionada con la formación de la lipovitelina (lipoproteína del vitelo). Se consideró entonces que ellas son un modelo adecuado para estudiar, por primera vez, el efecto de plaguicidas sobre las propiedades fisicoquímicas de lipoproteínas y hacerlo comparativamente entre dos sistemas lipoproteicos cuyas porciones lipídicas difieren cuali y cuantitativamente. Para tal fin se emplearon técnicas de polarización de fluorescencia, descritas en materiales y métodos. Este tipo de estudio posee un interés fisiológico, ya que las alteraciones en las estructuras y propiedades de las lipoproteínas podrían estar afectando sus funciones en el transporte e intercambio de lípidos con los tejidos, y con la formación del vitelo.

## **RESULTADOS:**

### **# Aislamiento y análisis de lipoproteínas**

Mediante la técnica de ultracentrifugación en gradiente de densidad, descrita en materiales y métodos, fueron aisladas las fracciones lipoproteicas HDL 1 (densidad de hidratación 1.13 g/ml) y HDL 2, (densidad de hidratación 1.18 g/ml). La composición de lípidos, determinada por TLC-FID, fue similar a la mostrada en el capítulo 1. La clase de lípidos predominante en ambas lipoproteínas es la fosfatidilcolina, aunque con mayor concentración en HDL 1. Los porcentajes de fosfatidiletanolamina, triacilglicéridos, colesterol y ácidos grasos libres no muestran grandes diferencias. Es especialmente notable una concentración relativamente alta de esfingomielina en HDL 2 y su ausencia en HDL 1. La relación lípido/proteína de las dos lipoproteínas es acorde con sus densidades, no observándose una diferencia importante entre ambas.

### **#Anisotropía de fluorescencia en estado estacionario**

Con el objetivo de determinar en qué medida el FS afecta la anisotropía de fluorescencia en estado estacionario ( $r_s$ ), concentraciones crecientes de insecticida fueron adicionadas a alícuotas de HDL 1 y HDL 2 purificadas (Figura 3.1 y 3.2 respectivamente). El FS incrementó los valores de  $r_s$  en todo el rango de temperatura ensayado. Pudo observarse este efecto en las regiones internas más hidrofóbicas de las lipoproteínas detectadas por la depolarización de fluorescencia del DPH (Figura 3.1 A y 3.2 A); como así también en las zonas más externas detectadas por el DPH-PA (Figuras 3.1 B y 3.2 B).

## # Medidas dinámicas de fluorescencia

Las medidas dinámicas de fluorescencia brindan información sobre la fluidez ( $\tau_r$ ) y el orden ( $r_\infty$ ) de los lípidos en diferentes sistemas binarios lípido-proteína.

Para poder calcular el tiempo de correlación rotacional ( $\tau_r$ ) y la anisotropía límite ( $r_\infty$ ) (como se indica en materiales y métodos), primero se tuvieron que realizar las determinaciones de los tiempos de vida media por fase ( $\tau_p$ ) y modulación ( $\tau_m$ ) tanto del DPH como del DPH-PA, en las lipoproteínas tratadas y no tratadas con FS, como así también la diferencia de polarización de fase ( $\Delta$ ). Los resultados de estas medidas para la HDL 1 y HDL 2 son mostrados en las figuras 3.3 y 3.4.

Para ambas sondas el tiempo de vida media medido por modulación ( $\tau_m$ ) fue algo mayor que el medido por fase ( $\tau_p$ ), determinando una pequeña heterogeneidad en la población del fluoróforo. Se puede considerar que los valores de ( $\tau_r$ ) y de ( $r_\infty$ ) obtenidos son relativamente independientes de la frecuencia, indicando que ellos son, en promedio, valores esencialmente correctos de las diferentes poblaciones de rotámetros.

Además, los tiempos de vida media de los fluoróforos empleados, resueltos por modulación o por fase, fueron medidos a dos frecuencias: 18 MHz y 30 MHz. Se obtuvieron valores similares en ambas frecuencias, lo cual indica que en el sistema ensayado pudo ser detectado sólo una población del fluoróforo; por lo tanto en las figuras sólo se mostraron los valores obtenidos por medidas a 18 MHz.

Se pudo evidenciar un acortamiento del tiempo de vida media medido por fase y por modulación de los fluoróforos DPH (Figura 3.3.A) y DPH-PA (Figura 3.3.B) incorporados en la HDL 1, cuando esta fue tratada con diferentes concentraciones del fenitrotión tanto a 10 como a 30 °C. El  $\tau_r$  del DPH y del DPH-PA no se vieron afectados por la incorporación de FS, sugiriendo que su efecto es independiente de la movilidad de los lípidos. Por otro lado, los aumentos observados en los valores de anisotropía en estado estacionario y en la anisotropía límite al incorporarse distintas

concentraciones del tóxico y a ambas temperaturas, indican un aumento en el orden de los lípidos causado por la presencia de FS.

A diferencia de lo que ocurre en HDL 1, el efecto de la incorporación del FS en la HDL 2, se evidencia con una disminución significativa del  $\tau_r$  al adicionarse el tóxico, a ambas temperaturas en el DPH (Figura 3.4 A) y solo a 30 °C en el DPH-PA (Figura 3.4 B). En cuanto a los demás parámetros de fluorescencia medidos en la lipoproteína HDL 2, se comprobó que la incorporación de FS tuvo un efecto significativo usando ambos fluoróforos y a ambas temperaturas de ensayo.

#### # Capacidad de la HDL 1 para ligar ácido palmítico

En presencia de ácido palmítico marcado radiactivamente con  $^{14}\text{C}$ , la única fracción radiactiva detectada en la hemolinfa de animales no vitelogénicos correspondió a la HDL 1 (Capítulo 2). Los tiempos de retención en HPLC y la realización de electroforesis en geles de poliacrilamida corroboraron la identidad de la lipoproteína. Cuando se expuso la lipoproteína purificada a 20 y 40 ppm de FS, el pegado del ácido palmítico disminuyó entre 1.6 a 12.6 veces, siendo el porcentaje de la radiactividad entre un 64 y 9 % comparado con el control, respectivamente. Esto indica que el FS está interfiriendo con el pegado del ácido palmítico a la HDL 1, y que esta interferencia es mayor cuanto mayor es la concentración de FS en el medio.

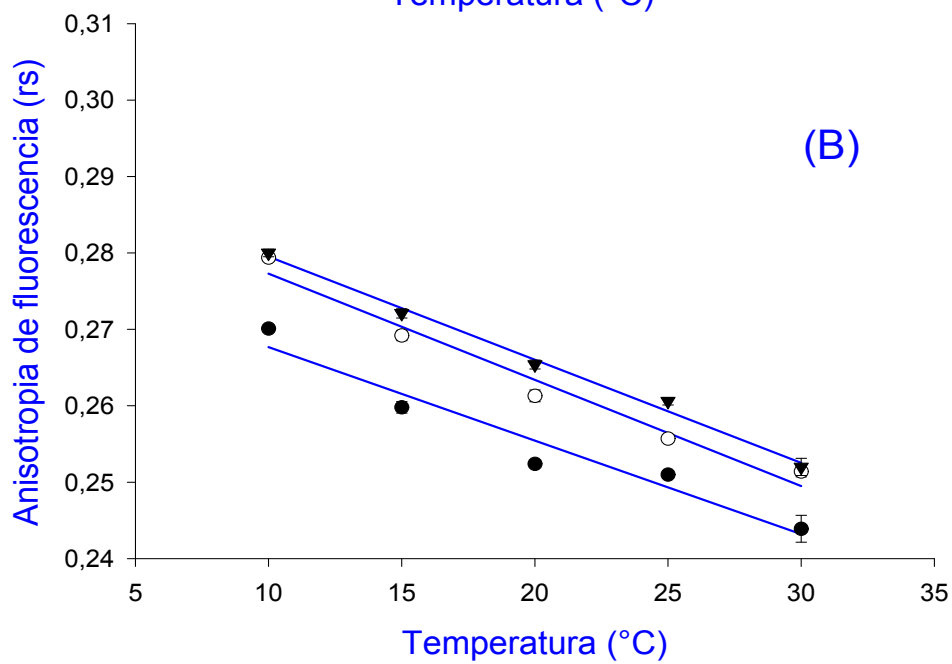
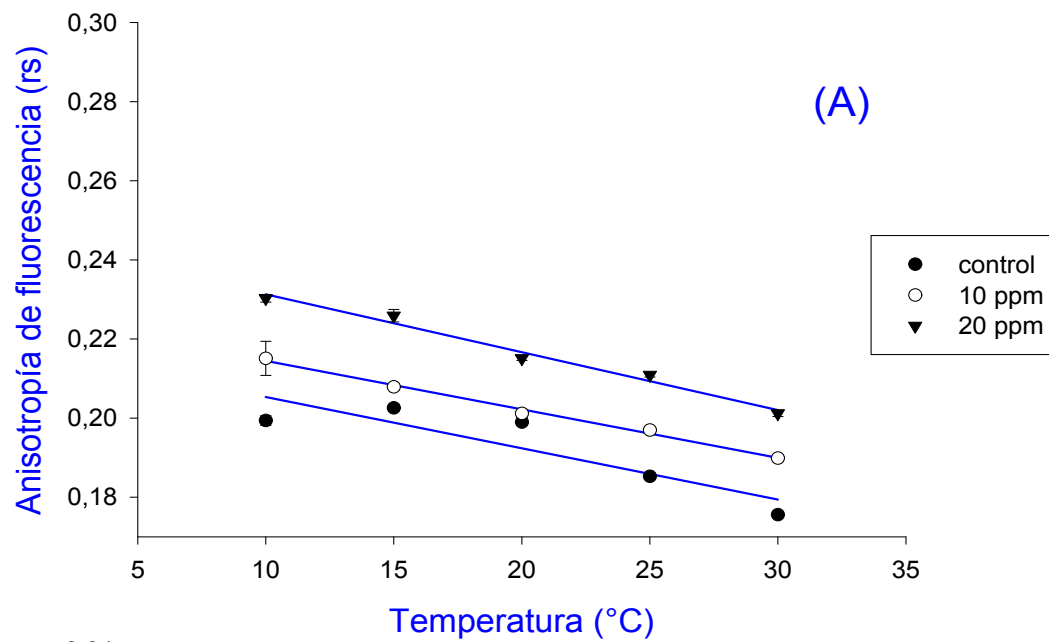


Figura 3.1: Anisotropía de fluorescencia del DPH (A) y DPH-PA (B) medida en la **HDL 1** en función de la temperatura, en ausencia y presencia de 10 y 20 ppm de FS.

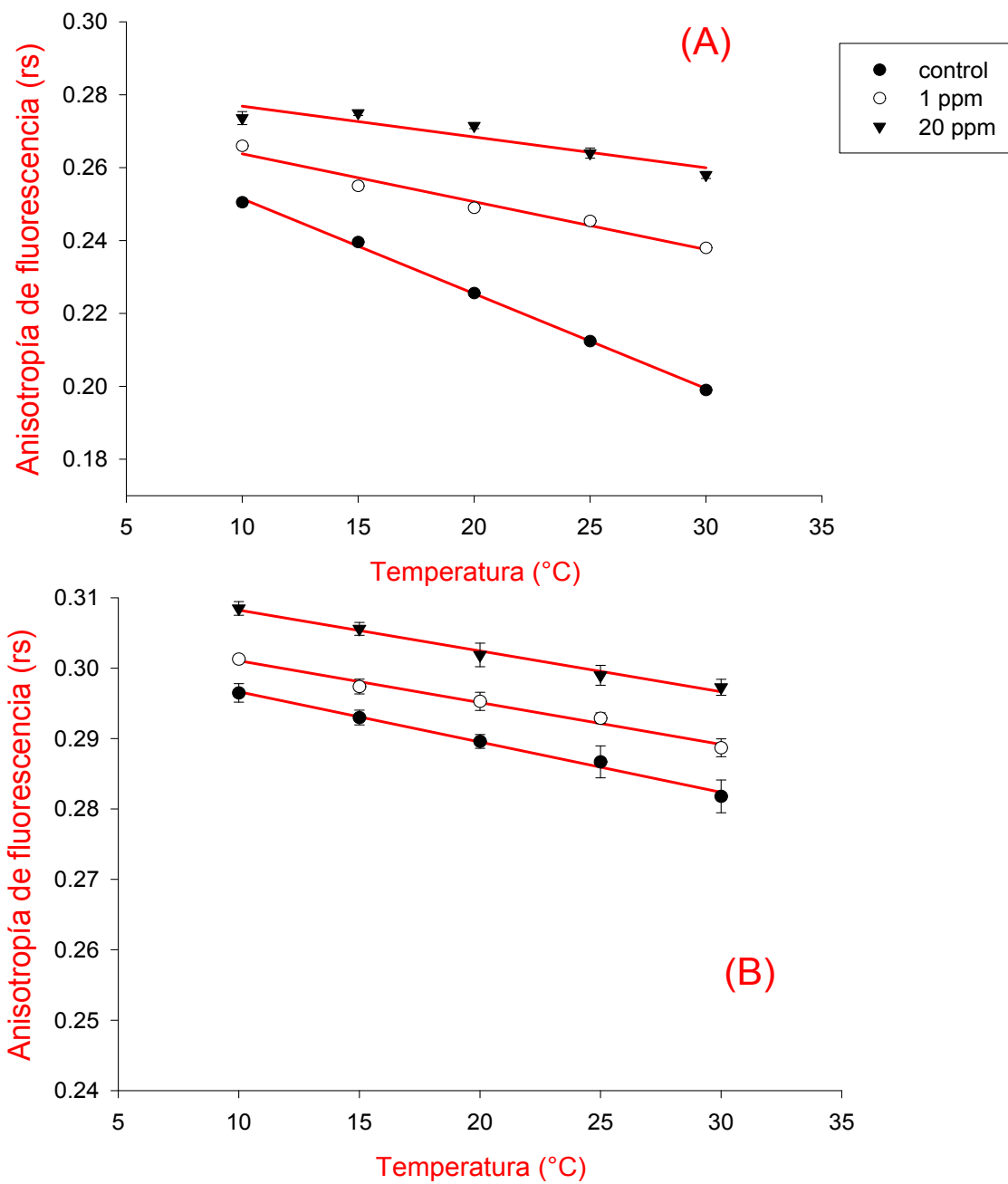


Figura 3.2: Anisotropía de fluorescencia del DPH (A) y DPH-PA (B) medida en la **HDL 2** en función de la temperatura, en ausencia y presencia de 10 y 20 ppm de FS.

