

T O M O I I

N<sup>o</sup> 821 (Tomo II)



Author Sou. Autor  
S.....  
Fecha 25-11-88  
Inv. E 7275 Inv. B 3167


PARTE III

DESCRIPCION

Y DISCUSION

DE LOS RESULTADOS

EXPERIMENTALES

## CAPITULO I

### LA MEMBRANA MICROSOMAL NORMAL DE HIGADO DE COBAYOS

Aquí se reseñan algunas características de la membrana microsomal de hígado de cobayos, que fueron determinadas en el laboratorio, previo a los experimentos de modificación de estructura detallados posteriormente. Esta caracterización parcial resultó imprescindible ya que no se contaba con experiencia respecto a dicho animal (pág. 80).

Se analizaron la composición de ácidos grasos de la membrana y sus características físicas por medio de la polarización de fluorescencia del DPH. Al mismo tiempo se estudiaron algunas propiedades cinéticas de la UDP glucuronil transferasa, en la membrana microsomal nativa, que han sido, y son aún, objeto de controversia.

## LA COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS.

El cobayo y la rata presentan diferentes composiciones de ácidos grasos.

Antes de comentar las características propias de la composición de ácidos grasos, explicaremos brevemente las nomenclaturas existentes para designar dichos ácidos grasos. Además de la denominación trivial, se emplean la nomenclatura abreviada y la sistemática. La primera indica el número de átomos de carbono y el número de dobles ligaduras seguido del subíndice  $\omega$ , que denota el número de carbonos desde el último doble enlace hasta el metilo terminal inclusive. La nomenclatura sistemática también señala el número de átomos de carbono y el número de doble ligaduras, pero explicitando la posición de esas dobles ligaduras, numeradas a partir del grupo carboxilo.

En la Tabla I se comparan la composición de ácidos grasos de cobayos y ratas alimentados con dietas sintéticas de composición semejante. Se pueden apreciar diferencias marcadas en el contenido de ácido palmítico y, sobre todo, en los ácidos linoleico (18:2) y araquidónico (20:3 $\omega$ 6).

Habíamos mencionado (pág. 69) que en el retículo endoplásmico se encuentran las enzimas desaturantes y elongantes de ácidos grasos (51, 335) responsables de la síntesis de los ácidos grasos insaturados y polinosaturados. Los mecanismos de dicha biosíntesis, así como los factores que modulan la actividad de las enzimas desaturantes han sido extensamente estudiadas por diversos laboratorios en diferentes especies animales (336-338).

Las enzimas que forman los dobles enlaces entre los carbonos 6 y 7, 5 y 6; y 4 y 5; y se denominan  $\Delta 6$ ,  $\Delta 5$  y  $\Delta 4$  desaturasas, respectivamente (339).

T A B L A I

COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS DE MICROSOMAS DE HIGADO DE COBAYO Y RATA  
(porcentaje en peso).

Acido graso	Microsomas de cobayo	Microsomas de rata
14 : 0	0,8 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,1
16 : 0	13,9 $\pm$ 1,0	30,7 $\pm$ 1,2
16 : 1	1,2 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,1
18 : 0	26,8 $\pm$ 1,2	25,8 $\pm$ 1,3
18 : 1	9,7 $\pm$ 0,4	6,1 $\pm$ 0,3
18 : 2	34,4 $\pm$ 1,1	11,3 $\pm$ 0,7
20 : 3W9	1,0 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1
20 : 3W6	0,6 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,1
20 : 4W6	9,3 $\pm$ 0,4	20,8 $\pm$ 1,1
22 : 5W3	0,9 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,1
22 : 6W3	1,4 $\pm$ 0,2	2,8 $\pm$ 0,2
I D L	1,31	1,23

Los resultados son la media de determinaciones en 4 animales procesados separadamente, con sus respectivas desviaciones estándar.

Los animales fueron alimentados durante 7 días con dietas sintéticas balanceadas.

La  $\Delta 6$  desaturasa es la primera enzima de la secuencia de reacciones de la biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados, en los microsomas de células animales. Convierte los  $\Delta 9$ -enoil CoA monoinsaturados, palmitoil y oleil-CoA, a los acil CoA  $\Delta 6, 9$  16:2 y  $\Delta 6, 9$  18:2, respectivamente. Además, convierte los tioésteres de los ácidos grasos esenciales linoleico y  $\alpha$ -linolénico a  $\gamma$ -linolénico y  $\Delta 6, 9, 12, 15, 18:4$ , respectivamente. El orden de actividad es  $\alpha$ -linolénico > linoleico > oleico (340). La actividad de esta enzima cambia con la dieta (341) y la presencia de hormonas (341, 342).

En la rata, el camino preferencial para la biosíntesis del ácido araquidónico, comienza con la  $\Delta 6$  desaturasa, continúa con una elongación a ácidos de 20 carbonos y luego una desaturación por efecto de una  $\Delta 5$  desaturasa.

En cambio, poco se sabe de las rutas metabólicas de la biosíntesis de ácidos grasos polinosaturados en cobayos. En ensayos preliminares, se midieron las actividades de las enzimas desaturantes en estos animales, encontrándose valores muy bajos. Así, podría explicarse la diferencia en la composición de ácidos grasos entre ratas y cobayos. El mayor contenido de ácido 18:2 del cobayo se debería a que este ácido graso no sería transformado en ácido araquidónico.

En la Tabla I también puede apreciarse el IDL calculado como se indicó anteriormente (pág. 85). Este índice evidencia un valor promedio, algo mayor para los cobayos, tal vez debido al alto contenido de ácido palmítico de los microsomas de rata.

No obstante, la membrana microsomal de ambas especies se presenta rica en ácidos grasos polinosaturados, lo que facilita su interacción con las pro-

teínas integrales creando un medio de fluidez adecuado para el mantenimiento de sus funciones biológicas.

#### LAS PROPIEDADES DINAMICAS

La selección de las condiciones experimentales permite disminuir los errores del método.

Se estudiaron la estructura y la movilidad de esta membrana microsomal mediante la técnica de polarización de fluorescencia, empleando DPH como marcador. La Figura 1 muestra los espectros de excitación y fluorescencia del DPH en microsomas normales. Allí se evidencia una de sus características espectrales más beneficiosas: la gran separación de las bandas de excitación y emisión (343). Se evita así la reabsorción de la luz emitida y la transferencia de energía entre moléculas de marcador vecinas que originarían errores por defecto en las mediciones de polarización de fluorescencia.

Debe prestarse especial atención a la selección de las condiciones experimentales. Ello implica no sólo el uso de condiciones ópticas adecuadas, sino también, una apropiada concentración lipídica y relación lípido-marcador, que contribuyan a evitar los errores en las mediciones de polarización de fluorescencia. Dijimos (pág. 91) que no basta descontar la contribución de un blanco a la señal de emisión registrada para evitar los errores por "light scattering". En efecto, la Figura 2 presenta los resultados de experimentos realizados en colaboración con el Dr. A.A. Paladini, donde se observa cómo varía  $r_s$  con la concentración de proteína, es decir, con la turbidez de la membrana microsomal. Los valores de las ordenadas

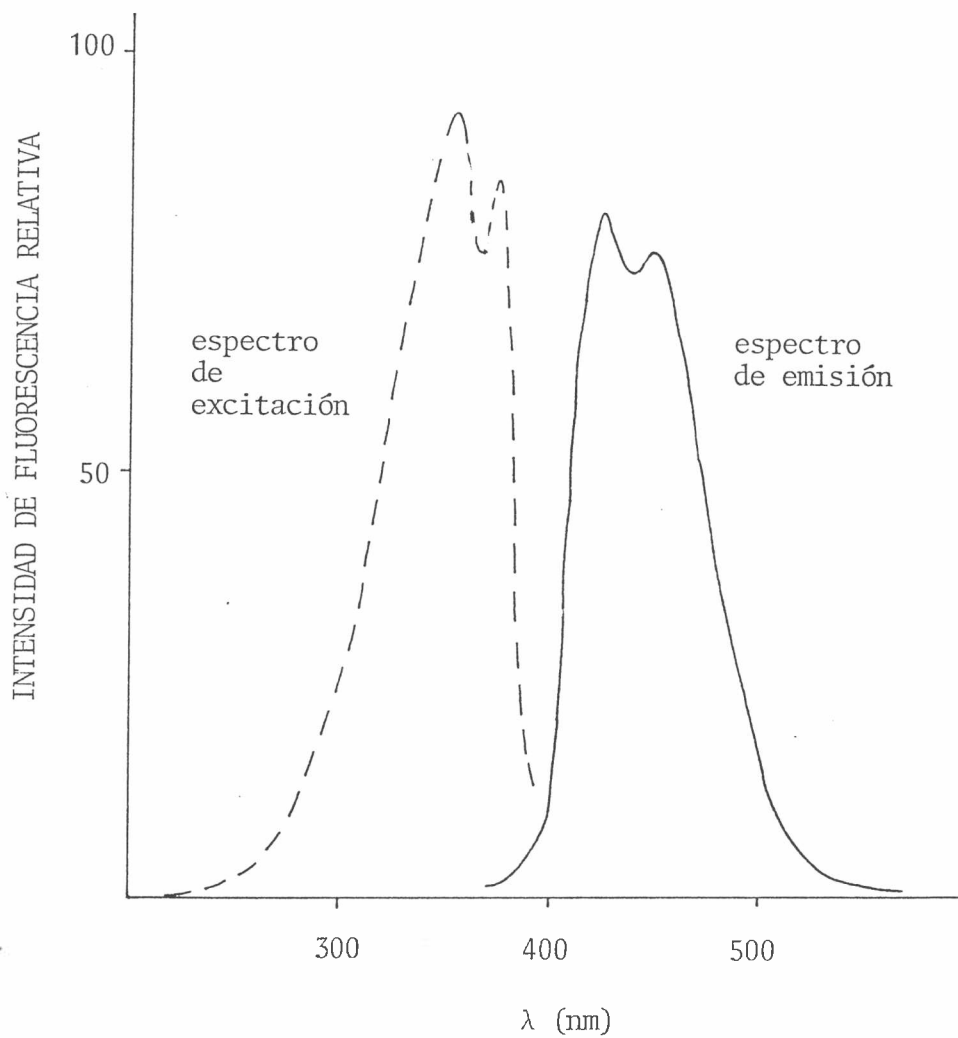


FIGURA 1 - Espectros de excitación y emisión del DPH en microsomas a 37°C. Para incorporar el DPH se siguió la técnica explicada en Procedimientos Experimentales (págs. 90 y 93) partiendo de una solución 1 mM del DPH en tetrahidrofurano.



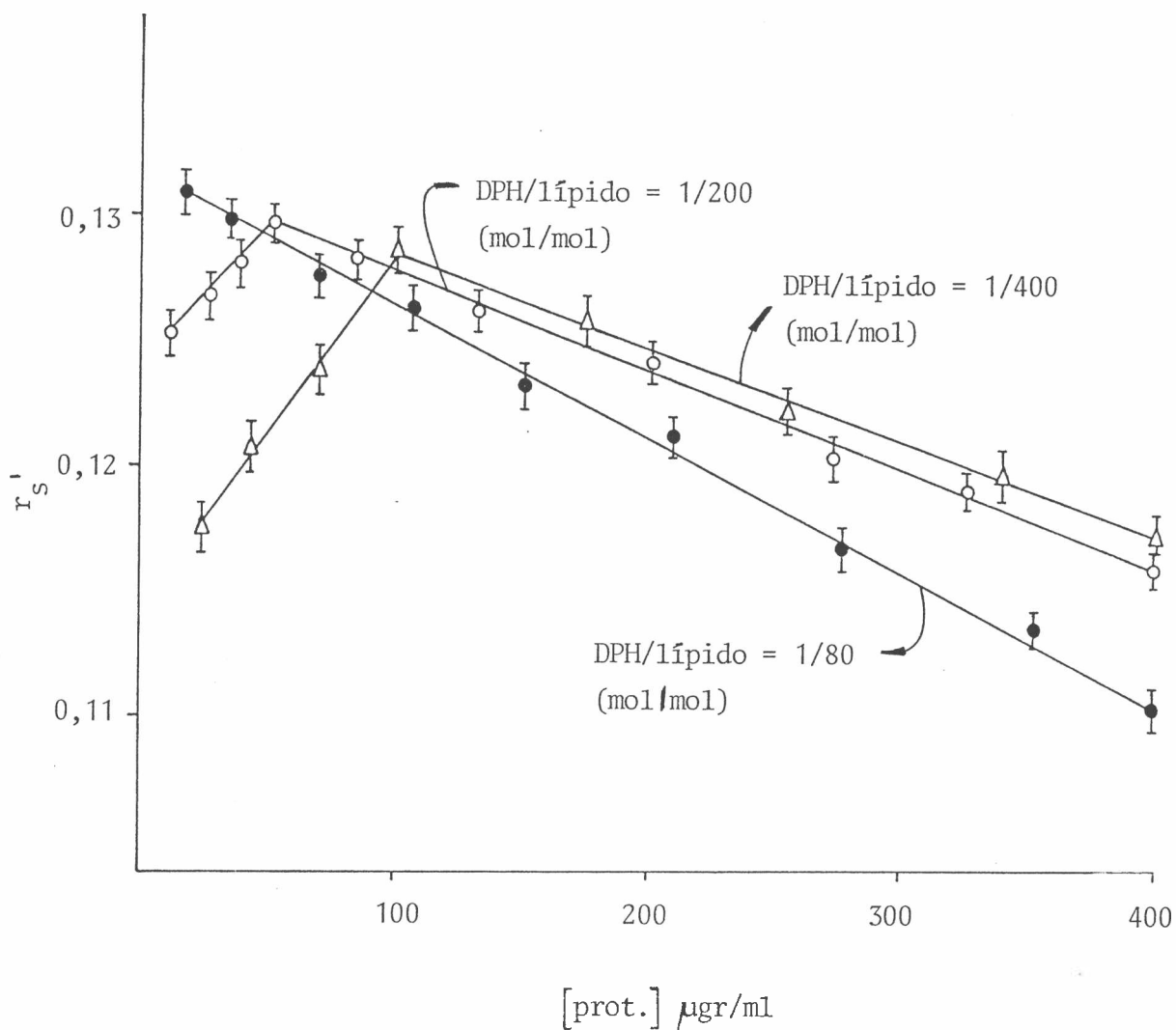


FIGURA 2 - Variación de la anisotropía de fluorescencia observada en función de la concentración de proteína microsomal a 37°C.

Los datos son la media de 6 determinaciones con sus respectivas desviaciones estándar.

Las condiciones experimentales son las mismas que en la Figura 1.

corresponden a las anisotropías de fluorescencia, una vez descontados los blancos correspondientes. En abscisas se ha graficado la concentración de proteína, en lugar de las absorbancias (pág. 91), para facilitar la comparación de los resultados. No obstante, ambas cantidades mantienen una relación lineal en el rango estudiado. Una suspensión microsomal con 400  $\mu\text{gr}$  prot/ml presenta una D.O igual a 0,54 medida a 356 nm y 1 cm de camino óptico. A medida que se diluye la muestra, la anisotropía aumenta siguiendo, inicialmente, la relación propuesta por Barenholz (329):

$$r' = r - K D O$$

lo que evidencia una depolarización adicional no fundada en propiedades moleculares del sistema sino en efectos de dispersión debidos a la turbidez de la muestra. La anisotropía no aumenta continuamente, como predice la ecuación anterior, sino que alcanza un valor máximo para disminuir luego abruptamente, como se observa en la Figura 2, para una relación marcador: lípido 1:200 (mol:mol). Como la incorporación del DPH en membranas biológicas depende de la partición lípido-agua, al diluir apreciablemente la muestra podría favorecerse el pasaje del marcador desde la bicapa lipídica hacia su entorno acuoso. Esta salida provoca una gran caída en la anisotropía medida, ya que el sistema ahora es anisotrópico y el rendimiento cuántico del DPH en el mismo es muy bajo.

Si la afinidad relativa del marcador por ambas fases fuera el único fenómeno determinante de los efectos descritos, cabría esperar que un sistema con una relación DPH:lípido 1:400 (mol:mol) exhibiera dicha quebradura, a concentraciones menores aún de proteína microsomal que la anterior. Sin embargo no sucede así, y más aún, una relación DPH:lípido=1:80 (mol:mol) no evidencia tal quebradura.

Las curvas de la Figura 2 deben interpretarse sobre la base de dos efectos actuando simultáneamente: por un lado, la ya mencionado, afinidad diferencial del marcador por las fases lipídica y acuosa y, por el otro, los diferentes rendimientos cuánticos del mismo en ambas fases. Entonces, para altas relaciones DPH:lípido como 1:80 (mol:mol), el rendimiento cuántico de las moléculas que permanecen en la fase lipídica es tan alto que enmascara el efecto de aquellas otras que pasan a la fase acuosa, no observándose ninguna quebradura en tales condiciones experimentales. Los mismos efectos pueden explicar la forma de la curva para una relación DPH:lípido 1:400 (mol:mol).

La Figura 2 también da las condiciones para la mejor selección de la relación lípido:marcador. Evidentemente, la relación ideal sería aquella que presente los valores más altos de anisotropía de fluorescencia. En ese sentido un cociente DPH:lípido 1:400 sería el indicado empleando una concentración de proteína microsomal igual a 100  $\mu$ gr/ml. Con la relación DPH:lípido 1:200 (mol:mol), en cambio, es posible alcanzar concentraciones de hasta 50  $\mu$ gr/ml. Se justifican así las condiciones experimentales elegidas para el DPH, que se mencionaron en la Parte II (pág. 93). El cociente DPH:lípido 1:80 (mol:mol) exhibe fenómenos de transferencia de energía entre las moléculas del marcador, provocando una depolarización adicional de la fluorescencia medida, lo que hace desaconsejable su empleo.

La membrana microsomal de hígado de cobayos no presenta una  $T_t$  en el rango estudiado.

La Figura 3 muestra la dependencia del logaritmo de  $r_s$  en función de

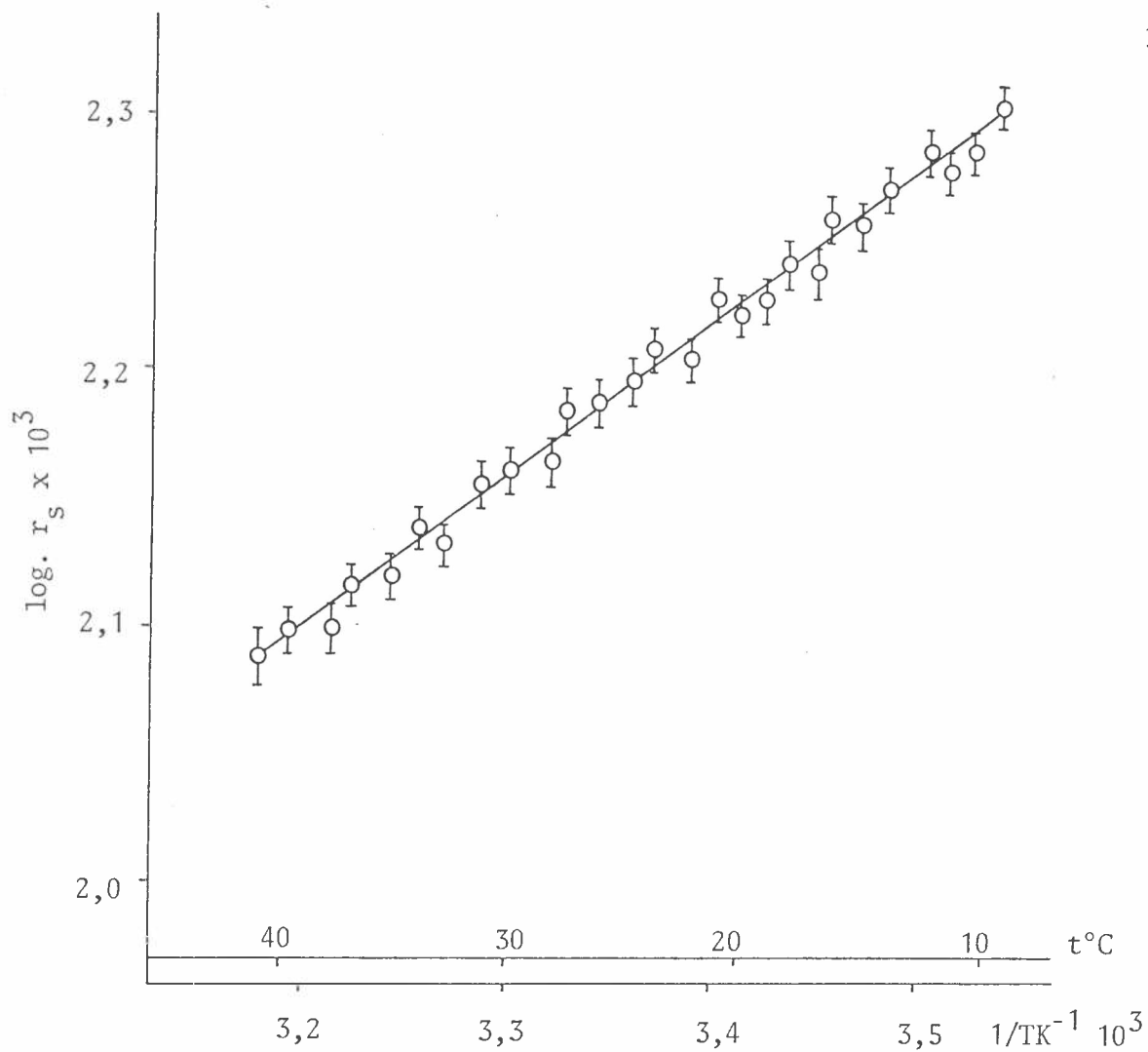


FIGURA 3 - Propiedades termotrópicas de la membrana microsomal normal, detectadas a través de la medición de la  $r_s$  del DPH a distintas temperaturas.

