

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

"INTERACCION ENTRE LIPIDOS Y PROTEINAS EN LA MEMBRANA MICROSOMAL.
UDP – GLUCURONIL TRANSFERASA"

TESIS

Autor
Celina Elisabet Castuma

Nº-821
(Tomo I)

Director
Prof. Dr. Rodolfo Roberto Brenner

Lugar de Trabajo
Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata
Facultad de Ciencias Médicas. UNLP. CONICET.

1986



Don. Autor
Fecha: 25-11-88
Inv. N.º 72724 53196

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Rodolfo R. Brenner por haberme guiado permitiéndome, al mismo tiempo, realizar la tarea con libertad e independencia; por intentar incansablemente que mis numerosos defectos no se impusieran sobre mis escasas virtudes, y por su invalorable contribución intelectual al desarrollo de mis investigaciones.

Si algún mérito tuviera esta tesis, a él sería debido.

A la Dra. Adela E. Croce por su generosa lealtad en los momentos más difíciles, aún en contra de sus conveniencias personales.

Sin su incondicional apoyo, este trabajo no habría sido terminado.

Al Dr. Raúl O. Peluffo, quien con su excepcional dimensión humana me brindó tanto cariño a lo largo de estos años.

A la Dra. Sixta Ayala, mi compañera de laboratorio, por haber soportado con infinita paciencia mi desorden y mis descuidos y por su silenciosa comprensión en muchas ocasiones.

Al Dr. Horacio Garda quien me enseñó, con gran humildad, todo lo que sé, aportando siempre valiosas ideas.

A las Dras. Irma N. Tacconi de Gómez Dumm y María J. Tacconi de Alaniz, por su sincero apoyo cuando comencé mi trabajo.

A la Sra. Ana María Bernasconi de Marcos, por su excelente colaboración.

A mis compañeros y a todo el personal del INIBIOLP y de la Cátedra de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Médicas.

Al personal de las Bibliotecas de la Facultad de Ciencias Exactas y de la Facultad de Ciencias Médicas, por su esforzada dedicación durante la redacción de esta tesis.

A la Sra. Josefina Fedeli de Acosta, por la esmerada elaboración de las copias dactilográficas.

Al Sr. Daniel Sergnese, quien realizó con eficiencia los dibujos y esquemas.

Al personal del CERLAP, por la colaboración prestada al fotocopiar y compaginar esta tesis.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por otorgarme las becas para desarrollar las tareas de investigación.

Quiero manifestar de esta forma mi profundo agradecimiento a todos los docentes de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata.

Ellos me transmitieron, a lo largo de mis años como alumna y como graduada, el discernimiento crítico, el ansia por el conocimiento y la fantasía inalcanzable de descubrir la verdad que se esconde detrás de todas las cosas.

A mi padre, a mi madre

a Lili, a Adela.

T O M O I

PARTE I

INTRODUCCION

Y REVISION

BIBLIOGRAFICA

¿QUE SON LAS MEMBRANAS BIOLÓGICAS?

El funcionamiento exitoso de un sistema biológico depende de la síntesis de sus componentes y su posterior autoensamble para constituirse en unidades funcionales. De éstas, tal vez la membrana biológica sea uno de los sistemas más complejos, siendo todavía primitivo el conocimiento de las fuerzas que gobiernan e interrelacionan su composición, estructura y función.

Una membrana esencial para la vida, la membrana plasmática, rodea a todas las células definiendo sus límites y manteniendo las diferencias esenciales entre su contenido y el medio ambiente. Pero la membrana plasmática es más que una barrera pasiva: es también un filtro altamente selectivo que permite la entrada de nutrientes y la salida de productos de desecho. A diferencia de las células procarióticas, las células eucarióticas presentan numerosas membranas intracelulares, que forman compartimientos dentro de los cuales ocurren procesos metabólicos. El propio núcleo se encuentra separado del citoplasma por un sistema de membranas denominado envoltura nuclear.

En las membranas de mitocondrias y cloroplastos se genera el ATP necesario para impulsar las reacciones biosintéticas energéticamente desfavorables. También existen en el citoplasma de la célula numerosas membranas que forman cisternas y redes de canales, constituyendo el Sistema de Golgi y el retículo endoplásmico. Este último con sus ribosomas, sintetiza nuevas proteínas integrales de membrana y proteínas para ser exportadas y contiene, además, diferentes enzimas biosintéticas, entre ellas las responsables de la síntesis de la mayoría de los lípidos celulares.

Todas las membranas biológicas poseen una propiedad común: están formadas mayoritariamente por lípidos y proteínas que se mantienen unidos por interacciones no covalentes. Los carbohidratos se encuentran en pequeña canti-

dad, principalmente como oligosacáridos unidos covalentemente a las proteínas de membrana (glicoproteínas) y en menor proporción a los lípidos (glicolípidos). La pared celular de bacterias y plantas contiene gran cantidad de polisacáridos, formando complejos con las proteínas, pero este sistema no se incluye dentro de las denominadas membranas biológicas por poseer una composición y estructura que le confieren características funcionales propias y distintivas.

En este capítulo comenzaremos por analizar, a la luz de los conocimientos actuales, las propiedades de los lípidos y proteínas de membranas, su interacción y su relación con la cinética enzimática para, finalmente, presentar una visión integradora de la estructura dinámica de las membranas biológicas y en especial de la membrana del retículo endoplásmico.

CAPITULO I.

LOS LIPIDOS DE LAS MEMBRANAS BIOLÓGICAS.

Los fosfolípidos son los constituyentes cuantitativamente más importantes de las membranas biológicas. Son sustancias anfifílicas que contienen una cabeza polar fuertemente hidrofílica y, generalmente, dos largas cadenas hidrocarbonadas (1). Dependiendo de la naturaleza de la cabeza polar, los fosfolípidos pueden clasificarse en dos grandes grupos: glicerofosfolípidos, los más abundantes, y esfingofosfolípidos. Otros lípidos anfifílicos, que se encuentran frecuentemente en células cerebrales, son los glicolípidos, en los que la cabeza polar está unida por un enlace glicosídico en lugar de un éster fosfórico, como en los fosfolípidos (2).

Muchas membranas, tales como la membrana plasmática, la de eritrocito y la de mielina, contienen también elevados niveles de colesterol, alcanzándose en esta última una relación molar colesterol:fosfolípido igual a 1,3. Otras

membranas, como las del retículo endoplásmico, la membrana nuclear y especialmente las mitocondriales, contienen cantidades menores de colesterol, hasta 0,2 moles/mol de fosfolípido (3). Si bien casi toda la molécula del esterol es hidrofóbica, la polaridad del $3/\beta$ -OH le confiere al colesterol cierto carácter anfifílico. Esto hace que el colesterol pueda incorporarse con relativa facilidad a las membranas y alcanzar relaciones molares colesterol:fosfolípido 1:1, o aún mayores (4,5).

En esas asociaciones el β -OH interacciona con las cabezas polares de los fosfolípidos; el anillo esteroideo y la cadena lateral se introducen en la región de las cadenas hidrocarbonadas (6,7). En cambio, en los ésteres de colesterol, componentes minoritarios de las membranas biológicas, el β -OH forma un enlace éster con un ácido graso. Este hecho, junto con el tamaño considerable de estos derivados del colesterol, dificulta la incorporación de los mismos en las estructuras lipídicas habituales (8).

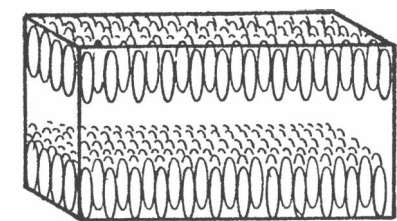
Además de los componentes ya mencionados, algunas membranas contienen muy pequeñas cantidades de lípidos con una sola cadena hidrocarbonada por grupo polar, como los lisofosfátidos, y también ácidos grasos libres y triglicéridos. Los dos primeros podrían aparecer por hidrólisis de los fosfolípidos debido a manejos experimentales indebidos, y los últimos aparecen debido a su presencia en el medio con el cual la membrana está en contacto (2).

POLIMORFISMO LIPIDICO

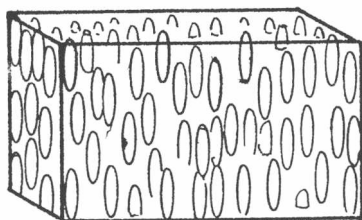
Los cristales líquidos comparten algunas propiedades con los líquidos y otras con los sólidos.

Las sustancias que presentan una estructura líquido-cristalina mantienen

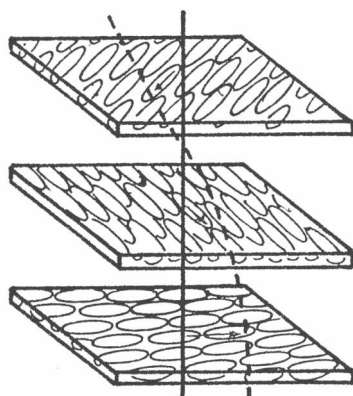
la característica cristalina de periodicidad en una, dos o tres dimensiones, pero las moléculas no están rígidamente ubicadas en una red: exhiben un movimiento difusional, similar a los líquidos, aunque dichos movimientos son anisotrópicos (9). De acuerdo a la composición química, los cristales líquidos pueden clasificarse en dos grupos (10): termotrópicos y liotrópicos. Los cristales termotrópicos están formados por un componente que, al ser calentado por encima de una temperatura bien definida, forma una fase líquido-cristalina. Los cristales liotrópicos consisten en dos o más componentes. Ambos tipos de cristales pueden asumir diversas fases estructuralmente distintas llamadas mesofases. Los cristales líquidos termotrópicos pueden dividirse en tres tipos de mesofases: esméctica, nemática y colestérica, tal como puede verse en la Figura 1. Los cristales líquidos esmécticos (Figura 1a) consisten en una serie de capas de moléculas alargadas, en las que los ejes longitudinales de dichas moléculas se alinean en forma más o menos paralela entre sí y perpendicular al plano de la capa. Las moléculas pueden rotar a lo largo de sus ejes longitudinales y difundir libremente en el plano (difusión lateral) de la capa, pero la rotación perpendicular al eje mayor está severamente restringida. En los cristales líquidos nemáticos (Figura 1b) los ejes longitudinales también son paralelos entre sí, pero las moléculas no se encuentran separadas en capas. Los cristales líquidos colestéricos (Figura 1c) se pueden construir esquemáticamente por superposición de capas de cristales nemáticos, con una torsión uniforme, como se muestra en la Figura 1 c. Esta estructura helicoidal origina una intensa actividad óptica.



a



b



c

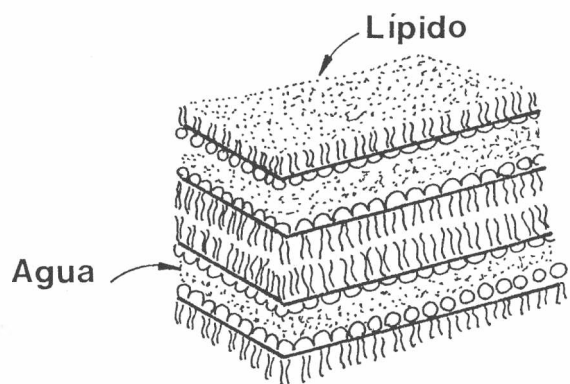
FIGURA 1. Cristales líquidos termotrópicos: a) cristal esméctico, b) cristal nemático, c) cristal colestérico.

Los cristales liotrópicos presentan un polimorfismo mayor aún que el de los cristales termotrópicos.

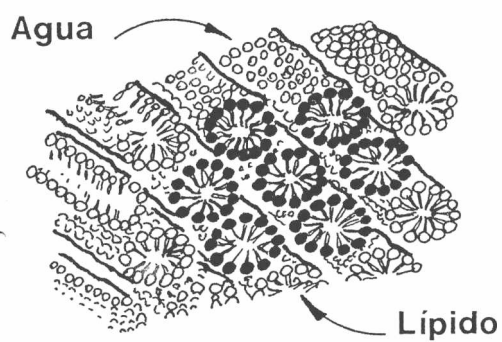
Los cristales liotrópicos se forman al tratar ciertas moléculas anfifílicas con cantidades controladas de agua u otros solventes, pudiendo presentar diversas estructuras de acuerdo al tipo de sustancia anfifílica y a la cantidad de solvente agregado. Dos estructuras liotrópicas importantes son las mesofases lamelar y hexagonal. En la mesofase lamelar (Figura 2 a) las moléculas anfifílicas se ordenan en capas dobles separadas entre sí por capas de agua. Los grupos polares están en contacto con el agua, mientras que las cadenas hidrocarbonadas no polares constituyen el núcleo hidrofóbico de la bicapa. Por analogía con los cristales líquidos termotrópicos, la mesofase lamelar también se llama cristal líquido liotrópico esméctico.

La fase hexagonal consiste en partículas cilíndricas y alargadas con un núcleo hidrofóbico y los grupos polares en la superficie externa en contacto con el entorno acuoso (Figura 2 b). Se denomina fase hexagonal porque en esta disposición cada cilindro se halla rodeado por otros seis cilindros. En algunas membranas biológicas se encuentran fases hexagonales invertidas, tal como se observa en la Figura 2 c. A esta estructura se la llama hexagonal II y consiste básicamente en una matriz atravesada por canales acuosos de aproximadamente 20 Å de diámetro, empaquetados hexagonalmente (11).

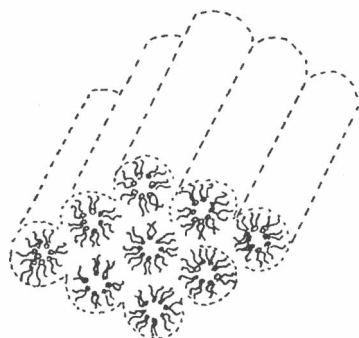
Las micelas pueden considerarse como precursoras primitivas de los cristales líquidos. Algunas moléculas anfifílicas, tales como los ácidos grasos o los jabones pueden disolverse en agua, tal como lo hacen las sales. Pero si la concentración de esas sustancias aumenta por encima de la denominada concentración micelar crítica, las porciones lipofílicas de la molécula se asociarán para minimizar el contacto con el agua (1). Las micelas son sistemas rápidamente fluctuantes y el tiempo de vida de una micela individual es



(a)



(b)



(c)

FIGURA 2. Cristales líquidos liotrópicos: a) bicapa, b) hexagonal I, c) hexagonal II (invertida).

bastante corto, desconociéndose aún si poseen una geometría bien definida (12).

Los lípidos pueden adoptar diversas estructuras, según las condiciones de hidratación.

Las mesofases lípido-agua representan una subclase dentro de los cristales líquidos liotrópicos, y su gran diversidad depende de factores intrínsecos, como la naturaleza de la cabeza polar, la longitud y el grado de insaturación de las cadenas hidrocarbonadas, o de factores extrínsecos, como el contenido de agua, temperatura, PH, cationes divalentes o la presencia de otros lípidos o proteínas (13, 14).

La Tabla I resume las fases que adoptan diversos lípidos hidratados bajo condiciones que se aproximan a la temperatura y PH fisiológicos, así como también las condiciones bajo las cuales esos mismos lípidos adoptan otras fases.

Los estudios realizados por difracción de rayos X (15) y ^{31}P RMN (16), han establecido que los lípidos en las membranas biológicas están organizados preferentemente en forma de bicapas.

La Tabla I muestra que, si bien la estructura lamelar es también la más frecuente entre los diversos fosfolípidos al ser hidratados en condiciones similares a las fisiológicas, la mayoría de ellos adopta estructuras no-lamelares en otras condiciones de hidratación.

La formación de bicapas es un proceso energéticamente dirigido por las interacciones entre las cadenas hidrocarbonadas y los grupos polares (1, 17).

Un requisito esencial para la formación de bicapas es la presencia, en la misma molécula, de dos cadenas hidrocarbonadas de suficiente longitud (9), ya que los fosfolípidos de cadena corta y los lisoderivados, al igual que los detergentes, forman micelas. El aumento de la insaturación y la temperatura disminuyen la preferencia de los fosfolípidos por la fase lamelar, favorecien-

T A B L A I.

PREFERENCIAS POLIMORFICAS DE LIPIDOS INSATURADOS EN EL ESTADO LIQUIDO CRISTALINO.*

Lípido	F a s e	
	Condiciones Fisiológicas	Otras condiciones
Fosfatidilcolina	L	H _{II} baja hidratación y alta temperatura.
Esfingomielinea	L	
Fosfatidiletanolamina	H _{II}	L,, PH ≥ 8,5, baja temperatura.
Fosfatidilserina	L	H _{II} , PH ≤ 3,5.
Fosfatidilglicerol	L	H _{II} , alta temperatura, alta concentr. salina.
Fosfatidilinositol	L	
Cardiolipina	L	H _{II} , cationes divalentes PH ≤ 3, alta concentración salina.
Acido fosfatídico	L	H _{II} , cationes divalentes PH ≤ 3,5, alta concentración salina.
Gangliósido	M	
Lisofosfatidilcolina	M	
Colesterol		Induce la formación de H _{II} en mezclas lipídicas.
Ácidos grasos insaturados		Induce la formación de H _{II} .

* Datos extraídos de la Referencia 9.

Símbolos: L: lamelar H_{II}: hexagonal M: micelar

do la transición a la fase hexagonal II.(9, 18). En efecto, la introducción de dobles enlaces "cis", así como el incremento de conformeros "gauche", por efecto de la temperatura, aumenta la sección transversal efectiva de las cadenas hidrocarbonadas, obligando a la molécula a adoptar una estructura cónica que se adapta mejor a la fase hexagonal. El aumento de tamaño y del grado de ionización de la cabeza polar ejercen un efecto contrario promoviendo, por lo tanto, la formación de bicapas. Por debajo de la T_t , todos los fosfolípidos adoptan esta estructura (13). La mayoría de los fosfolípidos, al ser dispersados en exceso de agua, forman espontáneamente bicapas cerradas de geometría esférica llamadas vesículas (19, 20). Al dispersar mecánicamente un lípido anhidro en agua, se obtienen vesículas multilamelares, que consisten en bicapas concéntricas, separadas por canales acuosos (21). Por sonicación de estas vesículas (22) se obtienen estructuras con un diámetro aproximado de 200 a 400 Å, formadas por una sola bicapa, que encierra un compartimiento acuoso. Se denominan vesículas monolamelares pequeñas para distinguirlas de las monolamelares grandes (600 Å de diámetro), que pueden obtenerse al hidratar lentamente una fina película lipídica.

Las mezclas de lípidos de membrana tienden a adoptar una organización lamelar.

La fosfatidilcolina puede estabilizar a la fosfatidiletanolamina en una fase lamelar, dependiendo del grado de insaturación de los lípidos, la temperatura y también la relación molar entre ambos fosfolípidos (23, 24). Así, una relación molar 1:1 es suficiente para estabilizar la fase lamelar (25). Dado que la esfingomielina exhibe el mismo efecto (26), se postula que la función primordial de la fosfatidilcolina y la esfingomielina en las membranas biológicas es estabilizar la bicapa lipídica.

Con respecto a los fosfolípidos ácidos, se sabe que el agregado de 15-30 moles por ciento de fosfatidilserina (27), o fosfatidilinositol (28), es suficiente para estabilizar la fase lamelar en mezclas con fosfatidiletanolamina de soja. La adición de Ca^{+2} a estos sistemas origina la formación de un complejo entre el ión positivo y el fosfolípido cargado negativamente, dejando a la fosfatidiletanolamina libre para adoptar la configuración hexagonal II. Algunas veces, al mezclar en la proporción adecuada un lípido que prefiere la estructura lamelar, con otro que prefiere la hexagonal II, se encuentran pequeñas partículas lipídicas visibles mediante la técnica de fractura por congelamiento (29). Estas partículas serían micelas invertidas, que representarían una estructura intermedia entre el ordenamiento hexagonal y el lamelar (25, 30).

En contraste con el rol generalmente aceptado del colesterol como estabilizador de membranas (3), se encontró que el colesterol desestabiliza la estructura de bicapa y promueve la fase hexagonal en mezclas de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina (25). Por esta razón, las membranas que contienen grandes cantidades de fosfatidiletanolamina invariablemente poseen poco colesterol (31). Los efectos desestabilizantes del colesterol se han observado también en mezclas binarias de fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina y en mezclas ternarias de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina (32).

El conocimiento acabado del polimorfismo permitiría una predicción cuantitativa de la estructura del lípido a partir de su fórmula química.

En la última década se han hecho grandes esfuerzos para comprender las bases físicas del polimorfismo, pero cada una de las distintas aproximaciones puede explicar sólo un número limitado de estructuras. Cullis y De Kruijf

(13), consideran que la "forma dinámica" de los lípidos determina la fase adoptada. Así, la fosfatidilcolina y la fosfatidilserina a PH neutro presentan una geometría cilíndrica que favorece el empaquetamiento lamelar. En cambio, la fosfatidiletanolamina o la fosfatidilserina a PH 3 poseen una geometría cónica, en la que el área efectiva de la cabeza polar es menor que la de las colas hidrocarbonadas. Esos lípidos se empaquetarían mejor formando estructuras invertidas, como la fase hexagonal II o la micelar invertida (33).

Israelachvili y col. (17, 34) , extienden estas ideas en base a una teoría de autoensamble que interrelaciona la termodinámica, la energía libre de interacción y la geometría molecular. Esta teoría conduce a expresiones analíticas simples para ciertas propiedades de la bicapa y de vesículas, en función de parámetros medibles, y también muestra cómo estas propiedades calculadas se correlacionan con mediciones experimentales. Sin embargo, no explica los fenómenos en los que se sustentan las distintas transiciones de fase mesomórficas.