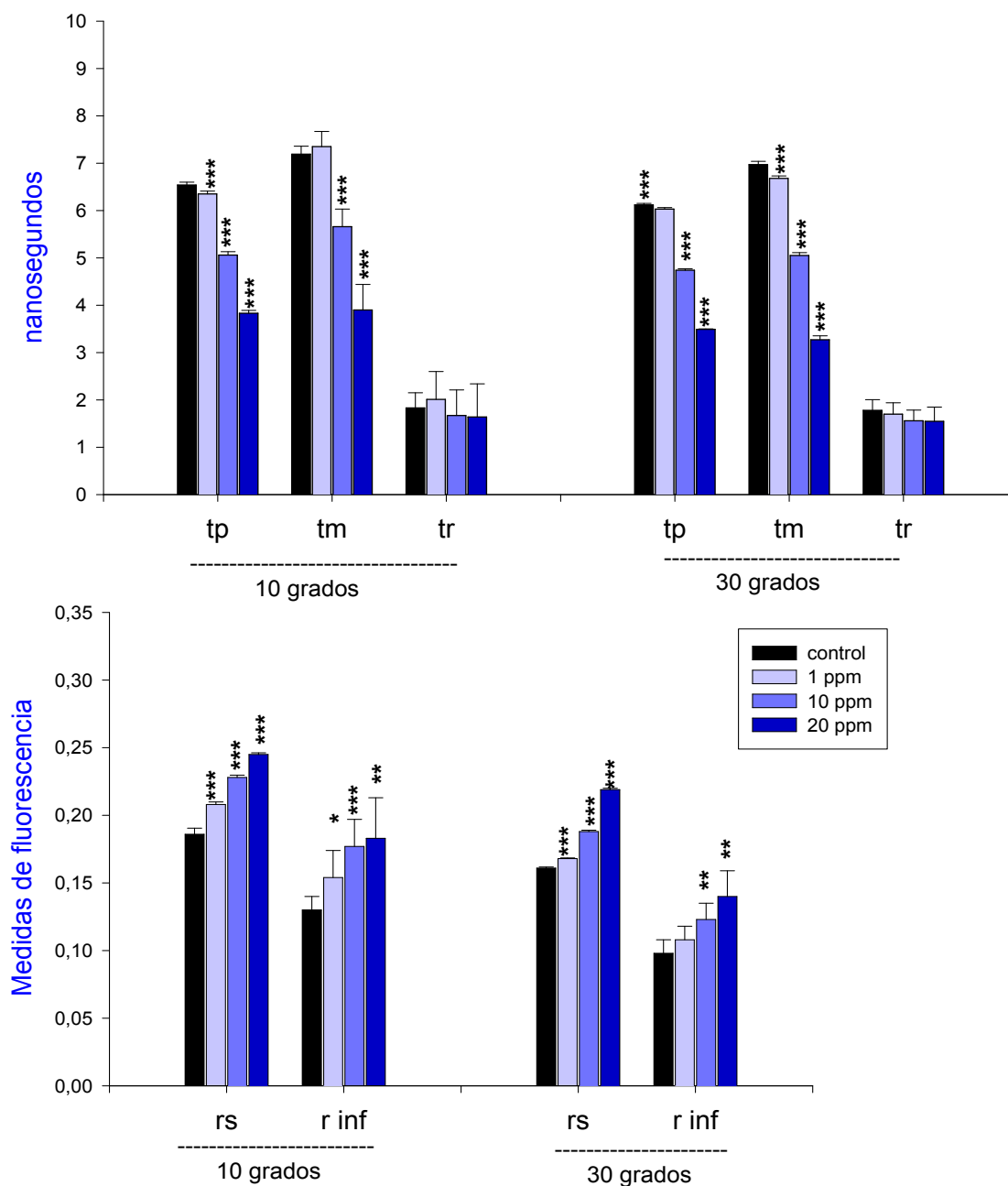


Figura 3.3 A: Anisotropía de fluorescencia en estado estacionario (rs), tiempos de vida media resueltos por fase (tp) y por modulación (tm); tiempo de correlación rotacional (tr) y anisotropía límite (r inf) de fluorescencia del **DPH**, medidos en ausencia y presencia de 1, 10 y 20 ppm de FS, a 10 y 30 °C en **HDL 1** de *Macrobrachium borellii*. El valor de P fue calculado por el test t de Student comparando muestras con y sin FS, obteniéndose los siguientes valores: \*\*\*<0.0001, \*\*<0.001, \*<0.01.



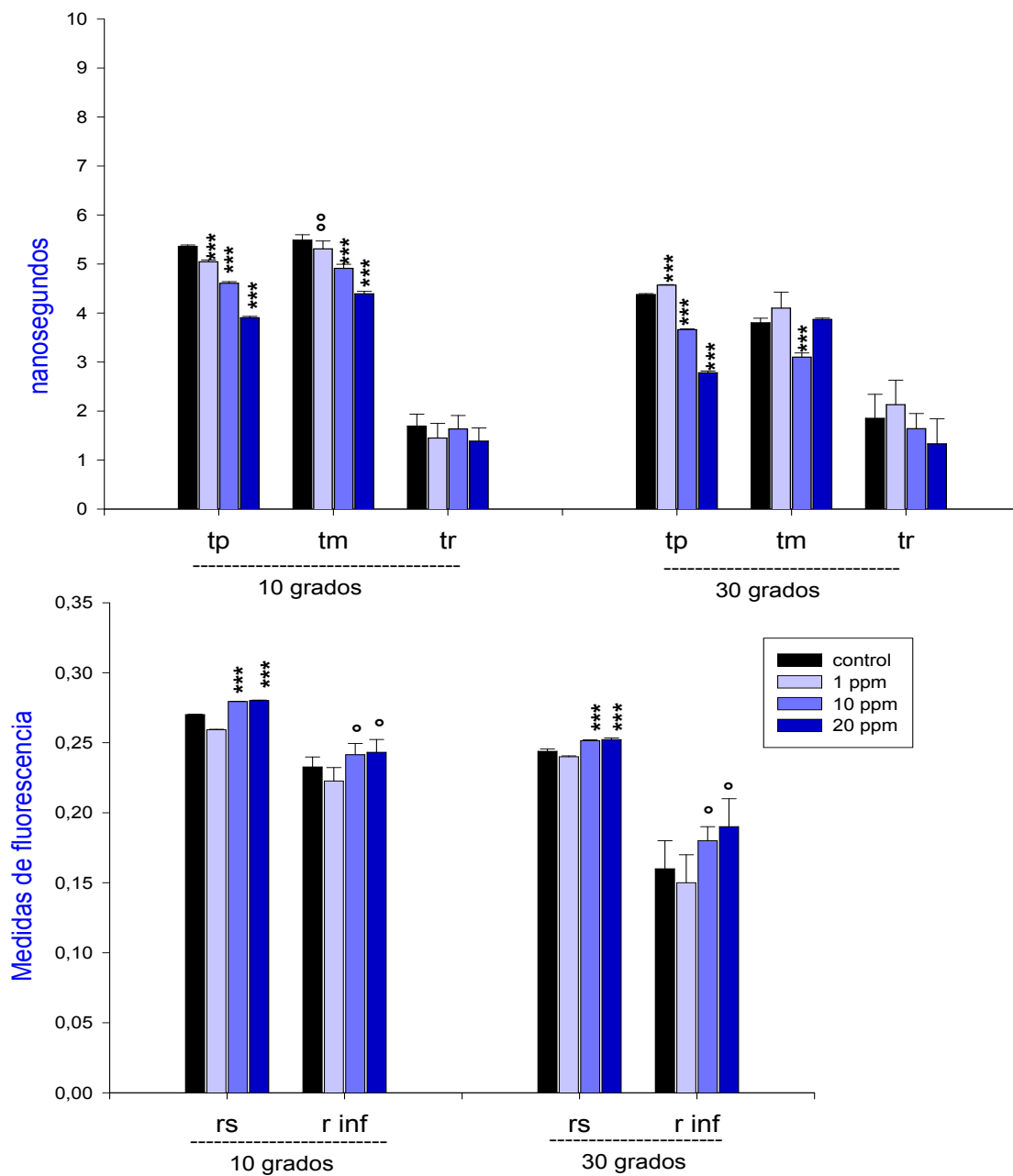


Figura 3.3 B: Anisotropía de fluorescencia en estado estacionario (rs), tiempos de vida media resueltos por fase (tp) y por modulación (tm); tiempo de correlación rotacional (tr) y anisotropía límite (r inf) de fluorescencia del **DPH-PA**, medidos en ausencia y presencia de 1, 10 y 20 ppm de FS, a 10 y 30 °C en **HDL 1** de *Macrobrachium borellii*. El valor de P fue calculado por el test t de Student comparando muestras con y sin FS, obteniéndose los siguientes valores: \*\*\*<0.0001, **oo**<0.05, **o**<0.06.

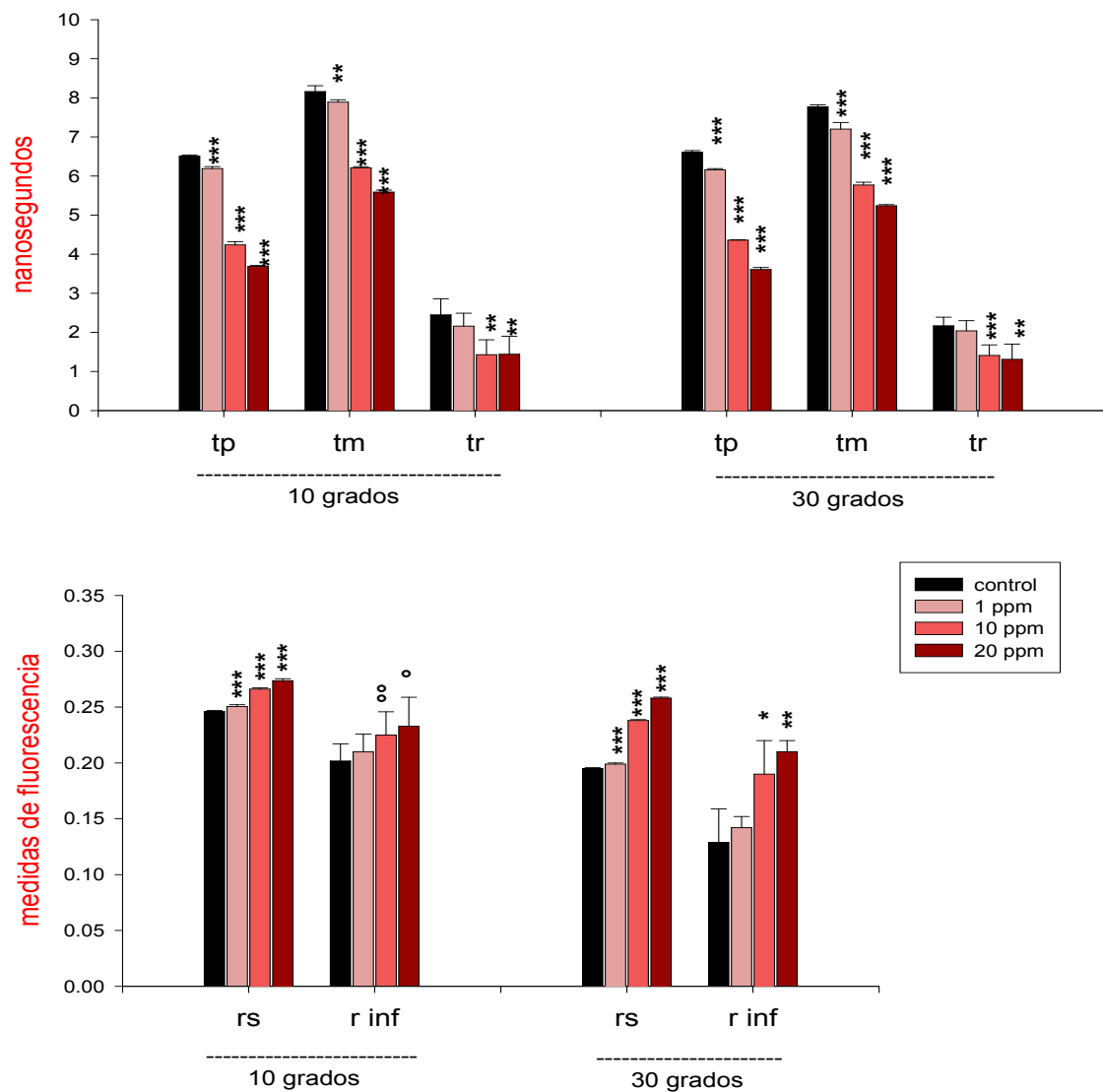


Figura 3.4 A: Anisotropía de fluorescencia en estado estacionario (rs), tiempos de vida media resueltos por fase (tp) y por modulación (tm); tiempo de correlación rotacional (tr) y anisotropía límite (r inf) de fluorescencia del **DPH**, medidos en ausencia y presencia de 1, 10 y 20 ppm de FS, a 10 y 30 °C en **HDL 2** de *Macrobrachium borellii*. El valor de P fue calculado por el test t de Student comparando muestras con y sin FS, obteniéndose los siguientes valores: \*\*\*<0.0001, \*\*<0.001, \*<0.01, oo<0.05, o<0.06.