Los resultados son la media de determinaciones en 4 animales procesados separadamente, con sus respectivas desviaciones estándar. El ajuste se hizo por el método de cuadrados mínimos. Las condiciones experimentales son las mismas que en la Figura 1.

1/T. Dicho gráfico sirve para detectar variaciones termotrópicas que aparecerían como discontinuidades en la pendiente, originadas en un cambio en la velocidad o en el rango de la rotación del fluoróforo. El gráfico de la Figura 3 no muestra ninguna transición de fase detectable, en el rango de 10 a 40°C.

Las transiciones de fase gel-líquido cristalino de los lípidos se han encontrado en algunas membranas biológicas, tal como se indicó anteriormente (pág. 54). En el retículo endoplásmico de corteza adrenal se evidencia una transición de fase de este tipo mediante técnicas de polarización de fluorescencia (344). En membranas de retículo endoplásmico de tetrahymena piriforme se midieron alteraciones de la estructura y movilidad de la fase lipídica por técnicas de RPE, pero no apareció ninguna  $T_t$  por encima de 0°C mediante técnicas de calorimetría diferencial (238). La membrana microsomal de hígado de rata no evidencia una transición de fase orden-desorden entre 0° y 50°C (280). En presencia de glicerol al 50% se observa una  $T_t$  por debajo de 0°C (281). Eletr y Zakim (289), en microsomas de hígado de cobayo detectaron alteraciones termotrópicas de los lípidos mediante RPE y marcadores fluorescentes, a temperaturas cercanas a los 20°C, que no se encuentran por calorimetría diferencial de barrido (281). Esto indicaría que las alteraciones termotrópicas reportadas constituirían separaciones laterales de dominios sólidos en el estado líquido cristalino, más que verdaderas transiciones de fase del estado desordenado al ordenado (288).

Nuestros resultados muestran que la membrana microsomal de hígado de cobayos se encuentra en el estado líquido cristalino por encima de los 10°C, lo cual concuerda con el alto contenido de ácidos grasos polinosaturados de estas membranas.

## LA UDP GLUCURONIL TRANSFERASA

Los gráficos de Lineweaver Burk de la UDP glucuronil transferasa no son lineales en todo el rango de concentraciones.

Vessey y col. (307) encontraron que las representaciones de  $1/v$  en función de  $1/AUDPG$ , para la UDP-glucuronil transferasa, no dan líneas rectas en todo el rango de concentraciones, sino que evidencian una concavidad hacia abajo, como consecuencia de un fenómeno de cooperatividad homotrópica negativa de la enzima. Este fenómeno desaparece al tratar los microsomas fosfolipasa  $A_2$  o detergentes (308).

La figura 4 es una representación de Lineweaver Burk, para concentraciones de A UDPG desde 0,25 hasta 25 mM. Nuestros resultados de dicha figura coinciden con aquéllos de Vessey y col. (307) observándose a concentraciones de A UDPG hasta 2,5 mM una concavidad hacia abajo. A altas concentraciones de dicho sustrato la representación es lineal.

Si bien el objetivo de este trabajo no es dilucidar los mecanismos enzimáticos de la UDP glucuronil transferasa, sino profundizar el conocimiento de su regulación lipídica, discutiremos brevemente las distintas explicaciones que pueden darse respecto de este fenómeno cinético.

Siempre que aparecen curvas de esta forma pueden intentarse por lo menos dos explicaciones: un efecto cooperativo homotrópico negativo (345,346) y la presencia de dos enzimas con  $K_m$  y  $V_{max}$  diferentes, catalizando la misma reacción (347). La primera explicación, apoyada por Vessey y col. (307) implica que la enzima cumple con la ecuación de Michaelis Menten por encima de una concentración de A UDPG igual a 2,5 mM, mientras que por debajo de la

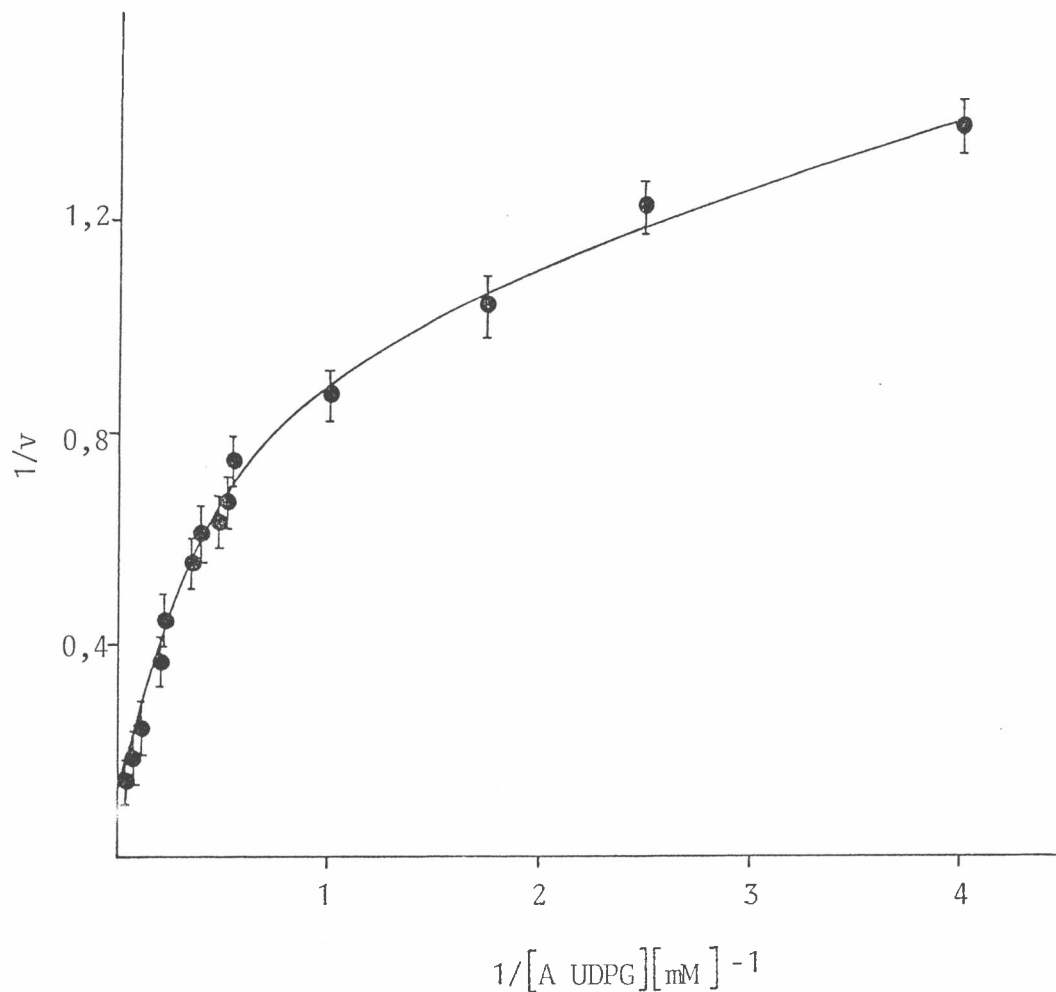


FIGURA 4 - Gráfico de Lineweaver-Burk para la UDP-glucuronil transferasa. Las velocidades iniciales se determinaron como se detalla en Procedimientos experimentales (p.97). La mezcla de incubación contenía Tris-ClH 50 mM PH 7,4,  $\text{MgCl}_2$  1,0 mM, p-NF 0,4 mM, 1 mgr de proteína microsomal y las concentraciones de A UDP G que se indican en la figura en un volúmen final de 0,6 ml. Los resultados son la media de determinaciones en 3 animales procesados individualmente, con sus desviaciones estándar.

misma se ajusta al comportamiento predicho por la ecuación de Hill:

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{S^n}{K + S^n} \quad \text{donde } n = \text{coeficiente de Hill}$$

adopta en este caso valores menores que 1, indicando que la unión de cada molécula de sustrato disminuye la afinidad intrínseca de los sitios vacantes.

Así, los gráficos de  $1/v$  en función de  $1/S$  serán rectas para concentraciones de A UDPG mayores que 2,5 mM y exhibirán concavidad hacia abajo para concentraciones inferiores a dicho valor, ya que tal es el comportamiento predicho por la ecuación de Hill en estas condiciones.

La otra explicación supone que en todo momento, la velocidad de la reacción enzimática es la suma de dos contribuciones:

$$v = \frac{[S] V_1}{K_1 + [S]} + \frac{[S] V_2}{K_2 + [S]} \quad (2)$$

La Figura 5 muestra los gráficos correspondientes a cinco combinaciones de dos enzimas con  $K_m$  que difieren en un factor de 10, evidenciándose una continua curvatura hacia abajo.

Cummings y col. (296) sostienen, tal como se explicó anteriormente (pág. 71), que la UDP glucuronil transferasa está localizada mayoritariamente en la cara interna de la membrana microsomal, siendo inaccesible a las proteasas, mientras que una pequeña proporción de la enzima estaría en contacto con la cara externa. Así la existencia de dos formas, la "escondida" y la "expuesta" de la enzima con diferentes  $K_m$  y  $V_{\max}$  genera, de acuerdo a estos autores, la forma de los gráficos de  $1/v$  en función de  $1/S$ .

Si se invierte la ecuación (2), se obtiene:



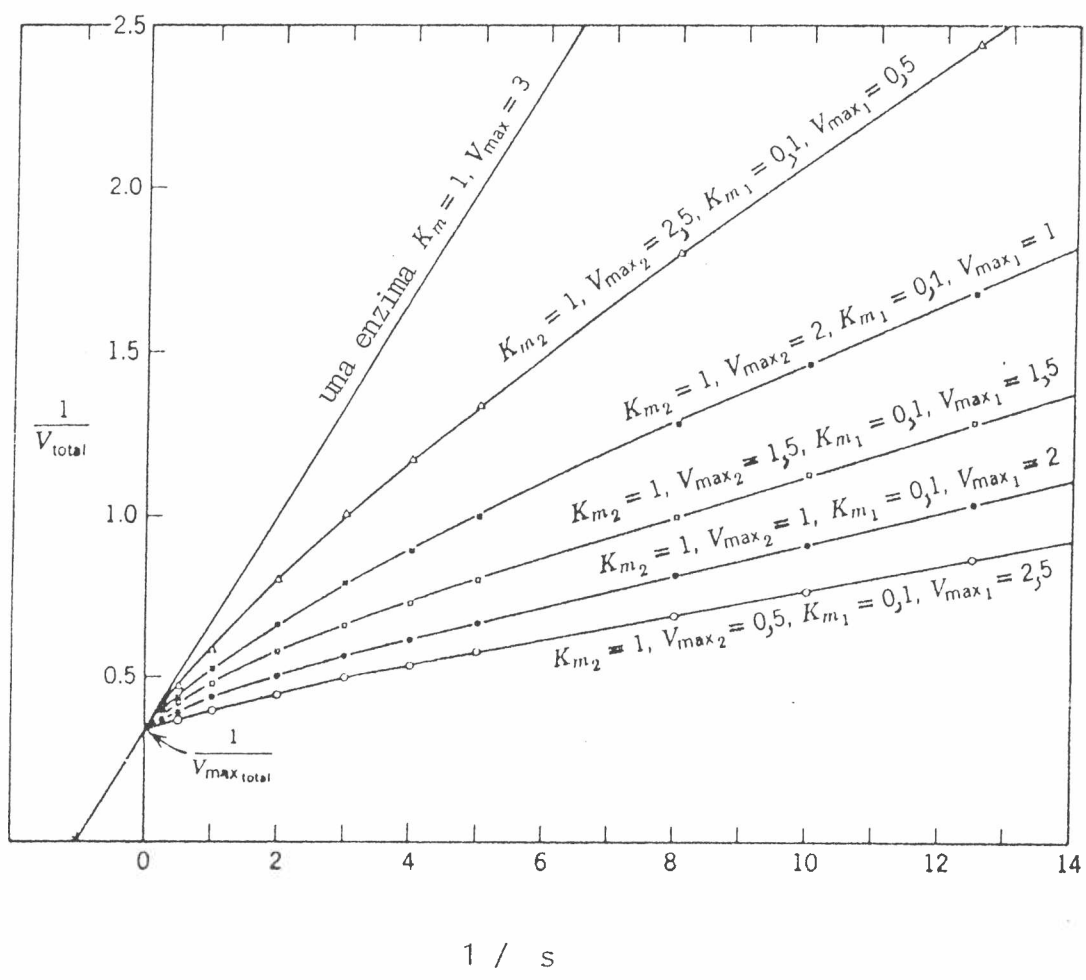


FIGURA 5 - Gráfico de Lineweaver-Burk para dos enzimas catalizando la misma reacción:  $V_{max1} + V_{max2} = 3$  y  $K_{m1} = 0,1 K_{m2}$ .

$$\frac{1}{v} = \frac{1 + (K_1 + K_2) \frac{1}{S} + K_1 K_2 \frac{1}{S^2}}{(V_1 + V_2) + (V_1 K_2 + V_2 K_1) \frac{1}{S}} \quad (3)$$

y a altas concentraciones de S esta relación se aproxima asintóticamente a una forma lineal.

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{(V_1 + V_2)} + \left[ \frac{V_1 K_1 + V_2 K_2}{(V_1 + V_2)} \right] \frac{1}{S} \quad (4)$$

Esta ecuación define la zona de la curva donde la forma de alto  $K_m$  de la enzima, ejerce su máxima contribución a la velocidad inicial,  $v$ .

A muy bajas concentraciones de sustrato, la ecuación (3) conduce a una segunda aproximación lineal:

$$\frac{1}{v} = \frac{V_1 K_2^2 + V_2 K_1^2}{(V_1 K_2 + V_2 K_1)} + \left[ \frac{K_1 K_2}{V_1 K_2 + V_2 K_1} \right] \frac{1}{S} \quad (5)$$

donde predomina la forma de bajo  $K_m$  de la enzima.

Así, la presencia de una zona lineal a altas concentraciones de sustrato, en un gráfico de  $1/v$  en función de  $1/S$  no excluye la presencia de dos enzimas con  $K_m$ s diferentes catalizando la misma reacción.

Las características del gráfico  $1/v$  en función de  $1/S$  permiten observar con mayor detalle la forma de las curvas a bajas concentraciones de sustrato (Figura 4). En la Figura 6 se amplía la escala de la Figura 4 para altas concentraciones de A UDFG. Para trazar la zona lineal de dicha curva, se calcularon los coeficientes de correlación para distintos conjuntos de datos, encontrándose el máximo coeficiente de correlación ( $R = 0,998$ ) para  $0,04 < 1/[A \text{ UDFG}] (\text{mM})^{-1} < 0,4$ .

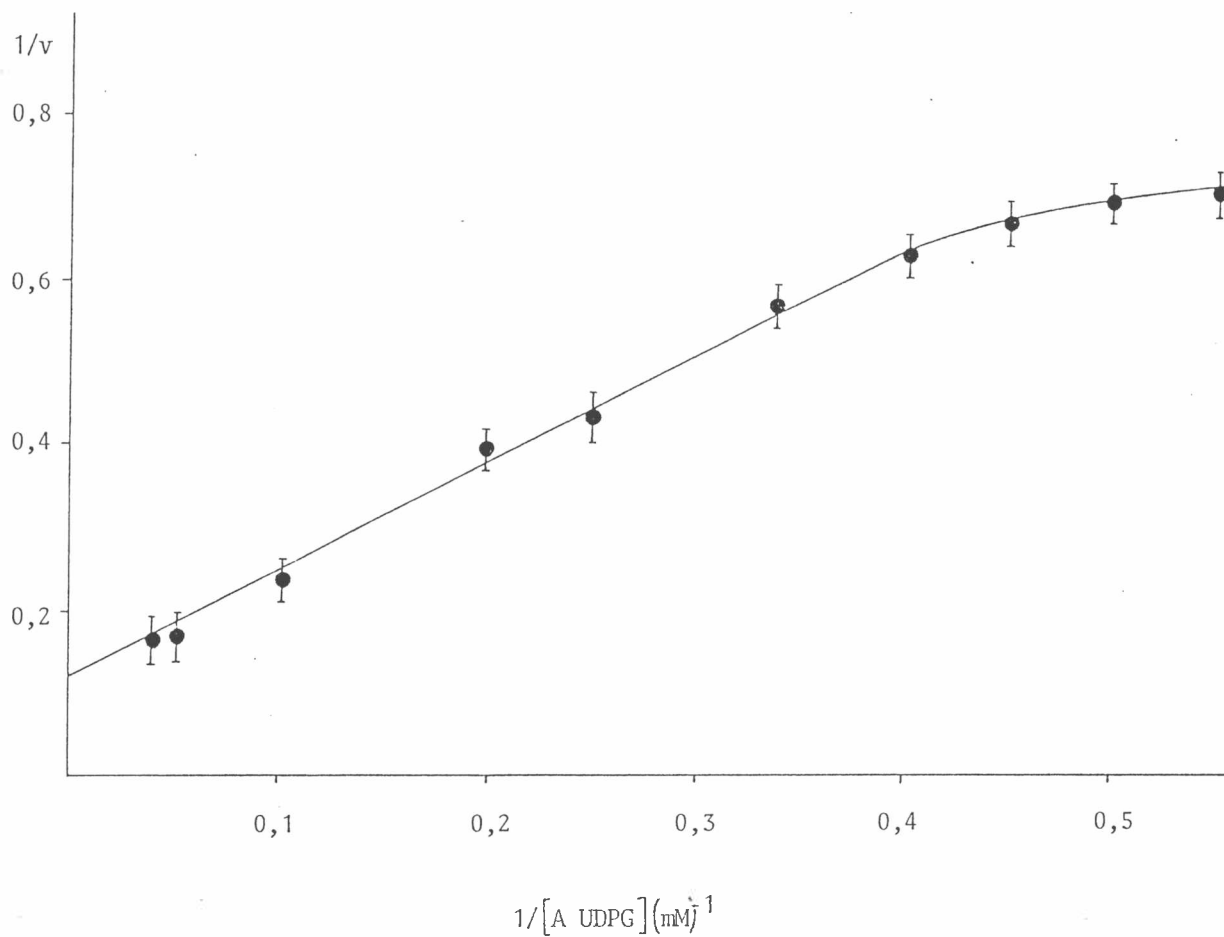


FIGURA 6 - Ampliación de la curva de la Figura 4 para altas concentraciones de A UDP G.

Estos resultados serían compatibles con un cambio de comportamiento de micheliano a cooperativo al bajar la concentración de sustrato por debajo de 2,5 mM o con un neto predominio de la forma de alto  $K_m$  de la enzima a altas concentraciones de sustrato.

## CAPITULO II

### LA CARENCIA DE ACIDOS GRASOS ESENCIALES

Cuando se realizaron estos experimentos, existía una tendencia generalizada que consideraba a la fluidez de la membrana como la responsable de los más diversos fenómenos en los sistemas biológicos. Así, el transporte a través de membranas, las actividades enzimáticas, la división celular, algunos efectos hormonales y el reconocimiento a nivel de receptores, parecían depender del estado de fluidez global del sistema.

Estos hechos se sustentaban en los exitosos experimentos de Shinitzky (50) a nivel internacional y Farías (228) en nuestro país. Este último, en particular, detectó numerosas correlaciones entre los coeficientes de Hill de enzimas alostéricas y la fluidez, medida a través del índice de dobles ligaduras, para diversos sistemas estudiados. En ese contexto quisimos investigar la relación entre las propiedades alostéricas de la UDP glucuronil transferasa y la dinámica de la membrana microsomal.

Para ello se alimentaron cobayos con dietas carentes de ácidos grasos esenciales, tal como se indicó anteriormente (página 105), esperando que la ausencia de los mismos provocara una disminución de su concentración en la membrana microsomal, capaz de alterar las propiedades físicas de esta última y la cinética de la UDP-glucuronil transferasa.

La carencia de ácidos grasos esenciales en los mamíferos origina síntomas típicos en la piel y mucosas, así como en diversos órganos, conduciendo a la muerte del animal, si el tratamiento se extiende por períodos largos de tiempo. Por eso en nuestros experimentos se estudiaron los efectos de la deficiencia de ácidos grasos a tiempos cortos, obteniéndose un patrón típico de deficiencia de ácidos grasos temprana sin síntomas de enfermedad en los animales.

#### LA COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS.

La carencia de ácidos grasos esenciales altera significativamente la composición de ácidos grasos de la membrana microsomal.

La alimentación de cobayos con dietas carentes de ácidos grasos esenciales provocó cambios típicos en el patrón de ácidos grasos de la membrana microsomal. Los datos de la Tabla II evidencian una disminución gradual del contenido del ácido linoleico, acompañado de un aumento progresivo en la proporción de los ácidos palmitoleico y oleico, constituyendo todos estos, síntomas inequívocos del desarrollo de una carencia de ácidos grasos temprana. Asimismo, se observa un incremento en la proporción del ácido palmítico. En efecto, a los 14 días de tratamiento, ya se aprecian diferencias

T A B L A I I

COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS DE MICROSOMAS DE COBAYOS ALIMENTADOS CON  
DIETA NORMAL Y CARENTE DE ACIDOS GRASOS ESENCIALES (Porcentaje en peso).