Recientemente, Kirk y col. (35), desarrollaron una teoría sintética que pretende explicar las transiciones de fase lamelar-hexagonal. Se consideran cuatro contribuciones a la energía libre: fuerzas elásticas, empaquetamiento molecular, hidratación y efectos electrostáticos, en base a las cuales se puede predecir la fase con menor energía libre.

Además, Borovjagin y col. (36) y Siegel (37), han efectuado aportes tendientes a aclarar el mecanismo y la dinámica de las transiciones de fase polimórficas, sin que haya aparecido hasta ahora una única teoría que dé cuenta de todos los aspectos involucrados en las propiedades mesomórficas de los lípidos.

¿Por qué existe tal diversidad de lípidos en las membranas biológicas, si la fosfatidilcolina por sí sola podría mantener la bicapa?

Algunos autores sostienen que la gran variedad lipídica puede proveer a la membrana de dominios con distintas características de fluidez, capaces de modular la actividad de enzimas integrales (38). Cullis y col. (13, 39), así como otros autores (40), ponen en duda estas razones. Sugieren que no existe evidencia suficiente para sostener que estímulos capaces de variar la estructura mesomórfica de los lípidos, tales como el PH, fuerza iónica o la presencia de cationes, originen la aparición de dominios locales de fluidez diferencial. Por otra parte, además de mantener una barrera de permeabilidad, las membranas llevan a cabo otras funciones celulares como fusión exocitosis y aún movimientos transversales de lípidos ("flip-flop"), que serían impensables en una estructura lamelar inviolable.

Actualmente, existen numerosas evidencias experimentales (39) indicando la necesidad de estructuras no-lamelares en el proceso de fusión. Independientemente de los eventos que puedan iniciar este mecanismo, en alguna etapa del mismo tendría que producirse una alteración local de la bicapa a nivel de la interfase de fusión. Por otra parte, la formación de micelas invertidas en el seno de la membrana constituiría un requerimiento estructural indispensable para el movimiento transbicapa de los lípidos.

No obstante, la cantidad de funciones que pudieran sustentarse en una organización no lamelar de las membranas no es muy grande: la variedad de especies lipídicas excede ampliamente el número de eventos potencialmente basados en dicha estructura lipídica. Así, el rol del polimorfismo dentro de la organización de las membranas es un problema aún no resuelto.

ESTRUCTURA Y DINAMICA DE LOS LIPIDOS.

Los métodos físicos contribuyen a dilucidar los mecanismos moleculares que rigen los sistemas biológicos.

Para comprender el funcionamiento de las membranas biológicas es necesario ahondar el conocimiento de las propiedades fisicoquímicas y, en especial de la dinámica de los fosfolípidos. Los últimos avances en estos aspectos se sustentan en la aplicación de métodos tales como: difracción de rayos X y neutrones (44,45), calorimetría diferencial de barrido (46), y una diversidad de métodos espectroscópicos. Dentro de estos últimos, podemos mencionar la espectroscopía Raman (47), la resonancia magnética nuclear (48), la resonancia electrónica paramagnética (10, 49) y técnicas de fluorescencia y polarización de fluorescencia (50, 51).

Al describir el comportamiento fisicoquímico de los lípidos, el primer punto de interés es la estructura, es decir, la orientación promedio de las cadenas hidrocarbonadas y de los grupos polares y las amplitudes de fluctuación de estos segmentos. El segundo punto de interés se relaciona con las propiedades dinámicas, que comprenden los movimientos de cada uno de los segmentos de la molécula de fosfolípido, la velocidad de rotación axial de la cadena y su velocidad de difusión dentro de la bicapa lipídica. Dado que todas estas características dependen del estado físico del sistema, analizaremos la transición termotrópica gel-líquido cristalino antes de ilustrar sobre la naturaleza dinámica de la organización lipídica.

Las bicapas experimentan cambios abruptos en su organización a una temperatura característica.

Las membranas artificiales, así como la gran mayoría de las membranas

biológicas, sufren una transición de fase, desde un estado ordenado, denominado gel, a un estado desordenado, el líquido cristalino, al ser calentadas por encima de una temperatura característica: la temperatura de transición (T_t) (52). Esta transición de fase va acompañada de cambios en el empaquetamiento de las cadenas de ácidos grasos y de los grupos polares (53-56). Por rayos X se sabe que en el estado ordenado las cadenas hidrocarbonadas de DPFC están separadas por una distancia de $4,2 \text{ \AA}$, que corresponde a cadenas totalmente extendidas y estrechamente empaquetadas, en una conformación todo-"trans", o antiperiplanar. Por encima de la T_t el espaciado es de $4,6 \text{ \AA}$, y las cadenas presentan una movilidad considerable debido a la conformación parcialmente "gauche", o sinclinal (57). La transición de fase gel-líquido cristalino también provoca un aumento en el área por molécula (58), una disminución en la densidad (1,4%), y un aumento de 3,5% en el volumen de la bicapa de DPFC (52). Por encima de la T_t aumenta la permeabilidad del sistema, la hidratación de los grupos polares y la capacidad de incorporar compuestos exógenos, tales como iones o drogas liposolubles (59).

Algunas teorías describen detalladamente los mecanismos del cambio de estado.

La transición de fase gel-líquido cristalino es un proceso endotérmico caracterizado por la temperatura del punto medio de la transición, T_t , y la entalpía de la transición (ΔH). La gran mayoría de la evidencia experimental sugiere que se trata de un cambio de fase de primer orden: la variación de energía libre del proceso es cero y al menos una de las propiedades termodinámicas del sistema sufre una modificación abrupta (52, 60).

Varios autores (42, 52), han explicado la naturaleza de las transiciones de fase gel-líquido cristalino a través de la formación de dominios altamente fluctuantes. De acuerdo al tercer principio de la termodinámica, por encima

del cero absoluto todos los sólidos presentan "defectos" como, por ejemplo, sitios vacantes en su red cristalina. La agregación de estos sitios y la posterior entrada de las moléculas circundantes, originaría pequeños dominios líquido cristalinos en el seno de la fase gel. A medida que la temperatura aumenta, estos núcleos crecen hasta ocupar finalmente la totalidad de la superficie de la bicapa, cuando se alcanza la T_t . Así, en la zona de temperatura en la que ocurre la transición coexisten ambas fases. Mediante técnicas de microscopía electrónica se ha demostrado la existencia de dominios de tamaño finito en membranas naturales y artificiales (42, 61). Dado que la transición gel-líquido cristalino ocurre generalmente en un rango de temperatura (ΔT) bastante estrecho, se ha postulado que los eventos moleculares que la originan tienen carácter cooperativo, es decir que al pasar unas pocas moléculas de lípidos del estado ordenado al estado fluído, la energía necesaria para que las moléculas circundantes sufran la transición se va haciendo cada vez menor (62).

Las transiciones de fases en sistemas lipídicos también se caracterizan por el fenómeno de histéresis: el pasaje del estado ordenado al desordenado ocurre a una temperatura algo mayor que la transformación inversa, del estado desordenado al ordenado. La histéresis es más notable en lípidos cargados y en mezclas lipídicas (61). Al estudiar el comportamiento termotrópico de vesículas de fosfatidilcolina (63), se vió que, en general, el comportamiento de fase del sistema se podía expresar por el siguiente esquema:



Calorimétricamente se observaba la transición principal ($P_{\beta} \rightleftharpoons L_{\alpha}$) y la pre-transición ($L_{\beta} \rightleftharpoons P_{\beta}$) unos 10° C por debajo de la anterior. Posteriormente,

Stümpel y col. (64) encontraron que, dependiendo de las condiciones de conservación, las fosfatidilcolinas sustituidas simétricamente en posición 1 y 2 presentan una tercera transición de fase llamada subtransición.

La literatura muestra modelos teóricos (60, 65) capaces de predecir algunas de las propiedades de las transiciones de fase gel-líquido cristalino. Así, Marcelja (65) considera que la energía de una cadena hidrocarbonada con una dada conformación viene dada por la siguiente expresión: ‘

$$E = E_{int} + E_{VdW} + jA$$

El primer término E_{int} , representa la energía interna de la cadena y depende del número de isómeros "gauche" y "trans"; el segundo término describe las interacciones de Van der Waals, que dependen del orden en la bicapa, y el tercer término tiene en cuenta una variedad de interacciones como repulsiones estéricas, fuerzas electrostáticas y efectos hidrofóbicos. La magnitud de las interacciones entre moléculas lipídicas vecinas determinaría cómo cambia el ordenamiento de la bicapa con la temperatura.

Factores muy diversos modifican la temperatura de transición de los fosfolípidos hidratados.

Los fosfolípidos anhidros son sólidos de muy alto punto de fusión, debido a la presencia de fuerzas electrostáticas asociadas con las cabezas polares. Debe notarse que la temperatura de fusión es independiente de la longitud y del grado de insaturación de las cadenas hidrocarbonadas (20). Al agregar agua al sistema, se produce una disminución muy marcada de dicha temperatura, hasta alcanzar un valor límite (66).

La transición de fase gel-líquido cristalino no es un proceso directamente comparable con la fusión de hidrocarburos. La temperatura de fusión de

estos últimos es menor que la T_t de los fosfolípidos. Además, los valores de ΔH y ΔS para la transición de fase de fosfolípidos son menores que los correspondientes a la fusión de hidrocarburos de la misma longitud de cadena, lo que indica que las cadenas hidrocarbonadas en la bicapa "fundida" no están tan desordenadas como en un hidrocarburo líquido puro (67).

La T_t es una función de la longitud de la cadena: en fosfolípidos que poseen la misma cadena en ambas posiciones, la T_t aumenta entre 14° y 17°C por cada dos metilenos de incremento en la longitud (68). Otros factores que deben considerarse son la presencia de dobles enlaces y ramificaciones en la cadena hidrocarbonada: ambos provocan una disminución de ΔH y de la T_t . Estos parámetros alcanzan un mínimo cuando el doble enlace "cis" se encuentra en la posición 9 (69). Si la entalpía de la transición es proporcional a la mínima energía potencial de interacción E_o , entre las cadenas en la fase gel, como proponen Shapiro y Ohki (70), es posible demostrar (69) que se obtiene el valor más bajo para E_o cuando el doble enlace está en la posición 9.

La introducción de un doble enlace "cis" impide que se adopte la conformación "trans", por lo menos en una posición de la cadena. Aún si fuera seguido por una conformación "gauche", el retorcimiento ("kink"), que se genera, impide el estrecho empaquetamiento propio de la conformación todo "trans".

Por esta misma razón, las cadenas "trans"-insaturadas presentan una T_t más alta que las "cis"-insaturadas.

Estudios recientes (71) muestran que, si bien la introducción del primer doble enlace "cis" en la DEFC, baja la T_t casi 50°C y el segundo doble enlace lo baja 22°C más; la incorporación del tercer y cuarto doble enlace no produce una disminución adicional de la T_t . Estos datos sugerirían

la falta de relación lineal entre las propiedades físicas y el grado de insaturación.

La naturaleza del grupo polar claramente afecta la T_t . La DMFE dispersada en agua, presenta una transición de fase a 49°C , 25°C por encima de la DMFC. Esto tiene su origen en el empaquetamiento más efectivo de la fosfatidiletanolamina, debido al menor tamaño de la cabeza polar y a la formación de pares iónicos entre los grupos fosfato y amino de moléculas adyacentes (72). Además de la temperatura de transición gel-líquido cristalino, las fosfatidiletanolaminas insaturadas exhiben una transición reversible de la fase lamelar a la hexagonal, ubicada dentro de los 10°C por encima de la transición principal (24).

La T_t de bicapas de fosfolípidos, en especial los cargados negativamente, es influenciada por factores tales como el PH, la fuerza iónica y la presencia de cationes bivalentes (42, 68, 73). La T_t de la fosfatidilcolina se mantiene constante entre PH 3 y 12, y aumenta a PH menor que 3 por neutralización del grupo fosfato. El efecto contrario ocurre en la fosfatidiletanolamina: la T_t permanece constante hasta PH 9 y disminuye por encima del mismo, debido a la neutralización del grupo amino. La adición de Ca^{+2} y Mg^{+2} puede producir un aumento en la T_t de los fosfolípidos cargados negativamente (73). El Ca^{+2} se une directamente al grupo fosfato, neutralizando una parte de su carga negativa y restringiendo la movilidad del grupo polar. El Mg^{+2} también se une al grupo fosfato, pero no tan fuertemente como el Ca^{+2} y sin afectar demasiado la movilidad del grupo polar. Los efectos de los cationes monovalentes son mucho menores.

Otras sustancias exógenas, como anestésicos o drogas (74, 75) también pueden alterar la T_t y el grado de empaquetamiento de la bicapa.

Del análisis de los diversos factores que afectan el cambio de estado, puede concluirse que aquéllos que debilitan las interacciones lípido-lípido en la fase gel, provocan una disminución de la T_t gel-líquido cristalino.

Las cadenas hidrocarbonadas 1 y 2 de los fosfolípidos no son conformacionalmente equivalentes.

Si bien desde el punto de vista químico, las dos cadenas de ácidos grasos de la DPFC son completamente equivalentes, el correspondiente espectro de ^2H RMN(76) se puede explicar sólo mediante un modelo conformacional en el que los primeros segmentos de las dos cadenas tengan distinta orientación promedio respecto a la superficie de la bicapa. En particular, la cadena 1 se extiende perpendicular a dicha superficie en todos los segmentos, mientras que la cadena 2 presenta el primer segmento CH_2 paralelo al plano de la membrana, para luego doblarse en dirección perpendicular al mismo.

De esta forma, la cadena 1 penetra más profundamente en la región hidrofóbica que la cadena 2, y esto podría originar problemas de empaquetamiento. En los lípidos encontrados naturalmente en las membranas biológicas, la cadena 2 es generalmente más larga que la cadena 1 (77) compensándose así los defectos en la interacción con las moléculas vecinas.

Del análisis de diversas organizaciones lipídicas (78-80) se deduce que las diferencias entre las cadenas 1 y 2 de los fosfolípidos, constituyen un fenómeno conformacional generalizado, presente tanto en membranas naturales como artificiales(78) e independiente del estado físico (79,80) de la bicapa lipídica.

La flexibilidad de las cadenas en el estado líquido cristalino reside en las rápidas isomerizaciones "trans" "gauche" de los enlaces C-C.

La Figura 13 muestra algunas posibles conformaciones de las cadenas

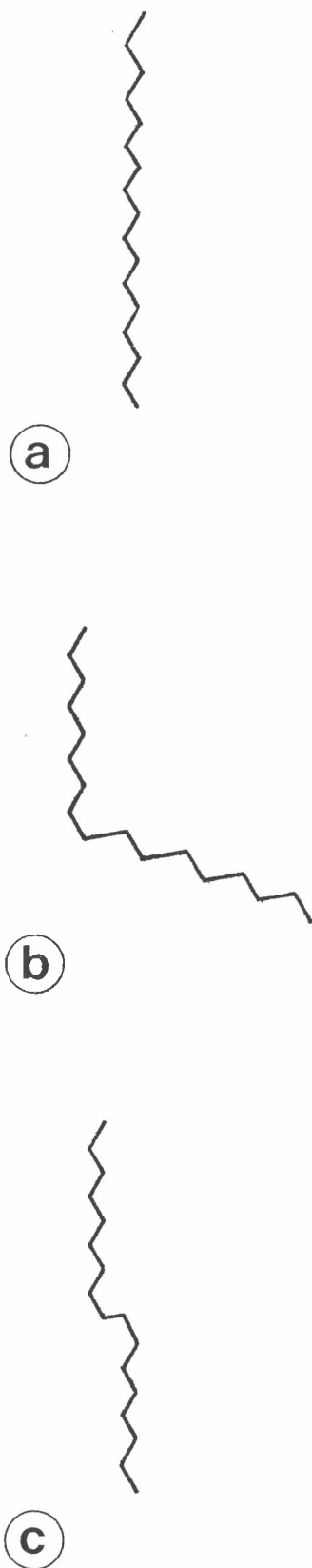


FIGURA 3. Conformaciones de una cadena hidrocarbonada obtenidas al introducir conformémeros "gauche": a) conformación todo-"trans", b) conformación obtenida al introducir un conformémero "gauche", c) conformación obtenida por la combinación "gauche" + "trans"-"gauche" o "kink".

hidrocarbonadas de los fosfolípidos (81). A temperaturas suficientemente bajas, por debajo de la T_t , los enlaces C-C exhiben una conformación todo "trans" (Figura 3 a), que permite un empaquetamiento muy efectivo. Pero, al elevarse la temperatura a valores cercanos, aunque inferiores a la T_t , Yellin y Levin(82) demostraron que el espectro Raman de algunas fosfatidilcolinas saturadas, mostraba picos característicos de rotamería "gauche" en el extremo metilo del ácido graso.

Por encima de la T_t se produce un aumento de las isomerizaciones "trans" -"gauche". Debido a la alta frecuencia de estos procesos (10^{10} seg^{-1}), las cadenas de ácidos grasos pueden asumir conformaciones muy distintas en períodos cortos de tiempo(83). La formación de un estado "gauche" aislado (Figura 3 b) es energéticamente desfavorable, pues provoca una reorientación de todos los segmentos impidiendo el empaquetamiento paralelo de las cadenas hidrocarbonadas. En cambio, la combinación de las conformaciones "gauche"⁺ - "trans" - "gauche"⁻, o "kink", (Figura 3 c), ejerce un efecto compensador, permitiendo una mejor acomodación de la estructura desordenada en el entorno restringido de la bicapa. Para DMFC, DPFC y DEFC, en el estado líquido-cristalino, el número de estructuras "gauche" calculadas a partir de los correspondientes espectros Raman es 7, 8-9 y 13-15, respectivamente (82).

El parámetro de orden no refleja las velocidades de los movimientos, sino la orientación promedio de los segmentos de la cadena.

Mediante el empleo de la técnica de ^2H RMN y marcando selectivamente cada segmento de la cadena hidrocarbonada, es posible medir el parámetro de orden de los segmentos individuales y calcular el parámetro de orden molecular: S_{mol} (84), que es directamente comparable con el obtenido mediante la

técnica de RPE (85). Las variaciones en el valor de S_{mol} se deben a las isomerizaciones "trans"- "gauche" de los enlaces C-C y a los movimientos que originan una inclinación de la cadena respecto de la normal (48). Pero S_{mol} sólo detecta las fluctuaciones angulares promedio respecto a la normal a la bicapa, ya que la frecuencia de las isomerizaciones es mayor (10^{10} seg^{-1}) que la frecuencia de resonancia del deuterio (10^7 seg^{-1}) (84).

Si las cadenas adoptan una conformación todo "trans" y rotan alrededor del eje mayor, S_{mol} vale 1. Por el contrario, si el movimiento es estadístico a través de todos los ángulos del espacio, S_{mol} vale 0. Es posible construir un perfil de orden de la bicapa lipídica, que muestra las variaciones de S_{mol} con la localización del segmento en la cadena del ácido graso. Para la DPFC, por encima de la T_t (86), S_{mol} vale aproximadamente 0,5, lo que indica una considerable flexibilidad, y se mantiene constante entre los carbonos 2 y 9, disminuyendo luego rápidamente hacia el metilo terminal.

En cambio, empleando la técnica de RPE y marcando los ácidos grasos con un grupo doxilo en distintas posiciones de la cadena hidrocarbonada (85), se encuentra que el parámetro de orden disminuye continuamente desde posiciones próximas al carboxilo hasta el metilo terminal. Este mismo efecto puede apreciarse también en vesículas preparadas con lípidos naturales (87,88), surgiendo así el concepto de "gradiente de flexibilidad" de la bicapa lipídica.

Ya que las coincidencias generales obtenidas con los distintos métodos espectroscópicos sugieren que las perturbaciones introducidas por los marcadores de "spin" no son importantes, las discrepancias observadas se han atribuido a las distintas escalas de tiempos de la RMN y la RPE (10). No obstante, ambas técnicas evidencian un aumento del desorden o una mayor amplitud de movimientos en los segmentos próximos al metilo terminal, es decir,

en la región central de la bicapa lipídica.

Mc Farland y Mc Connell(88) han sugerido, a partir de experimentos con marcadores de "spin" en lecitina de huevo por encima de la T_t , una inclinación promedio de 25° a 30° para los segmentos próximos al grupo carboxilo. Contrariamente, las determinaciones de RMN(89) excluyen cualquier inclinación colectiva de las cadenas hidrocarbonadas con una vida media mayor que 10^{-6} seg, siendo esta última hipótesis la más aceptada hasta ahora. Por debajo de la T_t , las cadenas están totalmente extendidas, adoptando la conformación todo-"trans". Tardieu y col.(90) por difracción de rayos X, mostraron que la DPFC al pasar del estado anhidro al hidratado, varía el ángulo de inclinación de las cadenas de ácidos grasos, de 0° a $30^\circ - 40^\circ$ C. Además, Rand y col.(91) encontraron que durante la pretransición, entre 35° y 42° C, las cadenas están todavía estrechamente empaquetadas, pero orientadas perpendicularmente al plano de la bicapa.

Basados en las isomerizaciones "trans" - "gauche", es posible calcular las distancias entre los segmentos de una cadena a partir de los correspondientes parámetros de orden, para luego evaluar la longitud de cadena promedio del ácido graso en la membrana(86). Para DPFC y DPFS por encima de la T_t , la teoría predice un espesor de la bicapa entre 33 y 35 \AA . Este valor es aproximadamente 10 \AA menor que el espesor de la bicapa en el estado sólido cristalino, determinado por difracción neutrónica (92).

Las cabezas polares de la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina presentan distinto grado de empaquetamiento.