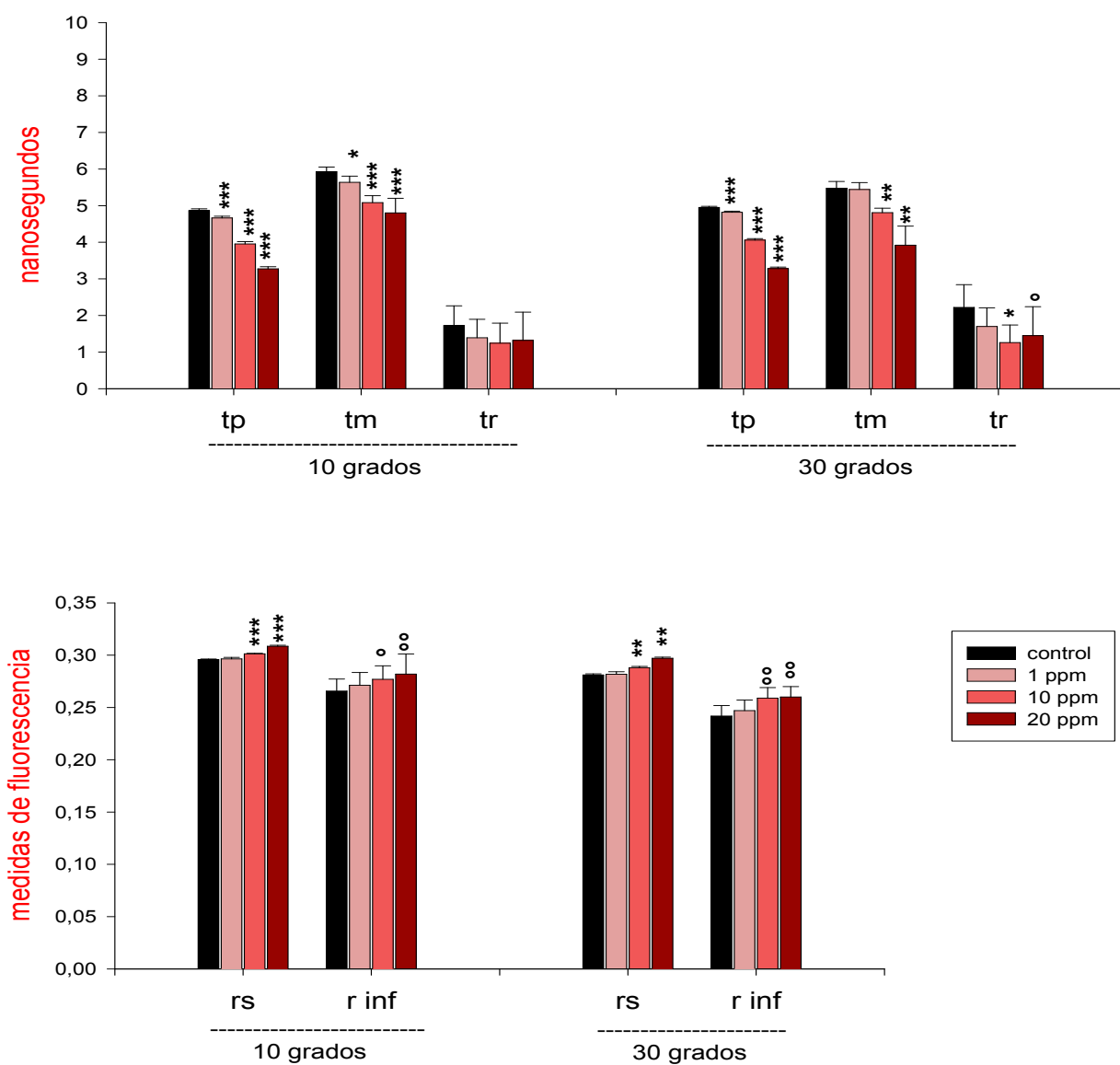


Figura 3.4 B: Anisotropía de fluorescencia en estado estacionario (rs), tiempos de vida media resueltos por fase (tp) y por modulación (tm); tiempo de correlación rotacional (tr) y anisotropía límite (r inf) de fluorescencia del **DPH-PA**, medidos en ausencia y presencia de 1, 10 y 20 ppm de FS, a 10 y 30 °C en **HDL 2** de *Macrobrachium borellii*. El valor de P fue calculado por el test t de Student comparando muestras con y sin FS y entre las diferentes concentraciones, obteniéndose los siguientes valores: \*\*\*<math><0.0001</math>, \*\*<math><0.001</math>, \*<math><0.01</math>, <sup>oo</sup><math><0.05</math>, <sup>o</sup><math><0.06</math>.

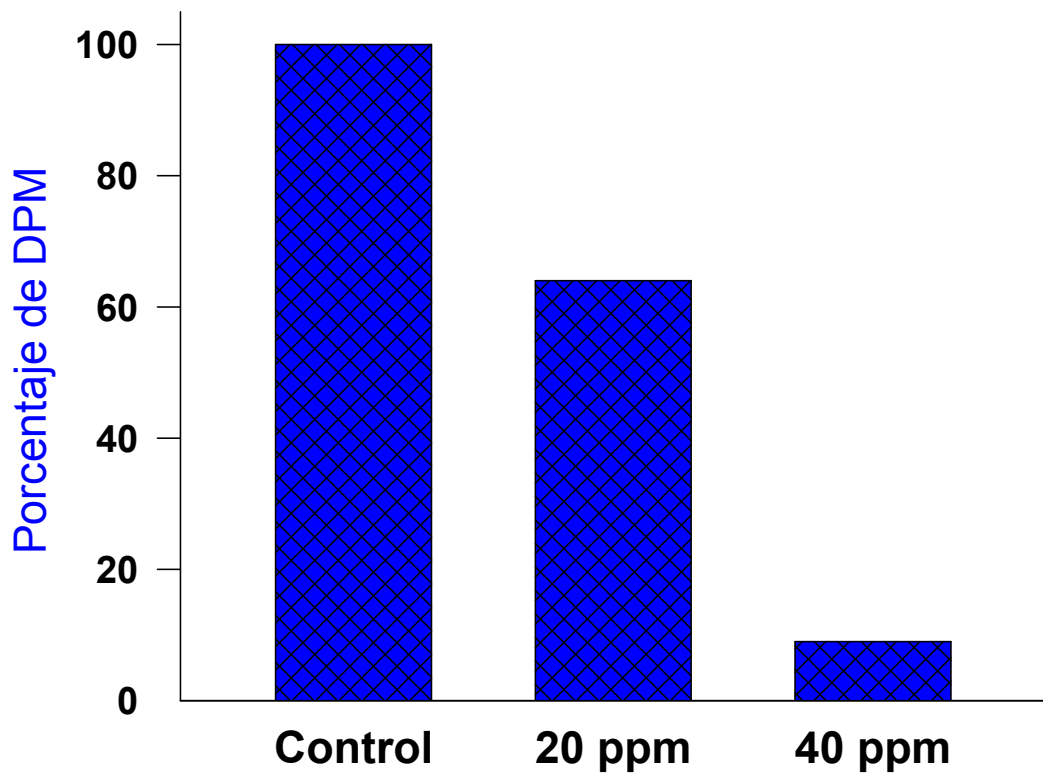


Figura 3.5: Disminución de la capacidad de pegado del ácido palmítico de la HDL 1 causado por el FS. La capacidad de unión "binding" del ácido palmítico de la hemolinfa total de *M. borellii* fue ensayada en presencia de 0, 10, 20 ppm de FS. La **HDL 1** fue purificada por HPLC y la radiactividad cuantificada por conteo de centelleo líquido. Los resultados son representativos de más de tres experimentos independientes. El coeficiente de variación fue menor a un 10%.

## **DISCUSION:**

Sobre la base de los resultados obtenidos por los métodos de fluorescencia empleados, fue posible detectar un aumento en los valores de  $r_s$  y de  $r_\infty$  provocado por la adición de fenitrotión sobre las lipoproteínas evidenciando un incremento en la rigidez de la porción lipídica de éstas. El hecho de observarse esta alteración con ambos fluoróforos, indica que el FS modifica la dinámica de los lípidos tanto en el interior hidrofóbico como de las zonas más externas de estas lipoproteínas. El  $r_s$  es un parámetro que depende del  $\tau_r$ ,  $\tau_m$  y  $r_\infty$  (como fue determinado en materiales y métodos). En la HDL 1 el incremento del valor de  $r_s$ , está influenciado por el aumento del  $r_\infty$  y la disminución de los tiempos de vida media; mientras que en la HDL 2 (con DPH a 10 y 30 °C y con DPH-PA sólo a 30 °C), no sólo depende de los parámetros anteriores sino también de la disminución del tiempo de correlación rotacional. Sin embargo, los valores de  $r_s$  observados en el interior de HDL 2 son mayores que en la misma zona de HDL 1, hecho que podría atribuirse a la diferente composición lipídica de ambas lipoproteínas. La principal diferencia de composición radica en la presencia de una importante cantidad de esfingomiélinina en HDL 2, la esfingomiélinina ejerce un efecto rigidizante ya descrito en membranas (Barenholz, 1984), monocapas de fosfolípidos (Lund-Katz *et al.*, 1988), liposomas (Sommer *et al.*, 1992) y en una lipoproteína humana (Lottin *et al.*, 1996). Esto explicaría los valores mayores de  $r_s$  hallados en la HDL 2, tanto en presencia como en ausencia de FS. De cualquier modo, la esfingomiélinina aparentemente no impide que el FS penetre al interior más hidrofóbico de esta lipoproteína y ocasione mayor efecto a 30°C, temperatura a la cual los lípidos son más móviles.

Algunas de las alteraciones observadas en las membranas por acción de plaguicidas organofosforados han sido relacionadas con el contenido de colesterol de esas membranas (Antunes-Madeira *et al.*, 1994). Así, altas concentraciones de colesterol impiden el ingreso del pesticida a la membrana. Si bien el contenido de colesterol en ambas lipoproteínas de *M. borellii* es relativamente alto, el colesterol parece no impedir totalmente la inserción del FS entre los lípidos. Por lo tanto, al estudiar en forma

comparada entre estos dos sistemas lipoproteicos con similar contenido de colesterol puede descartarse como un factor distorsionante el mencionado efecto minimizante de los cambios de fluidez en los lípidos ejercido por el colesterol.

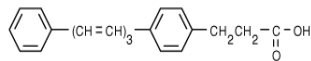
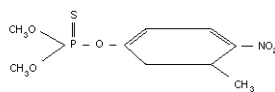
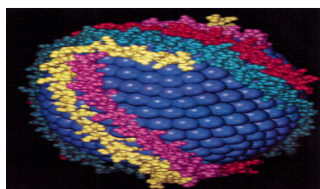
Cuando insecticidas piretroides interactúan con bicapas de fosfolípidos liposomales, se produce una disminución en el orden de los lípidos; lo cual resulta en un acortamiento del tiempo de vida media del fluoróforo (Stelzer y Gordon, 1985). En nuestro caso, por el contrario, los resultados muestran que por efecto del FS existe una disminución en el tiempo de vida media del DPH con un mayor ordenamiento de los lípidos. Es improbable que tal disminución se deba a un quenching directo de la fluorescencia del fluoróforo por efecto del FS, ya que en estudios previos se demostró que la intensidad de fluorescencia y el tiempo de vida media del DPH no eran afectados por un gran exceso de FS en solución etanólica (González Baró *et al.*, 1997). Esto refuerza la idea de que los cambios observados son una consecuencia de alteraciones en la estructura de la lipoproteína, provocadas por el FS. Es probable que los acortamientos en los tiempos de vida media se deban al mismo efecto observado en membranas microsomales de hepatopáncreas de *M. borellii* (González Baró *et al.*, 1997), o en liposomas de dipalmitoil (DPPC) y 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina (POPC) (González-Baró *et al.*, 2000b). En ambos casos las disminuciones en los valores de  $\tau_p$  y  $\tau_m$  fueron atribuidos a fallas en el empaquetamiento de los lípidos provocadas por el FS, que permitirían la penetración de agua en el sistema. Dado que la intensidad de fluorescencia del DPH es sensible a la polaridad del medio, un aumento en la polaridad disminuiría el tiempo de vida media del fluoróforo. Un hecho similar podría estar ocurriendo en estas lipoproteínas, de ahí que la acción rigidizante del FS sea más evidente en el interior más hidrofóbico de ambas lipoproteínas que en las zonas más externas, que están normalmente expuestas a la fase acuosa.

Finalmente, los resultados obtenidos en este capítulo indican que el FS puede ingresar en las lipoproteínas circulantes de *M. borellii*, disminuir su fluidez incrementando el orden de la fase lipídica, y producir defectos en el empaquetamiento, afectando su estructura y función. En la HDL 1, (principal

lipoproteína hemolinfática de *M. borellii*) se observó una disminución en el pegado del ácido palmítico, implicando que las características estructurales de las lipoproteínas son esenciales para la capacidad de pegado de ácidos grasos. Esto último podría considerarse en dos aspectos relacionados con la fisiología y toxicología de estos artrópodos. Por una parte, implicaría que la presencia del plaguicida pueda alterar el normal intercambio de lípidos entre las lipoproteínas y los tejidos; y por otro lado, que las lipoproteínas hemolinfáticas tengan capacidad para ser un vehículo para el transporte y distribución del tóxico en los diferentes tejidos.

## CAPÍTULO 4

### ***EFFECTO DEL FENITROTIÓN SOBRE PROPIEDADES FÍSICAS Y FUNCIONALES DE LA LIPOPROTEÍNA VITELÍNICA EN DIFERENTES ESTADOS DE DESARROLLO EMBRIONARIO.***





## INTRODUCCIÓN:

Durante el desarrollo embrionario de las especies ovígeras la fuente principal de recursos metabólicos y nutricionales para el embrión, está representada por los lípidos, seguidos de las proteínas. Ambos forman parte de las lipovitelinas, que son la principal reserva energética y de carbonos en el vitelo. Se han estudiado anteriormente las variaciones en la composición del vitelo durante la embriogénesis de *M. borellii*, y reportado que el embrión consume tanto las apoproteínas como los lípidos, aunque estos últimos selectivamente (Heras *et al.*, 2000). La acumulación de lipovitelinas durante el desarrollo del oocito en estas especies resulta vital para la viabilidad de la progenie. Las lipovitelinas en muchos crustáceos pueden estar expuestas a diferentes xenobioticos como son los insecticidas, posiblemente por dos vías, por exposición directa agua-huevo, o por intermedio de una vitelogenina, lipoproteína plasmática exclusiva de hembras que es endocitada por el ovario y genera la lipovitelina (Okuna *et al.*, 2002). Hemos demostrado en el Capítulo 3 que la vitelogenina de *M. borellii* no sólo es afectada estructuralmente cuando es expuesta al FS, sino que puede ser un medio de transporte del FS hacia diferentes órganos. El conjunto de variables en las composiciones y estructuras de esas lipoproteínas plasmáticas estudiadas en el capítulo anterior generaron algunas dificultades para la interpretación de los resultados del estudio de la interacción FS-lípidos. Surgió entonces la necesidad de utilizar modelos más simples, con menor número de variables. Así, hemos aislado de huevos del crustáceo *Macrobrachium borellii* tres formas de la única lipovitelina presente en el vitelo, en estadios tempranos (LV 1), intermedios (LV 2) y tardíos (LV 3). Se utilizaron en este trabajo solo las LV 1 y LV 3, dado que difieren significativamente en su composición lipídica siendo la LV 2 un estado intermedio entre LV 1 y LV 3 (caracterizadas en el Capítulo 1). En el vitelo se generan así, naturalmente, formas de una misma lipoproteína con idénticas composiciones apoproteicas y relaciones lípido/proteína, pero con distintas composiciones lipídicas. Estos fueron los modelos usados para estudiar nuevamente el efecto que ejerce el fenitrotión (FS), pero esta vez sobre formas lipoproteicas que difieren sólo en la composición de los lípidos. Para conocer el posible efecto de las proteínas sobre la interacción FS-lipoproteína, se aislaron los lípidos de ambas LV y se prepararon liposomas, generándose así modelos adicionales que prescinden totalmente de la influencia de la porción proteica, llamados LP 1 y LP 3, respectivamente. El efecto

del FS sobre la dinámica de los lípidos de estos cuatro modelos (LV 1, LV 3, LP 1 y LP 3) fue estudiado mediante medidas estáticas y dinámicas de polarización de fluorescencia. Por otro lado también fue evaluado *in vitro* cómo afecta dicho tóxico la función biológica de las LVs, midiendo la liberación de una clase de ácido graso libre, desde las lipovitelininas a una proteína aceptora. El presente estudio pretende determinar y correlacionar las posibles modificaciones estructurales causadas por el FS, con alteraciones funcionales que pueden afectar en distinto grado su importante rol de nutrir al embrión.