Acido graso	Tiempo de alimentación con dieta carente de ácidos grasos esenciales (en días)			
	0*	7	14	21
14 : 0	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,3 ± 0,1 ○
16 : 0	13,9 ± 0,6	15,4 ± 0,5	16,8 ± 0,6 ○	18,5 ± 0,5 ○
16 : 1	1,2 ± 0,1	1,5 ± 0,1	2,0 ± 0,1 ●	2,4 ± 0,2 ○
18 : 0	26,8 ± 1,2	26,5 ± 1,1	26,4 ± 1,2	26,0 ± 1,1
18 : 1	9,7 ± 0,4	12,9 ± 0,4 ●	17,5 ± 0,7 ○	21,6 ± 0,9 ○
18 : 2	34,4 ± 1,1	30,1 ± 0,8 ●	24,3 ± 0,9 ○	19,0 ± 0,6 ○
20 : 3w9	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1
20 : 3w6	0,6 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1
20 : 4w6	9,3 ± 0,4	9,0 ± 0,3	8,8 ± 0,2	8,3 ± 0,3
22 : 5w3	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,1
22 : 6w3	1,4 ± 0,1	1,2 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,7 ± 0,1
I D L	1,31	1,22	1,12	1,02

Los distintos símbolos indican los ácidos grasos de los microsomas carentes que presentan diferencias significativas respecto de los microsomas normales, con su correspondiente nivel de significación. Las comparaciones se hicieron mediante el test de Student. ○ p < 0,005 y ● p < 0,001.

Los resultados son la media de determinaciones en 4 animales procesados separadamente, con sus respectivas desviaciones estándar.

El IDL se calculó como se indicó en Procedimientos Experimentales (pág.85)

\*) Corresponde a cobayos alimentados con dieta normal durante 7 días.

significativas en el contenido de este ácido graso. Sin duda, la consecuencia más notoria es la ya mencionada disminución en el contenido de ácido linoleico. En efecto, los microsomas provenientes de animales alimentados con la dieta carente de ácidos grasos esenciales, muestran diferencias significativas en el contenido de ácido linoleico a partir del séptimo día de tratamiento. La disminución en los niveles de ácido araquidónico, en cambio, es muy leve.

La rata presenta un patrón de deficiencia de ácidos grasos semejante, aunque con una característica diferencial: la aparición del ácido eicosa-5,8,11-trienoico, el cual se encuentra en muy bajas concentraciones en la membrana microsomal normal. Es éste un efecto compensatorio muy difundido (335) en el que la disminución de un ácido graso polinosaturado esencial, el ácido araquidónico, origina el aumento de otro ácido polinosaturado de una familia no esencial: el ácido eicosa 5,8,11-trienoico antes mencionado.

Sin embargo, este mecanismo de compensación no se presenta en la membrana microsomal de cobayos.

En el mismo marco deben considerarse los aumentos de los ácidos palmítoleico y oleico. Así, la Tabla II presenta diferencias significativas en el contenido de ácido oleico, a los 14 días de alimentación con la dieta deficiente en ácidos grasos esenciales, mientras que para el ácido palmítoleico se observan diferencias significativas a partir del séptimo día de tratamiento.

En la Tabla II se toma como membrana normal a los microsomas provenientes de cobayos alimentados durante 7 días con la dieta normal. Podría creerse que los cambios en la composición de ácidos grasos de dicha tabla se deben, en realidad, a variaciones dentro del lote control, dependientes del período de alimentación. La Tabla III desecha tal posibilidad, ya que



T A B L A     III

COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS DE MICROSDOMAS DE COBAYOS ALIMENTADOS CON  
DIETA NORMAL (porcentaje en peso).

Acido graso	Tiempo de alimentación (en días)		
	7	14	21
14 : 0	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,1
16 : 0	13,9 ± 0,6	13,4 ± 0,7	13,8 ± 0,5
16 : 1	1,2 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1
18 ; 0	26,8 ± 1,2	27,4 ± 1,1	27,0 ± 1,5
18 : 1	9,7 ± 0,4	9,8 ± 0,3	9,9 ± 0,4
18 : 2	34,4 ± 1,1	34,8 ± 1,2	34,5 ± 1,3
20 : 3w9	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,3 ± 0,1
20 : 3w6	0,6 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1
20 : 4w6	9,3 ± 0,4	9,5 ± 0,5	9,5 ± 0,4
22 : 5w3	0,9 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,9 ± 0,1
22 : 6w3	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,9 ± 0,1
I D L	1,31	1,32	1,30

Los resultados son la media de determinaciones en 4 animales procesados separadamente, con sus respectivas desviaciones estándar.

El IDL se calculó como se indicó anteriormente (pág. 85).

no se observan diferencias en la composición de ácidos grasos de microsomas en cobayos alimentados durante 7, 14 y 21 días, con la dieta normal de composición controlada.

El índice de dobles ligaduras decrece continuamente con el período de deficiencia de ácidos grasos.

La Tabla II también exhibe las variaciones en el IDL como consecuencia de la carencia de ácidos grasos esenciales. El cálculo de este parámetro reviste especial importancia, ya que durante mucho tiempo fue considerado como uno de los factores determinantes de la fluidez de la bicapa lipídica y, más aún, como una estimación de dicha fluidez (229).

El IDL, que se relaciona con el número promedio de dobles enlaces por molécula, disminuye progresivamente al aumentar el período de deficiencia de ácidos grasos esenciales en los cobayos. Pero no ocurre lo mismo en la rata. En efecto, a los cuatro días de tratamiento (335) se observa una caída del IDL, que se acentúa a los 11 días, cuando todavía el incremento en los ácidos monoinsaturados no fue capaz de compensar la pérdida de ácidos poliinsaturados de la familia linoleica. Este índice, sin embargo, se normaliza a los 23 días de carencia, debido al aumento en la proporción de ácidos monoenoicos y a la síntesis e incorporación del ácido eicosa-5,8,11-trienoico. En los cobayos, la caída continua del IDL se debe en gran medida a la falta de síntesis compensatoria de este último ácido graso.

La carencia de ácidos grasos no modifica la relación molar colesterol:fosfolípido.

Para que el IDL pueda ser considerado como una medida de la fluidez

(229), otros parámetros tales como la relación FC:FE y el cociente colesterol:fosfolípido, deben permanecer constantes. El colesterol restringe la movilidad de las cadenas hidrocarbonadas por encima de la  $T_t$  (131) y el alto grado de empaquetamiento de la FE la hace menos fluida que la FC (93), como se explicó anteriormente (pág. 33).

En la Tabla IV puede observarse que la carencia de ácidos grasos no altera la relación colesterol:fosfolípido a lo largo del período estudiado. La incubación de fibroblastos humanos con ácidos grasos poliinsaturados (348) tampoco modificó la relación colesterol:fosfolípido. En algunas líneas celulares (349), se han detectado mutantes en los que el aumento de ácidos grasos insaturados es acompañado por una disminución en dicha relación colesterol:fosfolípido (mol:mol). En otros sistemas (350) se han descrito aumentos de la relación FE:FC debido a incubaciones con ácidos grasos poliinsaturados.

#### LAS PROPIEDADES DINAMICAS

La carencia de ácidos grasos provoca aumentos en la  $r_s$ .

La Figura 7 muestra cómo varía la  $r_s$  con la concentración de proteína microsomal para los microsomas con 21 días de carencia, comparativamente con los microsomas normales, discutido anteriormente. Puede apreciarse que las pendientes de ambas rectas no son iguales, lo que trae aparejado dos consecuencias relacionadas entre sí. Por un lado, el error relativo que se comete al trabajar a altas concentraciones de proteína, es mayor para los microsomas normales respecto de los carentes. Por ejemplo, para los microsomas normales, el error relativo al comparar suspensiones de concentraciones igua-

T A B L A I V

RELACION COLESTEROL : FOSFOLIPIDO (mol:mol) EN MICROSOMAS  
NORMALES Y DEFICIENTES EN ACIDOS GRASOS ESENCIALES.

Período de deficiencia (días)			
0	7	14	21
$0,32 \pm 0,04$	$0,33 \pm 0,01$	$0,28 \pm 0,03$	$0,30 \pm 0,02$

Los resultados son la media de determinaciones en 3 animales procesados separadamente, con sus respectivas desviaciones estándar.

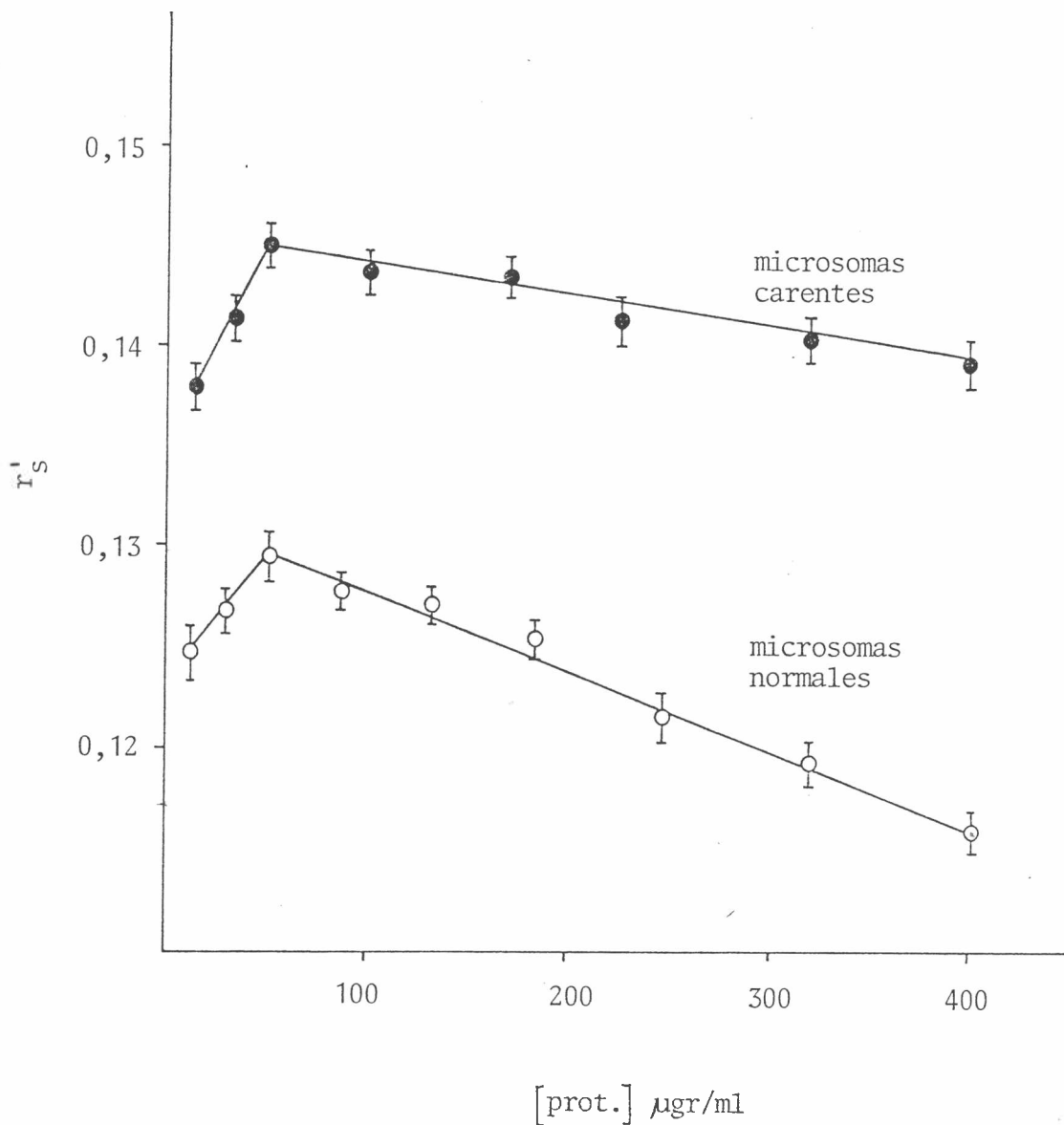


FIGURA 7 - Variación de la anisotropía de fluorescencia observada en función de la concentración de proteína microsomal a 37°C. Los datos son la media de 6 determinaciones con sus respectivas desviaciones estándar. Las condiciones experimentales son las mismas que en la Figura 1.

les a 50  $\mu\text{gr prot/ml}$  y 400  $\mu\text{gr prot/ml}$  es del 11%, mientras que para los microsomas carentes dicho error alcanza sólo un 4,3%. Por otro lado, si se comparan las anisotropías de fluorescencia de ambas membranas a una concentración igual a 400  $\mu\text{gr prot/ml}$  se obtendrán diferencias mucho mayores (19%) que las existentes a concentraciones de 50  $\mu\text{gr prot/ml}$  (11,5%), conduciendo a conclusiones equivocadas respecto de las propiedades moleculares del sistema.

Trabajando a esta última concentración de proteínas, se midió la  $r_s$  a 37°C en las diversas preparaciones microsomales. La Tabla V indica un aumento progresivo de la  $r_s$  con el período de carencia que se hace significativo recién a los 21 días de tratamiento. Este resultado es de singular importancia, ya que demuestra que la carencia de ácidos grasos disminuye la fluidez de la membrana microsomal y que esta disminución, de acuerdo a los resultados disponibles, surgiría de la disminución en el IDL. Al respecto, la literatura es contradictoria. Algunos autores (351), no encontraron cambios en la movilidad detectados por RPE, al incorporar ácidos grasos con distinto grado de insaturación en la membrana plasmática de células en cultivo, mientras que otros (352), en condiciones similares pudieron observar modificaciones de las propiedades dinámicas de dicha membrana plasmática.

La carencia de ácidos grasos no origina la aparición de una  $T_t$  entre 10° y 40°C.

Podría pensarse que la disminución de fluidez y del IDL de la membrana microsomal originaría un corrimiento de la  $T_t$  hacia zonas de mayor temperatura, posiblemente hasta su aparición en el rango entre 10° y 40°C. Para

T A B L A V

ANISOTROPIA DE FLUORESCENCIA ESTACIONARIA DEL DPH EN MICROSOMAS  
NORMALES Y DEFICIENTES EN ACIDOS GRASOS ESENCIALES a 37° C.

Período de deficiencia (días)			
0	7	14	21
0,128 ± 0,003	0,133 ± 0,005	0,140 ± 0,004	0,145 ± 0,003 (*)

Los resultados son la media de determinaciones en 4 animales procesados separadamente, con sus respectivas desviaciones estándar. Se siguió la técnica indicada en la Parte II (pp. 90 y 93).

(\*) Presenta diferencias significativas con los microsomas normales para  $p < 0,001$ .

investigar tal posibilidad se midió las  $r_s$  en función de la temperatura, para membranas normales y membranas con 21 días de carencia de ácidos grasos. Los resultados se muestran en la Figura 8. Los microsomas carentes, al igual que los normales, no presentan ninguna discontinuidad en la pendiente al graficar  $\log r_s \times 10^3$  en función a la inversa de la temperatura en °K, lo que descarta la posibilidad que se planteó al comienzo. La  $r_s$  de los microsomas carentes es siempre mayor que la correspondiente a los microsomas normales, apreciándose las diferencias más marcadas a bajas temperaturas. Posiblemente la magnitud del cambio de composición provocado por la carencia de ácidos grasos sea pequeña como para producir una variación apreciable en la  $T_t$ . Otra explicación podría ser que la  $T_t$  fuera sensible a cambios en la composición de las cabezas polares, pero no a modificaciones en la composición de los ácidos grasos (111) para la membrana microsomal.

#### LA UDP-GLUCURONIL TRANSFERASA

La cooperatividad aparente del A UDP G desaparece al aumentar el período de carencia de ácidos grasos.

En los experimentos que se detallan en este capítulo, se ha trabajado con una sola concentración de p-nitrofenol y concentraciones variables de A UDP G siguiendo la técnica descrita anteriormente (97). Se estudió cómo variaba la velocidad inicial con la concentración de A UDP G para los distintos tipos de microsomas, normales y carentes, mostrándose los resultados en la Figura 9. Las membranas normales presentan una clara concavidad hacia abajo, en el gráfico de Lineweaver-Burk, para concentraciones de A UDP G < 2,5 mM. A medida que aumenta el período de carencia, esa cooperatividad



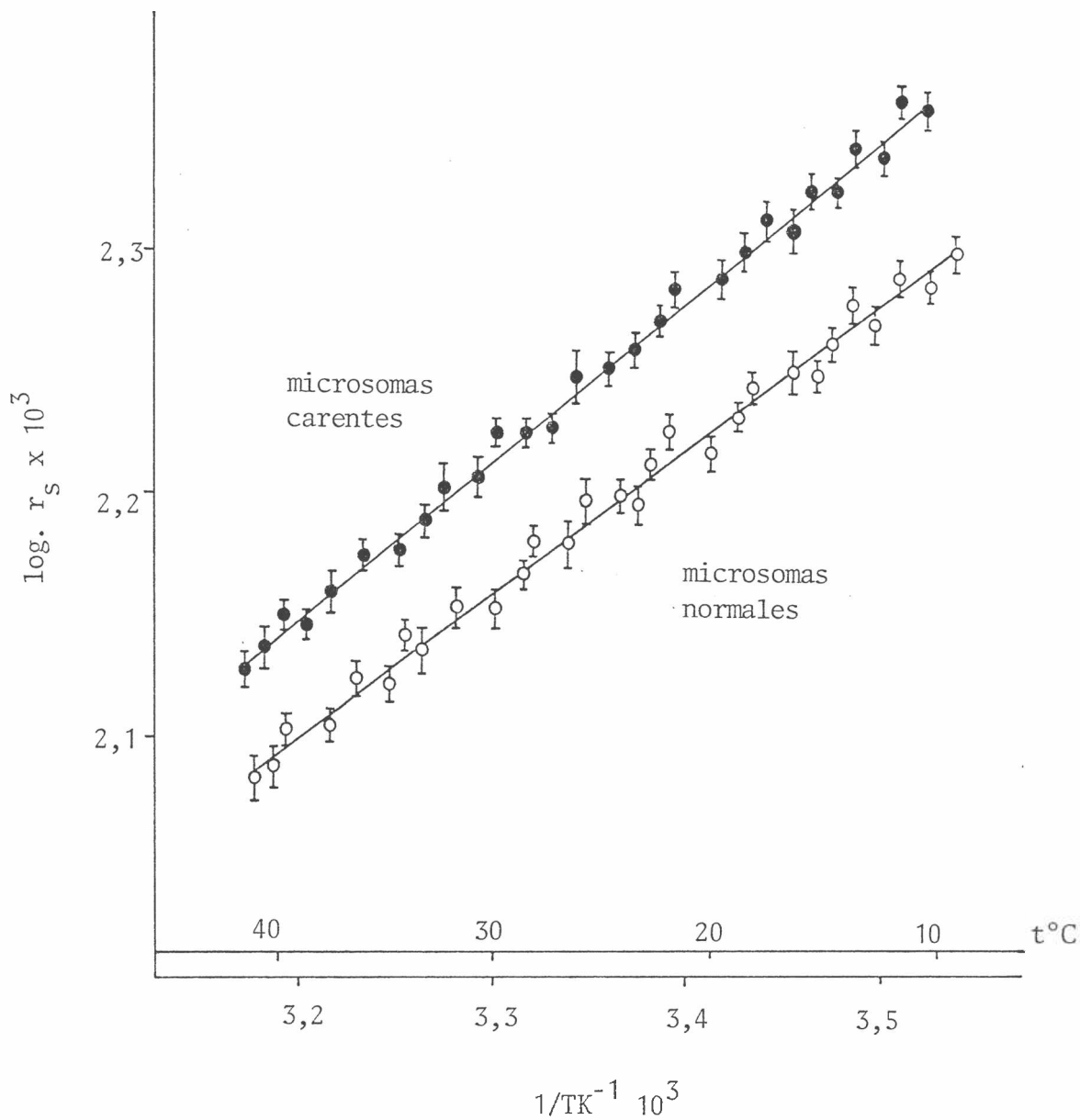


FIGURA 8 - Propiedades termotrópicas de la membrana microsomal normal, detectada a través de la medición de la  $r_s$  a distintas temperaturas. Las condiciones experimentales son las mismas que en la Figura 3. Los resultados son la media de determinaciones en 3 animales procesados individualmente, con sus respectivas desviaciones estándar.