Si bien la comprensión de la estructura de la cabeza polar es todavía limitada, se han realizado progresos en el estudio de la fosfatidilcolina y

la fosfatidiletanolamina mediante técnicas de rayos X, difracción neutrónica y RMN (93). En dispersiones acuosas, por encima y por debajo de la T_t , los experimentos de RMN (83) indican que los dos fosfolípidos adoptan conformaciones similares. Más aún, esas estructuras se correlacionan muy bien con las encontradas en el sólido cristalino (78,94).

Las interacciones electrostáticas intra e intermoleculares dan origen a una conformación en donde el grupo amino sufre una torsión en la dirección del grupo fosfato, mientras que la cabeza polar en conjunto se ubica paralelamente al plano de la bicapa (93,95). Las disímiles propiedades fisicoquímicas de la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina (72) no pueden explicarse sobre la base de diferencias conformacionales, sino a las características de hidratación y a la capacidad para formar puente de hidrógeno de ambos fosfolípidos (96). Los grupos fosforiletanolamina forman una red compacta, estabilizada por fuertes interacciones electrostáticas y puentes de hidrógeno entre el nitrógeno del grupo amonio y los oxígenos del fosfato. En cambio, la fosfatidilcolina exhibe un empaquetamiento menos efectivo, en el que las moléculas de agua de hidratación forman puentes de hidrógeno con los oxígenos del enlace fosfato, disminuyendo las repulsiones entre grupos con la misma carga.

Las cadenas de ácidos grasos experimentan movimientos dentro y fuera del plano de la bicapa.

El ordenamiento de la cadena hidrocarbonada y las velocidades de los movimientos, son dos parámetros independientes que caracterizan la estructura y la dinámica, respectivamente, de la organización lipídica. La Figura 4 es una representación esquemática de los movimientos moleculares en la bicapa, a los que deben agregarse las isomerizaciones "trans"- "gauche" mostradas en la Figura 3. Para los conformeros "trans"- "gauche" (52), la diferencia

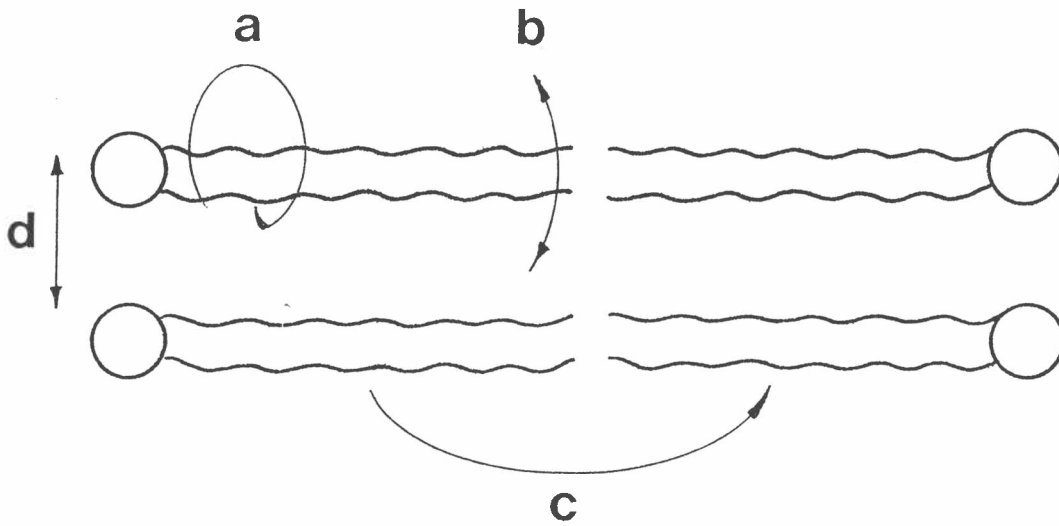


FIGURA 4. Representación esquemática de los movimientos moleculares en bicapas: a) rotación, b) movimiento segmental, c) "flip"~"flop", d) difusión lateral.

de energía libre es aproximadamente 0,5 Kcal/mol, la energía de activación vale 3,6 Kcal/mol y la frecuencia del movimiento es 10^{10} seg^{-1} .

El tiempo de relajación T_1 , medido por ^2H RMN provee información acerca de los movimientos segmentales (84,97), pero no depende sólo de la velocidad de los mismos, proporcional al tiempo de correlación, \overline{J}_c , sino también del parámetro de orden S_{mol} . La dependencia de \overline{J}_c con la posición del segmento es similar al perfil de orden de la bicapa: los tiempos correlación más cortos corresponden a la zona del metilo terminal. La movilidad rotacional ha sido extensamente estudiada y mediante técnicas de ^{13}C RMN se ha podido determinar la constante de difusión rotacional (52). Actualmente, se emplean para estos fines diversos marcadores fluorescentes (50).

Numerosas evidencias experimentales sugieren que los lípidos pueden moverse en el plano de la bicapa y que este movimiento es muy rápido. Por RPE, Devaux y Mc Connell (98) estimaron que el coeficiente de difusión lateral de la fosfatidilcolina, marcada con un grupo doxilo, vale $1,8 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{seg}$ a 25° C , encontrándose valores similares en vesículas de fosfatidilcolina de huevo (99). El coeficiente de difusión lateral aumenta con la temperatura, especialmente por encima de la T_t y decrece con la incorporación de colesterol (100).

En contraste con la rápida difusión de los fosfolípidos en el plano de la bicapa, el movimiento de intercambio entre uno y otro lado de la bicapa ("flip-flop") es muy lento en bicapas artificiales. Este proceso requiere una energía de activación muy alta, ya que involucra el pasaje de los grupos polares a través del interior de la bicapa. En vesículas de lecitina de huevo, a 30° C , el tiempo de vida medio del proceso fue estimado en 6,5 horas (101), correspondiendo a una probabilidad de 0,07/hora para el pasaje de una dada molécula de un lado al otro de la bicapa.

¿Qué es la fluidez?

El término fluidez permite restringir los alcances de la expresión, más general, "propiedades físicas". Estas últimas incluyen interacciones iónicas entre las cabezas polares, potenciales de membrana, movimientos de las proteínas y otros fenómenos asociados. La fluidez se refiere, específicamente, al estado físico de las cadenas de ácidos grasos que forman la bicapa lipídica. Se ha desarrollado una asociación entre la fluidez usada en este sentido y el usado por Singer y Nicolson (102) indicando movilidad lateral y rotacional. Algunos autores (83) consideran la fluidez como sinónimo de propiedades dinámicas, es decir, que involucraría las velocidades de los movimientos, pero no el ordenamiento molecular. Sin embargo, la acepción más generalizada del término se refiere a ambos tipos de propiedades, las que deben ser determinadas separadamente para conocer el sistema lipídico sin ambigüedades.

Un análisis cuantitativo de la fluidez (103) describe la bicapa lipídica en dos términos: uno referido a la velocidad de los movimientos de las cadenas hidrocarbonadas, y el otro relacionado con el rango o alcance angular de los movimientos. Es posible clasificar los parámetros extraídos de las diversas técnicas en alguno de estos dos términos, tal como se muestra en la Tabla II. Las técnicas de fluorescencia y REP emplean marcadores diversos, cada uno de los cuales refleja, en una forma que les es propia, la dinámica de las cadenas hidrocarbonadas adyacentes.

La anisotropía de fluorescencia estacionaria (r_s) del 1,6-difenil - 1,3,5-hexatrieno (DPH), se empleó originalmente para calcular la microviscosidad de la membrana (50). Estudios posteriores evidenciaron que r_s contiene contribuciones tanto de la velocidad como del alcance del movimiento del marcador (104). Midiendo la velocidad de cambio de la anisotropía de

TABLA II

CLASIFICACION DE LOS DIVERSOS PARAMETROS RELACIONADOS CON LA FLUIDEZ
LIPIDICA.

Parámetros relacionados con:

a. El rango del movimiento	b. La velocidad del movimiento	c. El rango y la velocidad del movimiento
Parámetro de orden (S)	constante de difusión rotacional (R)	anisotropía de fluorescencia estacionaria (r_s)
ángulo del cono (θ'_c)	constante de difusión precesional (D_w)	microviscosidad (η)
anisotropía de fluorescencia límite (r_∞)	constante de difusión lateral (D_L)	tiempo de relajación (T)

fluorescencia con el tiempo, es posible separar ambas contribuciones en una constante de difusión precesional (D_w) y una anisotropía de fluorescencia límite r_∞ , tal como lo muestra la Tabla II.

Diversos factores modifican la fluidez de la bicapa lipídica.

Mientras que el ángulo entre dos enlaces simples C-C adyacentes es 111° , el ángulo entre un simple enlace y un doble enlace es 123° . Si la cadena está totalmente extendida, la rigidez que introduce el doble enlace crea una curvatura que no puede ser totalmente compensada por combinaciones de rotámeros "trans" y "gauche" en otros carbonos (103). Así, la molécula no puede empaquetarse tan eficientemente como lo haría una cadena totalmente saturada, produciéndose un aumento en la sección transversal por cadena de ácido graso (105), una disminución del espesor de la bicapa y un consiguiente aumento de la fluidez (57).

Al comparar la DPFC con la PUFC por ^2H RMN (106) y fluorescencia (107) se encuentra que en la última, la introducción de un doble enlace "cis" provoca un aumento tanto de la velocidad como del alcance del movimiento. No obstante, la región del doble enlace en sí, es menos flexible que el resto de la cadena. El perfil de orden medido por ^2H RMN (106) exhibe un máximo en dicha región debido a la configuración impuesta por el doble enlace y no a una restricción en el alcance del movimiento.

La posición del doble enlace también juega un rol importante: el tiempo de relajación T_2 , medido por ^{13}C RMN, que es sensible a las isomerizaciones "trans" - "gauche", alcanza un máximo cuando el doble enlace "cis" se encuentra en la posición 9 (69), independientemente de la ubicación del carbono marcado. La introducción de un segundo doble enlace, también provoca un

aumento adicional de la fluidez (57, 103). En cambio, un incremento ulterior en el número de dobles ligaduras no ejercería un efecto apreciable (103). Como puede observarse, el grado de insaturación y la fluidez de la bicapa lipídica, no están relacionados en una forma sencilla y directa.

Además de los ácidos grasos, las cabezas polares de los fosfolípidos, su carga y estructura pueden afectar la fluidez de las membranas. Así, los movimientos de la cabeza polar y de las cadenas hidrocarbonadas aumentan cuando, por efecto del PH, la fosfatidiletanolamina se encuentra cargada negativamente (108). La atracción entre los grupos amino y fosfato disminuye hasta hacerse repulsiva, se dificulta el empaquetamiento lateral y aumenta la sección transversal efectiva de las moléculas permitiendo entonces una mayor movilidad, tanto de las cabezas polares como de las cadenas hidrocarbonadas. Resultados equivalentes se encontraron al aumentar la densidad de carga superficial en fosfolípidos cargados negativamente (43, 109). Empleando marcadores de "spin" (110), se pudo demostrar que, en condiciones fisiológicas, la fosfatidilcolina es más fluida que la fosfatidiletanolamina debido, como se explicó anteriormente (93), al alto grado de empaquetamiento de este último fosfolípido.

Con el objeto de discriminar la incidencia de las cabezas polares y de los ácidos grasos, sobre la fluidez lipídica, Gilmore y col. (111) midieron las propiedades dinámicas de fosfolípidos extraídos de diversas membranas naturales. Las diferencias halladas se deberían mayoritariamente a la diversidad en la composición de las cabezas polares y en menor proporción a las diferentes composiciones de ácidos grasos.

LA INTERACCION FOSFOLIPIDO-FOSFOLIPIDO.

Las mezclas de fosfolípidos químicamente distintos presentan generalmente inmiscibilidad en la fase gel.

Las propiedades de mezclas lipídicas pueden estudiarse mediante diagramas de fase, que son esencialmente relaciones de variables termodinámicas tales como temperatura, presión y composición (52). Experimentalmente se determina la variación con la temperatura de algún parámetro de la bicapa o de un marcador localizado en ella, estableciéndose así las condiciones para la coexistencia en equilibrio de la fase gel y líquido cristalino. El caso más simple es el de aquellos sistemas que presentan completa miscibilidad en la fase líquida y sólida, tales como las mezclas de fosfolípidos con la misma cabeza polar y cuyas cadenas hidrocarbonadas difieren hasta en dos átomos de carbono (110). Dichos sistemas exhiben una sola transición de fase aunque el rango de temperatura (ΔT) de la misma es más amplio que en las especies puras (110, 112). Cualquier otra combinación de fosfolípidos origina inmiscibilidad en la fase gel o en la fase líquido cristalino, surgiendo así el concepto de separación lateral de fases en el plano de la bicapa lipídica (110, 113).

Las mezclas binarias de DMFC-DPFC y DEFC-DPFC estudiadas por RPE (110), fluorescencia (112) y calorimetría diferencial de barrido (114, 115), muestran una completa miscibilidad en ambas fases, evidenciada por la variación continua en las pendientes de las curvas del sólido y del líquido, en los correspondientes diagramas de fase. En cambio, los diagramas de fase de las mezclas DMFC-DPFE y DPFC-DPFE, entre otros (116), muestran una discontinuidad en la curva del sólido atribuible a una parcial inmiscibilidad en la fase gel. Si bien

los estudios de Wu y Mc Connell (117) sugirieron la posibilidad de inmiscibilidad en la fase líquido cristalino para el sistema DEIFC-DPFE, experimentos muy recientes de Silvius (118) niegan tal posibilidad.

¿Cuáles son las fuerzas que promueven la separación lateral de fases?

El análisis de los diagramas de fase en mezclas de lípidos sirve para conocer la naturaleza del arreglo lipídico y los factores que influyen su interacción (119). Mediante el uso de la mecánica estadística, es posible predecir diagramas de fase (75, 120) para distintas mezclas fosfolipídicas y generar parámetros que describan el grado de no idealidad en el cristal líquido y la fase gel. Para una mezcla binaria, de A y B, puede definirse el parámetro de no idealidad U como:

$$U = \frac{X_{A-B}}{Z X_A X_B}$$

donde U es una medida del arreglo lateral lipídico en una mezcla binaria; X_A y X_B son las fracciones molares de las asociaciones de A entre sí y B entre sí, respectivamente; X_{A-B} es la fracción molar de las asociaciones de A y B entre sí, y Z es el promedio de moléculas vecinas para cada tipo particular de arreglo. Si no hay exceso de fuerzas atractivas o repulsivas, las moléculas de A y B se disponen al azar en configuraciones de igual energía y $U = 1$. Si las interacciones son repulsivas, en el límite, el sistema se separa en una región de A puro y otra de B puro, con una sola línea de contacto A-B y $U = 0$. Si las fuerzas son atractivas, las moléculas se distribuyen de manera tal de maximizar las interfases A-B y en ese caso $U = 2$. Para $U = 0$ y $U = 2$ los tamaños de los dominios son ∞ y 1, respectivamente, presentando

el sistema una sola configuración.

Las propiedades de las mezclas de lípidos dependen de las interacciones entre las cabezas polares y las cadenas de ácidos grasos. La fuerza impulsora, para una separación de fases, es la minimización de la energía libre, maximizando la interacción entre los fosfolípidos, a fin de evitar las tensiones que generaría una distribución al azar de especies químicas muy diferentes (52). Con respecto a las cadenas hidrocarbonadas, se sabe que la interacción entre dos fosfatidilcolinas es mayor cuando la longitud de las cadenas hidrocarbonadas es la misma. En efecto, la presencia de fosfolípidos con distinta longitud de cadena origina espacios vacíos en el centro de la bicapa y un aumento de los movimientos a lo largo de los enlaces C-C, dificultándose así la interacción entre moléculas vecinas (75). Con respecto a las cabezas polares, la presencia de grupos dadores y aceptores de puente de hidrógeno en la misma molécula, le permite a los fosfolípidos interactuar entre sí y con las proteínas (96). Las mezclas de fosfatidiletanolamina-fosfatidilcolina (116, 117, 121), fosfatidilcolina-fosfatidilserina (122) y fosfatidilcolina-esfingomielina (123) presentan desviaciones negativas de la idealidad, encontrándose en algunos casos una completa separación de fases en el estado gel (122).

Las interacciones entre moléculas de fosfolípidos determinan su distribución asimétrica en vesículas pequeñas.

La organización de fosfolípidos en vesículas mixtas ha sido explicada sobre la base del tamaño de la cabeza polar (17, 34) y las propiedades atractivas o repulsivas en las interacciones fosfolípido-fosfolípido (96). Las atracciones o el empaquetamiento estrecho entre las cabezas permitirían a los

lípidos ubicarse en la monocapa interna, mientras que las fuerzas repulsivas favorecerían su acomodación en la monocapa externa con mayor superficie.

El aumento de la preferencia de la fosfatidilserina por la monocapa interna al bajar el PH, se basa en la disminución de la carga negativa sobre el carboxilo (124). A PH = 11 la fosfatidiletanolamina se ubica igualmente en las caras internas y externas, lo que concuerda con la pérdida de su capacidad para dar puente de hidrógeno (108).

Algunos autores sostienen que el comportamiento de las mezclas lipídicas se relaciona, en mayor medida, con las propiedades de las cabezas polares que con la estructura de las cadenas hidrocarbonadas (111, 125). Otros autores, en cambio, le otorgan un peso equivalente a ambos factores (126). Así, en vesículas pequeñas formadas por fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina de huevo, esta última se ubica en la cara externa cuando su concentración es baja (127). Por el contrario, en mezclas de DMFE y DMFC no se detecta una ubicación preferencial del primer fosfolípido en todo el rango de concentraciones (128). Estos experimentos demuestran que la naturaleza de las cadenas hidrocarbonadas pueden afectar la distribución trans-bicapa de los fosfolípidos.

Al estudiar la distribución de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina de huevo en vesículas grandes unilamelares, se vió que los componentes estaban igualmente distribuidos en ambas monocapas para un amplio rango de concentraciones (126). La ausencia de una distribución preferencial en vesículas grandes, sugiere que otros componentes de la membrana deben jugar un rol importante en el mantenimiento de la asimetría en las membranas naturales.

LA INTERACCION COLESTEROL-FOSFOLIPIDO.

El colesterol ejerce una amplia variedad de efectos sobre las propiedades físicas de los sistemas lipídicos.

Experimentos realizados en monocapas muestran que la incorporación de colesterol, por encima de la temperatura de transición, provoca una disminución de la sección transversal por molécula (129, 130). Este efecto condensante se basa en una reducción de la flexibilidad de las cadenas hidrocarbonadas, debido a la influencia del colesterol en las isomerizaciones "trans"- "gauche" de los grupos metileno. En bicapas, por RPE (85) y RMN (131), se determinó que el colesterol interacciona con las cadenas de ácidos grasos, por encima de la T_t , disminuyendo también su flexibilidad. Es interesante destacar que dicho efecto condensante no se manifiesta sobre la DLiFC (132). Por debajo de la T_t , la presencia del colesterol inhibe la cristalización cooperativa de las cadenas hidrocarbonadas, ejerciendo un efecto fluidificante (7). Desordenando el empaquetamiento de los ácidos grasos a bajas temperaturas y reduciendo su flexibilidad a altas temperaturas, el colesterol crea un estado de fluidez intermedia (133) en la organización lipídica.

Con respecto al parámetro de orden, por encima de la T_t el colesterol aumenta el orden de la cadena hasta el carbono 10, pero no ejerce efecto sobre los segmentos ubicados en el centro de la bicapa. En la fase gel, en cambio, todas las posiciones de la cadena hidrocarbonada experimentan un aumento de S_{mol} (131). La inclusión de colesterol en una membrana debería provocar un aumento del espesor de la bicapa debido a la tendencia de las cadenas hidrocarbonadas a adoptar la conformación todo-"trans" (134). En efecto, el colesterol aumenta el espesor de la bicapa, si los ácidos grasos tienen hasta

16 átomos de carbono de longitud. En cambio, el espesor de la bicapa disminuye si el fosfolípido presenta cadenas de 18 átomos de carbono. El colesterol no es tan largo como una cadena con 18 átomos de carbono, y así el ácido graso debe doblarse para compensar el defecto de empaquetamiento (134).

La difusión lateral de fosfolípidos en presencia de colesterol ha sido estudiada usando técnicas de fluorescencia y RMN. Ambas medidas indican que el colesterol ejerce efectos no muy pronunciados sobre la difusión lateral en la mayoría de los casos (100, 135). Un efecto marcado se observa en la DMFC en fase gel. 20 moles por ciento de colesterol inhiben la formación de dicha fase gel y provocan un aumento en la difusión lateral (100).

Uno de los efectos más conocidos del colesterol es la eliminación de la transición de fase aguda y altamente cooperativa en bicapas de DPFC con 20- 25 moles por ciento del esteroles (135). Resultados análogos se encuentran en bicapas de DMFC (136). La T_t no se modifica, pero sí aumenta el rango de la transición (ΔT).

Algunos modelos describen el comportamiento del colesterol en bicapas lipídicas.

Los modelos más consistentes que explican la interacción colesterol fosfolípido en membranas proponen la formación de complejos cuando se alcanzan niveles de 20, 33,3 y 50 moles por ciento de colesterol. Tales esquemas se basan en mediciones calorimétricas (4), difracción de rayos X (137), fluorescencia (100), microscopía electrónica (138), RMN (139) y RPE (140).

Durante algún tiempo se sostuvo la existencia de uniones por puente de hidrógeno entre el OH en el C_3 y los grupos carbonilo de los fosfolípidos (141, 142). No obstante, como resultado de los trabajos de Yeagle y col.