## *RESULTADOS:*

### # Caracterización de los sistemas lipoproteicos y lipídicos empleados

Las LVs fueron aisladas del citosol de huevos en diferentes estadios de desarrollo embrionario mediante untracentrifugación en gradiente de densidad. La forma de caracterización de estos sistemas, tanto de las partes lipídicas como proteicas, fue descrita en el capítulo 1. Los liposomas preparados con los lípidos extraídos de ambas formas de LV, analizados por TLC-FID, no mostraron variaciones en su composición lipídica con respecto a sus lipoproteínas de origen. Se corroboró que el lípido más abundante en la LV 1 y LP 1 es la fosfatidilcolina, seguido de otros fosfolípidos y triacilglicéridos. Cuando se analizó la forma LV 3 se observó una importante disminución porcentual especialmente de fosfatidilcolina, a lo largo del desarrollo y concomitantemente un relativo aumento de ácido graso libre, colesterol y esfingomielina. Comparando las composiciones en ácidos grasos de las formas lipovitelinicas LV 1 y LV 3, se comprobó en la LV 3 una disminución del ácido palmítico (16:0), y un aumento relativo de los porcentajes de ácidos grasos insaturados de 20 C (20:4 n-6 y 20:5 n-3).

Las relaciones lípido/proteína de LV 1 y LV 3 fueron similares y acordes con sus densidades.

### # Medidas estáticas de fluorescencia

Se midió la anisotropía de fluorescencia en estado estacionario de LV 1, LP 1, LV 3 y LP 3 para poder evaluar en que medida el FS altera la estructura lipoproteica y lipídica de las LVs y LPs, respectivamente. En la región interna de las LVs sondeada por el DPH (Figuras 4.1 A y 4.2 A) se observó un incremento de los valores del rs generado por la adición de FS, siendo mayor dicho incremento a altas temperaturas. A diferencia de esto, las superficies de ambos sistemas lipoproteicos (sondeadas con DPH-PA), mostraron diferencias (Figuras 4.1 B y 4.2 B). En primer lugar los valores basales en los controles (sin tratar con FS) fueron algo mayores en la LV 1 que en la LV 3. Además se observó un incremento significativo de rs al adicionar sólo 1 ppm de FS a la lipoproteína LV 3. Por último, el incremento de rs a altas concentraciones en la LV 3 fue un 35% superior al incremento observado en la LV 1. En la zona externa de ambas lipoproteínas el efecto del FS mostró menor dependencia con las variaciones de la temperatura del ensayo. Con respecto al efecto de la temperatura sobre las estructuras de las LVs controles, ambas lipoproteínas sufrieron en su interior hidrofóbico una disminución de 0.014 unidades de rs por cada 5 °C de temperatura, mientras que en la región externa la disminución fue de sólo 0.006 de rs por cada 5 °C.

Con respecto al efecto del FS sobre liposomas LP 1 y LP 3, se observó que los incrementos de rs ocasionados por el FS eran significativos a mayores concentraciones del insecticida (10 y 20 ppm) en las zonas más internas de los liposomas, sensibles a la depolarización del DPH (Figuras 4.3 y 4.4). En las zonas más externas (sondeadas por el DPH-PA) se observaron cambios similares a los encontrados en las lipoproteínas: a) los valores de rs basales de LP 3 fueron inferiores; b) el efecto de FS a 1 ppm fue altamente significativo sólo en LP 3; y c) a altas concentraciones de FS, el aumento en la rs de LP 3 duplicó al que se produjo en LP 1 en todo el rango de temperaturas ensayado. En estos sistemas lipídicos puros, la temperatura del ensayo parece afectar de forma similar a ambas zonas analizadas, disminuyendo aproximadamente 0.013 unidades de rs por cada 5 °C.

Si bien existe mayor variación en los sistemas lipídicos puros (liposomas) que en los lipoproteicos (lipovitelinas), no se observó ningún cambio de fase en todo el rango de temperatura ensayado. El análisis de los rs controles demostró que si bien los liposomas se comportan en forma similar a los interiores de las LVs, con las

variaciones de temperatura, el efecto general del FS a las diferentes temperaturas fue comparable a los sistemas lipoproteicos que le dieron origen.

### # Medidas dinámicas de fluorescencia

Como fue mencionado anteriormente primero se tuvieron que realizar las determinaciones de los tiempos de vida media tanto del DPH como del DPH-PA, en los diferentes sistemas lipídicos y lipoproteicos tratados y no tratados con FS, como así también la diferencia de polarización de fase ( $\Delta$ ), para luego poder calcular el tiempo de correlación rotacional ( $\tau_r$ ) y la anisotropía límite ( $r_\infty$ ) (como se indica en materiales y métodos),.

Del análisis de los tiempos de vida media de los fluoróforos empleados, resueltos por modulación ( $\tau_M$ ) o por fase ( $\tau_P$ ), a 18 MHz y 30 MHz, se puede considerar (al igual que en el capítulo 3) la detección de solo una población de fluoróforo, mostrando por lo tanto en las figuras, únicamente los valores obtenidos a 18 MHz.

Los valores del tiempo de vida media de los fluoróforos DPH y DPH-PA incorporados dentro de los sistemas lipídicos (LPs) y lipoproteicos (LVs), mostraron una disminución dosis-dependiente con el agregado de concentraciones crecientes de FS. Los resultados del análisis del  $\tau_P$  y  $\tau_M$  fueron similares en ambos casos y por esa razón sólo se muestran los valores de  $\tau_P$  a 10 °C (Figura 4.5) y a 30°C (Figura 4.6). Los tiempos de vida media controles de los liposomas mostraron un patrón similar al de los valores de las lipoproteínas que le dieron origen, siendo mayores los  $\tau$  en el interior de estos sistemas (DPH), que en la zona externa (DPH-PA). El tiempo de correlación rotacional ( $\tau_r$ ) fue también medido en las LPs y LVs, a 10 y a 30 °C. De los cuatro sistemas ensayados sólo se observó afectada significativamente la lipovitelina LV 3, con la adición de altas concentraciones de FS (Figura 4.7). En forma similar, la LV 3 fue el sistema en el cual las medidas de  $r_\infty$  se vieron incrementadas con el agregado del tóxico. Esto ocurrió cuando las concentraciones máximas de FS fueron adicionadas, tanto a 10 como a 30 °C y en las dos regiones analizadas. En los liposomas, la adición del tóxico no provocó cambios significativos en las medidas de  $r_\infty$ .

#### # Aumento de la liberación de ácido graso libre por las lipovitelinas

La Figura 4.8 muestra los porcentajes de ácido palmítico  $^{14}\text{C}$  liberado por las lipovitelinas y captados por la albúmina, en ausencia y presencia de 1 y 20 ppm de FS. El FS adicionado a una concentración de 1 ppm no afectó la liberación del ácido graso libre (AGL) en la LV 1, pero sí produjo en la LV 3 un aumento del 20 % en la liberación de ácido graso respecto al control. Al tratarse las LVs con 20 ppm de FS, se observó que el ácido palmítico liberado y captado por la albúmina se incremento en 170 % y 109 % comparado con el control, en la LV 1 y LV 3, respectivamente.

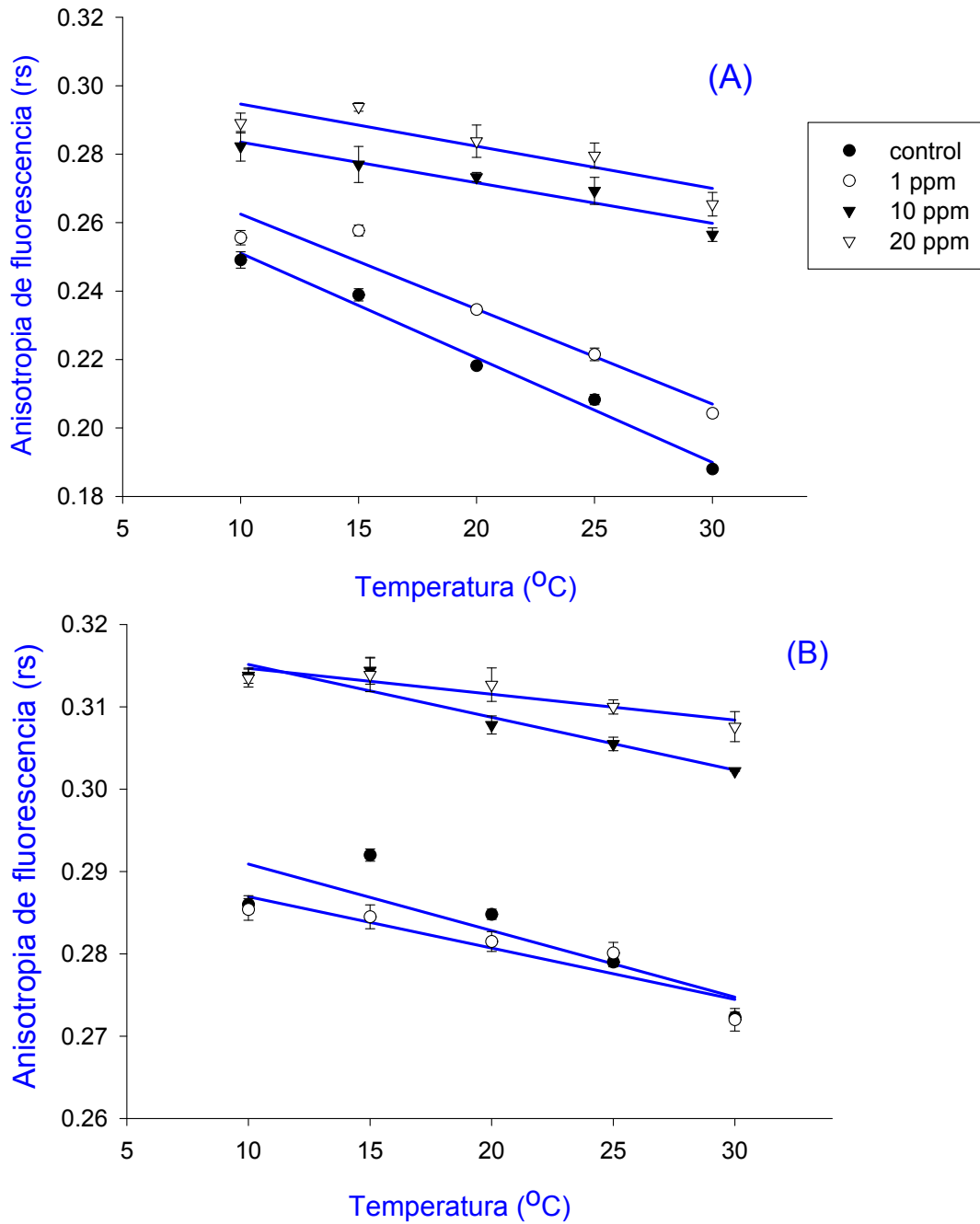


Figura 4.1: Anisotropía de fluorescencia en estado estacionario ( $r_s$ ) del DPH (A) y DPH-PA (B) medida en la **LV 1** en función de la temperatura, en ausencia y presencia de distintas concentraciones de FS.