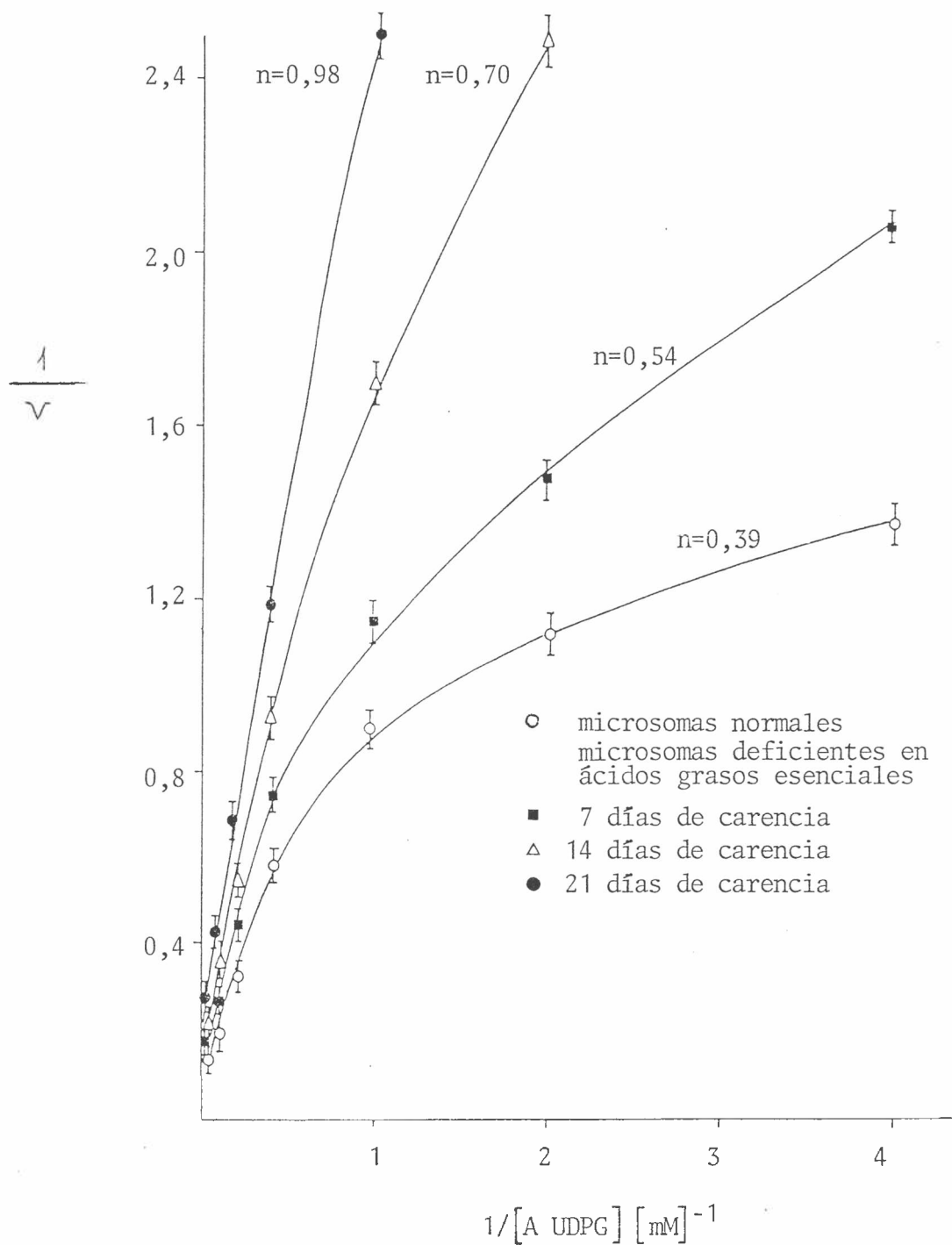


FIGURA 9 - Gráfico de Lineweaver-Burk para la UDP-glucuronil transferasa de microsomas normales y deficientes en ácidos grasos esenciales. Las condiciones experimentales son las indicadas en la Figura 4.

aparente desaparece hasta que, a los 21 días de carencia, el gráfico corresponde prácticamente a una enzima michaeliana. Los mismos resultados se pueden apreciar en una representación de Hill (Figura 10), donde se observa claramente que por encima de una concentración igual a 2,5 mM de A UDP G las pendientes para todos los tipos de microsomas son iguales a 1, mientras que, por debajo de esa concentración, se registra un aumento de la pendiente desde  $0,39 \pm 0,02$  para microsomas normales, hasta  $0,98 \pm 0,04$  para microsomas con 21 días de carencia de ácidos grasos esenciales.

La Tabla VI resume las propiedades cinéticas de la UDP glucuronil transferasa en los distintos tipos de preparaciones microsomales. Además de la variación en la cooperatividad aparente con el tiempo de carencia, se pueden observar las variaciones en la  $V_{\max}$  aparente de la enzima. La denominamos  $V_{\max}$  aparente porque fue medida para una concentración fija de p-nitrofenol. Dicha  $V_{\max}$  disminuye progresivamente desde  $8,5 \pm 0,3$  n moles/min mgr prot. para microsomas normales, hasta  $5,5 \pm 0,2$  n moles/min mgr prot. los microsomas correspondientes a 21 días de carencia de ácidos grasos esenciales.

¿Pueden atribuirse los cambios en las propiedades cinéticas de la UDP-glucuronil transferasa a variaciones en la fluidez de la membrana?

Se conocen diversos mecanismos de modulación de la actividad enzimática (pág. 58) por acción de los lípidos. Podríamos dividirlos en dos grandes grupos: regulaciones globales, a través de cambios en el estado físico de los lípidos y regulaciones directas para aquellas enzimas que tienen un requerimiento específico por un tipo particular de lípido.

Kimelberg y Papahadjopoulos (56, 224) encontraron correlaciones entre

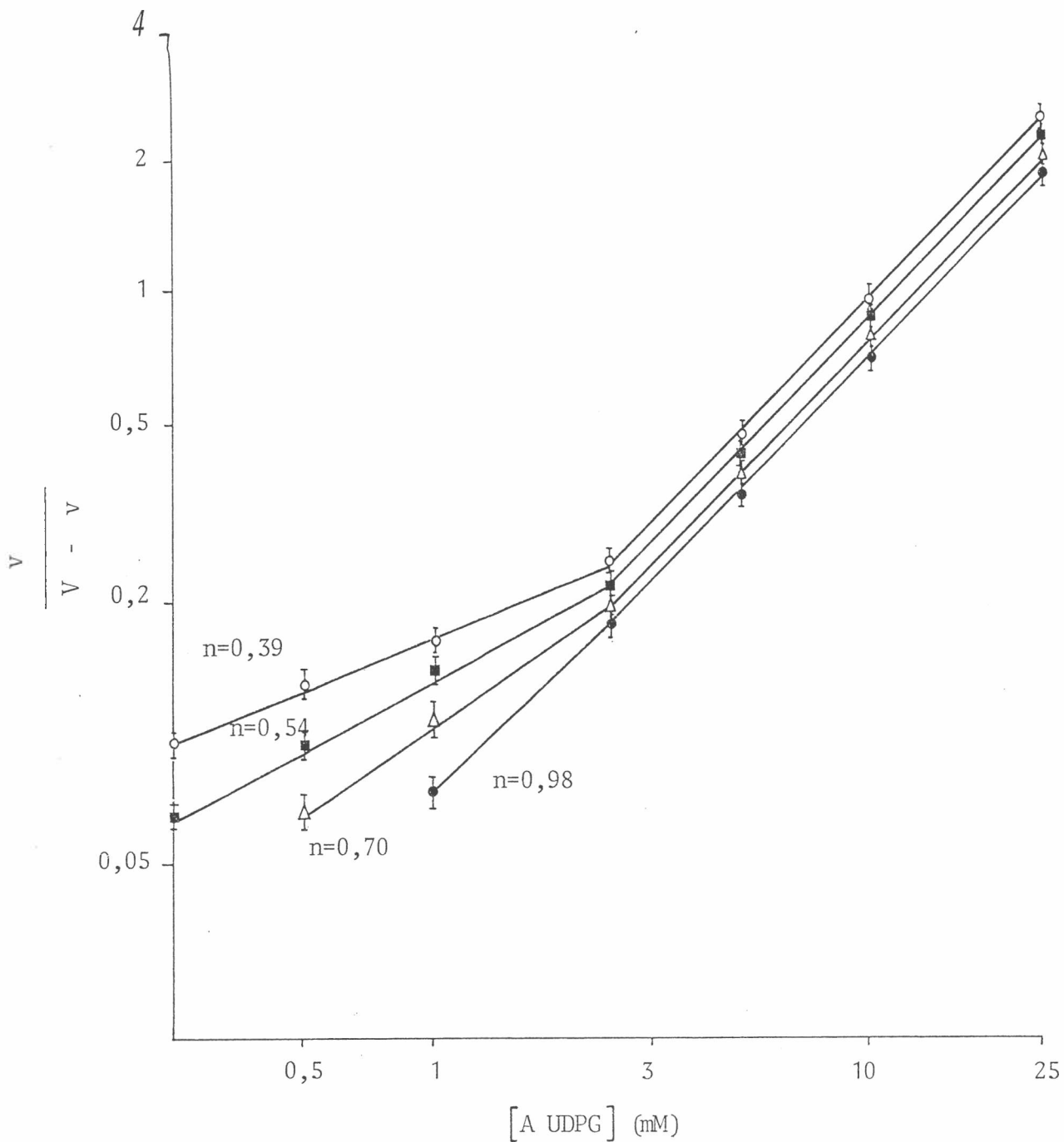


FIGURA 10 - Gráfico de Hill correspondiente a los datos experimentales de la Figura 9. Las rectas fueron ajustadas por el método de cuadrados mínimos. Las pendientes y sus respectivas desviaciones estándar se calcularon mediante el correspondiente análisis estadístico y constan en la Tabla VI. Las explicaciones de los símbolos corresponden a las dadas en la Figura 9.

T A B L A V I

PROPIEDADES CINÉTICAS DE LA UDP-GLUCURONIL TRANSFERASA EN MICROSOMAS  
NORMALES Y DEFICIENTES EN ÁCIDOS GRASOS ESENCIALES.

	Período de deficiencia			
	0	7	14	21
n	0,39 ± 0,02	0,54 ± 0,03 □	0,70 ± 0,03 □	0,98 ± 0,04 □
V <sub>max ap.</sub>	8,5 ± 0,3	7,3 ± 0,3	6,5 ± 0,2 □	5,5 ± 0,2 □

□ Presentan diferencias estadísticas con los microsomas normales para  $p < 0,005$ .

Los valores de n se obtuvieron a partir de las pendientes de las rectas de la Figura 10, determinadas por cuadrados mínimos.

Las desviaciones estándar fueron calculadas mediante el correspondiente análisis estadístico.

Los valores de V<sub>max ap.</sub> (n moles/min mgr prot) y sus desviaciones estándar se obtuvieron de la misma forma a partir de la Figura 9, efectuando el correspondiente análisis de regresión por cuadrados mínimos para altas concentraciones de sustrato.

la fluidez de las cadenas de hidrocarbonados y la reactivación de la  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$  ATP esa purificada. En nuestro laboratorio, Garda y Brenner (226, 227) demostraron que el transporte de la glucosa 6 fosfato hasta el lumen de la membrana microsomal es afectado por la incorporación de alcoholes de bajo peso molecular y colesterol, que modifican la estructura y movilidad de la bicapa lipídica. Muy relacionados con nuestros experimentos se encuentran aquéllos de Farías y col. (229), quienes, como ya se mencionó han encontrado numerosas correlaciones entre la cinética de enzimas alostéricas y el grado de fluidez de las membranas donde ellas se encuentran.

El caso de la UDP-glucuronil transferasa, sin embargo, no aparece con tanta claridad todavía. En estos experimentos se detectan cambios en la fluidez, atribuibles a variaciones en el IDL, ya que la relación colesterol:fosfolípido se mantiene constante. A su vez, aparecen modificaciones graduales en la cooperatividad aparente de la UDP glucuronil transferasa. ¿Es posible establecer una relación causa-efecto entre ambos resultados experimentales? La UDP-glucuronil transferasa es una enzima cuya actividad está restringida por los lípidos (301, 302) presentando diversas alteraciones de acuerdo al mecanismo perturbador empleado. Más aún, la enzima purificada y delipidizada recupera su actividad por el agregado de fosfolípidos. Y es en este aspecto donde los dos grupos de investigadores que han estudiado la enzima durante años coinciden : el porcentaje de reactivación depende de la fluidez del lípido empleado. Erickson y col. (312) observaron que el grado de activación depende de la longitud y grado de insaturación de las cadenas de ácidos grasos de la lecitina utilizada. Por su parte Singh y col. (297) encontraron que la reactivación más eficiente se obtenía al emplear fosfatidilcolina de yema de huevo y fosfatidilcolina micro-

somal en el estado fluido. A pesar de ello, creemos que nuestros resultados experimentales hasta aquí presentados, más los obtenidos por estos investigadores en el sistema purificado no son suficientes para concluir inequívocamente que los cambios en la cinética de la UDP-glucuronil transferasa se sustentan en variaciones globales dinámicas de la membrana microsomal.

### CAPITULO III

#### LA INCORPORACION DE COLESTEROL "IN VIVO"

Con el objeto de dilucidar si las alteraciones en las propiedades cinéticas de la UDP-glucuronil transferasa se sustentaban en cambios de la fluidez de la membrana debido a la carencia de ácidos grasos, se ensayó otro método de modificación de la estructura: la incorporación de colesterol mediante dietas ricas en el mismo. Para ello se alimentaron cobayos con una dieta enriquecida en dicho esteroide durante 25 días, tal como se indicó previamente (pág. 106), y se analizaron las propiedades dinámicas y estructurales de la membrana microsomal, así como las características cinéticas de la UDP-glucuronil transferasa.

#### ANALISIS LIPIDICO

La incorporación de colesterol no provocó cambios en la composición total de ácidos grasos de la membrana microsomal.

Para evidenciar los cambios que pudiera promover la incorporación de



colesterol en la membrana microsomal, se analizó la composición de ácidos grasos. La Tabla VII no muestra diferencias significativas en el contenido de ningún ácido graso. No obstante, se puede observar un leve aumento en la proporción relativa de ácido linoleico y ácido araquidónico.

El IDL tampoco muestra diferencias apreciables entre los microsomas normales y los enriquecidos con colesterol. Estos resultados no concuerdan con los obtenidos por otros autores (353), que describieron cambios en los niveles de ácidos grasos saturados y especialmente no saturados, al modificar el contenido de colesterol de células en cultivo.

Sería lógico esperar un aumento significativo del contenido de los ácidos polinsaturados como compensación del efecto rigidizante del estero-  
rol. Sin embargo, como puede observarse, en el período estudiado no se evidenciaron tales efectos en nuestros experimentos.

La relación FC-FE disminuyó apreciablemente en los microsomas enriquecidos con colesterol.

El efecto del colesterol de la dieta sobre la composición lipídica de la membrana microsomal se puede observar en la Tabla VIII. Luego de 25 días de alimentación con una dieta que contenía 3% de colesterol, los microsomas de hígados de cobayo evidenciaron prácticamente una duplicación en el porcentaje del estero-  
rol. La incorporación de colesterol en los microsomas hepáticos provocó un aumento de la relación colesterol-fosfolípido desde 0,31 hasta 0,46. Esta cifra se aproxima, pero no alcanza al máximo valor observado en membranas biológicas: una relación molar colesterol:fosfolípido 1:1 medido por RMN y difracción de rayos X (4). Pero la administración de colesterol también provocó otros cambios, no esperados,

T A B L A VII

COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS DE MICROSOMAS NORMALES Y ENRIQUECIDOS CON COLESTEROL.

Ácido graso	Tipo de microsomas	
	N	N + C
14 : 0	0,7 ± 0,1	0,5 ± 0,1
16 : 0	15,0 ± 0,4	14,1 ± 0,3
16 : 1	1,2 ± 0,1	1,0 ± 0,4
18 : 0	26,3 ± 0,1	25,7 ± 0,6
18 : 1	9,2 ± 0,6	8,4 ± 0,4
18 : 2	32,7 ± 0,8	34,5 ± 0,6
20 : 3w9	1,1 ± 0,1	0,9 ± 0,2
20 : 3w6	0,7 ± 0,1	0,5 ± 0,1
20 : 4w6	10,2 ± 0,2	11,9 ± 0,3
22 : 5w3	1,3 ± 0,1	1,2 ± 0,3
22 : 6w3	1,6 ± 0,1	1,3 ± 0,2
I D L	1,29	1,32

Símbolos: N = microsomas normales

N+C = microsomas enriquecidos con colesterol.

Los resultados son la media de determinaciones en 3 animales procesados separadamente con sus respectivas desviaciones estándar.

T A B L A V I I I

COMPOSICION LIPIDICA DE MICROSOMAS NORMALES Y ENRIQUECIDOS CON COLESTEROL.

Lípidos	N	N + C
Colesterol	$13,4 \pm 3,1$	$28,7 \pm 2,3$
Esteres de colesterol	$1,9 \pm 0,1$	$3,1 \pm 0,2$
Triglicéridos	$1,2 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,1$
Fosfatidilcolina	$47,8 \pm 1,8$	$41,5 \pm 1,9$
Fosfatidiletanolamina	$25,3 \pm 0,4$	$13,7 \pm 0,5$
Fosfatidilinositol	$6,0 \pm 0,2$	$5,8 \pm 0,2$
Fosfatidilserina	$2,1 \pm 0,2$	$3,2 \pm 0,1$
Esfingomiélinea	$2,3 \pm 0,4$	$2,2 \pm 0,2$
Colesterol:fosfolípido (mol:mol)	$0,31 \pm 0,10$	$0,46 \pm 0,08$
Fosfatidilcolina: fosfatidiletanolamina (p:p)	$1,89$	$3,03$

Símbolos: N = microsoma normal

N+C = microsoma enriquecido en colesterol.

Los resultados son la media de determinaciones en 3 animales procesados separadamente con sus respectivas desviaciones estándar.

en la composición lipídica de la membrana microsomal. En efecto, la Tabla VIII muestra un notable incremento de la relación FC-FE, provocado por el tratamiento. En lugar de un aumento compensatorio en el contenido de ácidos grasos polinsaturados, la membrana microsomal exhibe un incremento en la relación FC-FE originada principalmente en una brusca disminución del porcentaje relativo de la FE.

Es conocido que la temperatura de transición de las FE es entre 15° y 20°C superior a las correspondientes FC. Los grupos fosforiletanolamina forman una red compacta, estabilizada por fuertes interacciones electrostáticas y puentes de hidrógeno entre el nitrógeno de grupo amonio y los oxígenos del fosfato. En cambio, la fosfatidilcolina presenta 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. Esto explicaría la mayor fluidez de la FC con respecto a la FE (93), y por lo tanto el efecto compensatorio con respecto a la incorporación de colesterol.

La FC y la FE tampoco presentan diferencias significativas en sus composiciones de ácidos grasos.

La Tabla IX presenta las composiciones de ácidos grasos de la FC y la FE, los fosfolípidos mayoritarios de la membrana microsomal. Si bien no aparecieron diferencias en la composición de ácidos grasos como consecuencia de la incorporación de colesterol, se observa, sin embargo, algunas características interesantes. El índice de dobles ligaduras de la FC es sensiblemente menor que el correspondiente a la FE. Esta es una característica generalizada de la FE, descrita incluso en la membrana plasmática de células en cultivo (351).

T A B L A I X

COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS DE FC y FE DE MICROSOMAS NORMALES Y ENRIQUECIDAS CON COLESTEROL (Porcentaje en peso).

Ácido graso	F C		F E	
	N	+ C	N	+ C
14 : 0	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1
16 : 0	13,8 ± 0,5	13,0 ± 0,4	9,5 ± 0,3	9,2 ± 0,4
16 : 1	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,3 ± 0,1
18 : 0	27,9 ± 1,0	27,0 ± 1,1	28,8 ± 1,4	26,0 ± 1,7
18 : 1	9,0 ± 0,4	8,7 ± 0,1	8,3 ± 0,3	8,4 ± 0,4
18 : 2	43,1 ± 1,6	44,0 ± 2,7	32,2 ± 1,5	34,2 ± 1,8
20 : 3ω9	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1
20 : 3ω6	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1
20 : 4ω6	3,9 ± 0,2	5,1 ± 0,8	13,3 ± 0,6	14,8 ± 0,6
22 : 5ω3	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1	1,7 ± 0,2	1,6 ± 0,1
22 : 6ω3	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1	2,8 ± 0,1	2,8 ± 0,2
I D L	1,13	1,16	1,50	1,53

Símbolos: N = microsoma normal

+ C = microsoma enriquecido con colesterol

Los resultados son la media de determinaciones en 3 animales procesados separadamente con sus respectivas desviaciones estándar.

La FC contiene un bajo porcentaje de ácido araquidónico, pero una gran proporción de ácido linoleico comparada con la FE.

#### LAS PROPIEDADES DINAMICAS.

##### El colesterol disminuye la movilidad translacional y rotacional en la membrana microsomal.

En estos experimentos se empleó el pireno como marcador fluorescente para investigar la movilidad translacional en la membrana microsomal, tal como se explicó anteriormente (pág. 96). La relación  $I_E/I_M$  obtenido a partir del correspondiente espectro de fluorescencia del pireno, es proporcional a la movilidad translacional del marcador en una dada membrana. La Figura 11 muestra el efecto del colesterol sobre la eficiencia de la formación del excímero del pireno. Esta eficiencia aumenta linealmente con la concentración de pireno para ambas membranas, la normal y la enriquecida con colesterol. Pero los valores de  $I_E/I_M$  son mayores en las membranas normales que en las enriquecidas con el esteroide, para cualquier relación pireno:proteína. Así se pone de manifiesto el efecto condensante del colesterol que, sin embargo, ha sido negado por algunos autores (100, 135).