(143) con $^{31}\text{PRMN}$, esa suposición ha sido descartada. Otro mecanismo para la inmovilización de fosfolípidos por efecto del colesterol, involucra la interacción de la cara α plana y sin sustituyentes en posición axial, con las cadenas hidrocarbonadas (137). Pero las interacciones de Van der Waals por sí solas no alcanzan para abolir la transición gel-líquido cristalino de los fosfolípidos. Por lo tanto, algún tipo de interacción con las cabezas polares debe contribuir al efecto observado del colesterol en organizaciones lipídicas. La presencia de un OH con configuración β en el C_3 parece ser esencial, ya que el epicolesterol (OH con configuración α) tiene propiedades muy distintas a las del colesterol (144).

La desaparición completa de cualquier transición calorimétrica cuando hay 50 moles por ciento de colesterol (136) sugiere que cada molécula de colesterol se compleja con una de fosfolípido, excluyéndola de participar en la transición de fase. Algunos experimentos recientes (145) proponen para el grupo C=O, en presencia de colesterol, una conformación similar a la del fosfolípido anhidro cristalino. La observación cuidadosa de los modelos con DPFC en el estado cristalino, muestra la factibilidad de un puente de hidrógeno colinear entre el OH en el C_3 del colesterol y el oxígeno del glicerol esterificado con la cadena del ácido graso en el C_2 (145).

El agregado de colesterol a una estructura lipídica promueve la formación de diversos complejos con los fosfolípidos (145). Por debajo de 20 moles por ciento de colesterol, se separarían zonas formadas por una molécula de colesterol con dos de fosfolípidos. Estos dominios coexistirían con fosfolípidos libres, responsables de la transición calorimétrica gel - líquido cristalino. Cuando la concentración alcanza los 20 moles por ciento de colesterol, no es posible encontrar fosfolípidos libres permaneciendo, además de aquellos complejados con el esterol, los fosfolípidos interfaciales. Estos últimos desaparecen a una concentración igual a 33,3 moles por ciento de colesterol y, a una proporción de 50 moles por ciento

existen solamente complejos 1:1 colesterol-fosfolípido. La adición posterior de colesterol origina una separación de cristales de colesterol hidratados del seno de la bicapa (129).

Además de la presencia del OH en configuración β en el C₃ y el anillo esteroideo plano, ya mencionados, una cadena lateral móvil de por lo menos cuatro átomos de carbono, en el C₁₇, parece ser también un requisito indispensable para la interacción colesterol-fosfolípido. Por difracción neutrónica y de rayos X (6), se sabe que el anillo esteroideo se encuentra contiguo al segmento proximal de las cadenas de ácidos grasos, mientras que la cadena lateral en C₁₇ se extiende hacia el interior de la bicapa lipídica. De esta forma, se esperaría un gradiente de fluidez a lo largo de la región de contacto colesterol fosfolípido y los experimentos por ²HAMN así parecen confirmarlo (86).

El colesterol no presenta la misma afinidad por todos los fosfolípidos.

En mezclas de fosfolípidos que no presentan separación de fases, el colesterol se distribuye uniformemente. En mezclas de DOFE-DPFC, el colesterol interactúa preferentemente con la fosfatidilcolina, ya sea a temperaturas en las cuales ambas especies están en estado fluido o a temperaturas donde ya ocurrió una separación de fases (24). La interacción colesterol-fosfatidiletanolamina es termodinámicamente poco favorable (146) porque la inserción del esteroide destruiría las interacciones intermoleculares entre los grupos amino y fosfato de las cabezas polares (96).

Diversos autores (52, 147, 148) han demostrado que en mezclas con fosfolípidos, el colesterol muestra el siguiente orden de afinidades: esfingomiélin >> fosfatidilserina > fosfatidilcolina >> fosfatidiletanolamina,

independientemente de la temperatura de transición del lípido en particular. Además, Gruyer y Bloch (149) demostraron que el colesterol rigidiza vesículas con diferentes composiciones de ácidos grasos en el siguiente orden: fosfatidilcolinas disaturadas > fosfatidilcolinas monoinsaturadas > fosfatidilcolinas di-insaturadas. Estas asociaciones sugieren que la distribución del colesterol en las membranas biológicas no es al azar, ejerciendo un importante rol fisiológico al promover separaciones laterales de fase isotérmicas.

En aparente contradicción con estos resultados, se ha encontrado recientemente que mezclas de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina en presencia de colesterol, muestran espectros de RMN consistentes con una distribución al azar del estero, sin interacciones preferenciales con ninguno de estos fosfolípidos (32).

CAPITULO II.

LAS INTERACCIONES LIPIDO - PROTEINA.

Las membranas biológicas están compuestas por cantidades variables de lípidos y proteínas. La composición lipídica es siempre heterogénea, e incluye principalmente diversos fosfolípidos y colesterol. La permutación de varias cabezas polares, longitudes de cadena y grados de insaturación da como resultado la existencia de miles de lípidos, de los cuales algunos cientos están presentes en la misma membrana. No obstante la composición lipídica y la relación lípido-proteína están perfectamente bien definidas y son una característica para cada membrana. Queda aún por resolver cómo se alcanza tal heterogeneidad, dado que los lípidos no están codificados en el genoma sino que resultan de sucesivas reacciones enzimáticas. También es necesario comprender acabadamente las ventajas fisiológicas de la compleja interrelación entre lípidos y proteínas en las membranas naturales. Esta

interrelación resulta tanto más sorprendente si se tiene en cuenta que las moléculas de proteína en sí poseen una limitada estabilidad conformacional dada por el entorno lipídico, que los componentes en una membrana biológica se mantienen unidos por fuerzas débiles y que los cambios de fase en los lípidos son procesos cooperativos. Podría pensarse, entonces, que los lípidos y proteínas se imponen mutuas restricciones, constituyéndose así en un sistema regulador de la estructura y funcionalidad de las membranas biológicas.

LAS PROTEINAS DE MEMBRANA.

No existen diferencias marcadas de polaridad entre las proteínas integrales y las solubles.

Es razonable suponer que la cantidad y tipo de proteína de una membrana particular refleje el nivel de actividad de esa membrana. Así, la membrana de mielina, que sirve para aislar fibras nerviosas, posee menos del 25% de su masa como proteína, mientras que en las membranas involucradas en la generación de energía (membrana interna de mitocondria y cloroplasto) el 75% es proteína. La membrana plasmática posee aproximadamente un 50% de masa proteica. Las proteínas de membrana han sido clasificadas en dos categorías generales: periféricas e integrales, basadas en la facilidad con la que pueden disociarse del sistema (102).

Las proteínas periféricas pueden ser liberadas en forma soluble, por tratamientos suaves, tales como cambios en el PH o en la fuerza iónica. Por eso se cree que están débilmente unidas a la membrana a través de interacciones iónicas con los grupos polares de los fosfolípidos. Las proteínas inte-

grales, en cambio, requieren para su aislamiento de tratamientos drásticos como el uso de detergentes o agentes caotrópicos (150). Los extremos hidrofóbicos del detergente se unen a las regiones hidrofóbicas de las proteínas, desplazando a las moléculas lipídicas. Como los detergentes también poseen extremos polares, las moléculas proteicas pasan a la solución como complejos detergente-proteína. Al extraer el detergente, las proteínas se hacen altamente insolubles y precipitan en medio acuoso. Por esta razón, resulta muy difícil la purificación de las proteínas integrales de membrana.

La polaridad de la molécula proteica deriva de la polaridad de las cadenas laterales de los aminoácidos constituyentes, los cuales pueden ser clasificados en tres grupos: polares, intermedios y no polares (151, 152). Sobre la base de la composición de aminoácidos, se le atribuyó un porcentaje de polaridad a las diversas proteínas. Al comparar un gran número de éstas, se concluyó que las proteínas solubles tienen un porcentaje de polaridad algo mayor que las de membrana. Midiendo la solubilidad de cada aminoácido en solventes de distintas polaridades, es posible asignarle un índice de hidrofobicidad y obtener de esta forma la hidrofobicidad promedio de las distintas proteínas (152). Pero tampoco por este método se han encontrado diferencias consistentes entre las proteínas integrales y las solubles.

De los intentos mencionados, se deduce que el contenido de residuos no polares no parece ser el factor determinante para la inserción de una proteína en una membrana, sino el arreglo espacial de esos residuos en la cadena polipeptídica. Así, las superficies hidrofóbicas que resultan de la estructura terciaria y cuaternaria no podrían ser detectadas por un análisis global de aminoácidos. Más aún, las secciones hidrofóbicas continuas son relativamente cortas y están balanceadas por secuencias hidrofílicas dispuestas externamente (2).

Se presentan diferentes mecanismos de interacción entre las proteínas integrales y la bicapa lipídica.

En la actualidad se conoce la estructura primaria de varias proteínas integrales. Algunas de ellas consisten en dominios hidrofílicos e hidrofóbicos, que se determinaron a partir de ensayos de proteólisis limitada (153). En efecto, para el citocromo b_5 la proteólisis origina un fragmento soluble en agua, que retiene la función biológica de la enzima y un segmento de 40 residuos que le permite asociarse con la bicapa lipídica. Otras proteínas con una estructura similar son la citocromo b_5 reductasa (154) y el citocromo P 450 (155).

Una de las proteínas de eucariotes mejor caracterizada es la glicoforina de la membrana del glóbulo rojo (156). Es una proteína transmembrana que posee el 60% de su masa en la cara externa donde se ubica el grupo amino hidrofílico. El grupo carboxilo terminal está expuesto al citoplasma, mientras que un segmento de aproximadamente 20 aminoácidos, con estructura de α hélice, atraviesa la bicapa.

Algunas proteínas de membrana con estructura cuaternaria manifiestan una naturaleza anfifílica por la presencia de subunidades hidrofóbicas. Tal es el caso de ciertas ATP asas (157) y la β glucuronidasa del retículo endoplásmico (158).

También existen proteínas de membrana con una alta hidrofobicidad, como la rodopsina (159) y la bacteriorodopsina (160). Es más, algunas proteínas están unidas covalentemente a ácidos grasos o a fosfolípidos para poder insertarse en la membrana. Ejemplos de este comportamiento lo dan la ATPasa del retículo sarcoplásmico (161) y la lipoproteína mureína de E.coli (162).

La interpretación de los espectros de dispersión rotatoria y dicroísmo circular de proteínas de membrana es difícil debido a la naturaleza particu-

lada de las muestras (163). Por difracción de rayos X (160) se ha podido determinar que la estructura de α hélice resulta energéticamente favorecida, para la interacción de la mayoría de las proteínas integrales con el entorno hidrofóbico de las membranas.

LAS PROTEINAS Y LAS BICAPAS LIPIDICAS.

¿Existe un microentorno lipídico para las proteínas integrales?

La inclusión de proteínas en bicapas de fosfolípidos puede afectar la estructura y la movilidad de los lípidos, dependiendo de las características particulares de la proteína y de la composición lipídica del sistema. No está claro aún, si este efecto se extiende a toda la organización o afecta únicamente a aquellos lípidos que se encuentran en contacto directo con la molécula proteica (116). Además se conoce que las proteínas integrales también son capaces de alterar la permeabilidad de bicapas de fosfolípidos (164).

Al estudiar el efecto de distintas proteínas sobre fosfolípidos cargados negativamente, se vio que aquellas cargadas positivamente ejercían efectos inmovilizantes, dependiendo del PH del medio (165). Van y Griffith (166), mediante técnicas de RPE, mostraron que una proteína periférica, como el citocromo b_5 , no ejercía efectos significativos sobre la fluidez de los lípidos en el estado líquido cristalino.

Los espectros de RPE de una serie de sistemas lípido-proteína reconstituidos (167, 168), muestran la presencia de dos componentes. Uno, es el característico de una bicapa fluida normal, y el otro corresponde a moléculas de lípido inmovilizadas, en contacto directo con la superficie de la proteína. La proporción de este componente inmovilizado depende directamente de

la cantidad de proteína presente y, para la citocromo oxidasa, se correlaciona bien con el perímetro de la proteína. Marsh y col. (169) han desarrollado métodos matemáticos para determinar la estequiometría de la interacción proteína - "ánulus" lipídico, a partir de los correspondientes espectros. Así se pueden obtener n_1 , el número de sitios de asociación de la proteína con los lípidos y K , la constante de disociación promedio del complejo.

Debe quedar claro cuál es el sentido de la expresión "lípidos inmovilizados". El término se emplea para significar que los lípidos del "ánulus" tienen sus movimientos restringidos, pero no implica que el tiempo de vida de la interacción lípido-proteína sea largo (116). Entonces, cuando se estudian por RMN una serie de proteínas reconstituídas en una matriz de lípidos deuterados (84, 170), el correspondiente espectro muestra un solo componente, es decir, un entorno lipídico homogéneo por encima de la T_t . Los experimentos evidencian: un rápido intercambio entre los lípidos adyacentes a la proteína y los lípidos generales, la ausencia de complejos lípido-proteína estequiométricos y un aumento del desorden proporcional a la cantidad de proteína agregada. Es más, dicho aumento del desorden es notorio cerca del metilo terminal, evidenciándose así un efecto opuesto al ejercido por el colesterol (170). Jähnig (171) explica estas discrepancias suponiendo que los lípidos adyacentes a una proteína tienen menos conformaciones "gauche" que aquéllos alejados de la misma, pero la orientación de sus ejes mayores, en promedio, no coincide con la normal a la bicapa. Debido a las distintas escalas de tiempo asociadas con ambas espectroscopías, la ^2H RMN detecta los movimientos combinados y la RPE registra sólo la reducción en el número de conformeros "gauche" (172).

Se han encontrado también "ánulus" lipídicos inmovilizados en otros sistemas enzimáticos: la apolipoproteína C (173), el sistema de la cito-

cromo P 450 oxigenasa (174), la glicoforina de glóbulos rojos reconstituida (175) y los receptores de acetilcolina en membranas de Torpedo californica (176).

Las proteínas integrales modifican las propiedades físicas de la bicapa lipídica.

La apolipoproteína C (173) puede hacer desaparecer la estructura de bicapa, al ser reconstituida en vesículas de DMFC, pero en general las proteínas integrales no parecen afectar la organización lamelar (116).

Los estudios por calorimetría diferencial (177) de barrido, muestran que las proteínas integrales reducen la entalpía de la transición gel-líquido cristalino. Los fosfolípidos adyacentes a la molécula proteica no participarían de la transición, permaneciendo en una configuración equivalente por encima y por debajo de T_t . En efecto, la citocromo C oxidasa mitocondrial reconstituida en vesículas de DMFC (178), no sólo disminuye la entalpía de la transición, sino que baja la T_t y aumenta el rango (ΔT) de la misma. La explicación más razonable para este último efecto parece ser la falta de cooperatividad en la transición, debido a los defectos introducidos por la proteína en la organización lipídica.

La (Ca^{+2}, Mg^{+2}) ATP asa de retículo sarcoplásmico, al ser incorporada en bicapas de DPFC, en una relación molar de lípido a proteína menor de 30, originó la desaparición de la transición de fase a $41^\circ C$ característica de la DPFC (168). Resulta curioso que la perturbación introducida por la proteína no se extienda más allá del "ánulus", ya que al reconstituir el sistema en una relación molar de lípido a proteína superior a 30, aparece la transición de fase de la DPFC a aproximadamente $41^\circ C$.

Dependiendo del efecto sobre la transición de fase, es posible clasificar a las proteínas en tres grupos (179): las que disminuyen el ΔH y la T_t del lípido (citocromo c oxidasa) (178); las que disminuyen ΔH pero no modifican la T_t (gramicidina A) y aquéllas que incrementan ΔH independientemente de los cambios en la T_t (ribonucleasa).

En cuanto a la estructura y movilidad de los lípidos, las proteínas ejercen efectos diferenciales por encima y por debajo de la T_t de los mismos. Por ^2H RMN (84) se encontró que las cadenas de ácidos grasos se desordenan en contacto con las regiones hidrofóbicas de las proteínas, sin que esto implique un aumento del espacio disponible para los movimientos conformacionales. Por el contrario, el número total de conformaciones posibles es menor, mientras que la probabilidad estadística para adoptar conformaciones más desordenadas es mayor, tal como se explicó anteriormente. Cuando la glicoforina se incorpora en vesículas de DPFC, se observó por ^{13}C RMN (180), que la movilidad de las cadenas hidrocarbonadas por debajo de la T_t es mayor en el "ánulus" que en el resto de la bicapa, evidenciando un efecto similar al ejercido por el colesterol (7). La diferencia radica en que el colesterol -con su anillo rígido- impone un estricto ordenamiento en su entorno, por encima de la T_t , mientras que la conformación irregular de las proteínas promueve las más variadas orientaciones en las cadenas hidrocarbonadas adyacentes.

Las proteínas también presentan interacciones diferenciales.

La evidencia experimental reunida hasta ahora, sugiere que las proteínas se particionan preferencialmente en la fase líquido cristalino (181-183). Al reconstituir la glicoforina en vesículas mixtas de DELFC-DPFC, la proteína

presenta mayor afinidad por los lípidos insaturados (184). De la misma forma, cuando tiene lugar una transición o separación de fases, las distintas proteínas exhiben diferentes grados de preferencia por la fase líquido cristalino. Así, la (Ca^{+2}, Mg^{+2}) ATP asa y la glicoforina se particionan casi exclusivamente en el estado desordenado (116). En E.coli, la afinidad de las enzimas que transportan β galactósidos por la fase fluída, depende de la composición lipídica de la membrana y puede ser de 2 a 20 veces mayor para dicha fase respecto de la fase gel (185).

Además de la preferencia general por la fase líquido cristalino, las proteínas de membrana interaccionan específicamente con ciertos fosfolípidos, dependiendo de las características estructurales de la proteína en cuestión. Para estudiar estos fenómenos se pueden seguir diversas metodologías (186): extraer la proteína con detergentes y analizar los fosfolípidos unidos a ella; delipidizar la molécula proteica y ensayar la capacidad reactivadora de distintos lípidos o estudiar la membrana nativa. Para la (Na^+, K^+) ATP asa de membranas de *Squalus acanthias* (187), se encontraron las siguientes preferencias en la interacción: cardiolipina > fosfatidilserina > fosfatidilglicerol = fosfatidiletanolamina. La citocromo oxidasa retiene específicamente cardiolipina y en menor proporción fosfatidilglicerol (188). La acetilcolinesterasa (189) también retiene cardiolipina en forma específica, y la glicoforina manifiesta una marcada preferencia por fosfatidilserina (190). Otra enzima que ha demostrado una alta especificidad en su interacción con fosfolípidos es la β -hidroxibutirato deshidrogenasa, que requiere fosfatidilcolina (191).

Actualmente, gracias a métodos físicos como transferencia de energía o decaimiento de la fluorescencia (192), es posible avanzar en el conocimiento molecular de las asociaciones lípido-proteína. No sólo se puede discernir

la naturaleza del lípido en las proximidades de una molécula proteica particular, sino conocer también la distancia que los separa (193) y el alcance de la interacción entre ambos constituyentes de la membrana.

LA ORGANIZACION DE LAS MEMBRANAS BIOLÓGICAS.

Los modelos propuestos son generalizaciones estructurales útiles.

Por primera vez, en el año 1925 se formuló la organización lamelar para las membranas biológicas (194). Luego, y en forma aparentemente independiente, Danielli y Davson (195) propusieron el modelo proteína-lípido-proteína, en el que la bicapa lipídica estaría ubicada entre dos capas de proteína. Con el desarrollo de la microscopía electrónica se vió que membranas biológicas de muy diversos orígenes responderían a esta estructura y esto llevó a Robertson (196) a postular el concepto de una unidad de membrana universal basada en el modelo de Danielli y Davson.

Del conjunto de datos obtenidos por difracción de rayos X (197-199), pudo demostrarse que la estructura de bicapa sería predominante en diversas membranas: la de mielina, el segmento externo de los bastoncitos de retina, la de eritrocitos y la de algunos microorganismos como *Mycoplasma laidlawii*.

El modelo de Danielli-Davson-Robertson debió ser rechazado por dos razones: en primer lugar, una proporción significativa de residuos de aminoácidos no polares de la proteína quedarían en contacto con el entorno acuoso o con las cabezas polares de los fosfolípidos, y en segundo lugar, la gran mayoría de las proteínas de membranas no son disociadas de las mismas por tratamientos suaves, sino que requieren el uso de detergentes o solventes orgánicos indicando una íntima asociación con los lípidos en el seno mismo

de la bicapa.

Naturalmente, surgió el modelo del mosaico de Lenard y Singer (200), en el que los grupos polares de los lípidos y proteínas estarían en contacto directo con el entorno acuoso y, las regiones no polares de ambas especies moleculares se ubicarían en el interior de la estructura, apartados del agua. Además de estas proteínas que atraviesan la bicapa (201), existirían otras globulares empotradas en el interior de la misma. La microscopía electrónica de fractura por congelamiento (202) presenta evidencia de una estructura como la propuesta por Lenard y Singer, para algunas membranas naturales (203).

Singer y Nicolson (102) ampliaron el modelo anterior incluyendo los aspectos dinámicos de la estructura de membranas. Se llegó así a la típica descripción de las proteínas globulares flotando como "icebergs" en un mar de lípidos. Si bien este modelo ha contribuido significativamente al avance del conocimiento de las membranas biológicas, evidencia severas limitaciones a luz de los conocimientos actuales sobre la compleja interrelación de lípidos y proteínas de membrana.

El ensamble de lípidos y proteínas en las membranas naturales genera mutuas restricciones en sus estructuras y movimientos.