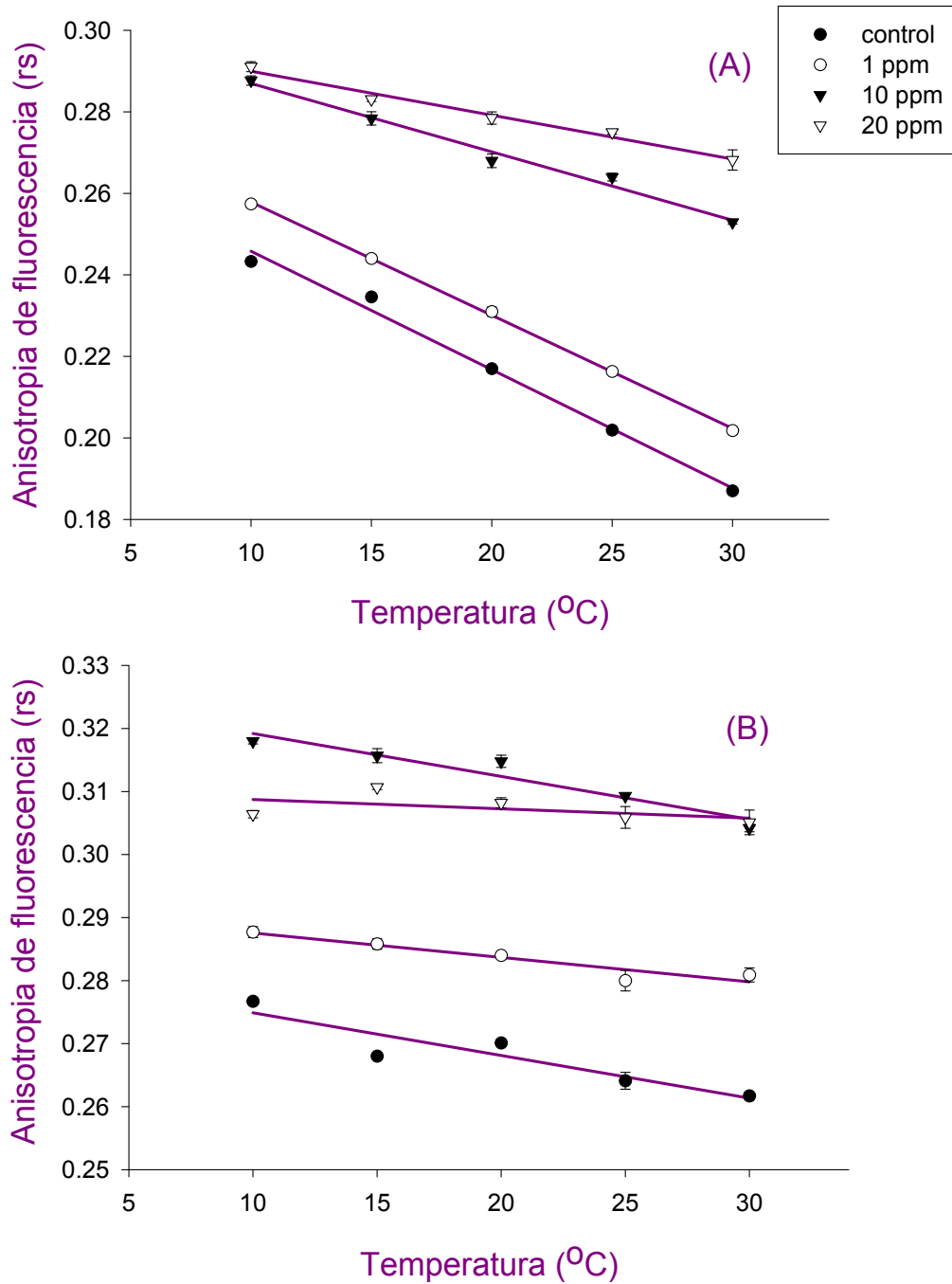


Figura 4.2: Anisotropía de fluorescencia en estado estacionario ( $r_s$ ) del DPH (A) y DPH-PA (B) medida en la **LV 3** en función de la temperatura, en ausencia y presencia de distintas concentraciones de FS.

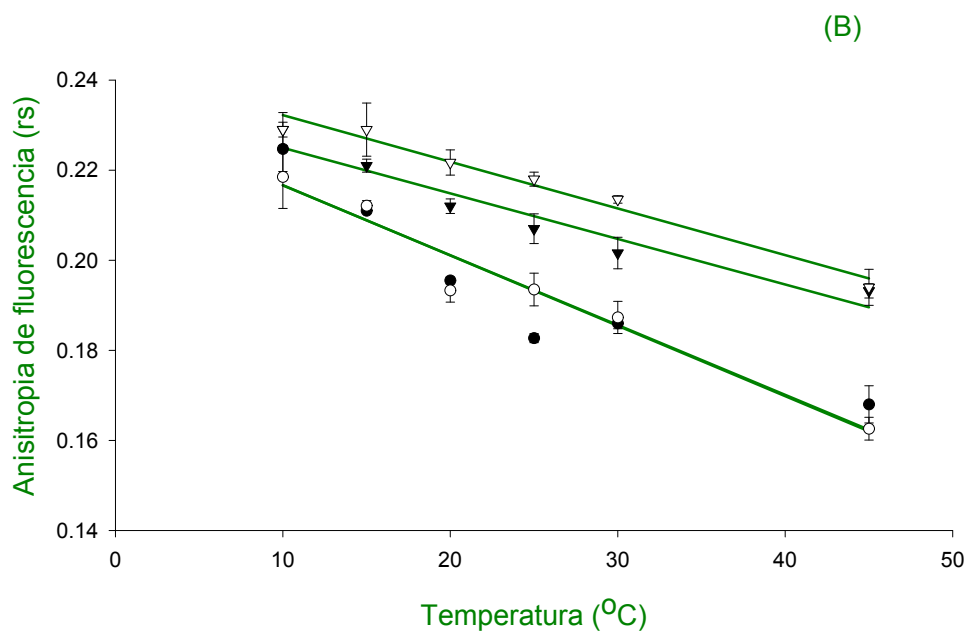
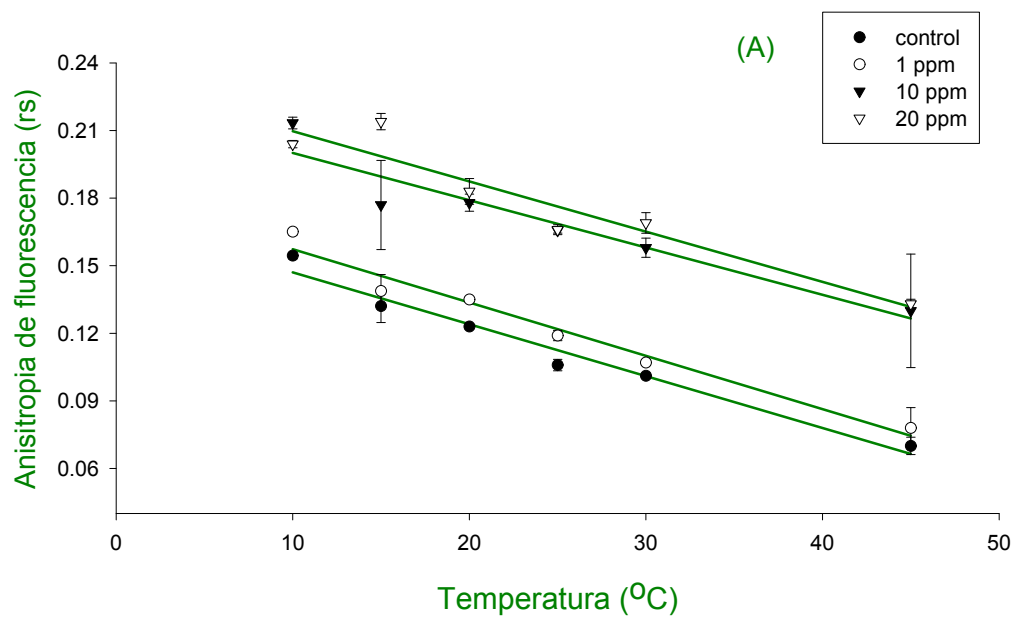


Figura 4.3: Anisotropía de fluorescencia en estado estacionario ( $r_s$ ) del DPH (A) y DPH-PA (B) medida en la **LP 1** en función de la temperatura, en ausencia y presencia de distintas concentraciones de FS.



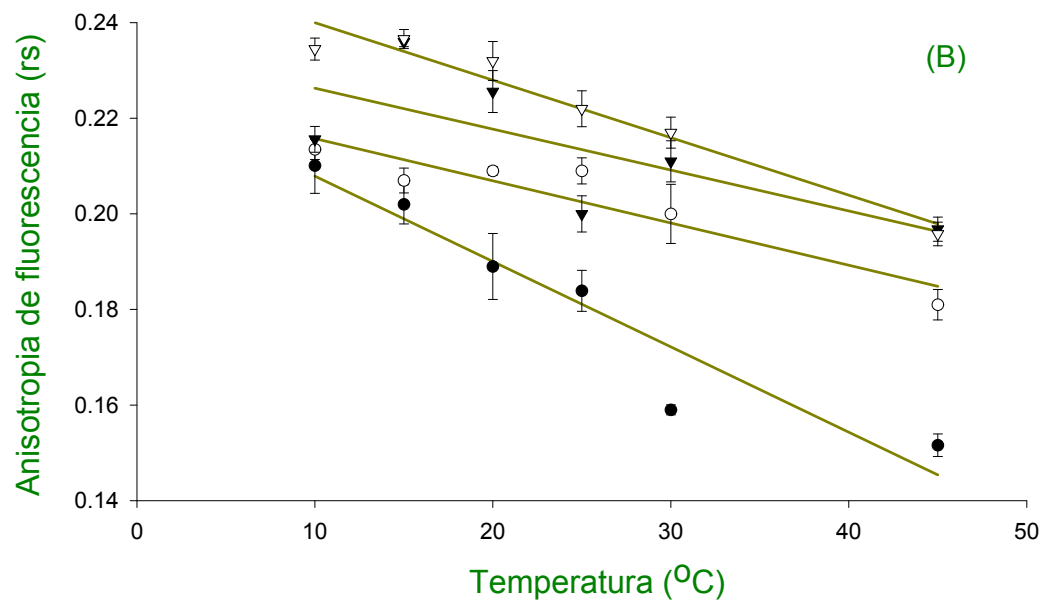
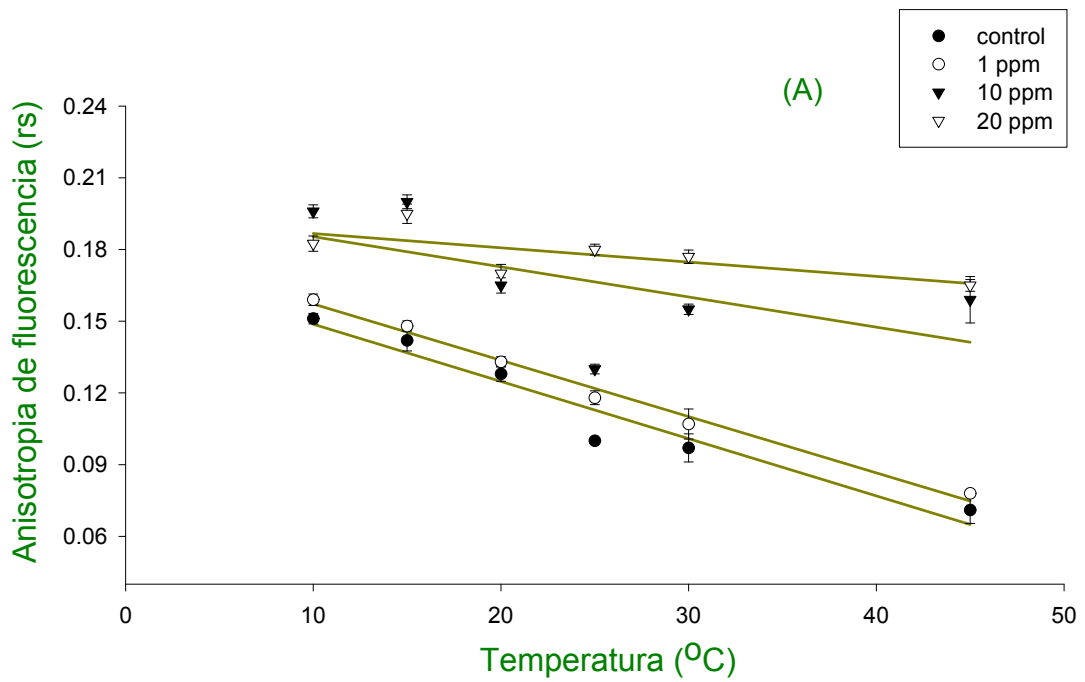


Figura 4.4: Anisotropía de fluorescencia en estado estacionario ( $r_s$ ) del DPH (A) y DPH-PA (B) medida en la **LP 3** en función de la temperatura, en ausencia y presencia de distintas concentraciones de FS.

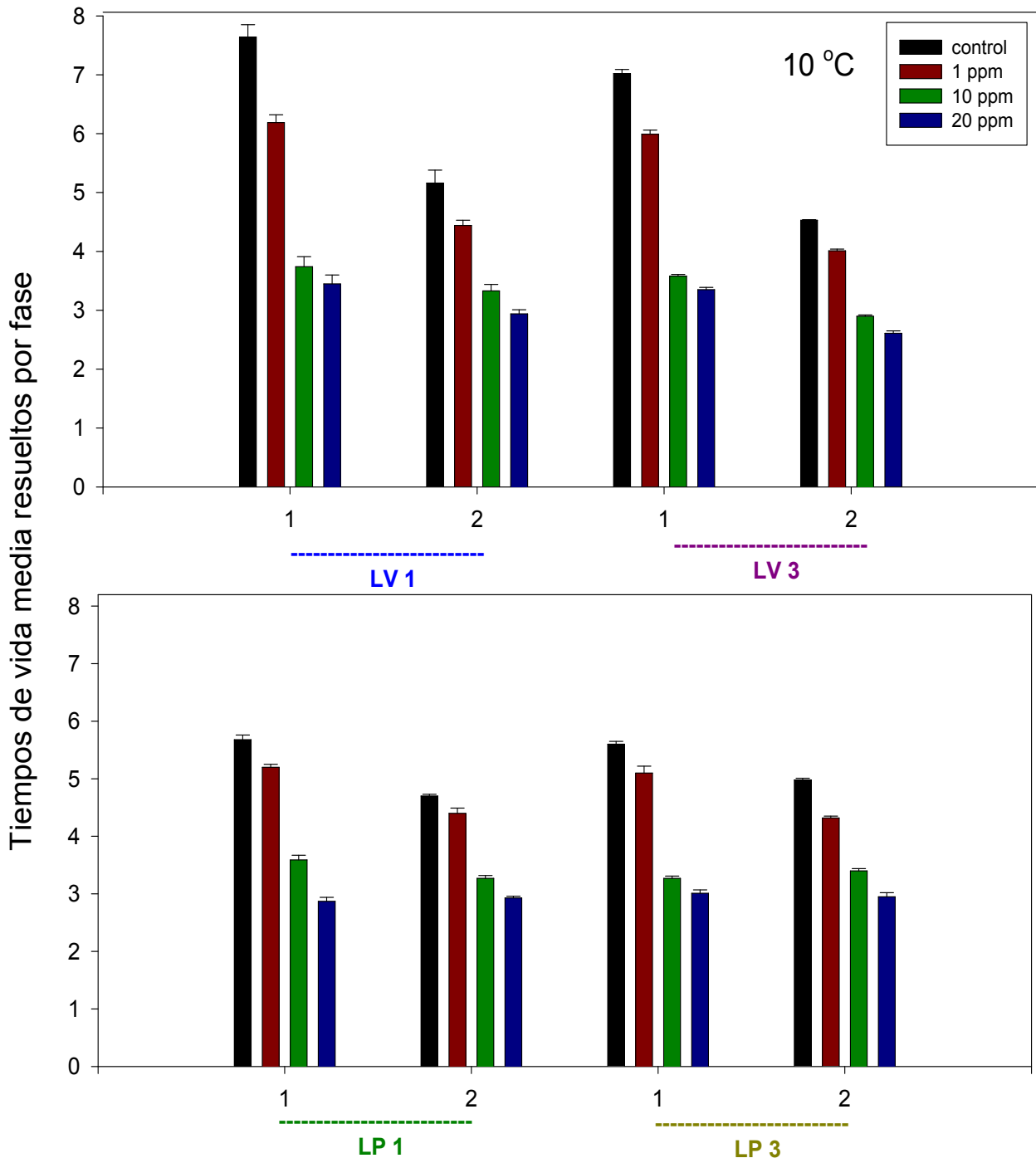


Figura 4.5: Tiempos de vida media resueltos por fase  $\tau_p$  del DPH (1) y DPH-PA (2) medida en la LV 1, LV 3, LP 1 y LP 3 a 10 °C en ausencia y presencia de distintas concentraciones de FS. El valor de P fue calculado por el test t de Student comparando muestras con y sin FS, obteniéndose valores  $<0.0001$ .