También estudiamos las propiedades termotrópicas de ambas membranas midiendo la  $r_s$  del DPH a distintas temperaturas. La Figura 12 indica que la  $r_s$  de los microsomas enriquecidos con colesterol es mayor que la correspondiente a microsomas normales en el rango de temperatura entre 10° y 40°C, aproximadamente. Asimismo, el gráfico no presenta discontinuidades en las pendientes, que pudieran indicar la aparición de una transición

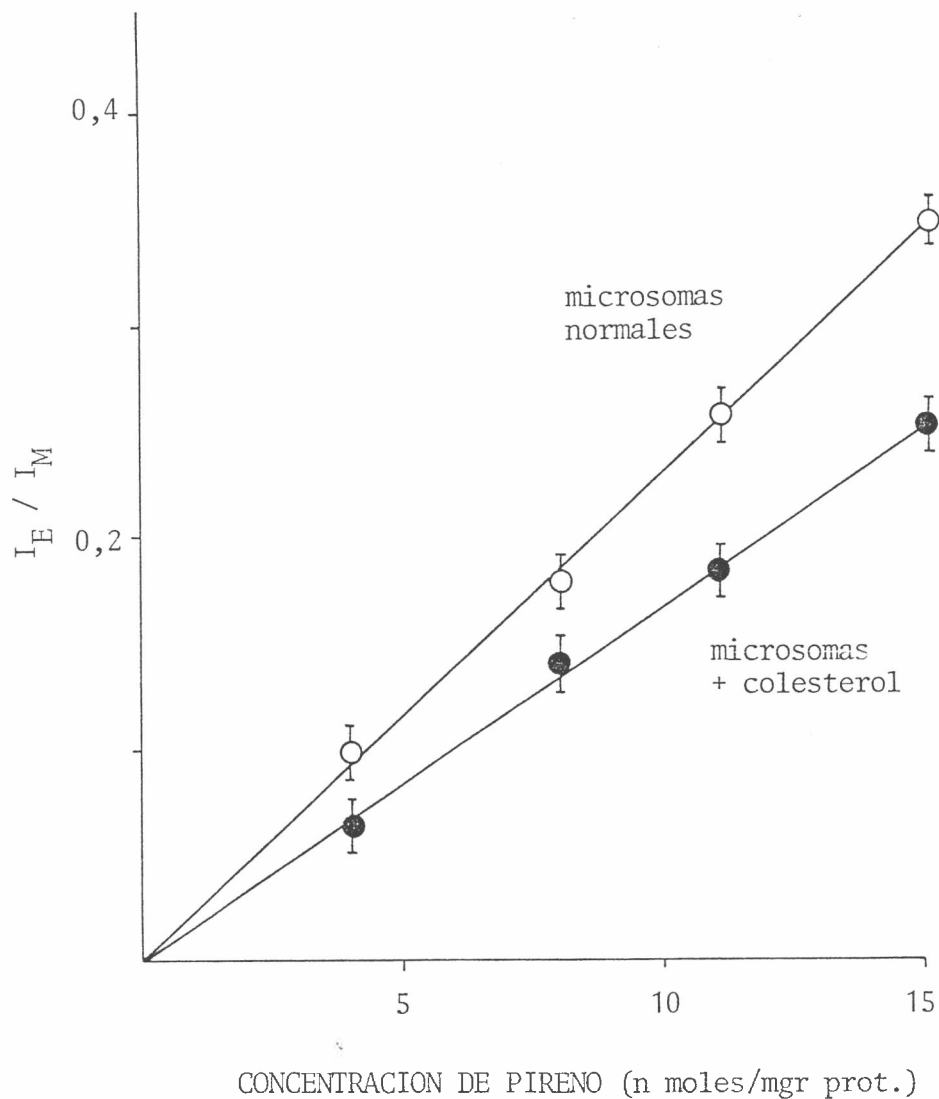


FIGURA 11 - Eficiencia de formación del excímero del pireno en microsomas normales y enriquecidos con colesterol a 37°C.

Las muestras se prepararon como se indicó en Procedimientos Experimentales (pág. 96), a partir de una solución 5mM de pireno en acetona.

Se registró el espectro de fluorescencia excitando a 322 nm. Se obtuvieron así  $I_E$  (470 nm) y  $I_M$  (391 nm) cuyo cociente se grafica en función de la concentración de pireno. Los resultados son la media de determinaciones en 3 animales procesados separadamente con sus respectivas desviaciones estándar.

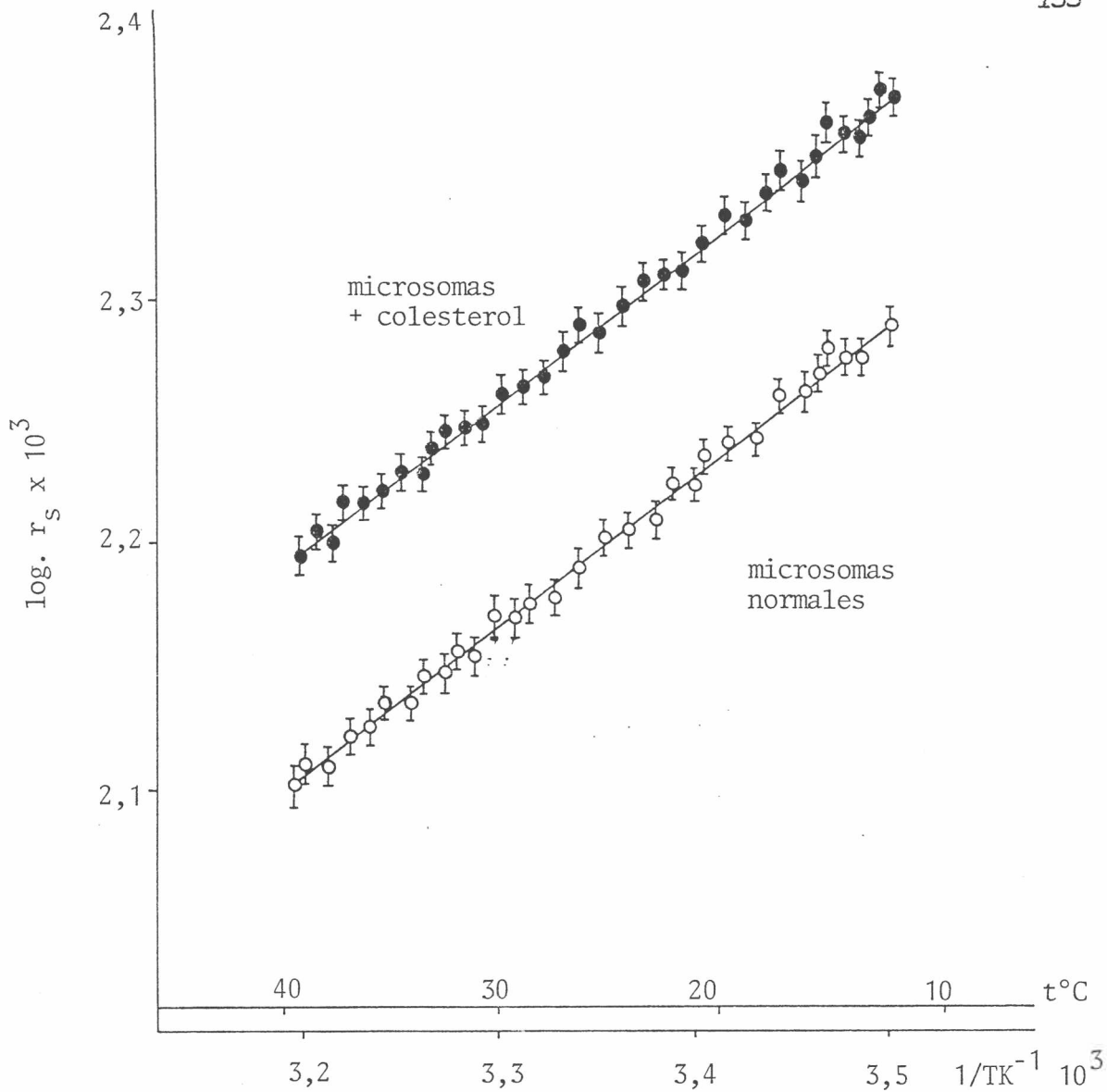


FIGURA 12 - Propiedades termotrópicas de la membrana microsomal detectadas a través de la medición de la  $r_s$  del DPH a distintas temperaturas. Los resultados son la media de determinaciones en 4 animales procesados separadamente, con sus respectivas desviaciones estándar. Las condiciones experimentales son las mismas que en la Figura 1.



de fase en el seno de la membrana microsomal, lo que concuerda con el efecto estabilizante del estero1 en bicapas lipídicas. La Tabla X resume los efectos del colesterol sobre las propiedades dinámicas de la membrana microsomal: la incorporación del 3% de colesterol en la dieta de cobayos durante 25 días, provocó un aumento de la  $r_s$  del DPH desde  $0,132 \pm 0,002$  hasta  $0,164 \pm 0,003$ , y una disminución de las pendientes  $I_E/I_M$  versus concentración de pireno, desde 0,023 a 0,017. Se pone de manifiesto así la disminución en la movilidad rotacional y translacional por acción del colesterol, ampliamente descriptas en vesículas artificiales (135).

El aumento de la relación FC-FE atenúa el efecto rigidizante del colesterol en la membrana microsomal.

Dado que la incorporación de colesterol modificó la relación FC-FE, quisimos investigar la contribución individual de cada uno de estos fosfolípidos a la  $r_s$  observada. Por esta razón se separaron la FC y la FE por cromatografía en capa fina (pág. 82), para luego mezclarlas, manteniendo las mismas proporciones en que se encontraban en la membrana normal y en la enriquecida con colesterol.

Para investigar el efecto del colesterol, se prepararon vesículas con los tres componentes: FC, FE y colesterol, manteniendo también las proporciones originales de la membrana objeto del análisis. En resumen, se "reconstituyó" la membrana microsomal con mezclas binarias de FC y FE o mezclas terciarias de FC, FE y colesterol. Las vesículas así preparadas se marcaron con DPH, tal como se indicó previamente (pág. 93), y se midió su  $r_s$ . Los resultados de estos experimentos se muestran en la Tabla XI. Las vesículas constituidas por FC y FE, manteniendo la proporción de las

T A B L A X

RESUMEN DE PROPIEDADES DINAMICAS DE MICROSOMAS NORMALES Y  
ENRIQUECIDOS CON COLESTEROL A 37° C.

	Pendiente IE/IM vs [ P ]	$r_s$ DPH
M	0,023	0,132 $\pm$ 0,002
M + C	0,017	0,164 $\pm$ 0,003 *

Simbolos: M = microsomas normales

M+C = microsomas enriquecidos con colesterol.

(\*) Hay diferencias significativas para  $p < 0,005$ .

## T A B L A X I

PREPARACION DE LIPOSOMAS DE MICROSOMAS NORMALES Y ENRIQUECIDOS CON COLESTEROL.

Vesícula	Composición (% en peso)	$r_s$
A	FCN: 65,4 FEN: 34,6	$0,112 \pm 0,005$
B	FC + C: 75,2 FE + C: 24,8	$0,100 \pm 0,003$
C	FCN: 53,5 FEN: 28,3 Col (N): 18,2	$0,120 \pm 0,003$
D	FC + C: 46,9 FE + C: 15,5 Col(+C): 37,6	$0,150 \pm 0,005$

Símbolos: Col(N) = contenido de colesterol en microsomas normales  
 Col(+C) = contenido de colesterol en microsomas enriquecidos con colesterol.  
 + C = microsomas enriquecidos con colesterol  
 N = microsomas normales

Las vesículas A y B se prepararon con las proporciones de FC y FE que aparecen en la Tabla VII, excluyendo el resto de los fosfolípidos.

Las vesículas C y D se prepararon con las cantidades de FC, FE y colesterol que se muestran en la Tabla VII, excluyendo los otros fosfolípidos.

membranas normales (A), presentan una  $r_s$  mayor que las vesículas formadas por FC y FE, mezcladas en la proporción de las membranas enriquecidas con colesterol (B). Esto se debe a que estas últimas (B) presentan un aumento de la relación FC-FE, que las hace más fluidas. Si observamos el comportamiento de las mezclas ternarias, las vesículas (C), "semejantes" a la membrana microsomal normal, exhiben en cambio una  $r_s$  menor a las vesículas ternarias (D) reconstituidas en la proporción correspondiente a la membrana enriquecida con colesterol.

Estos experimentos muestran que, si bien la FC fluidifica la bicapa lipídica, dicho efecto no alcanza a compensar totalmente la acción global rigidizante del colesterol sobre la estructura de la membrana.

El aumento de la proporción FC-FE en este experimento, se debe, según Lim y col. (356), a un aumento de la síntesis de FC inducido por el colesterol. Este aumento se correlaciona bien con un aumento en la actividad de la CTP fosfocolina citidil transferasa y su traslocación hacia los microsomas. Se considera que esta traslocación regula la actividad de la enzima (357) y determina la velocidad de biosíntesis de la FC. Sin embargo, no se conoce aún, exactamente, el rol que juega el colesterol modificando la afinidad de la enzima por la membrana.

#### EL COLESTEROL Y LA UDP-GLUCURONIL TRANSFERASA

La incorporación de colesterol modifica la cinética de la UDP-glucuronil transferasa.

Para estudiar el efecto del colesterol sobre las propiedades de la UDP-glucuronil transferasa, se determinaron las constantes cinéticas para la enzima, en microsomas normales y enriquecidos con colesterol. Se

midieron las velocidades iniciales de reacción, en función de concentraciones variables de A UDP G a algunas concentraciones fijas de p-NF, y en función de cantidades variables de p-NF, para varias concentraciones fijas de A UDP G, tal como se explicó anteriormente (pág. 99). Si los datos se grafican en forma de doble recíproca, es posible obtener las constantes correspondientes a los complejos binarios. Al graficar luego las intersecciones sobre el eje  $1/v$  en función de las concentraciones fijas de sustrato, se obtiene la  $V_{\max}$  de la reacción y las constantes correspondientes a los complejos ternarios (pág. 99).

Este análisis cinético se efectuó en los microsomas normales y en los enriquecidos con colesterol. Las Figuras 13, 14 y 15 muestran los resultados correspondientes a los microsomas enriquecidos con colesterol, y la Tabla XII resume los datos cinéticos para ambos tipos de membranas.

Se puede observar que la incorporación de colesterol provoca incrementos en la  $V_{\max}$  y una disminución en todas las constantes, lo que pone de manifiesto un aumento en la afinidad de la enzima por el sustrato, ya sea cuando éste se une en primer lugar o cuando lo hace en segundo término.

La Tabla XII también muestra una variación en la cooperatividad aparente del ácido UDP-glucurónico, provocado por la incorporación de colesterol. En efecto, dicho parámetro calculado a partir de la ecuación de Hill, pasa de  $0,40 \pm 0,02$  en los microsomas normales, a  $0,68 \pm 0,03$  en los microsomas enriquecidos con colesterol, indicando así una tendencia de la enzima a pasar de una cinética no michaeliana a otra michaeliana.

¿Cuál es el mecanismo de acción del colesterol sobre la UDP-glucuronil transferasa?

Hasta el momento no podemos atribuir los cambios en las propiedades

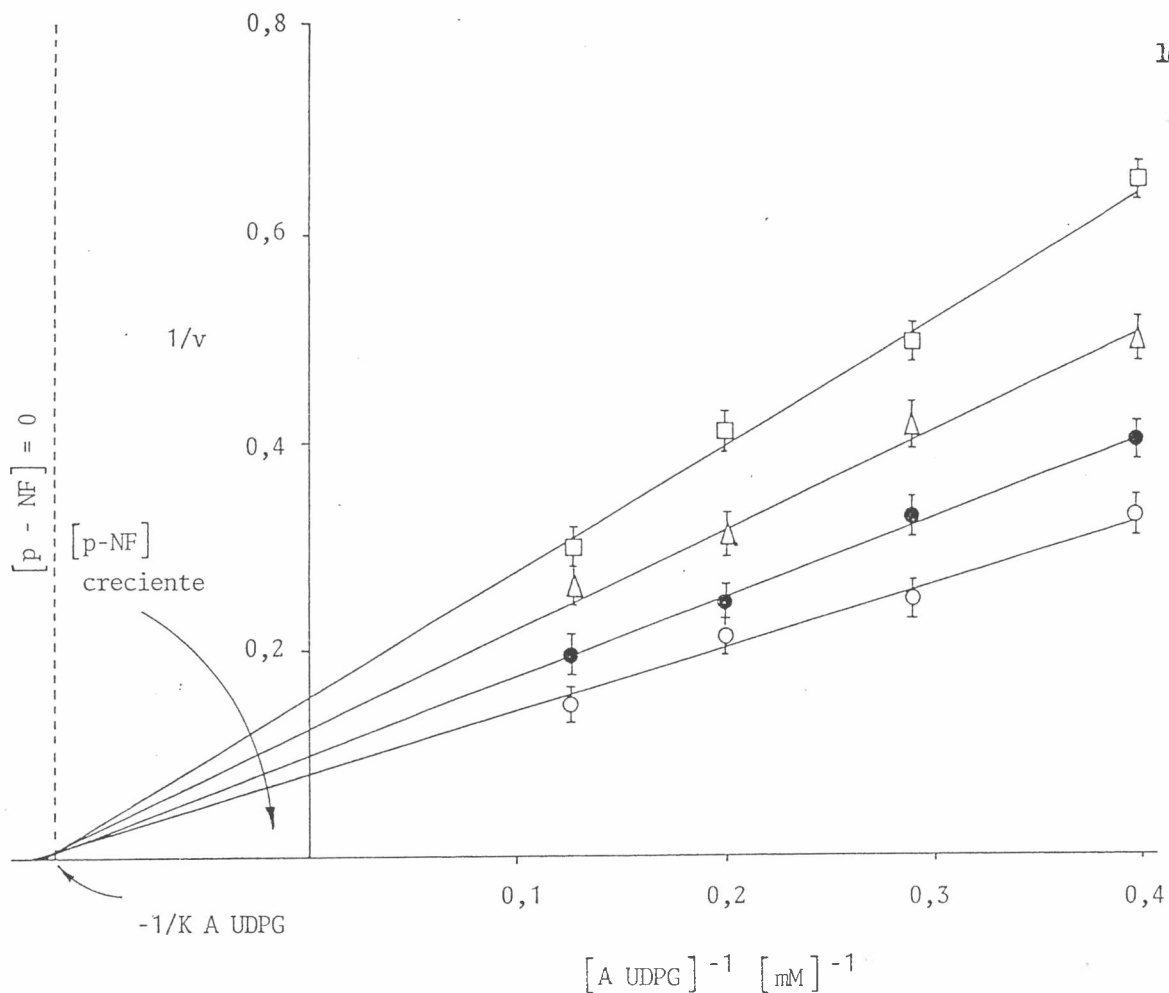


FIGURA 13 - Gráfico de Lineweaver-Burk para la UDP-glucuronil transferasa a 37° C, en microsomas enriquecidos con colesterol.

(□) 0,04 mM; (Δ) 0,06 mM; (●) 0,1 mM; (○) 0,2 mM

Los resultados son la media de determinaciones en 3 animales procesados individualmente con sus respectivas desviaciones estándar.

La  $v$  se expresa como n moles de p-nitrofenol conjugados por min por mgr de proteína microsomal.

Todas las rectas fueron ajustadas por el método de cuadrados mínimos.

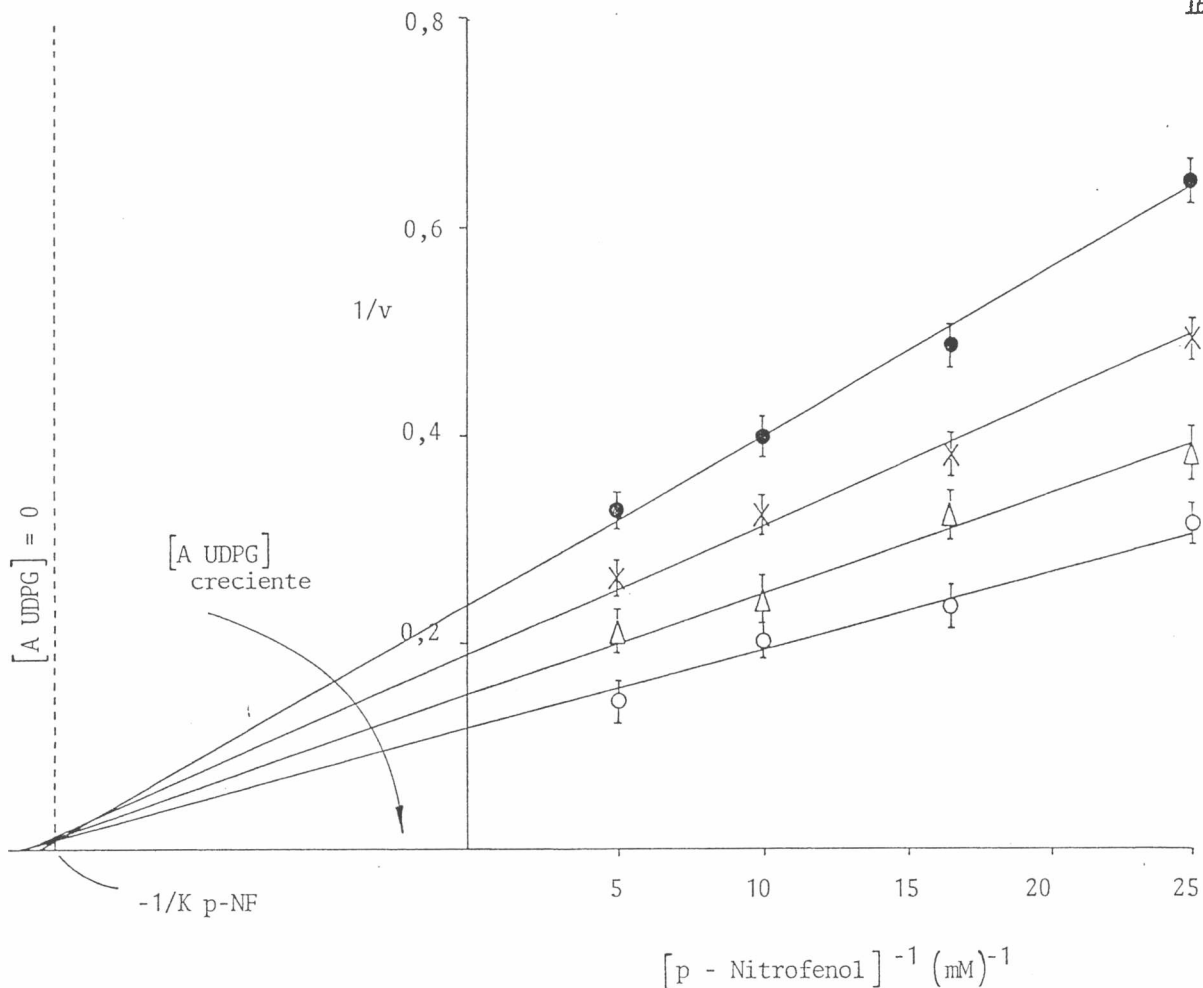


FIGURA 14 - Gráfico de Lineweaver Burk para la UDP-glucuronil transferasa a 37° C, ídem 13.