El modelo de Singer y Nicolson estimuló las investigaciones acerca de la movilidad de los constituyentes de las membranas. Frye y Edidin (204), mediante un elegante experimento de fusión, demostraron que las proteínas de membrana experimentan difusión lateral. Las mediciones de velocidad de difusión lateral indican que los lípidos difunden a velocidades ($D_L = 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{seg}$) cien veces mayores que las proteínas (205), y en algunos casos estas últimas

parecen estar inmóviles.

A pesar de la característica fluidez de las membranas biológicas, la estructuración bidimensional de las mismas no es al azar. Esta distribución heterogénea surge a partir de limitaciones en el empaquetamiento e interacciones específicas lípido-lípido y lípido-proteína (116, 121), dando origen a separaciones de fase y formación de dominios altamente diferenciados que regulan el funcionamiento del sistema biológico. Así, la movilidad de las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos de la membrana de eritrocito se encuentra más reducida que en sistemas lipídicos puros, tal como se demostró por RPE (206) y RMN (207). Por otra parte, algunas proteínas de membrana, están sujetas a restricciones que limitan y controlan su movimiento en el plano de la bicapa. Por ejemplo, los receptores de superficie no se distribuyen al azar, y se conocen además asociaciones de proteínas de membrana formando complejos multienzimáticos. Otro mecanismo que tiende a inmovilizar a las proteínas es la presencia de un "ánulus" lipídico de composición diferente al resto de la membrana (175).

La fluidez de las membranas está relacionada con numerosos procesos celulares tales como transporte y actividades de enzimas y de receptores (208). Se han detectado cambios en la fluidez de membrana durante el ciclo de división celular en fibroblastos, linfocitos y hepatocitos (209). En membranas de *Mycoplasma laidlawii* crecidas en presencia de altas cantidades de ácidos grasos saturados, es posible encontrar una transición de fase por calorimetría. La temperatura de esta transición coincide con la observada en dispersiones de los mismos lípidos extraídos de la membrana (210). No obstante, la variación de la entalpía por mol de lípido es un 25% menor en la membrana total que en la dispersión lipídica. Este efecto concuerda con el ejercido por las proteínas en sistemas lípido-proteína reconstituídos (116).

Con respecto a la estructura, se sabe que algunos lípidos no adoptan la estructura lamelar (9) y en algunos casos se ha descrito la formación de micelas invertidas ricas en fosfatidiletanolamina en equilibrio con los lípidos de la bicapa (19). Se postula que estas estructuras crean áreas de inestabilidad en el seno de la membrana para que, procesos tales como la fusión, puedan tener lugar.

Las membranas naturales también evidencian asimetría transversal.

La distribución asimétrica de los lípidos a través del plano de la bicapa, que fue inicialmente descrita en membranas de eritrocito (211), parece ser una característica común a muchas membranas biológicas (212). La asimetría proviene de la orientación vectorial de las proteínas, de los diferentes entornos químicos a ambos lados de la membrana y de las diferentes composiciones lipídicas de cada monocapa.

La distribución asimétrica de los fosfolípidos es relativa, ya que si bien muestran preferencias por alguna de las monocapas de la membrana, todos los fosfolípidos se distribuyen sobre ambas caras. En cambio, la asimetría de las proteínas es absoluta: las moléculas proteicas se encuentran únicamente en una de las monocapas.

La disposición trans-membrana de lípidos y proteínas plantea interrogantes acerca de los mecanismos necesarios para establecer y mantener esa distribución heterogénea (213). Bergman y col. (214) han demostrado recientemente que tal distribución asimétrica se mantiene, independientemente de los aumentos en la velocidad de los movimientos "flip-flop", sugiriendo que la asimetría no es sólo una consecuencia de la generalmente baja velocidad de los movimientos trans-bicapa de los fosfolípidos (207). Para las proteínas estos movimientos son indetectables, y en la membrana microsomal los fos-

folípidos pueden pasar a la otra hemicapa con mayor rapidez que en otras membranas naturales (215).

LA CINÉTICA ENZIMÁTICA Y LOS LÍPIDOS DE MEMBRANA.

Los lípidos modulan la actividad enzimática a través de distintos mecanismos.

La modulación de la actividad enzimática por los lípidos se detectó a través de modificaciones de algunos parámetros cinéticos de las enzimas, al extraer o alterar los lípidos de la membrana (216). Este tipo de modulación se ha descrito para aproximadamente cincuenta sistemas enzimáticos purificados y postulado para unos doscientos (217).

En algunos casos el lípido puede actuar como cofactor necesario para solubilizar sustratos insolubles en agua, como sucede en la succinato deshidrogenasa mitocondrial (218) y las reacciones de transferencia de azúcares que ocurren durante la biosíntesis del lipopolisacárido de Salmonella (219).

Muchas enzimas de membrana y sistemas de transporte emplean sustratos solubles en agua y catalizan reacciones que tienen lugar cerca de la interfase lípido-agua. Se ha encontrado que la cinética de estas enzimas varía con los parámetros del microentorno (220). En el caso de la piruvato oxidasa de E.coli (221), enzima periférica, se ha detectado que los lípidos inducen efectos cinéticos similares a efectos alostéricos.

No existe ningún ejemplo de una enzima dependiente de lípidos que posea una estricta especificidad por la estructura química de las cadenas de ácidos grasos. En cambio, existen numerosos ejemplos de requerimientos específicos por grupos polares bien definidos (216). La β hidroxibutirato deshidrogenasa

mitocondrial es una enzima en la que se ha demostrado una estricta especificidad por fosfatidilcolina (222). Recientemente Cortese y Vidal (191) demostraron que la sigmoicidad de las curvas de activación de la apoenzima mitocondrial, por lecitinas de cadena corta, es compatible con un modelo en el que la apoenzima contiene dos sitios idénticos y no interactuantes para la ligadura de fosfolípidos.

De este conjunto de datos puede deducirse que, si bien la dependencia de lípidos es un fenómeno bastante general, aparecen múltiples formas de regulación basadas en la especificidad de las interacciones lípido-enzima. No obstante, desde el punto de vista funcional, pueden distinguirse claramente dos situaciones (217): la modulación de la actividad enzimática por los lípidos y el requerimiento específico de fosfolípidos. En el primer caso, la dependencia es relativa y los fosfolípidos pueden ser reemplazados por detergente. Para poder caracterizar a un sistema enzimático como dependiente de lípidos, deben cumplirse los siguientes requisitos (223):

- a) la extracción del lípido por mecanismos que no inactiven irreversiblemente a la enzima debe originar una pérdida de la actividad catalítica,
- b) la adición del lípido en condiciones adecuadas debe reactivar el sistema delipidizado, y
- c) el mecanismo de reactivación debe implicar la formación de un complejo enzima-lípido activo. Cortese y Vidal (191) introducen otra condición: la preparación delipidizada debe ser reactivada por la adición de fosfolípidos de cadena corta. De esta forma se puede establecer que la enzima posee un requerimiento específico por la molécula de fosfolípido y no por una interfase fosfolípido-agua definida.

Las propiedades cinéticas de algunas enzimas dependen de la fluidez de la membrana.

Si bien la dependencia de la actividad enzimática con la fluidez de la bicapa lipídica no es un fenómeno tan generalizado, como se creyó en la última década, existen algunos ejemplos en los que este mecanismo aparece con claridad. Kimelberg y Papahadjopoulos (56, 224), designaron con la expresión "regulación viscotrópica" al efecto de la fluidez de las cadenas de ácidos grasos sobre el funcionamiento de enzimas unidas a membranas. Estos autores ensayaron la acción de fosfolípidos con ácidos grasos de longitud y grado de insaturación variables, sobre la reactivación de la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ ATP asa purificada. La máxima reactivación se obtiene cuando las cadenas de ácidos grasos se encuentran por encima de la T_t ya que en esas condiciones la proteína tendría mayor libertad para cambios conformacionales y topográficos. El sistema de la glucosa-6-fosfatasa ha sido estudiado por Arion y col. (225), quienes postulan para el mismo tres componentes: a) una traslocasa específica que permite la entrada de la glucosa-6-fosfato a la membrana microsomal; b) una fosfohidrolasa-fosfotransferasa con su sitio activo en la cara luminal, y c) otra traslocasa que media la salida del fosfato inorgánico. Los resultados de Garda y Brenner (226, 227) indicarían que la actividad de la traslocasa guarda una relación directa con la fluidez de la membrana microsomal, modificada ya sea por la incorporación de alcoholes de bajo peso molecular (226), o colesterol "in vitro" (227). Farías y col. (228, 229) investigaron extensamente la dependencia de la cinética de enzimas alostéricas con la fluidez de las membranas. En particular, al alimentar ratas con dietas con distinta proporción de ácidos grasos insaturados, se encontró que el coeficiente de Hill, para la inhibición por F^- de la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ ATP asa y acetilcolinesterasa, se modificaba correlativamente con el índice

de dobles ligaduras de los lípidos de la membrana. Los autores excluyeron cualquier posibilidad de una acción directa de los ácidos grasos sobre las enzimas. En cambio propusieron que las variaciones en la fluidez lipídica, evidenciadas a través del índice de dobles ligaduras, regulaban las transiciones alostéricas de los sistemas estudiados. Se encontraron efectos similares con enzimas cooperativas en membranas de *E. coli* (229).

La mayoría de las enzimas de membrana presentan quebraduras en las curvas de Arrhenius.

Comparando la variación con la temperatura de la actividad de enzimas de membrana y de algún parámetro de movilidad de la fase lipídica, es posible extraer conclusiones acerca de la interacción lípido-enzima. La temperatura ejerce complejos efectos sobre las velocidades de las reacciones enzimáticas (230-231), que a menudo se cuantifican en términos de la energía de activación calculada a partir de las curvas de Arrhenius. En general, las reacciones catalizadas por enzimas solubles dan una curva de Arrhenius lineal. Sólo unas pocas enzimas solubles (232, 233) y la mayor parte de las enzimas de membrana (230, 234, 235) dan curvas de Arrhenius con una o dos quebraduras más o menos abruptas. No existe una única causa para las discontinuidades en las curvas de Arrhenius. Las reacciones enzimáticas son generalmente complejas y las distintas etapas presentan constantes de velocidad y energías de activación características. Al variar la temperatura, puede ocurrir un cambio en el paso limitante de la velocidad y los gráficos de Arrhenius consistirán en dos líneas rectas que se cortan en un punto. Otra causa de discontinuidades son los cambios conformacionales de las enzimas inducidos por la temperatura (230).

Dado que las quebraduras en las curvas de Arrhenius se presentan generalmente en enzimas de membranas, es posible relacionar ese comportamiento con alteraciones en la organización de la matriz lipídica. Sin embargo, una curva de Arrhenius no lineal no debe atribuirse únicamente a los lípidos de membrana. En el caso de la 5' nucleotidasa de hígado de rata (236), el cambio de la E_a con la temperatura, parece deberse a una característica propia de la enzima. Por el contrario, Houslay y Palmer (235), encontraron que diversas enzimas de membrana plasmática de hamsters exhibían corrimientos similares en las quebraduras de sus curvas de Arrhenius al disminuir la temperatura ambiental. Esta similitud en la respuesta, no puede deberse a cambios en la etapa determinante de la velocidad o a transiciones conformacionales de la molécula proteica, sino a fenómenos estructurales de la bicapa capaces de afectar a todas las enzimas por igual. Mediante técnicas espectroscópicas (5, 237), se han podido detectar cambios en la fase lipídica de diversas membranas, a las mismas temperaturas en las que aparecen discontinuidades en las curvas de Arrhenius (238, 239) de los sistemas enzimáticos. La modificación de la composición lipídica de la bicapa mediante técnicas de fusión o sustitución de lípidos (237) o a través del uso de dietas o medios de cultivo (240, 241), mostró que los cambios en la E_a aparente en algunas curvas de Arrhenius pueden correlacionarse con la composición y con las propiedades físicas de las membranas.

Un ejemplo interesante lo constituyen los animales poikilotermos y los microorganismos, en los que se conoce que el efecto de la temperatura sobre las propiedades físicas de las membranas se compensa a través de cambios adaptativos en los lípidos (242, 243). En algunos casos, la dependencia de la quebradura de la curva de Arrhenius con la temperatura de adaptación, se correlacionó bien con alteraciones en la composición lipídica (244). Por

otra parte, al reconstituir sistemas enzimáticos purificados con diversas especies lipídicas, se encontró que la temperatura de discontinuidad de la curva de Arrhenius depende de la T_t de los lípidos empleados en la reconstitución (56, 168, 245).

La dependencia de la velocidad del transporte de azúcares con la temperatura, para *E. coli*, exhibe un comportamiento trifásico (185) que fue explicado sobre la base de la partición de las proteínas entre dominios lipídicos fluidos y ordenados.

Las discontinuidades en las curvas de Arrhenius no siempre coinciden con la T_t de los lípidos de la bicapa.

Así como en la membrana plasmática de hígado de hamsters (235), diversas enzimas presentan el mismo comportamiento termotrópico, se conocen otros sistemas enzimáticos que, formando parte de la misma membrana, presentan quebraduras a temperaturas significativamente diferentes (246). Podría pensarse que, para esas enzimas, la dependencia de la actividad con la temperatura, responde a las transiciones de fase de su "ánulus" lipídico y no de los lípidos globales. Según Marcelja (247), las transiciones de fase de los lípidos anulares ocurrirían en rangos más o menos amplios de temperatura dependiendo de las interacciones de Van der Waals entre el lípido y la enzima (248, 249, 250). Un ejemplo interesante lo constituye la (Ca^{+2}, Mg^{+2}) ATP asa de retículo sarcoplásmico (168). Cuando esta enzima se reconstituye en vesículas de DMPC muestra dos quebraduras en la correspondiente curva de Arrhenius: una a 29°C correspondiente a la transición de fase de los lípidos del "ánulus", y otro a 39°C, que corresponde a la transición de fase de los lípidos generales. La enzima es capaz de reflejar tanto los cambios en el estado físico

de los lípidos del "ánulus", como en el de los lípidos del resto de la bicapa.

Los cambios de pendiente en el gráfico de Arrhenius también pueden atribuirse a fenómenos de separación de fases. La citocromo C oxidasa muestra una discontinuidad a 18°C, que se relaciona con cambios en la movilidad de marcadores de "spin" correspondientes a una separación lateral de fases (251). Se han realizado numerosos intentos para correlacionar la E_a de reacciones enzimáticas con el grado de fluidez de los lípidos de membrana. En los poikiloterms existe un mayor porcentaje de ácidos grasos insaturados que en los homeoterms (252). La E_a para la succinato oxidasa de mitocondrias de pez y sapo es mucho menor que la obtenida para esa enzima en membranas de homeoterms (253). Mediante la administración de dietas ricas en ácidos grasos insaturados, se modificó la fluidez de la membrana mitocondrial, lo que se correspondió con un incremento de la E_a de la succinato oxidasa por encima de la temperatura de discontinuidad (254).

¿Cómo se explica la no linealidad de las curvas de Arrhenius?

Las discontinuidades en las curvas de Arrhenius implican el entrecruzamiento de dos rectas a una dada temperatura originándose cambios en la energía de activación, pero no en la velocidad de la reacción enzimática. Esto requiere de una exacta compensación entre la entalpía y la entropía, que ha sido discutida extensamente (230, 234).

Si la curva de Arrhenius fuera la resultante de dos procesos ocurriendo simultáneamente, se observaría una curva continua y no un cambio abrupto de pendientes a una temperatura (234). Por otra parte, si el cambio es dominado por eventos remotos respecto del sitio de catálisis, la compensación

entropía-entalpía no sería exacta y se esperarían dos líneas rectas con pendientes distintas que no se intersecan. Se conocen muchos ejemplos con tales comportamientos (253, 255) en los que, sin embargo, la diferencia en la constante de velocidad, por encima y por debajo de la temperatura de la discontinuidad, no excede 0,5 unidades de logaritmo. En base a estas suposiciones Kumamoto y col. (234) propusieron el modelo del cambio de fase como única forma para explicar las discontinuidades observadas en las curvas de Arrhenius. Según estos autores el carácter isotérmico de un cambio de fases sustenta la existencia de dos procesos independientes que funcionan exclusivamente en sus respectivos rangos de temperatura.

Por el contrario, Wynn-Williams (256), en lugar de asumir una estrecha conexión entre entalpía y entropía, consideró que el sitio activo de la enzima no se ve afectado por los cambios de fase de los lípidos proponiendo dos posibles explicaciones para las variaciones de la E_a aparente. En un caso supone que la membrana es una sola fase, es decir, una solución de enzimas en lípidos y logra predecir curvas de Arrhenius con una forma correcta. En el otro caso, supone que la enzima y el lípido son sólo parcialmente miscibles. Así, la membrana contendría dos fases a todas las temperaturas, excepto a la temperatura de inflexión, en la que presentaría 3 fases. Una fase sería una solución de enzima y lípido, y la otra, u otras a la temperatura de inflexión, serían lípidos puros. La actividad de una enzima en una solución enzima-lípido sería aproximadamente proporcional al contenido lipídico de la solución, dando así una explicación simple del cambio en la energía de activación.

De esta teoría se pueden extraer dos conclusiones importantes. Por un lado, la E_a del paso limitante de una reacción enzimática no se puede deducir a partir de la pendiente del gráfico $\log v$ en función de $1/T$. Esto es

así para cualquier enzima de membrana a menos que se demuestre que la composición de las fases conteniendo la enzima es independiente de la temperatura. Por el otro lado, el cambio de fase que causa la variación en la E_a aparente puede no tener lugar en la fase que contiene la enzima: la solución enzima-lípido sería afectada por alteraciones en la fase lipídica pura.

LA MEMBRANA MICROSOMAL

La principal diferencia entre microsomas lisos y rugosos parece ser la presencia de ribosomas unidos a estos últimos.

Las membranas del retículo endoplásmico (R.E.) constituyen generalmente más de la mitad del contenido total de membranas de una célula (257). A pesar del gran número de circunvoluciones que presenta, el retículo endoplásmico sería una sola lámina que delimita una cavidad cerrada.

El retículo endoplásmico provee a la célula de un mecanismo capaz de separar las moléculas recién sintetizadas según pertenezcan o no al citosol. Además juega un rol central en la biosíntesis de macromoléculas empleadas para construir otras organelas celulares. Los lípidos, las proteínas y los carbohidratos complejos que deben ser transportados al aparato de Golgi, a la membrana plasmática, a los lisosomas o al exterior de la célula, se sintetizan asociados con el retículo endoplásmico (258). En hepatocitos de rata, el R.E. contiene aproximadamente el 20% de las proteínas, el 50% de los fosfolípidos y el 60% del ARN celular (259), lo que indica la importancia cuantitativa de estas membranas celulares.

Por micrografías electrónicas es posible distinguir (260-261) en algunas

células dos regiones: el retículo endoplásmico rugoso (R.E.R) que posee ribosomas en su cara citoplasmática, y el retículo endoplásmico liso (R.E.L) que carece de dichos ribosomas. Ambas formas presentan distintas estructuras: el R.E.R está organizado como sacos o cisternas aplanadas, ubicadas paralelamente y el R.E.L consiste en finos túbulos y vesículas muy dispersos (261), generalmente próximos al aparato Golgi. El espesor del R.E alcanza valores de $50 - 80 \text{ \AA}$ (259). El lumen del R.E.R tiene unos $200 - 300 \text{ \AA}$ de diámetro y el lumen del R.E.L es algo mayor, de $300 - 600 \text{ \AA}$ de diámetro. El R.E.R es abundante en células especializadas en secreción proteica, o en la síntesis activa de membranas (261).

A fin de estudiar las funciones y la bioquímica del R.E, es necesario separarlo de los otros componentes celulares. Cuando, para tal fin, se homogeniza el tejido o célula, el R.E. se fragmenta en pequeñas vesículas cerradas llamadas microsomas (262), relativamente fáciles de purificar. Los microsomas derivados del R.E.R. se llaman microsomas rugosos y poseen siempre los ribosomas en la cara externa, demostrando que su interior es bioquímicamente equivalente al espacio luminal del R.E. Los microsomas lisos son vesículas con un tamaño semejante a los microsomas rugosos pero sin los ribosomas unidos. Proviene en parte del R.E.L y del aparato de Golgi e incluyen algunos fragmentos de la membrana plasmática. Como el hepatocito posee grandes cantidades de R.E.L, la mayoría de los microsomas lisos pueden considerarse como derivados de esa fracción del R.E. El sitio de unión de los ribosomas está localizado en la subunidad mayor y parece conectarse a dos glicoproteínas específicas de las membranas del R.E. (263). Estas proteínas, llamadas riboforinas, atraviesan la membrana y se encuentran exclusivamente en las zonas rugosas del R.E.

En general, ambos tipos de microsomas presentan proteínas (264) y una

distribución y composición de fosfolípidos (265-266) muy semejantes. Sin embargo los microsomas lisos contienen aproximadamente el doble de colesterol que los rugosos (265).

Recientemente se ha descubierto una "flipasa" en el retículo endoplásmico.