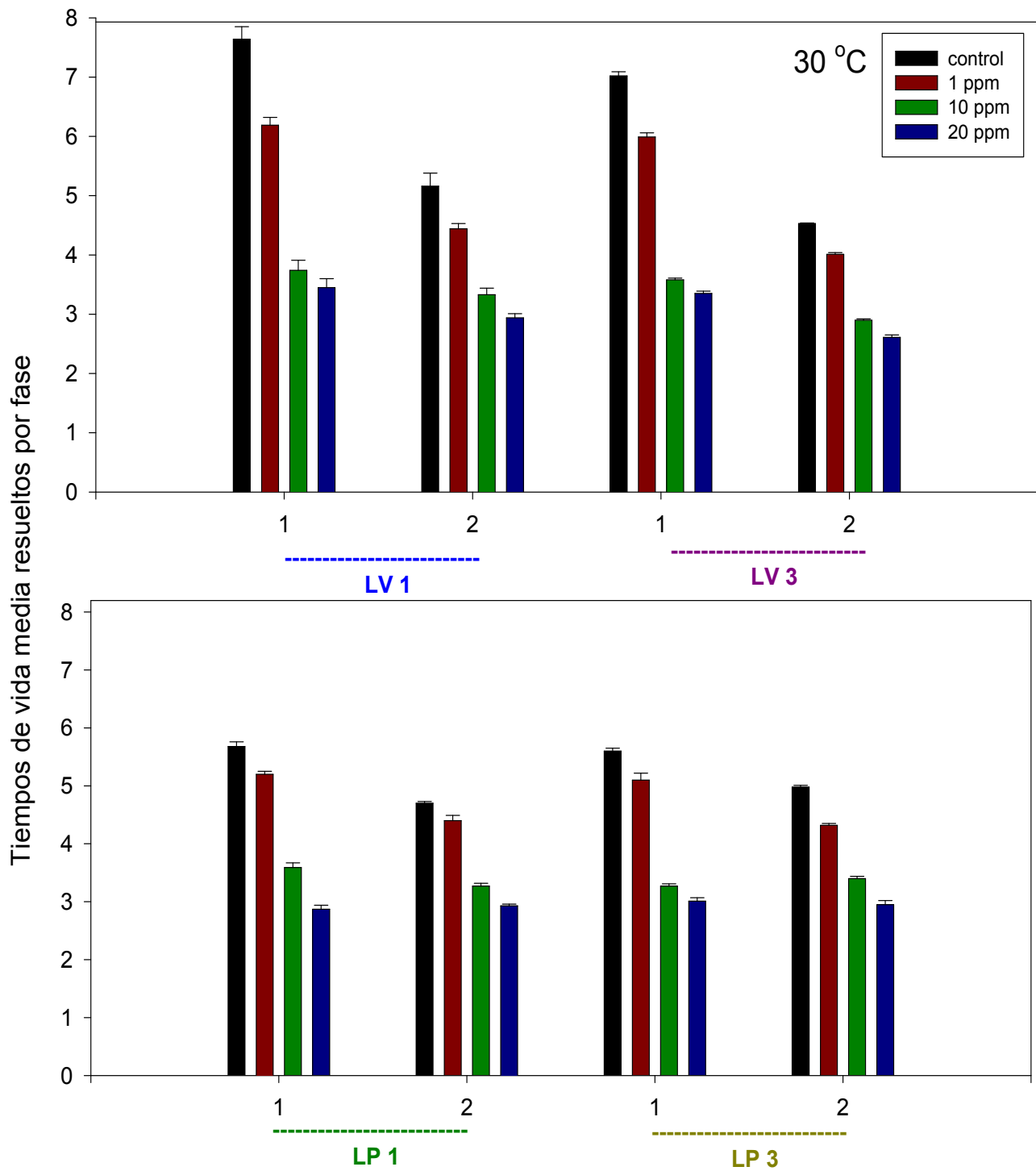


Figura 4.6: Tiempos de vida media resueltos por fase  $\tau_p$  del DPH (1) y DPH-PA (2) medida en la LV 1, LV 3, LP 1, LP 3 a 30 °C en ausencia y presencia de distintas concentraciones de FS. El valor de P fue calculado por el test t de Student comparando muestras con y sin FS, obteniéndose valores  $<0.0001$ .

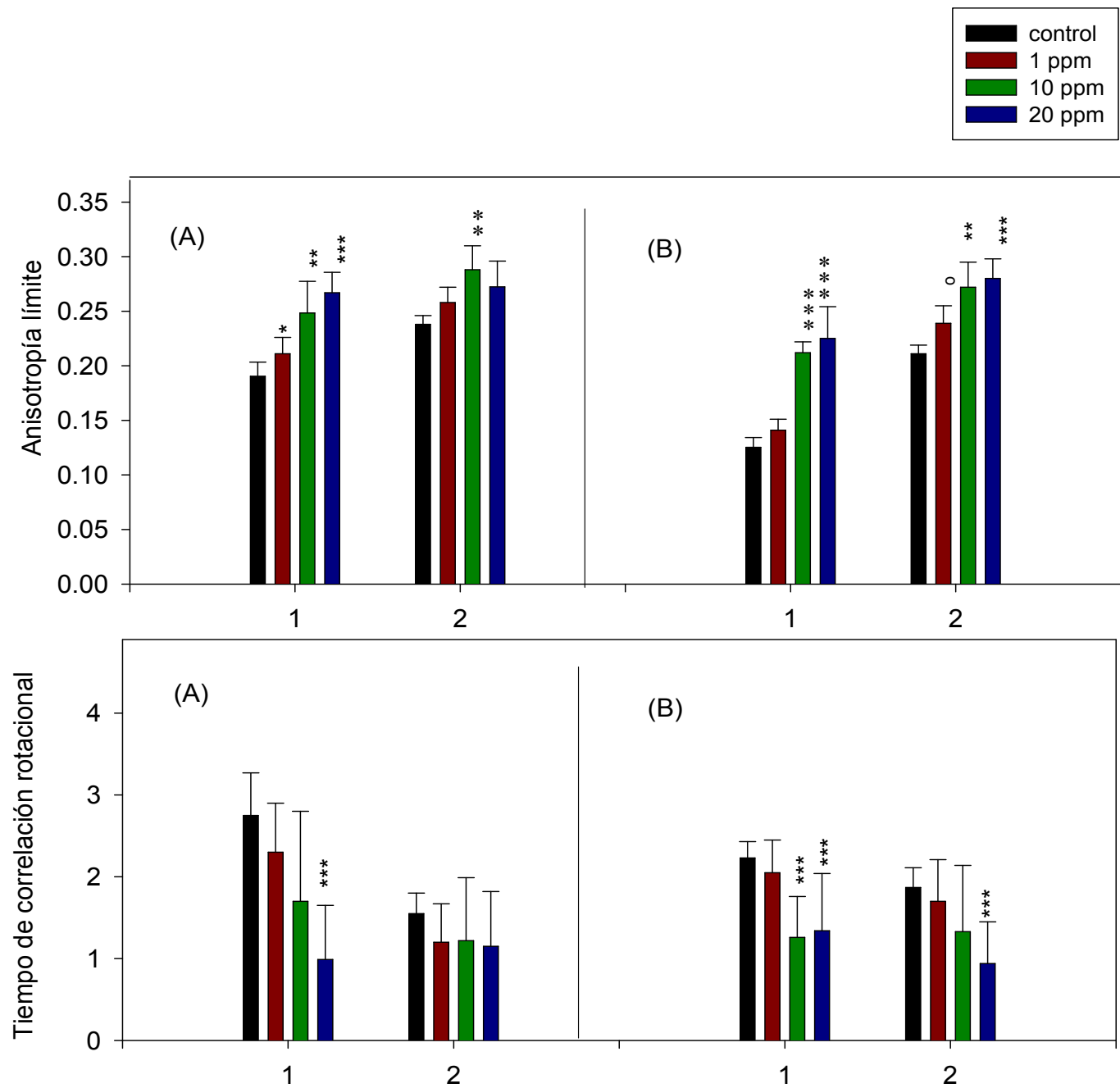


Figura 4.7. Tiempo de correlación rotacional ( $\tau_r$ ) y anisotropía límite ( $r_\infty$ ) de fluorescencia del DPH (1) y del DPH-PA (2), medidos en ausencia y presencia de 1, 10 y 20 ppm de FS, a 10 (A) y 30 °C (B) en **LV 3** de *Macrobrachium borellii*. El valor de P fue calculado por el test t de Student comparando muestras con y sin FS, obteniéndose los siguientes valores: \*\*\*<0.0001, \*\*<0.001, \*<0.01,  $\theta$ <0.059.

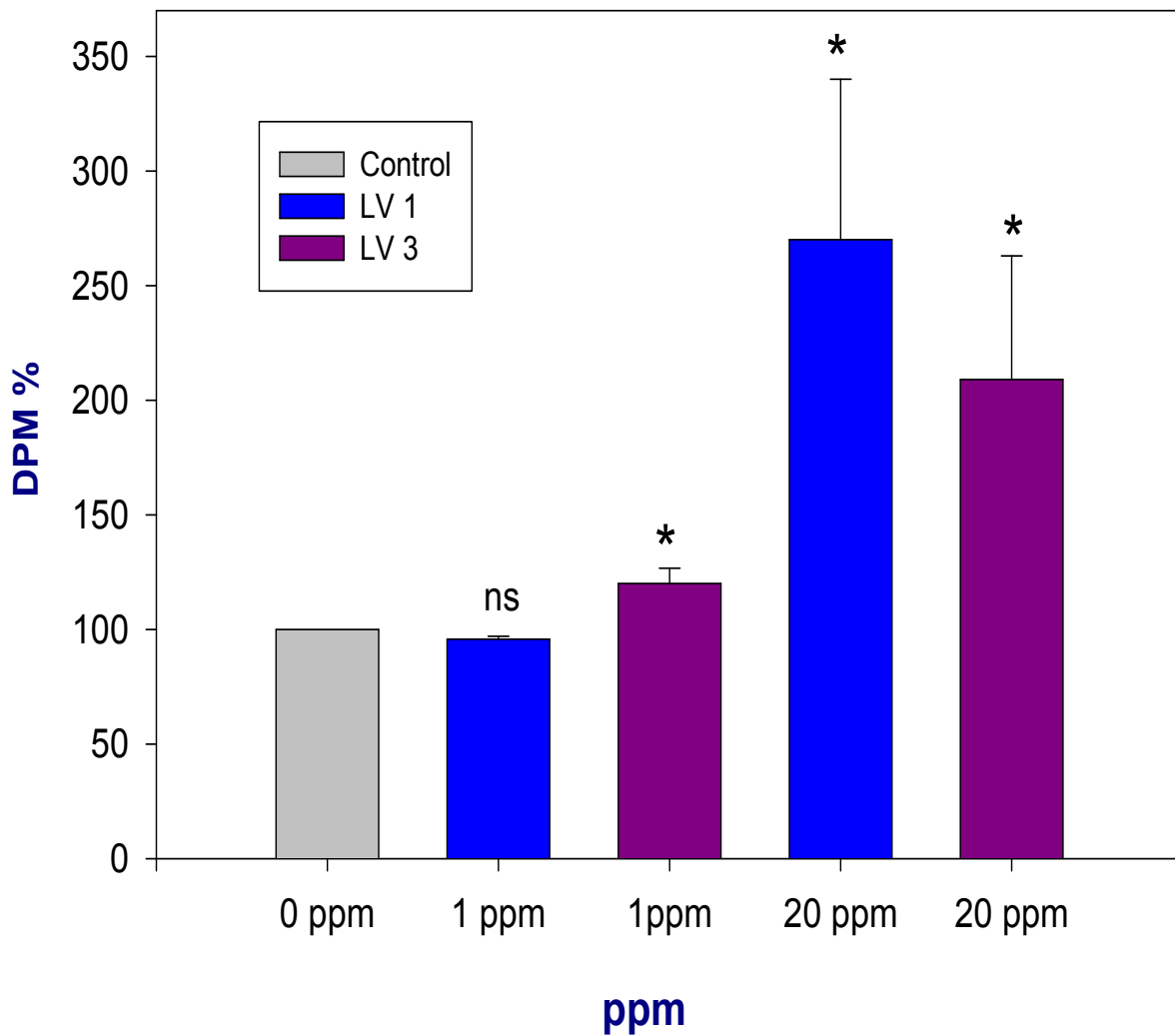


Figura 4.8. Liberación del ácido palmítico de la **LV 1** y **LV 3**. La capacidad de liberación del ácido palmítico de las LVs de *M. borellii* fue ensayada en ausencia y en presencia de 1 y 20 ppm de FS. Las LVs fueron purificadas por HPLC y la radiactividad cuantificada por centelleo líquido. El valor de P fue calculado por el test t de Student comparando muestras tratadas y no tratadas, obteniéndose valores <0.05 (\*) y no significativo (ns)

## DISCUSIÓN:

Los incrementos en los valores de  $r_s$  observados en las lipovitelinas tratadas con FS comparadas con los controles, mostraron que el insecticida penetra en ellas y provoca una rigidización. En este sentido, el efecto es similar al comprobado en el capítulo anterior sobre lipoproteínas circulantes, y sobre lipoproteínas de arácnidos (Cunningham *et al.*, 2002). En el presente estudio pudo comprobarse que tales rigidizaciones son aproximadamente del mismo orden en el core hidrofóbico de ambas lipoproteínas (zona ensayada con DPH). Sin embargo, en las zonas más externas (ensayadas con DPH-PA) el efecto del insecticida sobre la LV 3 es significativamente mayor que sobre la LV 1. La principal diferencia entre estas dos LVs la establece la composición lipídica, ya que ambas contienen las mismas apoproteínas e iguales relaciones lípidos totales/proteínas. Ambas difieren principalmente en las proporciones de sus fosfolípidos y colesterol, hecho que hace suponer estructuras diferentes precisamente en la zona periférica. Estos resultados fueron comparados con los obtenidos a partir de liposomas construidos con las mismas clases lipídicas que pueden brindar información sobre la dinámica de los lípidos en sus zonas interna y externa, prescindiendo de la influencia de las proteínas. Los resultados obtenidos con liposomas de composiciones iguales a LV 1 y LV 3 mostraron que, del mismo modo que en las lipoproteínas originales, el FS afecta en igual medida el entorno del DPH, mientras que en el entorno del DPH-PA el efecto del plaguicida es más notable en LP 3 que en LP 1. Mas aún, la zona externa de LP 3 es significativamente afectada por la adición de sólo 1 ppm de FS.