Las velocidades iniciales se grafican en función de cantidades variables de p-NF para cantidades fijas de A UDP G: 2,5 mM (●), 3,5 mM (×); 5,0 mM (Δ) y 8,0 mM (○).

Las velocidades se expresan como en la Figura 13.

Los resultados son la media de determinaciones en 3 animales procesados individualmente, con sus respectivas desviaciones estándar.

Todas las rectas fueron ajustadas mediante el método de cuadrados mínimos.

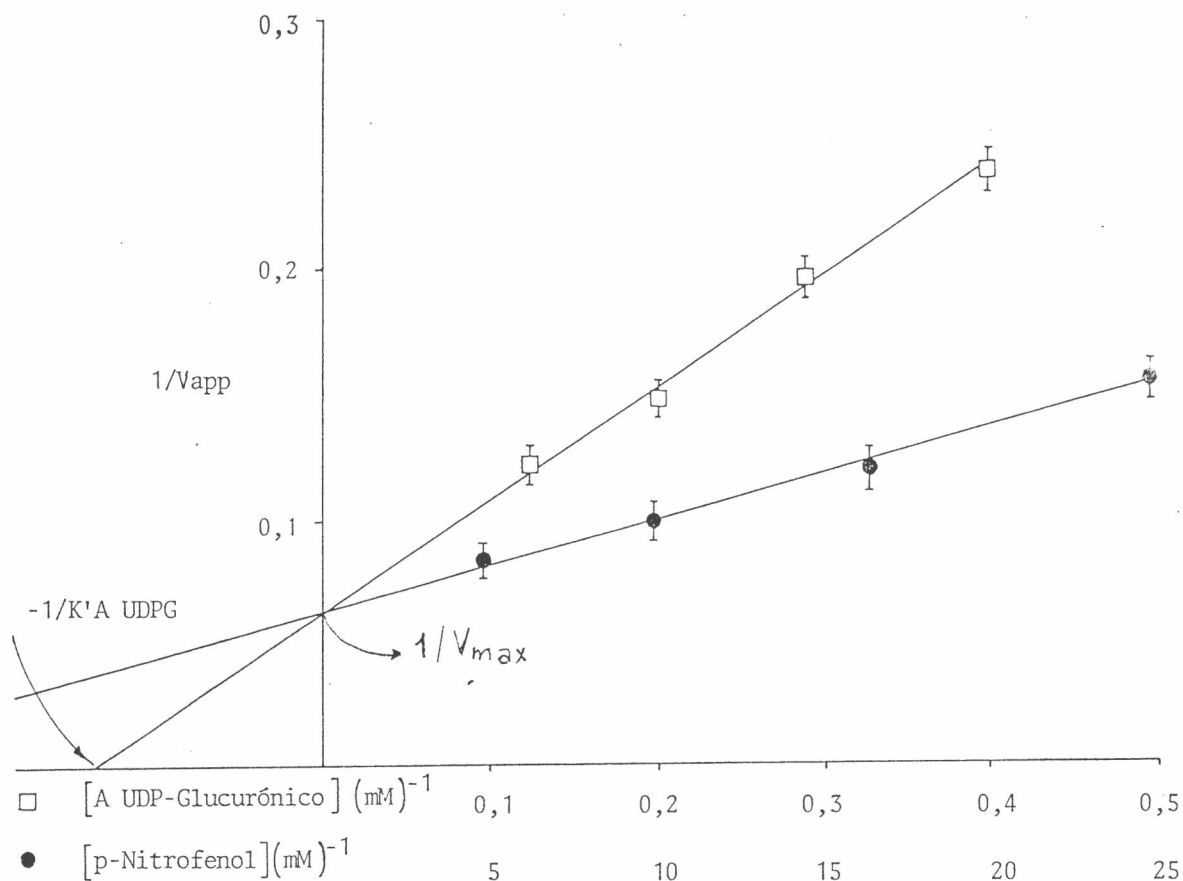


FIGURA 15 - Las intersecciones sobre el eje  $1/v$  de las figuras 13 y 14 se grafican en función de las concentraciones fijas de ambos sustratos para obtener  $V_{max}$ ,  $K^A_{UDPG}$  y  $K^p_{NF}$ , tal cual se explica en Procedimientos Experimentales.

Las rectas fueron ajustadas por el método de cuadrados mínimos.



T A B L A X I I

CONSTANTES CINÉTICAS DE LA UDP-GLUCURONIL TRANSFERASA

	K A UDP G (mM)	K <sup>o</sup> A UDP G (mM)	K P-NF (mM)	K <sup>o</sup> P-NF (mM)	V <sub>max</sub>	Cooperatividad aparente
Normal	12,3 ± 0,4	10,6 ± 0,2	0,12 ± 0,03	0,10 ± 0,01	10,5 ± 1,1	0,40 ± 0,02
Normal + colesterol	8,1 ± 0,3 <sup>o</sup>	7,2 ± 0,1 <sup>o</sup>	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,01	15,9 ± 1,3 <sup>o</sup>	0,68 ± 0,03 <sup>o</sup>

Las constantes cinéticas se determinaron a partir del análisis cinético de las velocidades iniciales para reacciones bisustrato. Los resultados son la media de determinaciones en 3 animales procesados separadamente con sus respectivas desviaciones estándar.

<sup>o</sup> Existen diferencias significativas para p 0,005.

cinéticas de la UDP-glucuronil transferasa, exclusivamente a un efecto de la molécula de colesterol. En efecto, en estos experimentos dichas variaciones pueden deberse a una acción directa del colesterol, a una modificación de la relación FC-FE o a un efecto combinado de ambos. No obstante, estos resultados señalan una coincidencia con nuestros experimentos anteriores: el aumento en el empaquetamiento de la membrana, originado por la incorporación de colesterol, o por la deficiencia de ácidos grasos esenciales, provocan cambios en la cinética de la enzima no michaeliana a michaeliana.

Hochman y col. (299) encontraron que la UDP-glucuronil transferasa delipidizada de hígado de cerdo, presentaba una cinética no michaeliana al ser reconstituido con vesículas unilamelares de FC en el estado gel. En tales condiciones, los gráficos de Lineweaver-Burk mostraban una concavidad hacia abajo. La base para este comportamiento cinético reside en la presencia de un sitio con alta afinidad y otro con baja afinidad para la unión del A UDP G. Estos dos sitios de unión se generan por la presencia de dos subunidades para la unión con el A UDP G en la misma molécula.

Cuando se reconstituye la enzima con fosfolípidos en el estado líquido cristalino, se produce un cambio en la cinética de la enzima, de no michaeliana a michaeliana, mientras que uno de los sitios de unión para el A UDPG pierde su funcionalidad.

Sin embargo, se sabe que a temperaturas fisiológicas, los lípidos de la membrana microsomal se encuentran en el estado líquido cristalino (280), mientras que la UDP-glucuronil transferasa de la membrana nativa presenta una cinética no michaeliana (307). Para compatibilizar sus resultados, Hochman y col. (299) sugirieron que el entorno de la UDP glucuronil transferasa en la membrana nativa, se encontraría en el estado gel, es decir,

en un estado de empaquetamiento diferente con respecto al resto de los lípidos.

Nuestros resultados actuales, así como los obtenidos anteriormente con la carencia de ácidos grasos esenciales, muestran que la cinética no michaeliana de la enzima desaparece al disminuir la fluidez de los lípidos globales. Si analizamos estos experimentos a la luz de las ideas de Hochman y col. (299), deberíamos admitir que los lípidos del entorno de la enzima se encuentran en la fase gel, mientras que los lípidos globales están en un estado líquido cristalino. Así, la carencia de ácidos grasos o la incorporación de colesterol rigidizarían los lípidos globales, produciendo un efecto fluidificante opuesto en el entorno de la enzima, que cambiaría su cinética no michaeliana por otra michaeliana.

La existencia de entornos enzimáticos, en un estado físico distinto al de los lípidos globales, ha sido suficientemente demostrada a la luz de los conocimientos actuales sobre la interacción lípidos-proteína (358, 359). También se conoce que las proteínas tienen marcada preferencia por la fase líquido cristalina (130) y que el colesterol genera separaciones laterales de fase al interaccionar preferentemente con determinadas especies lipídicas (24, 52). Si a estos hechos le sumamos el requerimiento específico de la UDP-glucuronil transferasa por la FC (300), estaríamos en condiciones de enunciar un modelo que explicara la interacción de la UDP-glucuronil transferasa con el entorno lipídico. Se sabe que el colesterol interacciona preferentemente con las fosfatidilcolinas saturadas (149), excluyendo a las moléculas insaturadas. Gruyer y Bloch (149) demostraron que el colesterol rigidiza vesículas con diferentes composiciones de ácidos grasos en el siguiente orden:

FC disaturadas > fosfatidilcolinas monoinsaturadas > fosfatidilcolinas diinsaturadas.

La menor interacción del colesterol con las especies insaturadas da asidero a nuestra hipótesis, sugiriendo una posible segregación de las moléculas de fosfatidilcolina insaturadas respecto de los dominios colesterol-fosfatidilcolina saturada. Estas FC excluidas fluidificarían los lípidos del ánulus de la UDP glucuronil transferasa provocando así el pasaje de una cinética no michaeliana a michaeliana.

En resumen, proponemos que los cambios en la cinética de la UDP-glucuronil transferasa, debido a la incorporación de colesterol, sería la consecuencia de alteraciones en el empaquetamiento de los lípidos en contacto con la enzima (360).

## CAPITULO IV

### LA INCORPORACION DE COLESTEROL "IN VITRO"

Dijimos en el capítulo anterior que los experimentos realizados no permitían atribuir los cambios en las propiedades cinéticas de la UDP-glucuronil transferasa directamente a la molécula de colesterol. En efecto, la incorporación de colesterol "in vivo" fue acompañada de un incremento no esperado en la relación FD-FE. Por eso resultó imprescindible desarrollar un método para modificar exclusivamente el contenido de colesterol de la membrana sin que se alterara el resto de los componentes lipídicos.

Existen diversas técnicas para transferir colesterol entre membranas (361, 362), pero adolecen de dos grandes defectos. Algunas no son selectivas y además del colesterol transfieren fosfolípidos, por ejemplo. Otras emplean tratamientos drásticos tales como altas temperaturas, lo que hace desaconsejable su uso en la membrana microsomal, ya que así se destruirían sus propiedades de barrera. El método ideado por el Dr. Garda en

nuestro laboratorio consiste en la fabricación de liposomas enriquecidos con colesterol, a partir de los mismos lípidos de la membrana microsomal, empleando para la transferencia bajas temperaturas que no perturben la integridad de dicha membrana. Además, la técnica evita la tediosa purificación de las proteínas transportadoras (36<sup>3</sup>) mediante el uso del sobrenadante de 12.000 g que contiene las membranas microsomales y el citosol. La técnica detallada para extraer e incorporar colesterol "in vitro" fue descrita en Procedimientos Experimentales (pág. 106).

#### ANALISIS LIPIDICO

La técnica empleada permite la extracción e incorporación específica de colesterol.

En la Tabla XIII se puede apreciar la necesidad de la presencia de las proteínas transportadoras para una transferencia eficaz del colesterol. En la primera línea se observan el contenido de colesterol y fosfolípidos del microsoma normal. En la segunda línea aparecen los resultados obtenidos al incubar dichos microsomas con liposomas enriquecidos con colesterol (LFC) durante 2 horas a 5° - 7° C. Como puede apreciarse, sólo se logra un leve aumento de la relación colesterol/fosfolípido, ya que en dicho sistema no se encuentran presentes las proteínas transportadoras. Por el contrario, cuando se agrega citosol (N+C), mediante el uso del sobrenadante de 12.000 g (pág. 106), la relación colesterol:fosfolípido aumenta desde 0,368 en los microsomas controles hasta 0,513 en los microsomas enriquecidos con colesterol.

## T A B L A X I I I

CONTENIDO DE COLESTEROL Y FOSFOLIPIDOS DE LOS MICROSOMAS MODIFICADOS.

	Fosfolípido: proteína ( $\mu$ mol/mgr prot.)	Colesterol: proteína ( $\mu$ mol/mgr prot)	Colesterol : fosfolípido (mol/mol)
M N	0,33 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,01	0,364
M N + L F C	0,37 $\pm$ 0,02	0,15 $\pm$ 0,01	0,405
N	0,38 $\pm$ 0,02	0,14 $\pm$ 0,01	0,368
N + C	0,39 $\pm$ 0,01	0,20 $\pm$ 0,02	0,513
N - C	0,37 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,02	0,270

Símbolos: Corresponden a los empleados en Procedimientos Experimentales (pág. 106).

MN = microsomas normales

MN+LFC = microsomas normales incubados con liposomas enriquecidos en colesterol LFC.

N = microsoma control (sobrenadante de 12.000 g incubado con liposoms LF)

N-C = microsomas-colesterol (microsomas con el contenido de colesterol disminuido).

N+C = microsomas + colesterol (microsomas enriquecidos con colesterol)

Para extraer colesterol de la membrana microsomal se incubaron dichos microsomas con liposomas fabricados a partir de sus propios lípidos y cantidades variables de citosol fresco (pág. 106), obteniéndose así los microsomas N-C que aparecen en la Tabla XIII. En esta tabla también se aprecia un aumento en la relación fosfolípido:proteína, para todos los tipos de microsomas, que tal vez sea debido a una pérdida de proteína durante la incubación.

Los liposomas y los microsomas preparados como se indicó en Procedimientos Experimentales (pág. 106), difieren sólo en el contenido de colesterol, por lo que no se esperan cambios en ningún otro componente durante la incubación. Para corroborar esta hipótesis se analizaron la composición de ácidos grasos totales (Tabla XIV), y la composición de ácidos grasos de FC y FE (Tabla XV y XVI), no encontrándose diferencias entre los distintos tipos de microsomas. Tampoco aparecieron modificaciones en la distribución de los diversos fosfolípidos.

#### LAS PROPIEDADES DINAMICAS

La difusión lateral guarda una relación inversa con el contenido de colesterol.

Se evaluó la difusión lateral en los distintos tipos de microsomas, midiendo la eficiencia en la formación del excímero del pireno. En la Figura 16 se aprecia el efecto de la incorporación y extracción de colesterol sobre la movilidad lateral. La eficiencia en la formación del excímero del pireno aumenta linealmente con la cantidad de marcador, mientras que un aumento o disminución de la relación  $I_E/I_M$  corresponde a cambios opuestos en el contenido de colesterol de los microsomas modificados.



## T A B L A X I V

COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS DE MICROSOMAS CON CANTIDADES VARIABLES DE  
COLESTEROL (Porcentaje en peso).

Acido graso	N	N+C	N-C
14 : 0	0,7 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,1
16 : 0	15,6 $\pm$ 0,6	14,8 $\pm$ 1,0	14,5 $\pm$ 0,7
16 : 1	1,1 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 0,2
18 : 0	27,0 $\pm$ 1,4	26,7 $\pm$ 1,2	25,9 $\pm$ 1,3
18 : 1	9,6 $\pm$ 0,6	9,0 $\pm$ 0,4	9,4 $\pm$ 0,5
18 : 2	33,7 $\pm$ 1,8	34,3 $\pm$ 1,2	34,7 $\pm$ 1,9
20 : 3W9	0,8 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 0,1
20 : 3W6	0,5 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,1
20 : 4W6	8,7 $\pm$ 0,4	9,6 $\pm$ 0,3	9,4 $\pm$ 0,4
22 : 5W3	1,0 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,1
22 : 6W3	1,3 $\pm$ 0,4	1,4 $\pm$ 0,2	1,5 $\pm$ 0,2

Símbolos: N = microsomas control

N+C = microsomas enriquecidos con colesterol

N-C = microsomas con menor contenido de colesterol.

Los resultados son la media de determinaciones en 4 animales procesados por separado con sus respectivas desviaciones estándar.

## T A B L A X V

COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS DE FC DE MICROSOMAS CON DISTINTO CONTENIDO DE COLESTEROL (Porcentaje en peso).

Ácido graso	F + C		
	N	+C	-C
14 : 0	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,2	0,3 ± 0,1
16 : 0	12,8 ± 0,4	13,7 ± 1,0	13,0 ± 0,8
16 : 1	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1
18 : 0	27,9 ± 1,1	26,5 ± 1,1	28,1 ± 1,3
18 : 1	8,9 ± 0,3	9,4 ± 0,4	9,3 ± 0,6
18 : 2	44,0 ± 1,4	43,6 ± 2,2	43,3 ± 1,5
20 : 3W9	0,3 ± 0,3	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,1
20 : 3W6	0,6 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1
20 : 4W6	4,0 ± 0,2	4,2 ± 0,2	3,9 ± 0,3
22 : 5W3	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1
22 : 6W3	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1

Símbolos: N = FC de microsomas control

+C = FC de microsomas enriquecidos con colesterol

-C = FC de microsomas con menor contenido de colesterol.

Los resultados son la media de determinaciones en 3 animales procesados separadamente con sus respectivas desviaciones estándar.

T A B L A X V I

COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS DE FE DE MICROSOMAS CON CANTIDADES VARIABLES DE COLESTEROL (Porcentaje en peso).

Acido graso	N	+ C	- C
14 ; 0	0,5 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,1
16 : 0	9,0 $\pm$ 0,8	8,9 $\pm$ 1,3	9,1 $\pm$ 1,4
16 ; 1	1,1 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,5	1,2 $\pm$ 0,1
18 : 0	28,7 $\pm$ 1,6	28,5 $\pm$ 1,8	27,5 $\pm$ 1,7
18 : 1	8,6 $\pm$ 1,4	8,5 $\pm$ 1,2	8,7 $\pm$ 1,6
18 : 2	33,3 $\pm$ 1,9	32,9 $\pm$ 1,9	33,3 $\pm$ 1,8
20 : 3W9	0,6 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,1
20 : 3W6	0,8 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,2
20 : 4W6	12,8 $\pm$ 1,4	13,5 $\pm$ 2,0	13,4 $\pm$ 1,6
22 : 5W3	1,7 $\pm$ 0,3	1,6 $\pm$ 0,4	1,8 $\pm$ 0,5
22 : 6W3	2,9 $\pm$ 0,2	3,0 $\pm$ 0,3	2,7 $\pm$ 0,3

Símbolos: N = FE de microsomas control

+C = FE de microsomas enriquecidas con colesterol.

-C = FE de microsomas con menor contenido de colesterol.

Los resultados son la media de las determinaciones en 3 animales procesados separadamente, con sus respectivas desviaciones estándar.