Los experimentos realizados para conocer la asimetría en la distribución transversal de fosfolípidos muestran resultados contradictorios. Tal vez, una posible explicación sea el uso, por parte de Nilsson y Dallner (267,268), de fosfolipasa A_2 . Esta fosfolipasa utilizada con éxito en la membrana de eritrocito, no puede emplearse para estudios de distribución de fosfolípidos en microsomas, pues genera lisoderivados que destruyen la estructura de la membrana (212). Otros autores usando fosfolipasa C como marcador (269-272), determinaron que los fosfolípidos están distribuidos asimétricamente con, aproximadamente, el 70% de la fosfatidilcolina y esfingomiélin y 30% de la fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina, localizadas en la cara externa de la bicapa lipídica. Empleando trinitrobenzenosulfonato como marcador (273) se pudo demostrar una distribución similar para la fosfatidiletanolamina. Sin embargo el uso de fosfolipasa C también ha sido criticado, ya que los diglicéridos que produce (274) se segregan en la membrana, reordenando los fosfolípidos de la cara interna hacia la cara externa. Así, la enzima no podría usarse para discriminar entre ambos tipos de fosfolípidos. Los sitios activos de las enzimas que participan en la biosíntesis de fosfolípidos, han sido localizados en la cara citoplasmática de microsomas de hígado de rata (275), mostrando que dicha síntesis es un proceso asimétrico. Uno de los eventos más intrigantes de la bioquímica del R.E. es la traslocación de los fosfolípidos hacia la cara luminal, durante el

autoensamble de la bicapa lipídica. ¿Cómo pueden las moléculas hidrofílicas o aún cargadas, atravesar el interior hidrofóbico de la membrana microsomal sin destruir sus características de barrera? Bishop y Bell (276) han presentado evidencia experimental acerca de una "flipasa" con estereoespecificidad, que facilita la traslocación de fosfatidilcolinas de cadena corta en ambas direcciones, y es sensible al ataque de proteasas sobre la cara citoplasmática del R.E. No se sabe si esta proteína interviene también en la traslocación de otras especies de fosfolípidos (277).

En resumen, podríamos decir que, la distribución de equilibrio de los fosfolípidos individuales a través de la membrana del R.E es todavía incierta, pero está gobernada por rápidos procesos de traslocación aparentemente mediados por proteínas.

En el rango fisiológico la membrana microsomal es una bicapa líquido cristalina altamente heterogénea.

Tal como sucede en la gran mayoría de las membranas biológicas, la distribución lateral de los lípidos en membranas del R.E. no parece ser homogénea. Gran parte de los lípidos adoptan una estructura de bicapa con un alto grado de fluidez detectada esta última por R P E midiendo el parámetro S (278). Sin embargo se han encontrado dominios lipídicos de menor fluidez, tal vez inducidos por la presencia de proteínas microsomales (278), dado que esos dominios no se observan en dispersiones de los lípidos obtenidos a partir de los propios microsomas. Por RMN, De Kruijff y col. (279) observaron que algunos fosfolípidos podían adoptar, en determinadas condiciones, estructuras no lamelares. Una vez más, este fenómeno se sustentaría en interacciones lípido-proteína en la membrana microsomal, ya que el espectro de los lípidos extraídos de la membrana intacta corresponde a una estructura lamelar. Como

ya se mencionó, estas mesofases podrían participar en procesos como la fusión y el transporte trans-bicapa de fosfolípidos (39). Este último es más rápido en microsomas (215) que en otras membranas naturales y artificiales, siendo el tiempo medio de traslocación de fosfatidilcolina igual a 45 min.

En la membrana microsomal de hígado de rata no se ha detectado ninguna temperatura de transición por calorimetría, en el rango de 0 a 50°C (280). En presencia de glicerol al 50%, los microsomas hepáticos de rata mostraron una transición de fase por debajo de 0°C (281). Por medio de técnicas calorimétricas más sensibles aún, se detectó otra transición a aproximadamente 20°C, con un cambio entálpico mucho menor que el correspondiente a la transición por debajo de 0°C (179). Este último correspondería a la T_t de la membrana microsomal. Por el contrario, a 20°C debe producirse una separación lateral de fases en el estado líquido cristalino, basada en interacciones preferenciales entre fosfolípidos, colesterol y proteínas.

Las proteínas de la membrana microsomal se distribuyen asimétricamente.

El R.E. es una verdadera usina celular, sintetizando compuestos muy diversos que son exportados a otras zonas de la economía. En tal sistema no debe sorprender la distribución asimétrica de las enzimas biosintéticas que allí se asientan, dada por su funcionalidad y por las interacciones con los demás componentes.

La topología de membranas ha sido determinada por diversas técnicas (275) que incluyen el uso de proteasas y reactivos no penetrantes (282), anticuerpos específicos (283) o la accesibilidad de distintos sustratos (284). De esta forma pudo concluirse que el citocromo b_5 (282, 283), la citocromo b_5 reductasa (282) y la citocromo P 450 reductasa (282) se encuentran ubicadas

en la cara citoplasmática, mientras que la glucosa-6-fosfatasa (285) y nucleósido difosfatasa (284) se localizan en la cara luminal. Para la UDP-glucuronil transferasa, en cambio, todavía se encuentra en discusión cuál es su localización en la membrana (286).

Varias enzimas microsomales no presentan quebraduras en las curvas de Arrhenius entre 0 y 50°C, pero algunas reacciones catalizadas por el sistema del citocromo P 450 (287) evidencian discontinuidades a 20°C.

La UDP-glucuronil transferasa y la glucosa-6-fosfatasa también presentan cambios en las pendientes de la curva de Arrhenius (288, 289), que se han correlacionado con alteraciones termotrópicas de los lípidos, detectadas por RPE y fluorescencia.

En el R.E. se encuentran las enzimas desaturantes y elongantes de ácidos grasos (57) responsables de la síntesis de los ácidos grasos insaturados y polinosaturados. Las desaturasas son enzimas anfifílicas ubicadas en la cara externa del microsoma, que controlan la composición de ácidos grasos y por lo tanto la estructura y fluidez de la membrana microsomal. No obstante, aún no se ha establecido la existencia generalizada de un mecanismo autorregulatorio de la fluidez de la membrana microsomal en el que estén involucradas las enzimas desaturantes de ácidos grasos.

Otro aspecto de interés en estos momentos, es el mecanismo a través del cual se incorporan los polipéptidos recién sintetizados en las diferentes membranas de la célula eucariótica (290). El R.E. interviene en la biogénesis de membranas, permitiendo la inserción contraduccional de polipéptidos que, sintetizados por los ribosomas unidos a membrana, son luego transferidos a otros compartimientos subcelulares. Pero sin dudas, los mayores interrogantes los plantea la biosíntesis de proteínas integrales y los mecanismos que permiten su retención en el R.E. distinguiéndolas de aquéllas que deben ser

transferidas a otros sistemas de membranas.

LA UDP - GLUCURONIL TRANSFERASA.

La UDP-glucuronil transferasa participa en los mecanismos de detoxificación.

La glucuronidación es la forma más extendida de conjugación en el metabolismo de los mamíferos. La conjugación es una reacción sintética que involucra el acoplamiento de dos moléculas, generalmente con eliminación de agua. En la glucuronidación el ácido D-glucurónico reacciona con una amplia variedad de compuestos para dar glicósidos, en particular β glucurónidos (291).

La conjugación es una reacción de detoxificación. Este proceso consiste en un aumento progresivo en la polaridad de una molécula conduciendo a su solubilidad en orina y consecuente excreción del organismo.

El mecanismo de detoxificación (292) ha sido dividido en dos fases. La fase 1 consiste en reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis que le permiten a la molécula adquirir un grupo polar tal como $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$ ó $-\text{COOH}$, para luego entrar en la fase 2 y tomar parte en la conjugación. La UDP-glucuronil transferasa (E.C 2.4.1.17) interviene en la fase 2 catalizando la siguiente reacción:



donde RH puede ser un ácido orgánico, un fenol o una amina. Esta reacción es importante para la detoxificación no sólo de agentes farmacológicos sino también productos de excreción endógenos.

Por métodos cinéticos (293) se ha demostrado que, más que una enzima la

UDP-glucuronil transferasa es un grupo de enzimas relacionadas que catalizan la glucuronidación de diversos aceptores (293, 294) en la fracción microsomal de la célula. Si bien su actividad es alta en el hígado, también se encuentra presente en la piel, riñón, mucosa intestinal y algunos órganos endócrinos(295).

La función catalítica de la UDP-glucuronil transferasa está regulada por los fosfolípidos.

Los fosfolípidos de la membrana intacta ejercen dos tipos de influencia reguladora actuando simultáneamente sobre la enzima (296). En primer lugar, la expresión de la actividad catalítica de la transferasa requiere su asociación con fosfolípidos. Más aún, se ha demostrado recientemente (297-299) que la enzima purificada necesita dichos fosfolípidos para mantenerse en una conformación reactiva (300). No obstante, en la mayoría de las preparaciones microsomales la enzima está latente y la estructura intacta de los lípidos aparece restringiendo su actividad. Así, suaves perturbaciones a la matriz lipídica, como bajas concentraciones de detergentes o sonicación, activan a la UDP-glucuronil transferasa, mientras que agentes capaces de destruir las interacciones enzima-fosfolípido, inactivan la molécula de transferasa (301-304). De la observación de estos fenómenos han surgido las expresiones: "dependencia de fosfolípidos" y "restricción por fosfolípidos" (305).

Vessey y col. (306) proponen para la enzima de microsomas de hígado de cobayos, usando p-nitrofenol como aglicón, un mecanismo secuencial al azar. A bajas concentraciones del ácido UDP-glucurónico (307), los gráficos de Lineweaver-Burk para la UDP-glucuronil transferasa no dan líneas rectas sino que presentan una concavidad hacia abajo indicando, según Vessey y col. (307) un fenómeno de cooperatividad homotrópica negativa de la enzima hacia

su sustrato natural, el ácido UDP-glucurónico. Dicho fenómeno desaparece al tratar los microsomas con fosfolipasa A_2 o detergentes (308). Además, la UDP-N-acetilglucosamina se comporta como un efector alostérico positivo de la enzima siempre que el microsoma no haya sido tratado previamente con fosfolipasa A_2 (309).

A fin de explicar los complejos efectos de los lípidos sobre la cinética de la UDP-glucuronil transferasa, se han propuesto desde hace tiempo dos teorías. Una de ellas, la teoría de la compartimentalización (296, 310), considera que las moléculas de transferasa, en la membrana microsomal intacta, están ubicadas cerca de la cara luminal del microsoma. La bicapa lipídica actuaría restringiendo el acceso del sustrato al sitio activo, generándose así el fenómeno de latencia. De la misma forma, las perturbaciones suaves de la estructura lipídica destruirían la barrera de permeabilidad de manera que la enzima pueda manifestar toda su actividad.

La otra teoría (286, 311) delinea un modelo conformacional que se apoya en experimentos cinéticos. En efecto, Vessey y Zakim (311) no encontraron suficiente evidencia para la localización del sitio activo de la transferasa en la cara luminal, detectando en cambio que los distintos tratamientos perturbadores producían formas activas de la enzima con diferentes perfiles cinéticos. Consecuentemente, postularon que la UDP-glucuronil transferasa existe como diferentes isómeros conformacionales cuya estabilidad estaría determinada por el entorno lipídico. En la membrana intacta, los fosfolípidos restringen a la enzima en una conformación de baja actividad, apareciendo así el fenómeno de latencia. Cada tratamiento perturbador activaría la enzima llevándola a un estado conformacional distinto y característico.

La UDP-glucuronil transferasa purificada presenta un requerimiento específico por fosfatidilcolina.

Los grupos de investigadores que sostienen las dos teorías que acabamos de reseñar han purificado la UDP-glucuronil transferasa mediante técnicas diferentes. Singh y col. (297) empleando solubilización con detergentes y cromatografía de afinidad aislaron la enzima de cobayos, asociada con fosfolípidos de membrana y en especial con fosfatidilcolina. La enzima delipidizada es inactiva y recupera su actividad al ser reconstituída con fosfatidilcolinas por encima de la T_t .

Por otra parte Erickson y col. (312), al delipidizar la UDP-glucuronil transferasa de hígado de cobayo con fosfolipasa A_2 encontraron que la especie obtenida era activada por una serie de lecitinas y lisolecitinas. El grado de activación dependía de la longitud y grado de insaturación de las cadenas de ácidos grasos. Estos autores pudieron reconstituir una forma de la enzima con alta actividad, pero no lograron devolverle a la misma sus propiedades regulatorias.

Hochman y Zakim (313) purificaron la UDP-glucuronil transferasa de cerdo, obteniéndose dos formas de la enzima con diferentes propiedades cinéticas. Una forma está libre de fosfolípidos y la otra contiene una pequeña cantidad de los mismos.

LA FINALIDAD DE ESTAS INVESTIGACIONES

El objetivo general de este trabajo es contribuir al conocimiento bioquímico en el área de las membranas biológicas.

En esta introducción quisimos presentar una visión actualizada y realista de las interrelaciones entre la composición y estructura dinámica que sustentan el funcionamiento exitoso de las membranas biológicas.

Ya que nuestro conocimiento de los sistemas naturales se basa, en buena medida, en las propiedades de las membranas artificiales, comenzamos por analizar las características polimórficas, la estructura y la dinámica de organizaciones lipídicas. La complejidad crece en cada caso, al mezclar lípidos con cabezas polares químicamente distintas, longitudes de cadena y grados de insaturación variables. Naturalmente, surgen las atracciones y repulsiones de las moléculas de fosfolípidos entre sí y con el colesterol, conduciendo a separaciones laterales de fases en el plano de la membrana. Las proteínas interrumpen la organización lamelar, modificando las propiedades físicas de los lípidos y presentando ellas mismas cambios en su conformación, generados por las moléculas del entorno. Si avanzamos un poco más, vemos que hasta la funcionalidad de la molécula proteica depende de su interacción con los demás componentes de la membrana: la actividad enzimática está modulada por la interacción lípido-proteína.

Estas interacciones son estudiadas, generalmente, con proteínas purificadas en sistemas reconstituídos. Es cierto que este procedimiento permite el desarrollo de experimentos en condiciones controladas, así como la evaluación independiente de la relación causa-efecto para las distintas variables del sistema. Pero también es cierto que el método de purificación-re-

constitución destruye la compleja riqueza de la regulación en la membrana nativa.

Las membranas naturales aparecen como estructuras dinámicas y altamente heterogéneas en el plano lateral y transversal, donde conviven estructuras lamelares con no-lamelares, gradientes de fluidez con "ánulus" inmovilizados, creando todos ellos el medio propicio para la expresión de la actividad catalítica de las enzimas de membrana. Y es en una membrana natural donde se llevaron a cabo los experimentos para conocer las relaciones que vinculan la composición lipídica, la estructura dinámica y la cinética de enzimas de membrana, que se detallan en el presente trabajo.

El objetivo específico de este trabajo es el estudio de la interacción de los lípidos con la UDP-glucuronil transferasa microsomal.

Las investigaciones desarrolladas tuvieron como objetivos los siguientes:

- a) el estudio de la interrelación entre la composición lipídica, la composición de ácidos grasos y la estructura y propiedades dinámicas de la membrana microsomal.
- b) la profundización del conocimiento sobre la regulación lipídica de las propiedades cinéticas de la UDP-glucuronil transferasa, en microsomas de hígado de cobayo normales y modificados.

Ambas investigaciones fueron encaradas con enfoques de bioquímica básica y métodos físicos adecuados al estudio de membranas biológicas.

Siguiendo estos lineamientos generales se llevaron a cabo los experimentos que se mencionan a continuación:

- a) Se modificó la estructura de la membrana microsomal alimentando cobayos con dietas carentes de ácidos grasos esenciales. Este tratamiento originó una disminución del índice de dobles ligaduras y de la fluidez.
- b) Se incorporó colesterol "in vivo" en la membrana microsomal. De esta forma se provocó una "rigidización" de la estructura microsomal sin cambios en la composición de ácidos grasos. No obstante, aumentó la relación molar fosfatidilcolina - fosfatidiletanolamina como mecanismo compensatorio.
- c) Se extrajo e incorporó colesterol "in vitro" de la membrana microsomal. De esta forma se obtuvieron membranas modificadas cuya única diferencia con la normal residía en el contenido de colesterol, sin variaciones en la composición de ácidos grasos ni en la distribución de las cabezas polares de los fosfolípidos.

En los diversos experimentos se estudiaron la composición de lípidos y la dinámica molecular, tanto de la membrana microsomal como de las distintas fracciones lipídicas extraídas de ella. Al mismo tiempo se determinaron los parámetros cinéticos de la UDP-glucuronil transferasa correspondientes a los diversos tipos de membranas. En todos los casos, la metodología empleada se describe detalladamente en la Parte II.

PARTE II

PROCEDIMIENTOS

EXPERIMENTALES

CAPITULO I

METODOLOGIA GENERAL

En este capítulo se describen la procedencia de los materiales empleados, así como las técnicas generales, de aplicación en los diversos experimentos realizados. Dichas técnicas incluyen, entre otras, el análisis lipídico, esencial para conocer la calidad y cantidad de los distintos lípidos constituyentes que se presentan en un sistema tan heterogéneo como las membranas naturales. La dinámica molecular se evaluó mediante técnicas de fluorescencia y polarización de fluorescencia empleando como marcadores al 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH), los ácidos cis y trans parinárico, el pireno y la merocianina 540. Asimismo, se detalla en este capítulo la metodología conducente a la determinación de los parámetros cinéticos de la UDP-glucuronil transferasa: los correspondientes K_m para cada uno de los sustratos, la V_{max} de la reacción y la cooperatividad aparente del ácido UDP-glucurónico, entre otros.

LA PROCEDENCIA DEL MATERIAL UTILIZADO.

a) Sustratos y activadores empleados en las reacciones enzimáticas:

- A - UDPG (Sigma Chemical Co.)
- UDP - NAGA (Sigma Chemical Co.)
- M - G - P (Sigma Chemical Co.)

b) Fluoróforos marcadores:

- 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (Aldrich Chemical Co.)
- Pireno (Aldrich Chemical Co.)
- Ácidos cis y trans parinárico (P.L.Biochemicals Inc.)
- Merocianina 540 (Eastman Kodak Co.)

c) Material para cromatografía:

- Silicagel G (Merck G.A. Darmstadt)
- Silicagel H (Merck G.A. Darmstadt)
- SP - 2330, 10% sobre Chromosorb WAW 100/200 (Supelco Inc.)

d) Otros:

Todos los solventes utilizados en este trabajo fueron de grado analítico.

Las drogas empleadas para la preparación de las dietas fueron de calidad pura.

El resto de las drogas utilizadas fueron de grado analítico.

ANIMALES Y DIETAS

En todos los experimentos se emplearon cobayos.

En estos estudios se emplearon cobayos machos, pesando entre 100-200 g provenientes del Centro Panamericano de Zoonosis. No pudimos emplear las tradicionales ratas para experimentación, ya que este animal posee una activa e inespecífica nucleótido pirofosfatasa que hidroliza el ácido UDP-glucurónico (A UDPG) (314). Al medir en ensayos previos la actividad de esta enzima en cobayos se encontró que la misma era despreciable.

Los animales fueron alimentados con una dieta de composición controlada.

Reid y Briggs (315), propusieron una dieta controlada que se adecuaba bien a las exigencias nutricionales de los cobayos. La misma contiene (por ciento en peso): 30% de caseína, 20% de almidón, 10% de sacarosa, 6,4% de glucosa, 15% de celulosa, 7% de aceite de maíz y diversas sales minerales y vitaminas. Esta es la dieta control suministrada a los animales en todos los experimentos. Para su preparación, se unen los componentes antes mencionados con cantidades adecuadas de agua, hasta lograr una mezcla con una consistencia tal que permita su moldeado en trozos pequeños.

LA FRACCION MICROSOMAL

Los microsomas se obtuvieron por ultracentrifugación.

Los cobayos se mataron por decapitación y sus hígados se extrajeron rápidamente. Luego los hígados fueron homogenizados en sacarosa 0,25 M (1:3 p/v),

con un homogenizador rotatorio con émbolo de teflón. Este homogenato crudo se centrifugó a 10.000 x g durante 10 minutos, en una centrífuga Sorvall, a fin de separar núcleos y desechos celulares. El precipitado se descartó y el sobrenadante se filtró a través de gasas. Posteriormente, este filtrado fue centrifugado a 105.000 x g durante 60 minutos en una centrífuga Spinco ó MSE. El "pellet" de microsomas se resuspendió en sacarosa 0,25 M y se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones. El "pellet" final se resuspendió en un volumen de sacarosa 0,25 M que permitiera alcanzar la concentración de proteína deseada, generalmente entre 25-35 mgr proteína/ml. Todo el procedimiento se llevó a cabo a 4°C. Los microsomas se conservaron a -70°C hasta el momento de su empleo. La concentración de proteína microsomal se determinó por el método de Lowry y col. (316).

ANALISIS LIPIDICO

Los lípidos microsomales se extrajeron mediante la técnica de Folch y col.(317).

Los lípidos de la fracción microsomal se extrajeron con $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1 v/v) siguiendo el método de Folch y col. (317). A una parte de la muestra se le agregaron 20 partes de la mezcla extractiva de solventes. El sistema se filtró luego por papel de filtro, que fué lavado repetidas veces con la misma mezcla extractiva. Al filtrado se le agregó la quinta parte de su volumen de agua destilada, se agitó y se dejó decantar en frío para permitir la separación de dos fases. Luego de desechar la fase superior, se tomó una alícuota de la fase inferior y se evaporó el Cl_3CH hasta pesada constante, a fin de cuantificar los lípidos. El resto del extracto clorofórmico se guardó a -20°C en atmósfera de N_2 para determinaciones posteriores.

Los lípidos polares se separaron por cromatografía en capa fina en silicagel H (318).

La composición en lípidos polares se determinó por cromatografía en capa fina mediante una técnica de doble desarrollo (318). Se emplearon placas de vidrio de 20 x 20 cm y silicagel H como fase estacionaria. En la primera corrida, la fase móvil estaba constituida por cloroformo:metanol:amoníaco:agua (70:25:3,5:1,5, v/v/v/v). La fase móvil en la segunda corrida estaba formada por cloroformo:metanol:ácido acético:agua (80:10:2:0,75, v/v/v/v). Es importante destacar que ambas corridas se realizaron en el mismo sentido. Las cubas de desarrollo que contenían las mezclas de solventes fueron saturadas previamente con los respectivos vapores. Una vez que la placa estuvo seca, fue posible visualizar las manchas correspondientes a los distintos fosfolípidos mediante su exposición a valores de I_2 .