Anteriormente hemos observado que la esfingomielina ejerce un efecto rigidizante en la HDL 2 de *M. borellii*, en contraste con la HDL 1 carente de esfingomielina (Capítulo 3). En el presente caso, los sistemas LV 3 y LP 3 poseen mayor concentración de esfingomielina que los sistemas LV 1 y LP 1 pero, sin embargo, los primeros no alcanzan mayores valores en sus

parámetros de orden. El hecho podría deberse a que ambas formas de la lipovitelina contienen esfingomielina, y presentan por ende menores diferencias entre sí que las plasmáticas. Es también posible que el supuesto efecto rigidizante de ese fosfolípido se vea contrarrestado por la presencia de otros lípidos, tales como los ácidos grasos libres, que les confieren menor orden a los sistemas. El menor orden existente en la región externa, tanto en LV 3 como en LP 3 posibilitaría que la misma cantidad de FS afecte mayormente a dicha zona.

Podemos inferir que el FS penetra en los cuatro sistemas estudiados de forma equivalente. Este hecho se basa en que los tiempos de vida media del DPH y DPH-PA disminuyen de igual manera en LV 1, LP 1, LV 3 y LP 3 al adicionarse una determinada cantidad de FS, dando indirectamente información de la penetración-efecto en dichos sistemas.

Tomando en consideración variables más independiente que el  $r_s$ , como la correlación rotacional y la anisotropía límite, resalta también el incremento en el orden lipídico provocado por el FS tanto en el core como en la región menos hidrofóbica de la LV 3. Debe destacarse que el efecto del plaguicida como modificador del orden, parece estar condicionado a los valores del orden inicial ( $r_\infty$  control). Esto es que la medida del  $r_\infty$  en la LV 3 sin FS es inferior a la que se obtiene con la LV 1, existiendo una correlación directa entre el menor orden inicial y la mayor rigidización producida por el FS. Algo similar se observa con referencia a la temperatura; un incremento en la temperatura del ensayo determina un menor orden en los controles y, consecuentemente, un mayor efecto rigidizante en las muestras tratadas con FS. En los liposomas, los valores de  $r_\infty$  no variaron significativamente ante la adición del tóxico. Pero debe tenerse en cuenta que se trata de estructuras que presentan un orden muy inferior al de las lipoproteínas que le dieron origen, seguramente debido a la ausencia de la fase proteica, la que genera un ordenamiento de la fase lipídica (Castuma y Brenner, 1989, Garda *et al.*, 1994a). Por lo tanto, puede inferirse que las modificaciones provocadas por el FS en el orden de los sistemas lipoproteicos, depende no solo de la fase lipídica sino también, en alguna medida, de la fase proteica.



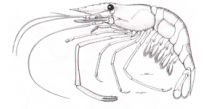
De los parámetros de fluorescencia medidos, el tiempo de vida media de los fluoróforos es el que presentó mayor similitud entre los sistemas lipoproteicos y lipídicos puros. El agregado de FS provocó en todos ellos un acortamiento del  $\tau_p$  y  $\tau_m$  que fue proporcional a las concentraciones del tóxico. Dado que los valores de  $\tau$  son dependientes de la polaridad en el entorno del fluoróforo, la mayor disminución observada en las regiones sondeadas por el DPH, podría deberse al hecho de que esa zona, por poseer menor polaridad (mayores valores iniciales de  $\tau$ ), resulta ser la más afectada. El acortamiento del  $\tau$  de ambos fluoróforos (DPH y DPH-PA), podría atribuirse a la penetración de agua tanto en el interior como en la parte externa de lipoproteínas y liposomas, facilitada por la alteración en el empaquetamiento de los lípidos a causa del FS. Un hecho similar hemos reportado antes trabajando con membranas artificiales (González-Baró *et al.*, 2000b) y con lipoproteínas plasmáticas de invertebrados (Cunningham *et al.*, 2002). Basados en el análisis de los ensayos realizados por González-Baró en 1997 (comentado en el Capítulo 3), se descarta la posibilidad que la disminución de los  $\tau$  se deba a un quenching directo del FS a las sondas fluorescentes.

Hemos demostrado en los capítulos anteriores que la principal lipoproteína plasmática de esta especie, capta y transfiere lípidos desde y hacia el hepatopáncreas (Capítulo 2), y que el FS provoca alteraciones estructurales que disminuyen significativamente la captación, principalmente de ácido graso libre (Capítulo 3).

Los ensayos *in vitro* realizados en el presente trabajo y tratados en este capítulo, mostraron que los cambios provocados por el FS al insertarse en las lipovitelininas, también pueden afectar su funcionalidad. Se evidencia, concretamente, que al alterarse la dinámica de los lípidos se produce un cambio en la unión "binding" lípidos-proteínas, manifestado por una mayor liberación de ácido graso libre al medio, la cual indicaría o bien una posible disminución de la afinidad y/o del número de sitios de unión del ácido graso a las LVs. Dado que los ensayos fueron realizados a una única concentración de ligando, no es posible distinguir en qué medida estas condiciones son afectadas por el FS. Como también se observó una aparente disminución en

la afinidad de la HDL 1 por el ácido graso (Capítulo 3), todo parece indicar que es necesaria una apropiada estructura de la lipoproteína para mantener una adecuada unión a los lípidos y no alterar su función. Los resultados obtenidos aquí no permiten determinar si la aparente disminución en la afinidad de la lipoproteína por el ácido graso libre, obedece solo a una alteración estructural provocada por el FS o también a una competencia entre ácido graso libre y FS por un mismo sitio de unión. Sin embargo esto último parece poco probable, ya que aún a muy baja concentración de FS, se observa una correlación directa entre el cambio estructural y la alteración funcional. Por otro lado, iguales concentraciones de FS, ácido graso y lipoproteína en el medio se comportan en forma distinta dependiendo de la composición de la fase lipídica de la lipoproteína.

En síntesis, hemos comprobado que el FS penetra en la lipoproteína vitelínica de *M. borellii*, produce defectos en el empaquetamiento de su fase lipídica y modifica su acción fisiológica, pudiendo inclusive llegar a afectar la viabilidad del embrión al modificar su capacidad de cesión de al menos un tipo de lípido energético. Dichos cambios son de distinta magnitud, según la composición que la lipovitelina va poseyendo a lo largo de la embriogénesis. En estadios tempranos, la lipovitelina es afectada estructural y funcionalmente solo con altas concentraciones del plaguicida. Pero en los estadios más avanzados del desarrollo, cuando su composición lipídica cambia, el efecto del tóxico es notable aún en bajas concentraciones, determinando un estado más sensible de la lipovitelina.



**CONCLUSIONES**

1 Dos lipoproteínas plasmáticas y una vitelínica, no descritas anteriormente, fueron aisladas del crustáceo decápodo *Macrobrachium borellii*. y caracterizadas en sus composiciones lipídicas, proteicas y densidades de hidratación. Se las denominó HDL 1, HDL 2 a las plasmáticas y LV a la vitelínica, respectivamente.

- # Las tres lipoproteínas son de alta densidad, poseen un contenido alto de fosfolípidos, y distinto número de subunidades apoproteicas.
- # HDL 1 es transportadora de lípidos plasmáticos entre órganos; aunque carece de esfingomielina, presenta similitud en su composición general con las HDLs de otros crustáceos.
- # HDL 2 contiene un alto porcentaje de esfingomielina. Es exclusiva del plasma de hembras en estado de oogénesis.
- # LV es la única lipovitelina presente en huevos, y realiza el principal aporte de materiales y energía durante la embriogénesis.
- # HDL 2 y LV están relacionadas estructural y funcionalmente, sugiriendo que la primera es precursora de la segunda.

2 Se demostró que durante la embriogénesis se consumen los lípidos y las proteínas de la LV. Se pudieron distinguir tres formas de la lipovitelina en los estadios temprano, medio y tardío del desarrollo. Las tres formas fueron denominadas LV 1, LV 2 y LV 3, respectivamente.

- # LV 1 comparte dos subunidades apoproteicas con HDL 2, y contiene mayor proporción de fosfatidilcolina y triacilglicéridos.
- # Las tres formas mantienen igualdad de densidad de hidratación, relación lípidos totales/proteínas totales y proporción de las apoproteínas.
- # Las tres formas difieren en sus composiciones lipídicas. Las concentraciones relativas de fosfatidilcolina y triacilglicéridos

disminuyen durante el desarrollo, mientras que las de colesterol y ácidos grasos libres aumentan.

3 Se comprobó *in vitro* que existe un intercambio de lípidos entre la hemolinfa y los tejidos, principalmente el hepatopáncreas, en el que está involucrada la lipoproteína plasmática HDL 1.

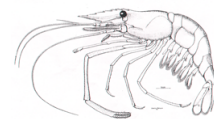
- # El ácido palmítico circulante en la hemolinfa se incorpora *in vivo* en los tejidos y genera glicerolípidos.
- # La lipoproteína hemolinfática proporciona al hepatopáncreas ácido graso libre y fosfatidilcolina.
- # La HDL 1 también tiene capacidad para captar lípidos cedidos por el hepatopáncreas; principalmente ácidos grasos libres, fosfatidilcolina y en menor medida triacilglicéridos.
- # Los resultados sugieren la existencia de algún factor (probablemente proteico), necesario para la transferencia de fosfatidilcolina desde el tejido a la hemolinfa, e innecesario para la transferencia de ácidos grasos libres.

4 El plaguicida fenitrotión penetra en las dos lipoproteínas circulantes (HDL 1 y HDL 2), y altera sus estructuras.

- # La rigidez en el entorno lipídico del interior y de la periferia de ambas lipoproteínas, se incrementa proporcionalmente a la concentración de tóxico agregada.
- # El grado de rigidización es diferente en cada lipoproteína, hecho atribuible a la alta concentración de esfingomielina en HDL 2 y su ausencia en HDL 1.
- # Aumentos en la polaridad provocados por el tóxico, podrían deberse a la penetración de agua como consecuencia de fallas en el empaquetamiento de los lípidos.
- # Los cambios estructurales provocados por el fenitrotión en la HDL 1, disminuyen la capacidad de unión de los ácidos grasos libres a la lipoproteína, pudiendo alterar consecuentemente su función biológica.

5 El fenitrotión también modifica la estructura de diferentes formas de la lipovitulina y afecta su funcionalidad.

- # Altera el empaquetamiento de los lípidos tanto en el interior como en la superficie de las formas temprana (LV 1) y tardía (LV 3). También lo hace en los liposomas contruídos con los lípidos de ambas formas (LP 1 y LP 3). En todos los casos, el efecto es proporcional a la concentración del tóxico adicionada.
- # El plaguicida afecta el orden y la fluidez de los lípidos en la forma tardía de lipovitulina (LV 3).
- # De forma similar a las lipoproteínas plasmáticas, los cambios en el empaquetamiento producen una probable penetración de agua en estos sistemas.
- # La alteración en la dinámica de los lípidos produce una mayor liberación al medio de los ácidos grasos libres.
- # En el estadio temprano, la lipoproteína es afectada estructural y funcionalmente sólo con altas concentraciones de fenitrotión. En el estadio tardío es más sensible; siendo afectada aún con bajas concentraciones del tóxico.



# ***BIBLIOGRAFIA***

- Ackman, R. G. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **40**: 558, 1963.
- Ackman, R. G. y Eaton, C. A. *J. Fish. Res. Bd. Can.* **24**: 467, 1967.
- Ackman, R. G. *J. Planar Chromat.* **3**: 450, 1990.
- Addison, R. F., Ackman, R. G. y Hingley, J. *J. Fish. Res. Bd. Can.* **29**: 407, 1972.
- Agrawal, V. *Proc. Zool. Soc. London* **143**: 133, 1964.
- Allen, W. V. *J. Fish. Res. Bd. Can.* **28**: 1191, 1971.
- Al-Mohanna, S., Nott, J. A. y Lane, D. J. *Mar. Biol. Ass. U. K.* **65**: 901, 1985.
- Al-Mohanna, S. Y. y Nott, J. A. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* **66**: 403, 1986.
- Ansell, A. *Mar. Biol.* **25**: 85, 1974.
- Antunes-Madeira M. C. y Madeira, V. M. *Biochim. Biophys. Acta* **778**: 49, 1984.
- Antunes-Madeira, M. C. y Madeira, V. M. *Biochim. Biophys. Acta* **861**: 159, 1986.
- Antunes-Madeira, M. C. y Madeira, V. M. *Biochim. Biophys. Acta* **982**: 161, 1989.
- Antunes-Madeira, M. C., Almeida, L. M. y Madeira, V. M. *Biochim. Biophys. Acta* **1022**: 110, 1990.
- Antunes-Madeira, M. C. y Madeira, V. M. *Biochim. Biophys. Acta* **1023**: 469, 1990.



Antunes-Madeira, M. C., Almeida, L. M. y Madeira, V. M. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **51**: 787, 1993.

Antunes-Madeira, M. C. y Madeira, V. M. *Biochim. Biophys. Acta* **1149**: 86. 1993.

Antunes-Madeira, M. C., Videira, R. A. y Madeira, V. M. *Biochim. Biophys. Acta* **1190**: 149, 1994.

Barenholz, Y: in "*Physiology of membrane fluidity*"., Shinitzky, M., Ed., Press, Boca Raton, FL., Vol 1: 131, 1984.

Blasiak, J. *Acta. Biochim. Pol.* **40**: 39, 1993.