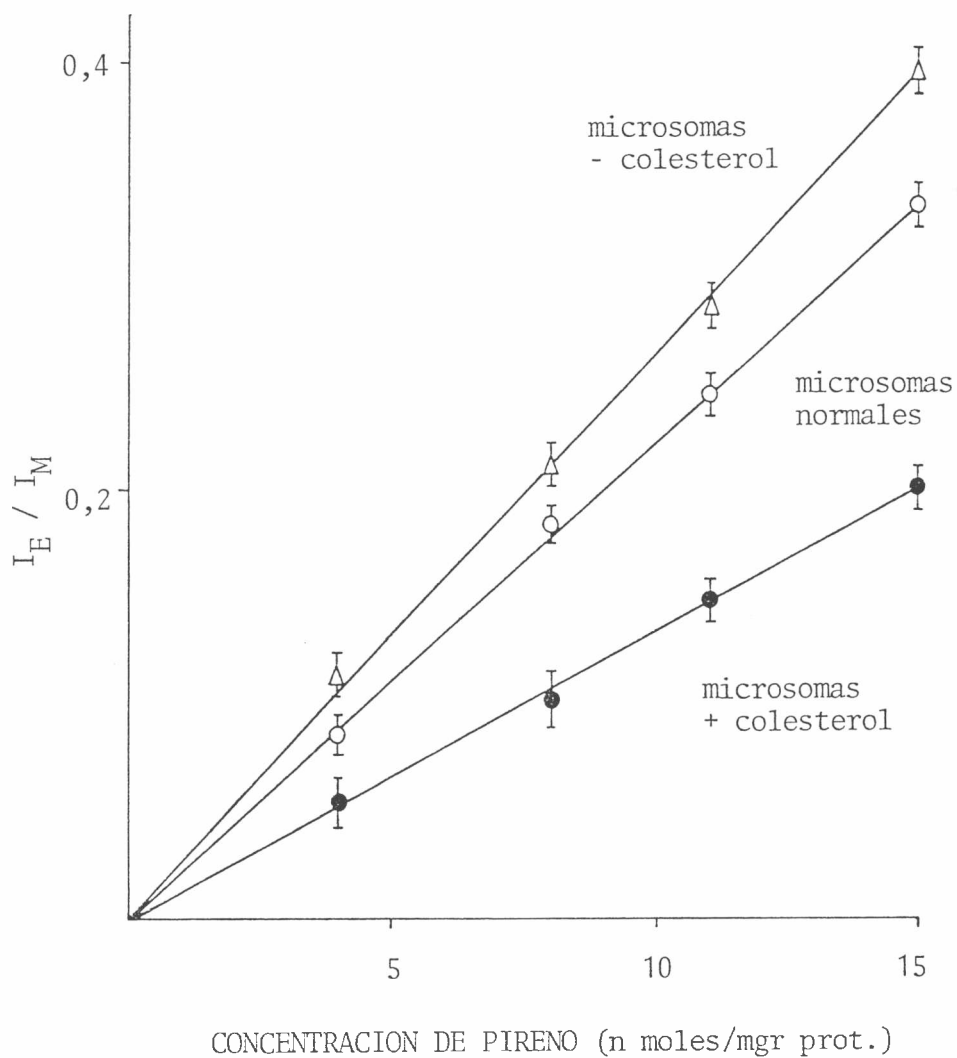


FIGURA 16 - Eficiencia de formación del excímero del pireno en microsomas con distinto contenido de colesterol.

Las condiciones experimentales son las mismas que en la Figura 11.

Los resultados son la media de determinaciones en 3 animales procesados separadamente con sus respectivas desviaciones estándar.

La  $r_s$  guarda una relación directa con el contenido de colesterol.

La Figura 17 muestra las anisotropías de fluorescencia del DPH medidas en función de la temperatura, para los distintos tipos de microsomas, los lípidos totales y los fosfolípidos extraídos de ellos.

A todas las temperaturas el orden relativo de las anisotropías de fluorescencia entre los distintos microsomas es:

$$r_{s \text{ N+C}} > r_{s \text{ N}} > r_{s \text{ N-C}}$$

Para los lípidos totales la secuencia es:

$$r_{s \text{ N+C}} > r_{s \text{ N}} > r_{s \text{ N-C}}$$

mientras que las anisotropías de los fosfolípidos extraídos de los tres tipos de microsomas coinciden. Por otra parte, al comparar las diversas fracciones extraídas de una misma membrana el ordenamiento es:

$$r_{s \text{ microsomas}} > r_{s \text{ lípidos totales}} > r_{s \text{ fosfolípidos}}$$

La primera desigualdad se explica a través del efecto rigidizante de las proteínas (84). La segunda desigualdad, sin embargo, podría no tener ese signo. En efecto, al pasar de los lípidos totales a los fosfolípidos se pierden el colesterol y los triglicéridos que ejercen, por cierto, efectos antagónicos. Así, dependiendo de las cantidades relativas de colesterol y triglicéridos podría invertirse el sentido de la desigualdad.

En todos los casos representados en la Figura 17, se obtuvieron líneas rectas que excluyen la posibilidad de una transición de fases en el rango estudiado.

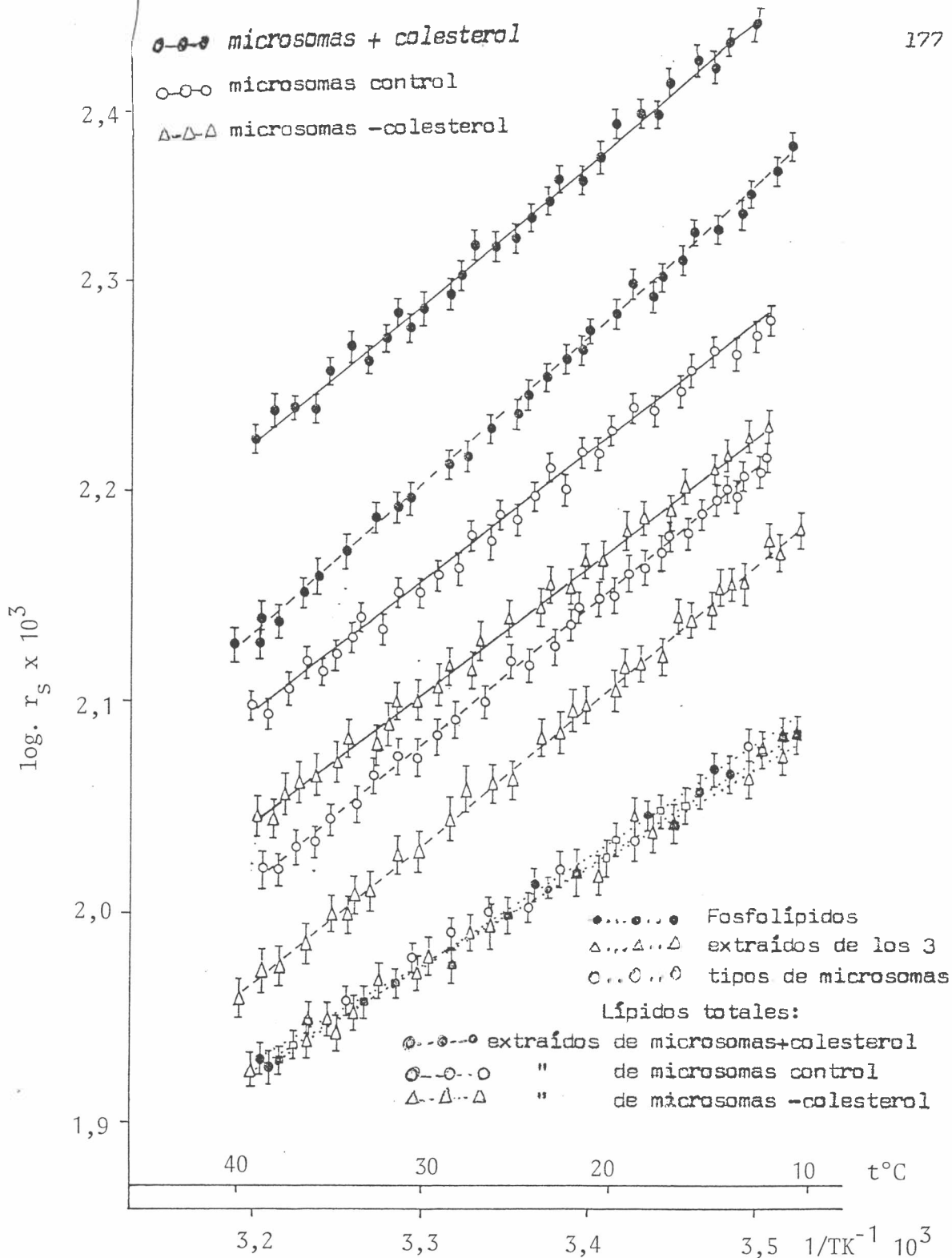


FIGURA 17 - Propiedades termotrópicas de la membrana microsomal y diversas fracciones lipídicas. Los resultados son la media de determinaciones en 3 animales procesados separadamente, con sus respectivas desviaciones estándar. Las condiciones experimentales son las mismas que en la Figura 1.

El ácido trans parinámico detecta una separación de fases en los fosfolípidos.

La Figura 18 muestra los espectros de excitación y fluorescencia del ácido trans parinámico. Así como el DPH, este marcador fluorescente presenta una buena separación entre ambas bandas. Tal como se explicó anteriormente, el ácido trans parinámico prefiere la fase sólida y el cociente de polarización se mantiene constante con la temperatura para un dado porcentaje de lípido en la fase sólida y aumenta abruptamente cuando se inicia alguna solidificación de especies lipídicas. No sólo se midió el cociente de polarización de las membranas microsomales sino, también, de los lípidos totales y fosfolípidos extraídos de ellas, con el objeto de detectar nuevas alteraciones en las propiedades físicas del sistema al reducir la complejidad del mismo. Y este enfoque ha dado resultados en este caso particular. Así, las curvas correspondientes a la membrana microsomal control y a las que poseen menor contenido de colesterol no presentan ningún cambio abrupto que pueda indicar la aparición de fase sólida. En cambio, las curvas correspondientes a los lípidos totales presentan una suave curvatura que evidenciaría la aparición de fase sólida aproximadamente a los 20°C. En los fosfolípidos se advierte un cambio abrupto a los 20°C que indica inequívocamente la aparición de fase sólida a partir de dicha temperatura. Por lo tanto, el resto de los componentes de la membrana, y en especial la proteína, actuaría enmascarando este efecto que se evidencia claramente en la fracción fosfolipídica. (Figura 19).

Una situación distinta se presenta en las membranas enriquecidas con colesterol. Para los microsomas y los lípidos totales se observa una línea recta, indicando que el aumento en el contenido de colesterol destruye cualquier indicio de separación de fases (135).

Por último, los fosfolípidos extraídos de los 3 tipos de microsomas presentan curvas coincidentes con una abrupta transición a los 20°C,

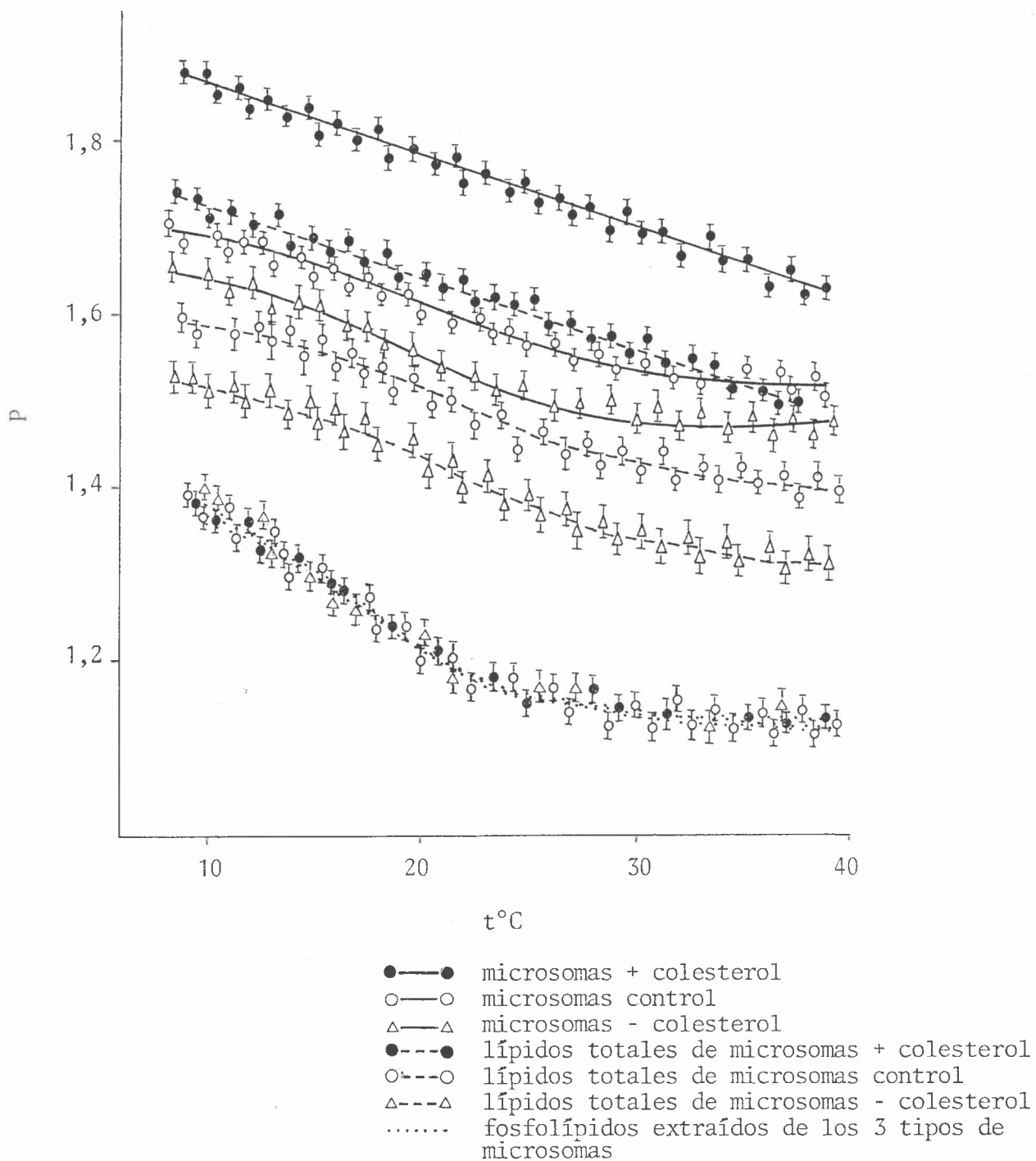


FIGURA 19 - Variación del cociente de polarización  $P$  del ácido  $\beta$  parinámico en función de la temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ). Los resultados son la media de determinaciones en 3 animales procesados separadamente. Se siguió la técnica detallada en Procedimientos Experimentales (págs. 90 y 94).



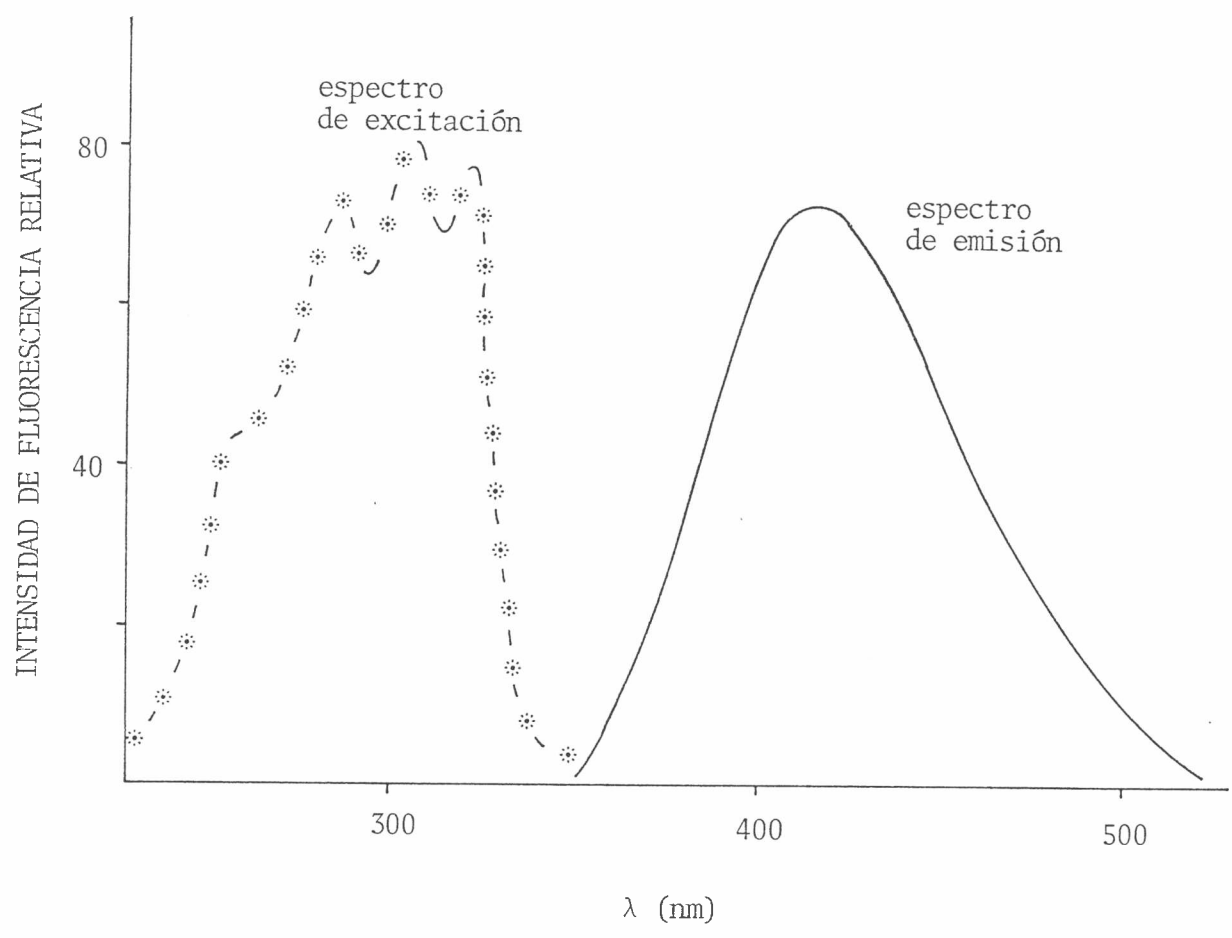


FIGURA 18 - Espectros de excitación y de emisión del ácido  $\beta$  parinárico en microsomas a 37° C. Se siguió la técnica que se indica en Procedimientos Experimentales (págs. 90 y 94), empleando una solución de ácido  $\beta$  parinárico 1 mM en etanol.

ya que la única diferencia entre los tres tipos de membranas es el contenido de colesterol.

#### Integridad de la membrana microsomal.

A pesar de los suaves tratamientos empleados, ya sea para incorporar o extraer colesterol fue necesario verificar si la manipulación de las membranas no alteró significativamente la integridad microsomal y las propiedades enzimáticas. Así, la integridad microsomal se ensayó midiendo la latencia de la manoso 6-fosfatasa. Los valores obtenidos fueron: 85, 81 y 78% para las microsomas control, enriquecidos con colesterol y con el contenido de colesterol disminuido.

#### LA UDP GLUCURONIL TRANSFERASA

El colesterol es el responsable de los cambios en la cinética de la UDP glucuronil transferasa.

Siguiendo la técnica habitual, se determinaron las constantes cinéticas de la UDP glucuronil transferasa para los tres tipos de microsomas. En la Tabla XVII se resumen las diversas constantes halladas. Los resultados obtenidos al incorporar colesterol "in vitro" son análogos a los que obtuvimos mediante la dieta rica en colesterol. La  $V_{max}$  aumenta y los distintos  $K_m$ s disminuyen, y se aprecia una tendencia de la enzima para pasar de una cinética no michaeliana a otra michaeliana, ya que el coeficiente de Hill se aproxima a 1. Por el contrario, la extracción de colesterol, evidenciado por la disminución de la relación colesterol:fosfolípido modificó muy poco el valor del coeficiente de Hill.

T A B L A X V I I

RESUMEN DE LAS PROPIEDADES CINÉTICAS DE LA UDP-GLUCURONIL TRANSFERASA.

Microsomas	$K_{AUDPG}$ (mM)	$K'_{AUDPG}$ (mM)	$K_{p-NF}$ (mM)	$K'_{p-NF}$ (mM)	$V_{max}$	Cooperatividad aparente
N	$12,0 \pm 0,2$	$10,6 \pm 0,2$	$0,15 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,01$	$10,1 \pm 1,2$	$0,40 \pm 0,03$
N + C	$8,9 \pm 0,1 \circ$	$6,2 \pm 0,1 \circ$	$0,10 \pm 0,02 \circ$	$0,08 \pm 0,02$	$14,3 \pm 1,2 \circ$	$0,74 \pm 0,01 \circ$
N - C	$13,1 \pm 0,2$	$10,9 \pm 0,1$	$0,20 \pm 0,01$	$0,15 \pm 0,01$	$8,7 \pm 0,7 \square$	$0,38 \pm 0,01$

Los símbolos corresponden a los empleados en la Tabla XIII.

Los resultados son la media de determinaciones en 5 animales procesados individualmente con sus respectivas desviaciones estándar.

$\circ$  = existen diferencias significativas para  $p < 0,005$

$\square$  = existen diferencias significativas para  $p < 0,001$ .

Estos nuevos experimentos donde se modifica exclusivamente el contenido de colesterol sin cambios en la distribución del resto de los componentes demuestra, sin dudas, que la concentración de colesterol a la bicapa es claramente responsable de los cambios dinámicos, estructurales y cinéticos que se produjeron en los dos tipos de ensayos.

Las variaciones en el porcentaje de activación por la UDP-NAGA confirman el modelo propuesto.

La incorporación y extracción de colesterol de la membrana microscmal también modificó la activación por UDP-NAGA. En la membrana microsomal (Fig.20) intacta la UDP glucuronil transferasa es estimulada por la UDP-NAGA (307), pero este efecto se pierde en la enzima delipidizada (299). Sólo la fosfatidilcolina en la fase gel puede reactivar dicha forma de la enzima. En nuestros experimentos la extracción de colesterol de la membrana microsomal aumenta el porcentaje de activación de la UDP-glucuronil transferasa, indicando que la enzima se encuentra en un medio más empaquetado, oponiéndose al estado fluido de los lípidos como consecuencia de la salida de colesterol. Por el contrario, la incorporación de colesterol rigidiza los lípidos globales, fluidificando los lípidos del ánnulus y disminuyendo la activación por la UDP-NAGA.

LA UDP-glucuronil transferasa presenta una quebradura en la curva de Arrhenius.