La composición cuantitativa de los fosfolípidos se determinó midiendo el contenido de fósforo en cada una de las fracciones separadas por cromatografía en capa fina. Para ello se siguió el método de Chen y col. (319), que emplea ácido perclórico para mineralizar y un reactivo colorimétrico formado por molibdato de amonio y ácido ascórbico en medio ácido.

Los lípidos neutros se separaron por cromatografía en capa fina en silicagel G.

La composición en lípidos neutros se determinó por cromatografía en capa fina empleando placas de vidrio de 20 x 20 cm y silicagel G como fase estacionaria. La fase móvil estaba constituida por éter de petróleo:éter etílico:ácido acético (80:20:1, v/v/v). Una vez desarrollada la cromatografía y eliminados los restos de solvente, fue posible cuantificar el contenido de los diversos lípidos neutros por carbonización de las respectivas manchas. Para

ello se rociaron las placas con una solución saturada de $\text{Cr}_2\text{O}_7\text{K}_2$ en SO_4H_2 al 70% (320) y se colocaron a 180°C durante 30 minutos. Las manchas se cuantificaron por densitometría en un fotodensitómetro Zeiss a 540 nm, registrándose los picos con un registrador Sargent Welch. El área de cada pico fue proporcional a la cantidad de carbono en las manchas. Las áreas de los picos se obtuvieron por triangulación y para transformar los porcentajes en peso de carbono en los porcentajes en peso de los distintos lípidos, se multiplicó por un factor de conversión para cada una de las distintas especies de lípidos. Estos factores fueron: lisofosfátidos 1,64, ácidos grasos libres 1,27, triglicéridos 1,30, colesterol 1,19, ésteres de colesterol 1,17 y diglicéridos 1,33. El colesterol también se determinó por una técnica colorimétrica descrita por Huang y col. (321).

La composición de ácidos grasos se determinó por cromatografía gas-líquido.

La cromatografía gas-líquido presenta buenas separaciones para ácidos grasos libres si se trata de ácidos grasos de cadena corta. Sin embargo, los ácidos grasos de longitudes de cadena mayores y con distintos grados de insaturación, son los que se encuentran más frecuentemente en los sistemas biológicos. De allí surge la necesidad de obtener derivados más volátiles que los propios ácidos grasos, tales como sus ésteres metílicos, para que puedan ser analizados por cromatografía gas-líquido (322).

La columna del cromatógrafo contiene un material poroso e inerte llamado soporte, que sostiene a la fase líquida estacionaria. El gas portador constituye la fase móvil, atravesando continuamente la columna. Los componentes de una mezcla, que presentan coeficientes de partición distintos entre la fase móvil y la fase estacionaria, se mueven a velocidades diferentes a través de la columna y a medida que salen de ella se miden sus concentraciones por medio de sistemas de detección apropiados.

En nuestro laboratorio se empleó un aparato Hewlett Packard 5840 A, provisto de un sistema de detección por ionización de llama y con un sistema automático de integración de áreas y procesamiento de datos que indica la composición de la muestra. Se utilizó para las columnas SP-2330, 10% sobre Chromosorb WAW 100/200, y N_2 como gas portador. La temperatura de la columna fue programada para ser mantenida a $140^\circ C$ durante el primer minuto y luego incrementada a una velocidad de $3^\circ C$ por minuto hasta los $220^\circ C$. Los picos se identificaron por medio de sus respectivos tiempos de retención relativos.

Para determinar la composición de ácidos grasos de microsomas, se saponificó el correspondiente extracto lipídico, agregándole una solución de HOK al 10% en etanol, en una proporción de 7 ml por gramo de lípido. El sistema se llevó a $80^\circ C$ durante 45 minutos en atmósfera de N_2 . Una vez fría la mezcla se agregó igual volumen de agua destilada y se lavó con éter de petróleo 3 veces con 2 ml en cada vez, a fin de eliminar el insaponificable. Luego se acidificó el medio con HCl concentrado y se extrajeron los ácidos grasos con éter de petróleo, 3 veces con 2 ml por vez. El extracto se llevó a seco y se procedió con la esterificación. Para ello se agregaron 3 ml de metanol-ClH 3N y se llevó el material, gaseado con N_2 , a $64^\circ C$ durante 45 minutos. Luego se le adicionó igual volumen de agua destilada y 3 ml de cloroformo, se agitó y se centrifugó, desechándose la fase superior. El extracto clorofórmico se lavó con agua destilada, se llevó a sequedad y los ésteres metílicos se disolvieron en éter de petróleo.

Para determinar la composición de ácidos grasos de los distintos fosfolípidos, las fracciones identificadas por cromatografía en capa fina, que no fueron expuestas a vapores de I_2 , se eluyeron con $Cl_3CH:CH_3OH$ (2:1, v/v). El extracto se evaporó a seco para su posterior saponificación y esterificación siguiendo la técnica descripta anteriormente.

El índice de dobles ligaduras se ha empleado como medida del grado de insaturación.

De la composición de ácidos grasos obtenida como se indicó precedentemente, se calculó el índice de dobles ligaduras mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de dobles ligaduras (IDL)} = \frac{\sum (\text{Nro. de moles de ácidos insaturados}) \times \text{Nro. de dobles ligaduras.}}{\sum (\text{Nro. de moles de ácidos saturados}) + \sum (\text{e insaturados.})}$$

LA ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Porqué no fluorescen todas las sustancias.

Los tres estados electrónicos que juegan un rol preponderante en los procesos fotofísicos son: S_0 , estado singlete del nivel fundamental; S_1 , estado singlete del primer nivel excitado y T_1 estado triplete del primer nivel 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, ocurre aproximadamente en 10^{-15} seg. 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.

No obstante, 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" ("quenching") tiene numerosas aplicaciones en sistemas biológicos. Todos los procesos reseñados constituyen transiciones no radiativas. Se denomina fluorescencia a la transición radiativa desde el nivel más bajo de energía de S_1 hasta el nivel fundamental S_0 . Fosforescencia es la transición radiativa desde T_1 hasta el nivel fundamental S_0 .

El rendimiento cuántico es una medida de la eficiencia del proceso de emisión y se define como la fracción de los fotones absorbidos que es reemitido como fluorescencia. Una expresión general para el rendimiento cuántico de fluorescencia es:

$$\phi_e = \frac{K_e}{K_e + \sum k_i} \quad (1)$$

donde K_e es la constante de velocidad radiativa y $\sum k_i$ es la suma de todas las constantes (unimoleculares o pseudounimoleculares) que desactivan al estado emisor. Si se observa o no fluorescencia depende del valor de ϕ_e , y se

puede ver que éste tiene una dependencia crucial respecto de $\sum k_i$: si $\sum k_i \gg k_e$, no habrá fluorescencia. A su vez los valores que toma $\sum k_i$ dependerán de la estructura química de la molécula, de los perfiles de energía potencial, de las interacciones con el solvente y de la temperatura, entre otros.

Las características espectrales de las moléculas fluorescentes dependen del solvente y la temperatura

Se ha observado que al transferir un fluoróforo a un solvente menos polar, se produce un corrimiento en el espectro de emisión hacia zonas de menor longitud de onda. En un entorno polar las moléculas del solvente se disponen alrededor de S_0 . Al producirse la excitación, el dipolo del fluoróforo cambia, y de acuerdo al principio de Franck-Condon para el estado excitado las moléculas del solvente no estarían dispuestas en la configuración más estable. No obstante, al ocurrir la transición hasta el nivel más bajo de energía de S_1 , las moléculas del solvente se pueden reorientar alrededor del nuevo dipolo del estado excitado, antes de la emisión. Así, dicho estado excitado se estabiliza por interacciones con el solvente.

En un solvente no polar, no pueden ocurrir las reorientaciones mencionadas anteriormente y se desestabiliza el estado S_1 , explicándose así el corrimiento del espectro hacia zonas de menor longitud de onda. La temperatura también ejerce efectos sobre la emisión de fluorescencia. Al disminuir la temperatura, las constantes de velocidad de los procesos no radiativos disminuyen más que la constante del proceso de emisión de fluorescencia y de acuerdo a la ecuación (1) se produce un aumento de ϕ_e .

Los espectros de absorción y emisión están relacionados.

Excepto para los átomos en la fase vapor, generalmente se observa que la emisión de fluorescencia aparece en zonas de mayor longitud de onda que la absorción. Este fenómeno fue observado en 1825 por Stokes (323). Una de las causas posibles es el rápido decaimiento al nivel vibracional más bajo de S_1 . Cuando las concentraciones de los gases son lo suficientemente pequeñas como para evitar colisiones, no se observa este corrimiento.

Otra característica notable de la fluorescencia es que generalmente se observa el mismo espectro de emisión, independientemente de la longitud de onda de excitación. Esto se debe a que al producirse la excitación a niveles superiores de energía, el exceso de ésta se disipa rápidamente dejando al fluoróforo en el nivel vibracional más bajo de S_1 , tal como se señaló anteriormente.

Por último, debe señalarse que los espectros de absorción y emisión aparecen como imágenes especulares, específicamente para la absorción representada por $S_0 - S_1$. Este efecto de simetría de los espectros surge como consecuencia de la similitud en el espaciamiento de los niveles vibracionales en S_0 y S_1 (324).

LA POLARIZACION DE FLUORESCENCIA.

Si no se pueden realizar mediciones dinámicas de la anisotropía de fluorescencia, conviene expresar los resultados como P o r simplemente.

Si se excita con luz polarizada una muestra fluorescente, su emisión también estará polarizada. Esta polarización es el resultado de la fotoselección de los fluoróforos de acuerdo a su orientación relativa con respecto a la dirección de la luz de excitación. La emisión puede depolarizarse por

diversas causas. La difusión rotacional de los fluoróforos es una causa común de depolarización. Las mediciones de la anisotropía de fluorescencia (r_s) revelan el desplazamiento angular promedio del fluoróforo entre la absorción y la subsecuente emisión de un fotón. Este desplazamiento angular depende de la velocidad y el rango de la rotación difusional durante el tiempo de vida del estado excitado. Estos movimientos difusionales, a su vez, dependen de la viscosidad del solvente y del tamaño y forma de las especies que difunden.

Para medir la r_s , se excita la muestra con luz polarizada verticalmente y se detecta la emisión, a 90° respecto de la excitación, a través de un segundo polarizador (analizador), orientado paralelo (I_{\parallel}) o perpendicular (I_{\perp}) a la dirección de polarización de la luz excitadora. Así es posible definir 2 parámetros:

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} = \frac{I_{\parallel}/I_{\perp} - 1}{I_{\parallel}/I_{\perp} + 1}$$

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} = \frac{I_{\parallel}/I_{\perp} - 1}{I_{\parallel}/I_{\perp} + 2} = \frac{2P}{3-P}$$

Si la luz está totalmente polarizada $I_{\perp} = 0$ y $P = r = 1$

La r_s se usó durante algún tiempo para calcular la microviscosidad de la membrana (50), aplicando las expresiones de la hidrodinámica clásica. Se consideraba que el movimiento del DPH en la membrana era isotrópico como en un aceite. Sin embargo, estudios posteriores (104) demostraron que la anisotropía de fluorescencia estacionaria contiene contribuciones tanto de la velocidad como del rango del movimiento y que el movimiento del DPH en las membranas es anisotrópico.

Para poder discriminar el rango y la velocidad de los movimientos se deben

realizar mediciones dinámicas, es decir, seguir el cambio de la anisotropía de fluorescencia con el tiempo. En la actualidad se emplean técnicas como fluorometría de fase diferencial (325) o conteo de fotones (326) para tales fines.

Como los estudios dinámicos son técnicamente más difíciles de llevar a cabo, algunos autores (327, 328) han discutido la posibilidad de extraer las contribuciones de la velocidad y el rango de los movimientos, a partir de mediciones de anisotropía de fluorescencia estacionaria, r_s . No obstante, los cálculos propuestos se pueden llevar a cabo en circunstancias muy restringidas, por ejemplo, en sistemas lipídicos saturados, o cuando $0,13 < r_s < 0,28$.

La técnica experimental empleada intentó disminuir los errores en las mediciones de anisotropía de fluorescencia.

Discutiremos aquí las condiciones experimentales generales en las mediciones de anisotropía de fluorescencia. Las concentraciones y la forma de incorporación de cada marcador se tratan al reseñar las propiedades particulares del fluoróforo en cuestión. Las mediciones de fluorescencia y polarización de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorómetro Aminco-Bowman equipado con dos prismas de Nicol desmontables que se ubicaron a la salida del monocromador de excitación y a la entrada del monocromador de emisión (prisma analizador). Los espectros se registraron en un registrador X-Y Hewlett-Packard. La temperatura se reguló con un termostatazador Lauda y se midió con un termómetro digital cuyo sensor se ubicó por encima del paso de la luz. Cuando se estudiaron las variaciones de la anisotropía de fluorescencia con la temperatura, esta última disminuyó en forma continua a una velocidad de 20°C/hora. Esta velocidad permitió que se estableciera adecuadamente

el equilibrio térmico en la cubeta. No hubo diferencia en los resultados cuando el sistema se termostatóizó durante 15 minutos a cada temperatura antes de efectuar las medidas.

Existen causas de depolarización que no proveen información acerca de las propiedades dinámicas del sistema y que surgen de un mal diseño óptico del experimento. Dentro de esas causas de depolarización debemos mencionar la dispersión de la luz ("light scattering") la reabsorción de la fluorescencia y la mala alineación de los polarizadores.

Los sistemas biológicos son generalmente turbios y esta turbidez origina dispersión de la luz. Si la luz dispersada llega al detector, originará errores en exceso, ya que está totalmente polarizada. Esto se puede corregir, tal cual se hizo en este trabajo, con un blanco preparado en las mismas condiciones de la muestra problema, pero sin marcador. Las lecturas de $I_{||}$ e I_{\perp} de este blanco se restaron de los correspondientes valores de la muestra en estudio. Pero, si los fotones emitidos son dispersados antes de alcanzar el detector, se registrará una depolarización adicional no corregible mediante un blanco. La anisotropía de fluorescencia decrece linealmente con la densidad óptica de la muestra según la siguiente relación (329):

$$r' = r - k D_0$$

donde r es la anisotropía de fluorescencia a dilución infinita, es decir, independiente de la dispersión de la luz. Por lo tanto, trabajando en sistemas diluidos es posible disminuir el error por dispersión de la luz. La dilución depende del tipo de muestra y del marcador empleado.

También fue necesario aplicar una corrección debido a factores instrumentales: el factor G . Se obtiene excitando con luz polarizada horizontalmente y midiendo la fluorescencia con el analizador en posición horizontal (I_{hh}) y vertical (I_{hv}). La relación I_{hh}/I_{hv} es el factor de corrección G . En con-

diciones ideales $G = 1$, en nuestros experimentos G alcanzó valores de 0,89.

Para las mediciones de anisotropía de fluorescencia se colocó una solución de NO_2Na 2M entre el monocromador de emisión y el fotomultiplicador a fin de evitar el pasaje de radiaciones por debajo de 390 nm.

Con el fin de incorporar los distintos marcadores fluorescentes en las membranas, se prepararon suspensiones de microsomas de concentración conocida y se agregó el marcador mientras se agitaba vigorosamente. En el caso de los lípidos, se partió de la solución clorofórmica, se llevaron a seco con N_2 y se dispersaron en sacarosa 0,25 M pH 7,0 por sonicación. Las dispersiones fueron posteriormente centrifugadas a 10.000 x g y el sobrenadante utilizado para las mediciones de fluorescencia.

La polarización y la anisotropía se calcularon mediante las siguientes ecuaciones:

$$P = \frac{\frac{I_{\parallel}}{I_{\perp G}} - 1}{\frac{I_{\parallel}}{I_{\perp G}} + 1}$$

$$r = \frac{\frac{I_{\parallel}}{I_{\perp G}} - 1}{\frac{I_{\parallel}}{I_{\perp G}} + 2}$$

¿Qué condiciones deben reunir los marcadores fluorescentes?

Durante años los marcadores fluorescentes han contribuido al conocimiento de la estructura y dinámica de las biomembranas. El marcador ideal (330):

- a) es sensible a los movimientos de las moléculas individuales en la escala de tiempo (nanosegundos) de las mediciones de fluorescencia;

- b) tiene alto coeficiente de extinción y rendimiento cuántico;
- c) no interfiere con el empaquetamiento natural de la bicapa;
- d) 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;
- * Definir el entorno que rodea al marcador.

Durante mucho tiempo se creyó que el DPH se particionaba por igual en la fase gel que en la líquido cristalino.

El DPH ha sido usado extensamente porque reúne muchas de las condiciones enumeradas anteriormente. Es uno de los marcadores más eficientes para la región hidrocarbonada de las bicapas lipídicas, por su alto rendimiento cuántico y su estructura todo trans que se adapta bien al interior hidrofóbico de las cadenas hidrocarbonadas. Se sostuvo, además, que se particionaba igualmente bien en la fase gel y en la líquido cristalino (50). Sin embargo, experimentos muy recientes (331), por transferencia de energía, demuestran que el DPH se particiona preferentemente en las regiones desordenadas de la bicapa.

En nuestros experimentos la relación DPH:lípido (mol/mol) fue 1:200, la concentración de microsomas fue 50 μ gr/ml y la concentración de lípidos 0,1 m M. Previo al agregado del marcador las suspensiones se burbujearon con N_2 . Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 356 y 420 nm, respectivamente.

El ácido trans parinámico prefiere la fase gel.

Los ácidos cis parinámicos (9, 11, 13, 15, c,t,t,c) octadecatetraenoico y trans parinámico (9, 11, 13, 15, t,t,t,t) han sido muy empleados como marcadores de membrana. La Figura 5 muestra las ubicaciones relativas del ácido transparinámico y el DPH en una membrana. Se puede observar que el-COOH del ácido trans parinámico se ubica cerca de la interfase polar, a diferencia del DPH que se ubica enteramente en la región hidrofóbica. Sklar y col.(332) midiendo la constante de partición sólido/líquido (K_p s/l) para ambos ácidos entre fases mixtas lipídicas, encontraron que si bien el ácido cis parinámico se particiona igualmente bien en ambas fases, el ácido trans parinámico prefiere la fase sólida. Estas diferencias se deberían a las distintas geometrías moleculares de ambos compuestos. La preferencia del ácido trans parinámico por la fase sólida y su alto rendimiento cuántico en dicha fase permiten usarlo para detectar pequeñas cantidades del componente sólido (5%). El análisis se realizó midiendo la denominada relación de polarización de fluorescencia:

$$P = \frac{I_{\parallel}}{I_{\perp} G}$$

en función de la temperatura.

En los experimentos que aquí se presentan la relación molar marcador: lípido fue 1:150; la concentración de microsomas 100 μ gr/ml, la concentración de lípidos 0,1 mM; la longitud de onda de excitación fue 325 nm para el cis parinámico y 320 nm para el trans parinámico. La longitud de onda de emisión fue 410 nm para ambos. Las suspensiones correspondientes se burbujearon con N_2 en forma exhaustiva antes del agregado del marcador correspondiente.

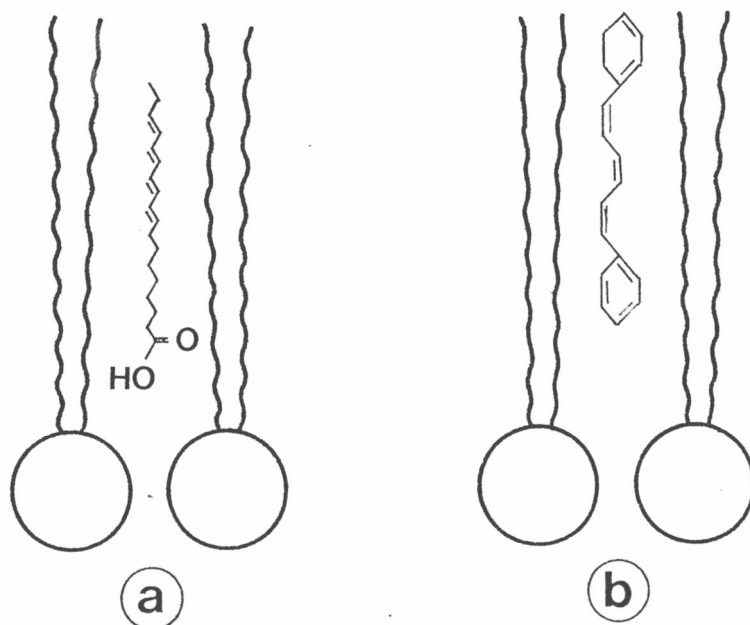
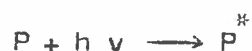


FIGURA 5. Representación esquemática de la ubicación del ácido trans-parinérico (a), y del DPH (b) en una membrana lipídica.

La formación de excímeros del pireno es una prueba óptica para investigar la movilidad traslacional de membranas.

El pireno se ubica en la región hidrofóbica de la membrana. Las reacciones básicas que sufre el pireno se pueden resumir en las siguientes: una molécula de pireno P en el estado fundamental es excitada por un cuanto de luz para dar P^{*}:



P^{*} puede volver a su estado primitivo emitiendo fluorescencia; puede desactivarse por un proceso no radiativo o puede reaccionar con otra molécula P para dar un excímero PP^{*}. Este último proceso se cree que está controlado difusionalmente (333). A partir del espectro de fluorescencia es posible obtener la intensidad del excímero (470 nm) y la del monómero (391 nm). El cociente I_E/I_M es una medida de la probabilidad de difusión lateral en una dada membrana y varía linealmente con la concentración de pireno. Así, la pendiente de las rectas I_E/I_M en función de pireno/lípido (mol/mol) es una característica de cada membrana y puede emplearse para comparar la movilidad lateral de diferentes organizaciones lipídicas (226).