Blumer, M., Mullin, M. M. y Thomas, W. D. *Science* **140**: 974, 1963.

Blumer, M. y Thomas, W. D. *Science* **147**: 1148, 1965.

Boschi, E. E. *Physis* **24**: 65, 1963.

Boschi, E. En "*Fauna Argentina de Agua dulce*"., Vol. XXVI, (Decapoda Natantia), R. A. Ringuelet Ed., 1981.

Brichon, G., Chapelle, S. y Zwingesten, G. *Comp. Biochem. Physiol.* **67B**: 647, 1980.

Brockerhoff, H. *J. Fish. Res. Bd. Can.* **23**: 1835, 1966.

Brockerhoff, H., Stewart, J. y Tracreiter, W. *Can. J. Biochem.* **45**: 421, 1967.

Brouillette, C., Anantharamaiah, G., Engler, J. y Borhani, D., *Biochim. Biophys. Acta.*, 1531: 4, 2001.

Burchfield, H. y Storrs, E. En: "*Biochemical Applications of Gas Chromatography*", pp. 527, Academic Press, London, 1970.

Burgos González, J. y Fernández Aguado, J. A. *Comp. Biochem. Physiol.* **68B**: 81, 1981.

Carlisle, D. y Knowles, F. En: "*Endocrine control in crustaceans*" pp. 119, The University Press, Cambridge, 1959.

Castuma, C. y Brenner, R. *Biochem. J.* **258**: 723, 1989.

Chang, C., Lee, F. y Huang, Y. *Comp. Biochem. Physiol.* **105B**: 409, 1993.

Chang, C., Lee, F., Huang, Y. y Hong, T. *Invertebr. Reprod. Dev.* **25**: 185, 1994.

Chapelle, S., Meister, R., Brichon, G. y Zwingenstein, G. *Comp. Biochem. Physiol.* **58B**: 413, 1977.

Charniaux-Cotton, H. *Arch. Zool. Exp. Gen.* **119**: 365, 1978.

Chen, C. y Chen S. N. *Comp. Biochem. Physiol.* **106B**: 141, 1993.

Clarke, A. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **38**: 1, 1979.

Clarke, A. En: "Oceanography and Marine Biology: An. Annual. Review", **21**: 341, 1983.

Clarke, A. *J. Crust. Biol.* **4 (spec. 1)**: 285, 1984.

Cunningham, M., Garcia, F., González-Baró, M., Garda, H. y Pollero, R. *Pest. Biochem. Physiol.* **73**: 37, 2002.

de Chafoy, D. y Kondo, M. *J. Biol. Chem.* **255**: 6727, 1980.

de Koning, A. J. *Biochim. Biophys. Acta* **202**: 187, 1970.

de Moreno, J., Pollero, R., Moreno, V. y Brenner, R. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **48**: 263, 1980.

Eto M. In: "Organophosphorous Pesticides; Organic and Biological Chemistry" CRC Press, Cleveland, O. H. Pp. 123, 1974.

Farkas, T. y Nevenzel, J. C. *Lipids* **8**: 728, 1973.

Folch, J., Lees, M. y Sloane-Stanley G. H. *J. Biol. Chem.* **226**: 497, 1957.

Galois, R. G. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **84**: 155, 1984.

Garda, H. A., Bernasconi, A. M. y Brenner, R. R. *J. Lipid Res.* **35**: 1367, 1994a.

Garda, H. A., Bernasconi, A. M. y Brenner, R. R. *An. Asoc. Quim. Arg.* **82**: 305, 1994b.

Garin, C. y Pollero, R. *Comp. Biochem. Physiol.* **111B**: 147, 1995.

Gilbert, L. I. *Adv. Insect. Physiol.* **4**: 69, 1967.

González-Baró M. y Pollero R. *Comp. Biochem. Physiol.* **91B**: 711, 1988.

González-Baró, M., Irazu, C. y Pollero, R. *Comp. Biochem. Physiol.* **97B**: 129, 1990.

González-Baró, M. R. y Pollero, R. J. *Comp. Biochem. Physiol.* **106B**: 71, 1993.

Gonzalez Baró, M. R., Garda, H. y Pollero, R. J. *Pest. Biochem. Physiol.* **58**: 133, 1997.

González-Baró, M. R., y Pollero, R. J. *Comp. Biochem. Physiol.* **119A**: 747, 1998.

Gonzalez Baró, M. R., Heras, H. y Pollero, R. J. *J. Exp. Zool.* **286**: 231, 2000a.

González-Baró, M. R., Garda, H. y Pollero, R. J. *Biochim. Biophys. Acta* **1468**: 304, 2000b.

Hall, M., Vanheusden, M. C. y Soderhall, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **216**: 939, 1995.

Heras, H. y Pollero, R. *Comp. Biochem. Physiol.* **92A**: 571, 1989

Heras, H. y Pollero, R. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **140**: 29, 1990.

Heras, H. y Pollero, R. *Biochim. Biophys. Acta* **1125**: 245, 1992.

Heras, H., Gonzalez Baró, M. R. y Pollero, R. J. *Lipids* **35**: 645, 2000.

Idler, D. R. y Wiseman, P. *Int. J. Biochem.* **2**: 91, 1971.

Irazú, C. E., González-Baró, M. R. y Pollero R. J. *Comp. Biochem. Physiol.* **102B**: 721, 1992.

Isay, S. V., Markarchenko, M. A. y Vaskovsky, V. E. *Comp. Biochem. Physiol.* **55B**: 301, 1975.

Johnston, J. y Corbett, M. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **85**: 181, 1986.

Karim-Malka, R. Muños, P. y Ceccaldi, H. *Comp. Biochem. Physiol.* **74B**: 433, 1983.

Kayama, M. y Nevenzel, J. C. *Mar. Biol.* **24**: 279, 1974.

Khayat, M., Shenker, O., Funkenstein, B., Tom, M., Lubzens, E. y Tietz, A. *Isr. J. Aquac. Bamidgeh.* **46**: 22, 1994.

Kleine, Z. *Vergl. Physiol.* **55**: 33, 1967.

Kobayashi, K., Nakamura, Y. y Imada, N. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* **51**: 599, 1985.

Komatsu, M., Ando, S. y Teshima, S. *J. Exp. Zool.* **266**: 257, 1993.

Laemmli, U. K. *Nature* **227**: 680, 1970.

Lakowicz, J. R., Prendergast, F. G. y Hogen, D. *Biochemistry* **20**: 7333, 1979.

Lakowicz, J. R. y Cherek, H. *J. Biol. Chem.* **255**: 831, 1980.

Lakowicz, J. R., Cherek, H. y Bevan, D. R. *J. Biol. Chem.* **255**: 4403, 1980.

Lakowicz J. R: En: "*Principles of Fluorescence Spectroscopy*", Plenum Press, New York. Capítulos 3 y 6, 1983.

Lal, B. y Singh T. P. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **13**: 13 1987.

Lands, W. y Hart, P. *J. Lipid. Res.* **5**: 81, 1964.

Lands, W. y Hart, P. *J. Biol. Chem.* **240**: 1905, 1965.

Lavarias, S., Heras, H., Demichelis, S., Portiansky, E. y Pollero, R. *Invert. Reprod. Devel.*, **41**: 157, 2002.

Lee, R. F. *Mar. Biol.* **26**: 313, 1974.

Lee, R. F. y Puppione, D. *Comp. Biochem. Physiol.* **59B**: 239, 1978.

Lee, R. F. y Puppione, D. L. *J. Exp. Zool.* **248**: 278, 1988.

Lee, R. F. In: "Advances in Comparative and Environmental Physiology"., Ed., R. Gilles. Springer-Verlag, London, Vol. 7 pp. 187, 1991.

Lee, R., Shih, T. y Chang, C. *Gen. Comp. Endocrinol.* **108**: 406, 1997.

Lindgren, F. *Am. Oil. Chem. Soc.* Champaign, Illinois. Pp. 204, 1975.

Litterst, C. L. y Vanloon, E. J. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **141**: 765, 1972.

Lopez-Aparicio, P., Recio, M. N. y Prieto, J. C. *Life Sci.* **49**: 1141, 1991.

Lottin, H., Motta, C. y Simard, G. *Biochim. Biophys. Acta* **1301**: 127, 1996.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. y Randall, R. J. *J. Biol. Chem.* **193**: 265, 1951.

Lubzens, E., Khayat, M., Ravid, T., Funkenstein, B. y Tietz, A., *Isr. J. Aquac. Bamidgeh* **47**: 185, 1995.

Lubzens, E., Ravid, T., Khayat, M., Daube, N. y Tietz, A. *J. Exp. Zool.* **278**: 339, 1997.

Lund-Katz, S., Laboda, H. M., Mc Lean, L. R. y Phillips, M. C. *Biochemistry* **27**: 3416, 1988.

- Madeira, V. M. y Antunes-Madeira M. C. *Can. J. Biochem.*, **54**: 516, 1976.
- Malins, D. y Sargent, J. R. *Biochemistry*, **10**: 107, 1972.
- Merril, C. R. In "Gel staining techniques, en Methods in Enzimology"., Ed., H. P. Deutscher. Academic Press, New York, Vol. 183 pp 477, 1990.
- Morris, R. J. y Sargent, J. R. *Mar. Biol.* **22**: 77, 1973.
- Morris, R. *J. Mar. Biol.* **16**: 102, 1972.
- Morris, R. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* **53**: 27, 1973.
- Morrison, W. y Smith, L., *J. Lipid. Res.* **5**: 600, 1964.
- Moya-Quiles, M. R., Munoz-Delgado, E. y Vidal, C. J. *Arch. Biochem. Biophys.* **312**: 95, 1994.
- Munday, K. A. y Munn, E. A. *Biochem. J.* **84**: 31, 1962.
- Munday, K. A. y Munn, E. A. *Biochim. Biophys. Acta* **110**: 202, 1965.
- O'Connor, J. D. y Gilbert, L. I. *Am. Zool.* **8**: 529, 1968.
- Okuno, A., Yang, W., Jayasankar, V., Saido-Sakanaka, H., Huong, D., Jasmani, S., Atmomarsono, M., Subramoniam, T., Tsutsui, N., Ohira, T., Kawazoe, I., Aida, K. y Wilder, M. *J. Exp. Zool.* **292**: 417, 2002.
- Omann, G. M. y Lakowicz, J. R. *Biochim. Biophys. Acta* **684**: 83, 1982.
- Perez-Albarsanz, M. A., Lopez-Aparicio, P., Senar, S. y Recio M. N. *Biochim. Biophys. Acta* **1066**: 124, 1991.
- Pollero, R., Irazú, C. y Brenner, R. *Comp. Biochem. Physiol.* **76B**: 927, 1983.

Pollero, R. J., Huca, G. y Brenner, R. R. *Comp. Biochem. Physiol.* **82A**: 339, 1985.

Pollero, R. *Comp. Biochem. Physiol.* **88**: 577, 1987.

Pollero, R. y Heras, H. *Comp. Biochem. Physiol.* **93**: 673, 1989

Pollero R., González-Baró, M., y Irazu, C. *Comp. Biochem. Physiol.* **99B**: 233, 1991.

Pollero, R., González Baró, M., y Garin, C. *Comp. Biochem. Physiol.* **102B**: 717, 1992.

Purshottan T. y Srivastava, R. K. *Pharmacology* **35**: 227, 1987.

Sanders, O. T., Zepp, R., y Kirkpatrick, L. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **12**: 394, 1974.

Sarkar, S. N., Balasubramanian, S. V. y Sikdar, S. K. *Biochim. Biophys. Acta* **1147**: 137, 1993.

Sargent, J. R. *Report. UCLA* **12**: 889, 1973.

Sargent, J. R. y McIntosh, R. *Mar Biol.* **25**: 271, 1974.

Sargent, J. R., Gatten, R. y McIntosh, R. *Comp. Biochem. Physiol.* **47B**: **217**, 1974.

Sarojini, R., Nagabhushanam, M. y Avelin, S. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **11**: 243, 1986.

Simoës, T. y Lunetta, J. *Biol. Fisiol. Animal Univ. S. Pablo* **2**: 49, 1978.



Sommer, A., Prenner, E., Gorges, R., Stutz, H., Grillhofers, H., Kostner, G. M., Paltauf, F. y Hermetter, A. *J. Biol. Chem.* **267**: 24217, 1992.

Spencer, R. D. y Weber, G. *J. Chem. Phys.* **52**: 1654, 1970.

Stelzer, K. J. y Gordon, M. A. *Biochim. Biophys. Acta* **812**: 361, 1985.

Teshima, S. y Kanazawa, A. *Comp. Biochem. Physiol.* **38**: 603, 1971.

Testerman, J. K. *Biol. Bull.* **142**: 160, 1972.

Ton, M., Shenker, O. y Ovadia, M. *Comp. Biochem. Physiol.* **104B**: 811, 1993.

Tricerri, M. A., Garda, H. A. y Brenner, R. R. *Chem. Phys. Lipids* **71**: 61, 1994.

Van der Veen, J., Medwadowski, B. y Olcott, H. S. *Lipids* **6**: 481, 1971.

Van Weel, P. B. *Physiol. Zool.* **28**: 40, 1955.

Videira, R. A., Antunes-Madeira, M. C., Custodio, J. B. y Madeira, V. M. *Biochim. Biophys. Acta* **1238**: 22, 1995.

Vonk, H. J. In: "The physiology of Crustacea", T. Waterman Ed., Academic Press N. Y. Vol. I, 291, 1960.

Wallace, R. A., Walker, S. L. y Hauschka, P. V. *Biochemistry* **6**: 1582, 1967.

Weber, G. *Acta. Phys. Pol.* **A 54**: 173, 1978.

Write, A. S., Akintonwa, D. y Wooter, M. F. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **1**: 7, 1977.

Yano L. y Chinzei, Y. *Comp. Biochem. Physiol.* **86B**: 213, 1987.

Yepiz-Plascencia, G., Sotelo-Mundo, R., Vazquez-Moreno, L., Ziegler, R. e Higuera-Ciapara, I. *Comp. Biochem. Physiol.* **111B**: 181, 1995.

Yepiz-Plascencia, G., Vargas-Albores, F. y Higuera-Ciapara, I. *Aquaculture* **191**: 177, 2000.

Zagalky, P. F., Cheesman, D. F. y Ceccaldi, H. J. *Comp. Biochem. Physiol.* **22**: 851, 1967.

Zandee, D. I. *Comp. Biochem. Physiol.* **20**: 811, 1967.