En los experimentos que se detallan luego, la concentración de pireno varió entre 2 y 6 μ M para una concentración de proteína microsomal igual a 0,4 mgr/ml. La longitud de onda de excitación fue 322 nm. Las muestras fueron burbujeadas durante una hora con N₂ para asegurar la eliminación completa del O₂.

La merocianina 540 es un marcador fluorescente sensible al empaquetamiento de la membrana.

El uso de este marcador fluorescente ha comenzado hace poco tiempo. Además, se le ha prestado más atención a las propiedades de su espectro de absorción que a la emisión de fluorescencia. Así, se sabe que la posición del máximo de la absorción varía con la polaridad del solvente. Se cree que la merocianina se ubica en las membranas algo por encima de la cadena del glicerol. La merocianina en solución acuosa tiene una baja eficiencia de fluorescencia, en solventes orgánicos se produce un gran aumento del rendimiento cuántico y un corrimiento del pico de emisión desde 570 a 590 nm. En membranas lipídicas, la altura del pico a 590 depende inversamente del grado de empaquetamiento del sistema (51).

La relación molar marcador/lípido, en nuestros experimentos fue 1:150, la concentración de microsomas 100 µg prot/ml y la concentración de lípidos 0,2 mM.

MEDICIONES ENZIMATICAS

La velocidad inicial se determinó extrayendo alícuotas de la mezcla de incubación a distintos tiempos.

En todos los ensayos se empleó p-nitrofenol como aglicón. La velocidad inicial de la reacción enzimática (v) se determinó de acuerdo a la técnica de Zakim y Vessey, midiendo la desaparición de p-NF (295). La mezcla de incubación contenía Tris-ClH 50 mM PH=7,4; Mg Cl₂ 1,0mM, cantidades variables de A UDPG (0,1 a 25 mM); cantidades variables de p-NF (0,1 a 0,5 mM) y 0,8 a 1,5 mgr de proteína microsomal en un volumen final de 0,6 ml.

Los tubos se precalentaron a la temperatura deseada y la reacción se inició por el agregado de la enzima. Luego de una rápida agitación se sacó una alícuota que sirvió como blanco. Posteriormente se sacaron otras alícuotas a distintos tiempos (entre 6 y 9 extracciones por tubo) y se agregaron sobre TCA 0,1 M. Los tiempos de las extracciones se regularon de acuerdo a la actividad de la preparación microsomal, a la temperatura y a la cantidad de enzima agregada. Las muestras con TCA se centrifugaron brevemente, los sobrenadantes se decantaron en tubos conteniendo KOH 10N para elevar el PH a valores mayores de 10, y se leyeron las absorbancias a 400 nm.

El coeficiente de extinción del p-nitrofenol en esas condiciones es $1,81 \times 10^4 \text{ cm}^2/\text{mol}$.

Los datos así obtenidos se ajustan a una curva de la forma:

$$y = ax^3 + bx^2 + cx + d$$

donde: y representa la absorbancia y x los tiempos. La derivada de la función para $x = 0$

$$\left(\frac{\partial y}{\partial x}\right)_{x=0} = c \quad \text{donde } \underline{c} \text{ es la velocidad inicial.}$$

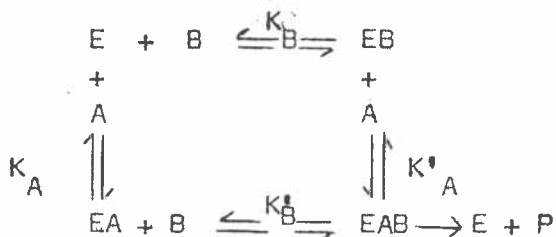
Todas las mediciones se efectuaron por triplicado y el correspondiente ajuste se realizó mediante un programa a tal fin en una calculadora programable Hewlett-Packard HP-41 CV.

La misma técnica se sigue en presencia de UDP-NAGA, adecuando los tiempos y la cantidad de proteína. En tales casos la concentración de UDP-NAGA se indica en la correspondiente figura.

Para los diferentes tipos de microsomas ensayados, las velocidades iniciales así calculadas fueron proporcionales a las cantidades de proteínas en un amplio rango.

Los K_m y la V_{max} se determinaron midiendo v a varias concentraciones de p -NF y A UDPG.

Vessey y Zakim (306) demostraron que los datos cinéticos para la UDP-glucuronil transferasa eran compatibles con un mecanismo de equilibrio rápido secuencial al azar, tal como se muestra en la figura 6. Explicaremos a continuación la forma en que se determinaron las constantes cinéticas para tal sistema. Supongamos el siguiente equilibrio:



Es un mecanismo secuencial al azar. El término secuencial indica que todos los sustratos se deben unir a la enzima antes de que se libere cualquier producto. Y es al azar porque no hay un orden preferencial para la entrada de los sustratos. K_A y K_B son las constantes correspondientes a los complejos binarios, es decir, cuando A y B se unen en primer lugar; y K'_A y K'_B son las constantes correspondientes a los complejos ternarios, es decir, cuando A y B se unen en segundo término.

La figura 7 muestra una familia de gráficos doble recíprocos que se obtiene al representar $1/v$ en función de $1/[B]$ variable, para varias concentraciones fijas de A. Si $[A] = \infty$ toda la enzima disponible para combinarse con B está como EA y el gráfico da $-1/K'_B$, la inversa con signo negativo de la constante correspondiente a la reacción $EA + B \rightleftharpoons EAB$. Si $[A] = 0$ la reacción predominante en la enzima es $E + B \rightleftharpoons EB$ y así el gráfico nos da $-1/K_B$.

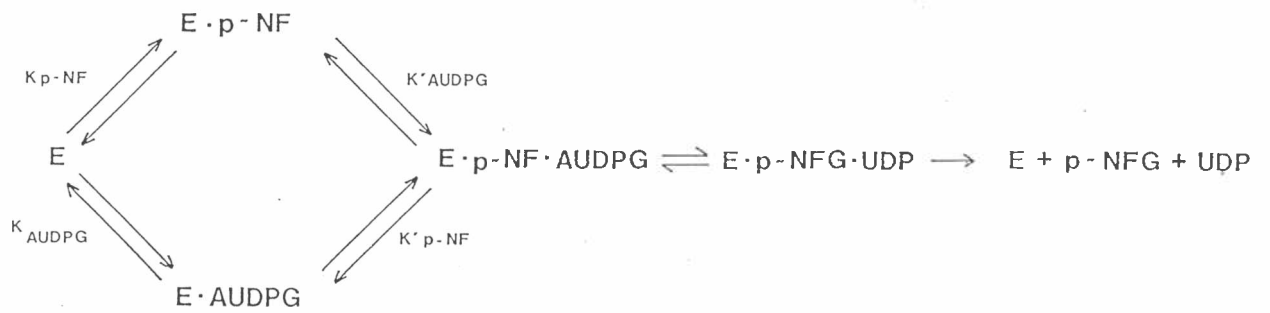


FIGURA 6. Mecanismo de reacción postulado para la UDP-glucuronil transferasa.

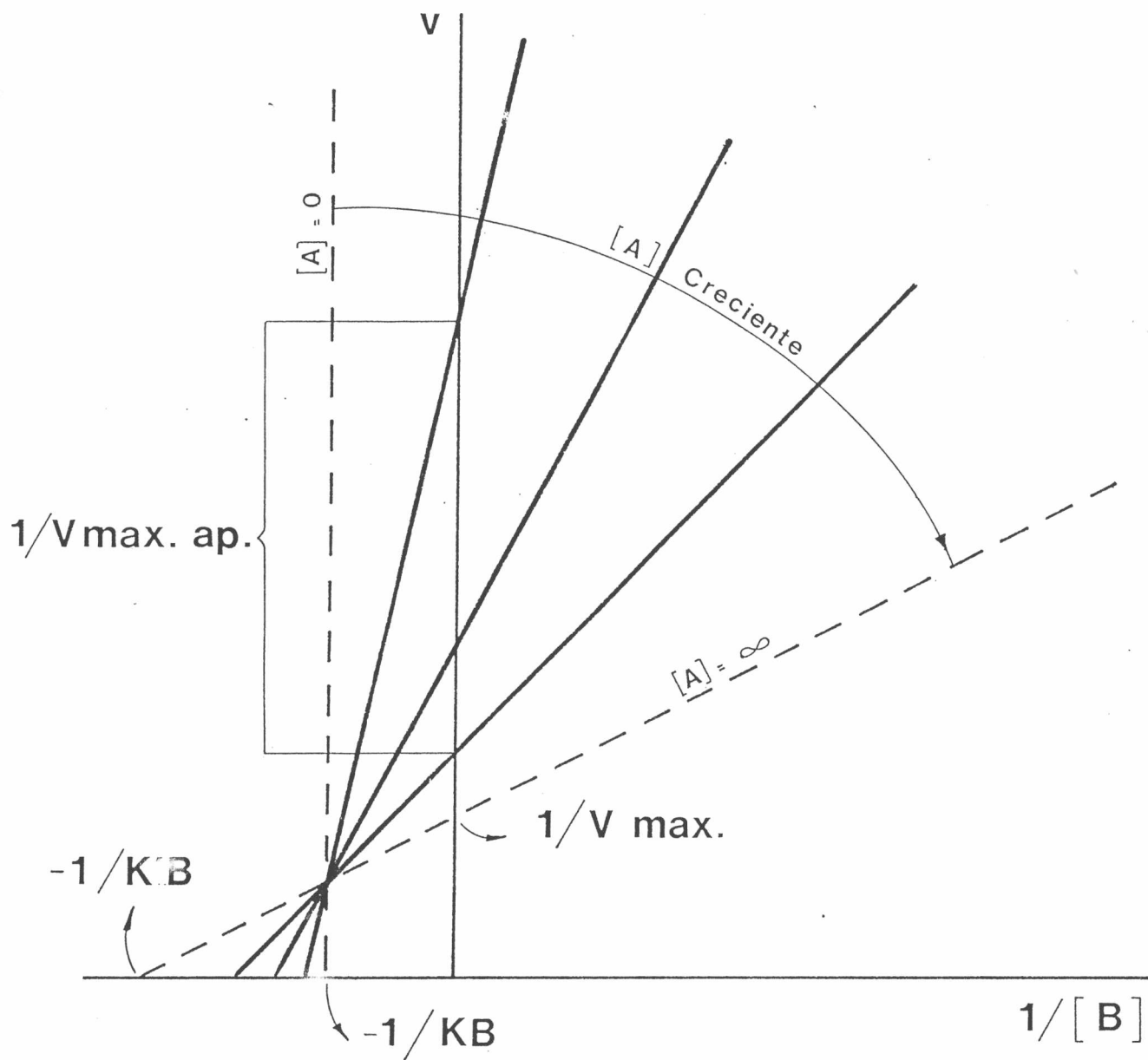


FIGURA 7. Gráfico de $1/v$ versus $1/[B]$ para diferentes concentraciones de A fijas en un equilibrio rápido al azar.

Llegaríamos a conclusiones similares si se variara $[A]$ dejando $[B]$ constante. Cabe señalar que las velocidades que se obtienen en la intersección con el eje y son las velocidades máximas aparentes.

En la figura 8 se grafican esas intersecciones en función de la $[A]$ fija que las originó, encontrándose una recta cuya ordenada al origen es la V_{\max} de la reacción. De su intersección con el eje X se obtiene $-1/K^0A$, es decir, la constante correspondiente al complejo ternario cuando A se une en segundo lugar.

Mediante el gráfico de Hill se determinó la cooperatividad aparente.

Con las velocidades iniciales medidas se calculó el coeficiente de Hill por medio de la siguiente ecuación:

$$\log \frac{v}{V_{\max} - v_{ap}} = n \log S - \log K_m$$

Las concentraciones de p-NF y A UDPG se indican en las respectivas figuras.

Midiendo las actividades enzimáticas a varias temperaturas se construyeron las curvas de Arrhenius.

Para medir la temperatura con exactitud, se empleó un termómetro digital, con una exactitud de $\pm 0,2^\circ$ C.

Las concentraciones de p-NF y A UDPG se indican en las respectivas figuras.

El PH del buffer varió en 0,3 unidades entre la temperatura máxima y la mínima.

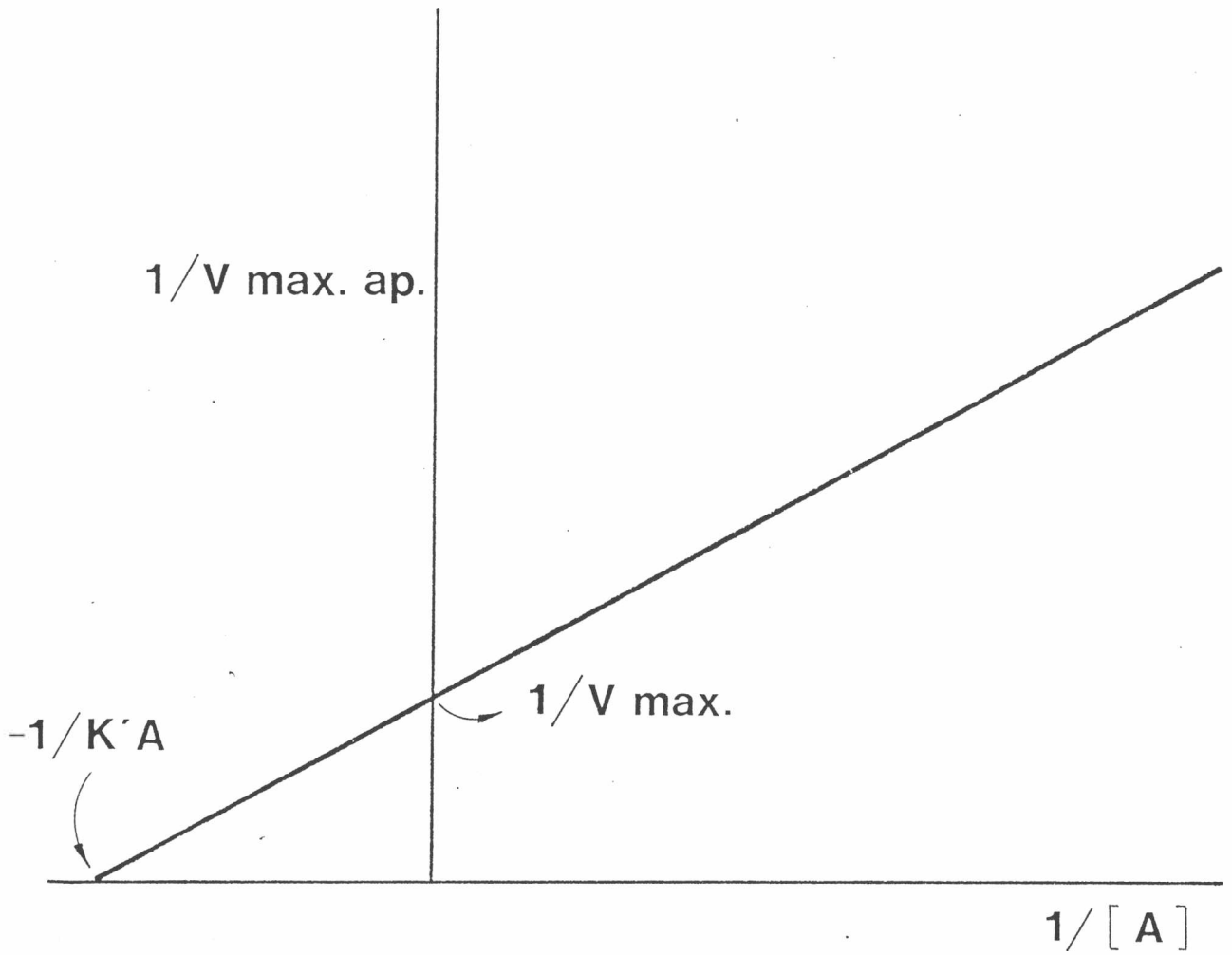


FIGURA 8. Gráfico de las V_{max} aparentes de la figura 7 en función de las correspondientes $[A]$ fijas.

Para detectar el grado de integridad de la membrana microsomal, se midió la latencia de la manosa-6-fosfatasa.

Las preparaciones microsomales no tratadas contienen dos tipos de estructuras: a) vesículas intactas y b) estructuras rotas que carecen de una barrera de permeabilidad (334). La actividad de bajo Km de la M-6-P fosfohidrolasa, únicamente se expresa en los microsomas rotos, ya que los microsomas intactos son completamente impermeables a la M-6-P a esta concentración (334). Así, la proporción de los dos tipos de estructuras puede ser fácilmente determinado midiendo la actividad M-6-P asa antes y después del tratamiento de los microsomas con detergentes. La actividad se determinó siguiendo la técnica de Arion y col. (334).

El porcentaje de latencia es la proporción de actividad que es expresada únicamente después de romper la barrera de permeabilidad de las vesículas microsomales y corresponde a la proporción de enzima que se encuentra en vesículas intactas.

$$\% \text{ de latencia} = \left(\frac{\text{actividad de microsomas tratados} - \text{actividad de microsomas sin tratar}}{\text{actividad de microsomas tratados}} \right) \times 100$$

CAPITULO II

METODOLOGIA ESPECIFICA

En este breve capítulo se describen ciertos procedimientos específicos aplicados a algún experimento en particular.

LA CARENCIA DE ACIDOS GRASOS ESENCIALES.

Los animales se dividieron en dos grupos. A un grupo se le suministró la dieta controlada ya descrita, y al otro una dieta semejante en la que el aceite de maíz era sustituido por glucosa.

Se les suministró agua y comida ad-libitum. Se ensayó el efecto de la alimentación apareada, no encontrándose diferencias significativas en cuanto a las variables que se tienen en cuenta en este trabajo.

De ambos lotes se sacrifican animales a los 7, 14 y 21 días de iniciado el tratamiento.

LA INCORPORACION DE COLESTEROL "IN VIVO".

Los animales se dividieron en dos grupos. Al grupo control se lo alimentó con la dieta controlada, anteriormente descripta, y al otro grupo con la misma dieta más un 3% de colesterol.

Los animales se sacrificaron a los 25 días de iniciado el tratamiento.

LA EXTRACCION E INCORPORACION DE COLESTEROL "IN VITRO".

El objetivo de este experimento fue extraer e incorporar colesterol selectivamente, sin que se produjeran alteraciones en ningún otro componente.

Los lípidos polares y neutros se separaron con ácido silícico.

El extracto lipídico total (0,6 mgr lípido/ml de cloroformo) se mezcló vigorosamente con ácido silícico (20:1 p/p), se filtró y se lavó dos veces con cloroformo para eliminar lípidos neutros. Los fosfolípidos se eluyeron con metanol, agregado en pequeñas alícuotas y se concentraron en un evaporador rotatorio bajo vacío. La relación molar colesterol/fosfolípido bajó desde 0,32 en los lípidos totales hasta 0,0008 en el extracto fosfolipídico.

Se prepararon liposomas pequeños por sonicación.

Se prepararon dos tipos de liposomas. Uno de ellos formado sólo por los fosfolípidos extraídos (LF) y el otro formado por los mismos fosfolípidos enriquecidos con colesterol (LFC). Los LF se prepararon en sacarosa 0,25 M PH = 7. Se evaporaron cantidades apropiadas del extracto lipídico microsomal y se agregó la sacarosa 0,25 M hasta alcanzar una concentración 6mM en fosfolípido. Luego se agitaron en un Vortex durante una hora a temperatura

ambiente, bajo N_2 para permitir que se equilibren las dos fases. Para preparar los LFC se agregó una cantidad apropiada de colesterol hasta alcanzar una relación molar colesterol:fosfolípido 1:1. Los liposomas se centrifugaron a 140.000 g durante 2 h para descartar vesículas multilamelares y se los conservó en atmósfera de N_2 a 4°C por no más de 24 hs.

¿Cómo se modificó el contenido de colesterol de los microsomas?

Para transferir colesterol desde liposomas enriquecidos en colesterol a membranas microsomales, se hubieran necesitado las proteínas transportadoras.

En estos experimentos se evita la purificación de esas proteínas transportadoras empleando directamente el sobrenadante de 12.000 g, separado por ultracentrifugación de los homogenatos de hígado de cobayo durante 20 minutos. Estos sobrenadantes contienen tanto los microsomas como las proteínas transportadoras citosólicas. El procedimiento seguido fue el siguiente: se sacrificaron los animales y se hizo un homogenato de hígado. Este homogenato se centrifugó a 12.000 x g durante 20 minutos y se separó el sobrenadante. Para incorporar colesterol se incubó un volumen de este sobrenadante con 9 volúmenes de LFC durante 2 horas a 5-7° C y posteriormente se centrifugó durante 1 hora a 100.000 g. El "pellet" formado por microsomas enriquecidos con colesterol se resuspendió en sacarosa 0,25 M y se recentrifugó en las mismas condiciones.

Para extraer el colesterol de los microsomas el sobrenadante de 12.000 g se centrifugó a 100.000 g durante 1 hora y el "pellet" se resuspendió en la misma solución. Este "pellet" se incubó durante 2 hs a 5-7°C con LF (9 volúmenes de liposomas por un volumen de sobrenadante de 12.000 g) y citosol fresco (3 y 6 volúmenes de citosol fresco por 1 volumen de sobrenadante de

12.000 g). La mezcla se centrifugó a 100.000 g durante 1 hora y se lavó una vez. Los diferentes tipos de microsomas se mantuvieron a -80°C hasta el momento de su uso.