Los gráficos de la Figura 21 muestran que la curva de Arrhenius de la UDP-glucuronil transferasa presenta una quebradura y que la temperatura de esa quebradura es distinta en los microsomas normales y los microsomas enriquecidos con colesterol.

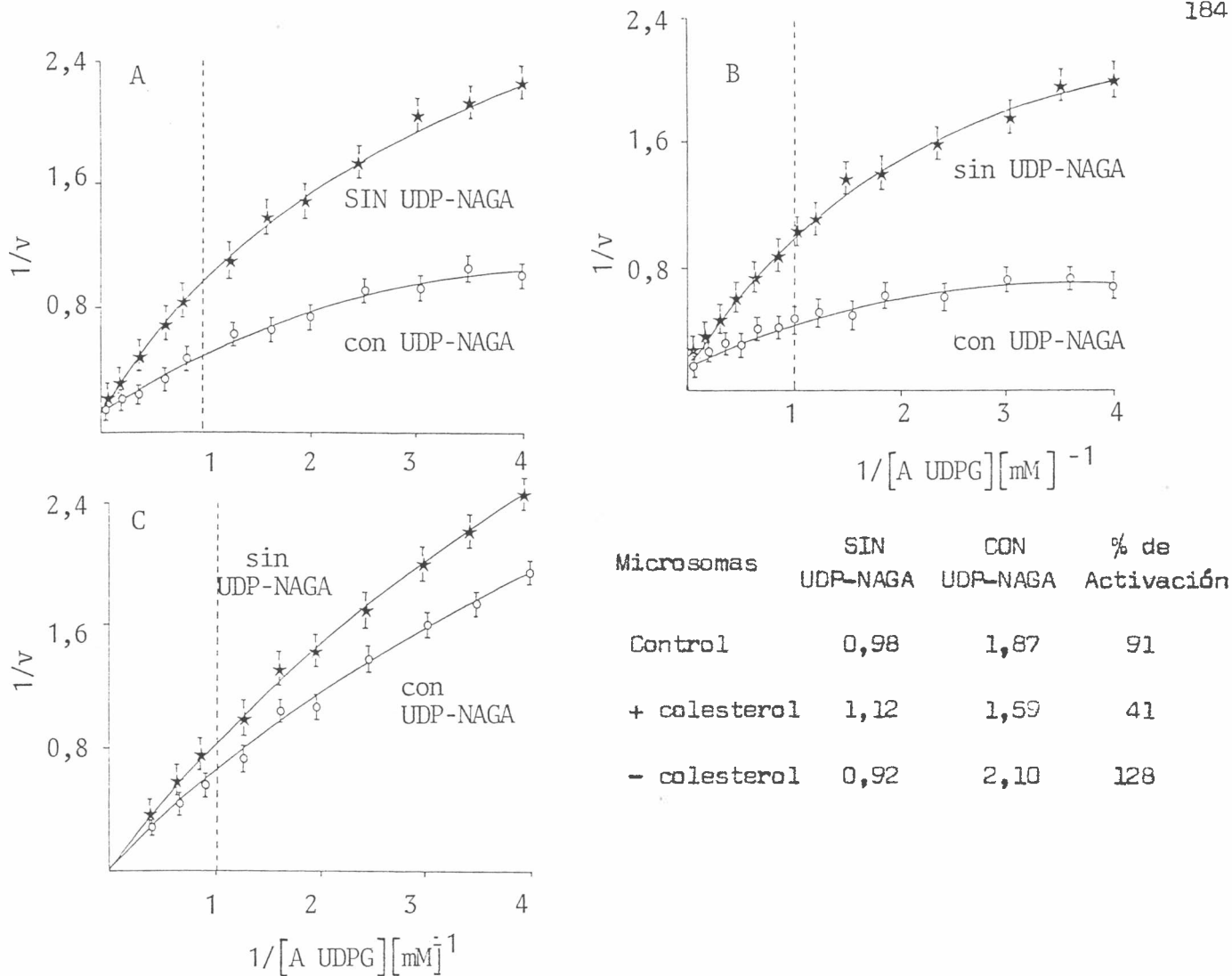


FIGURA 20 - Gráfico de Lineweaver Burk de la UDP-glucuronil transferasa a  $37^{\circ} \text{C}$ , en función de  $1/[A \text{ UDPG}] [\text{mM}]^{-1}$  con (O) o sin (\*) el agregado de UDP-NAGA.

A: microsomas control; B: microsomas-colesterol; C: microsomas + colesterol. Las concentraciones de p-NF y UDP-NAGA cuando se agregó, fueron 0,2 y 2,0 mM, respectivamente. El inserto muestra las velocidades iniciales (n moles/min mgr prot) y el porcentaje de activación de la UDP-N-acetilglucosamina para una concentración fija de A UDP G (1 mM).

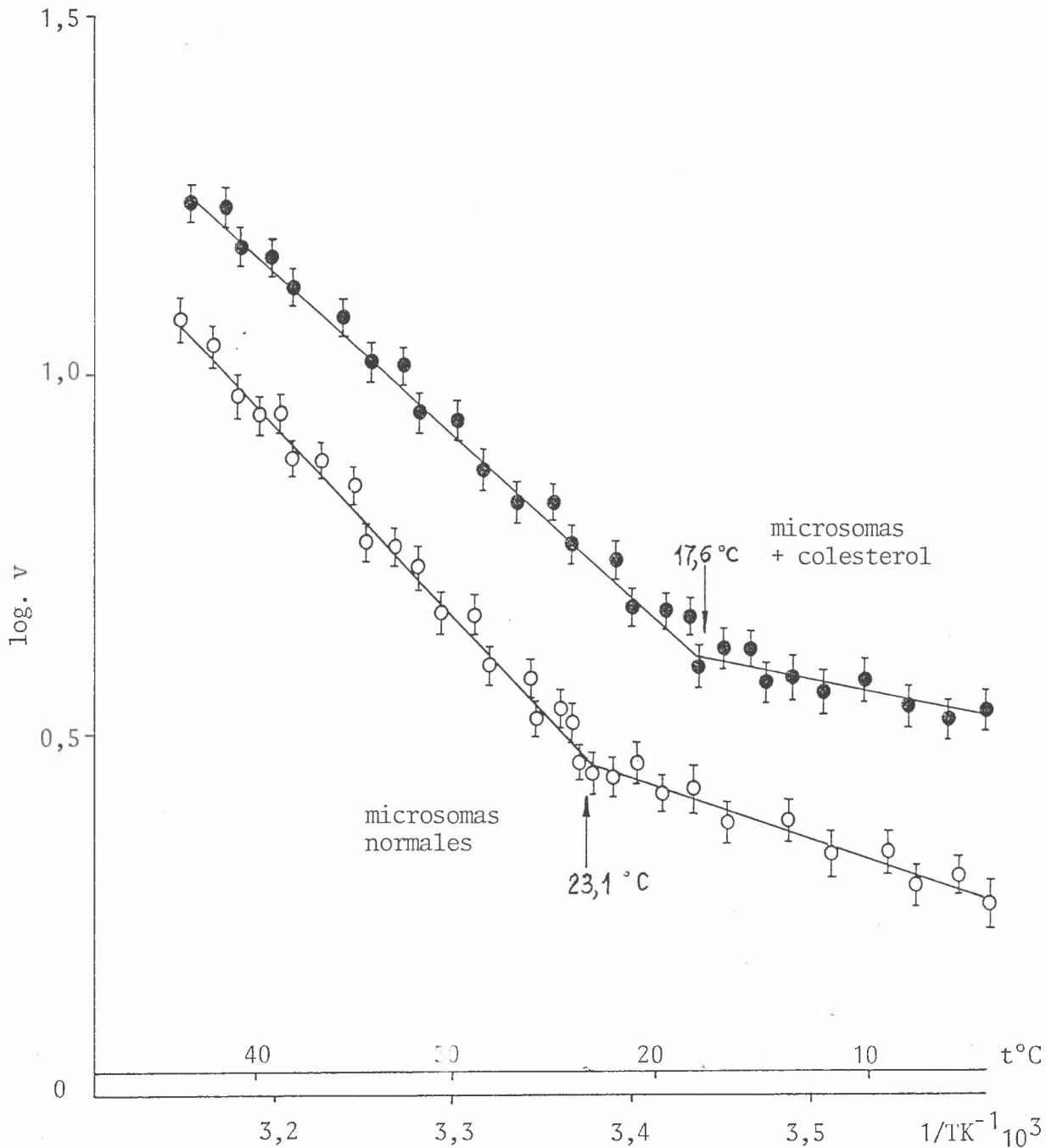


FIGURA 21 - Gráfico de Arrhenius para la UDP-glucuronil transferasa.  $v$  se expresa como en la Figura 20.

Los datos experimentales se ajustaron en una sola recta o en dos rectas que se cortan a una temperatura, la cual se varió en el rango medido. Los coeficientes de correlación de las rectas que se presentan son mayores que el coeficiente de correlación para una sola recta.

Las concentraciones de los sustratos fueron:

[A UDP G] = 25 mM paraalmgr. prot. en 0,6 ml volumen final  
 [p-NF] = 0,4 mM.

Al analizar las causas de las quebraduras en las curvas de Arrhenius vimos que los orígenes podían ser muy diversos. Aún tratándose de una consecuencia de la interacción lípido proteína, todavía las causas pueden no ser inequívocas. Una quebradura en la curva de Arrhenius puede responder a la  $T_t$  de los lípidos globales, a una separación de fases o a la temperatura de transición de los lípidos del anélus. Una característica distintiva es que la UDP-glucuronil transferasa presenta una  $E_a$  por encima de la  $T_t$  mayor que la encontrada por debajo de dicha temperatura. Algunos autores (289) consideraron que la quebradura a 20°C respondía a la  $T_t$  de la membrana microsomal, pero se vió que la  $T_t$  de la misma estaba por debajo de 0°C (181). Los resultados de los que disponemos hasta ahora no nos permiten dar una explicación definitiva de este fenómeno.

## CAPITULO V.

### NUEVAMENTE LA CARENCIA DE ACIDOS GRASOS ESENCIALES.

El modelo que propusimos para la UDP-glucuronil transferasa se fundamenta por un lado en las propiedades conocidas del colesterol, que a través de interacciones preferenciales con algunos fosfolípidos puede crear zonas o dominios especializados y, por el otro, en el conocimiento acabado de la naturaleza de las proteínas que prefieren siempre la fase líquido cristalino. Se nutre, además, nuestra hipótesis, de los experimentos realizados por el grupo de Zakim, que postula un "ánulus" en un estado físico distinto rodeando a la UDP-glucuronil transferasa.

Nuestra intención, al volver a tratar temas relacionados con la carencia de ácidos grasos, no es ofrecer más información al respecto, sino hacer hincapié en aquellos resultados nuevos que puedan aportar pruebas indirectas al modelo propuesto.



## ANALISIS LIPIDICO

La carencia de ácidos grasos provoca cambios no sólo en la composición de ácidos grasos totales, sino también en la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos.

La Tabla XVIII muestra la composición de ácidos grasos de los microsomas normales y carente comparada con la composición de los microsomas carentes del primer experimento. Puede observarse que el patrón de carencia es el mismo en ambos experimentos. La Tabla XIX analiza la composición lipídica de los microsomas normales y carentes. El tratamiento no provoca cambios en la distribución de los fosfolípidos ni en la relación FC:FE, así como tampoco en la relación colesterol:fosfolípido. Este resultado complementa nuestro experimento anterior, en el que no se midió la relación FC:FE. En este momento podríamos afirmar con más fundamento que las modificaciones de la fluidez de la membrana, que aparecen como consecuencia de la carencia de ácidos grasos, se basan en la disminución del IDL. En efecto, los demás parámetros capaces de afectar la estructura dinámica no mostraron variaciones significativas durante los períodos investigados. Es más, nuestros experimentos parecen indicar, en contra de otras evidencias (103) que el grado de insaturación y la fluidez de la bicapa lipídica estarían relacionados en una forma más o menos sencilla.

La Tabla XX presenta la composición de ácidos grasos de la FC y la FE normales y carentes. Se observa la misma tendencia que notamos al estudiar la composición de fosfolípidos de los microsomas normales y enriquecidos con colesterol: la fosfatidilcolina tiene un índice de dobles ligaduras menor que la fosfatidiletanolamina. Además la FC tiene un contenido de ácido araquidónico muy bajo, comparado con la FE. Estas diferencias entre

T A B L A X V I I I

COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS DE MICROSOMAS NORMALES Y DEFICIENTES EN  
ACIDOS GRASOS ESENCIALES (Porcentaje en peso).

Ácido graso	N	C	C*
14 : 0	0,9 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,3 ± 0,1
16 : 0	14,1 ± 0,7	18,4 ± 0,6	18,5 ± 0,5
16 : 1	1,3 ± 0,1	2,6 ± 0,4	2,4 ± 0,2
18 : 0	26,0 ± 1,3	25,3 ± 1,3	26,0 ± 1,1
18 : 1	9,8 ± 0,6	21,7 ± 0,9	21,6 ± 0,9
18 : 2	34,5 ± 1,2	19,5 ± 0,8	19,0 ± 0,6
20 : 3W9	1,0 ± 0,1	1,2 ± 0,2	1,1 ± 0,1
20 : 3W6	0,8 ± 0,6	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1
20 : 4W6	9,2 ± 0,5	7,8 ± 0,4	8,3 ± 0,3
22 : 5W3	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,6 ± 0,1
22 : 6W3	1,5 ± 0,2	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1
I D L	1,30	1,07	1,02

Símbolos: N = microsomas normales

C = microsomas carentes

C\* = datos extraídos de la tabla II

Los resultados son la media de determinaciones en 4 animales analizados separadamente, con sus respectivas desviaciones estándar.

Para el cálculo del IDL ver página 85.

T A B L A X I X

COMPOSICION LIPIDICA DE MICROSOMAS NORMALES Y DEFICIENTES EN ACIDOS GRASOS ESENCIALES.

Lípidos	N	C
Colesterol	9,5 $\pm$ 0,4	9,2 $\pm$ 0,3
Ésteres de colesterol	1,1 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 0,1
Triglicéridos	2,6 $\pm$ 0,2	2,5 $\pm$ 0,2
Fosfatidilcolina	46,5 $\pm$ 2,7	46,9 $\pm$ 2,7
Fosfatidiletanolamina	24,9 $\pm$ 1,6	25,3 $\pm$ 1,4
Fosfatidilinositol	7,8 $\pm$ 0,3	7,4 $\pm$ 0,3
Fosfatidilserina	3,3 $\pm$ 0,2	3,5 $\pm$ 0,1
Esfingomiélinea	4,3 $\pm$ 0,2	4,1 $\pm$ 0,2
Colesterol:fosfolípido (mol/mol)	0,31 $\pm$ 0,2	0,30 $\pm$ 0,1
Fosfatidilcolina: Fosfatidiletanolamina (P:P)	1,87	1,85

Símbolos: N = microsoma normal  
C = microsoma carente

Los resultados son la media de determinaciones en 3 animales procesados separadamente con sus respectivas desviaciones estándar.

la composición de ácidos grasos de ambos fosfolípidos podrían considerarse como un mecanismo de compensación: la fosfatidiletanolamina (93), cuya cabeza polar es capaz de presentar una red compacta estabilizada por puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas, es la que contiene los ácidos grasos más fluidos. La composición de ácidos grasos de los fosfolípidos sigue el patrón característico de la carencia de ácidos grasos temprana: se produce una disminución del ácido linoleico y un aumento del oleico en la fosfatidilcolina. En la FE aumenta el ácido oleico y el palmitoleico y disminuye el linoleico significativamente. El FI se caracteriza por su alto contenido de ácido araquidónico, superior al de cualquier otro fosfolípido. En la fosfatidilserina se observa una disminución significativa del ácido linoleico y del ácido araquidónico. (Tabla XXI).

La esfingomielina, en cambio, presenta características diferenciales. Es el fosfolípido con mayor proporción de ácidos grasos saturados. No obstante, por efecto de la carencia disminuye aún más el IDL pasando de 0,67 en cobayos normales a 0,51 en cobayos con 21 días de carencia de ácidos grasos. (Tabla XXII).

#### LAS PROPIEDADES DINAMICAS.

La carencia de ácidos grasos disminuye la movilidad rotacional y translacional.

La Figura 22 muestra el gráfico de  $\log r_s \times 10^3$  en función de la inversa de la temperatura en °K. Tanto para los microsomas como para los lípidos totales y fosfolípidos, las representaciones dan líneas rectas que indican la ausencia de transiciones de fase en el seno de la membrana.

T A B L A X X

COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS DE FC y FE DE MICROSOMAS DE COBAYO NORMALES  
Y CARENTES DE ACIDOS GRASOS ESENCIALES (Porcentaje en peso)

Acido graso	F C		F E		
	N	C	N	C	
14 : 0	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,1	1,2 ± 0,1	o
16 : 0	13,9 ± 0,5	15,1 ± 0,7	9,4 ± 0,7	12,3 ± 0,5	
16 : 1	0,3 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,2 ± 0,1	2,4 ± 0,1	o
18 : 0	28,3 ± 1,4	31,8 ± 1,8	28,9 ± 1,5	33,3 ± 1,9	
18 : 1	9,1 ± 0,3	10,9 ± 0,6	8,4 ± 0,4	12,6 ± 0,6	o
18 : 2	42,5 ± 1,5	36,4 ± 1,4	32,6 ± 1,7	23,9 ± 1,1	□
20 : 3ω9	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	1,2 ± 0,1	o
20 : 3ω6	0,6 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,5 ± 0,1	
20 : 4ω6	3,8 ± 0,2	2,9 ± 0,1	13,2 ± 0,5	9,6 ± 0,3	o
22 : 5ω3	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1	1,6 ± 0,7	1,3 ± 0,1	
22 : 6ω3	0,6 ± 0,1	0,4 ± 0,1	2,8 ± 0,2	1,7 ± 0,1	
I D L	1,14	1,00	1,51	1,16	

Los resultados son la media de determinaciones en 3 animales procesados individualmente con sus respectivas desviaciones estándar.

o = existen diferencias significativas para  $p < 0,005$

□ = " " " "  $p < 0,001$

T A B L A X X I

COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS DE FI y FS DE MICROSOMAS DE COBAYO NORMALES  
Y CARENTES DE ACIDOS GRASOS ESENCIALES (Porcentaje en peso).

Acido graso	F I		F S	
	N	C	N	C
14 : 0	0,8 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,5 ± 0,1	2,1 ± 0,1
16 : 0	6,7 ± 0,3	7,5 ± 0,3	7,2 ± 0,3	8,3 ± 0,4
16 : 1	1,3 ± 0,1	2,2 ± 0,1 ◊	1,3 ± 0,1	1,6 ± 0,1
18 : 0	39,6 ± 1,7	43,3 ± 1,9	37,8 ± 1,8	43,2 ± 2,1
18 : 1	10,3 ± 0,5	13,6 ± 0,8	9,2 ± 0,6	13,0 ± 0,7
18 : 2	19,4 ± 0,8	10,9 ± 0,5 ◊	27,7 ± 1,3	19,3 ± 0,9 ◊
20 : 3ω9	2,0 ± 0,1	3,7 ± 0,2	1,1 ± 0,1	1,5 ± 0,1
20 : 3ω6	2,9 ± 0,2	3,0 ± 0,1	1,5 ± 0,2	2,1 ± 0,2
20 : 4ω6	16,2 ± 0,7	14,0 ± 0,6	10,2 ± 0,6	6,7 ± 0,3 ◊
22 : 5ω3	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,2 ± 0,1
22 : 6ω3	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,0 ± 0,1
I D L	1,30	1,08	1,22	1,00

Los resultados son la media de determinaciones en 3 animales procesados individualmente con sus respectivas desviaciones estándar.

◊ = existen diferencias significativas para  $p < 0,005$ .

T A B L A    X X I I

COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS DE EM DE MICROSOMAS DE COBAYO NORMALES Y DEFICIENTES DE ACIDOS GRASOS ESENCIALES (Porcentaje en peso).

<u>Ácido graso</u>	<u>N</u>	<u>C</u>
14 : 0	1,4 ± 0,1	1,6 ± 0,1
16 : 0	10,8 ± 0,5	11,3 ± 0,6
16 : 1	1,4 ± 0,1	2,0 ± 0,2
18 : 0	30,7 ± 1,4	33,8 ± 1,5
18 : 1	9,1 ± 0,4	9,3 ± 0,5
18 : 2	17,3 ± 0,8	8,9 ± 0,4 <sup>c</sup>
20 : 0	1,2 ± 0,1	1,6 ± 0,2
20 : 1	0,7 ± 0,1	0,9 ± 0,1
20 : 2	2,5 ± 0,2	3,0 ± 0,1
22 : 0	19,3 ± 0,9	21,2 ± 1,2
22 : 2	1,8 ± 0,1	2,0 ± 0,1
24 : 0	2,2 ± 0,2	2,6 ± 0,1
24 : 1	1,6 ± 0,1	1,8 ± 0,1
I D L	0,67	0,51

Símbolos: N = EM de microsomas normales

C = EM de microsomas deficientes en ácidos grasos esenciales.

Los resultados son la media de las determinaciones en 3 animales procesados separadamente, con sus respectivas desviaciones estándar. El IDL se calculó como se indica en Procedimientos Experimentales (pág. 85).

<sup>c</sup> Existen diferencias significativas para  $p < 0,005$ .

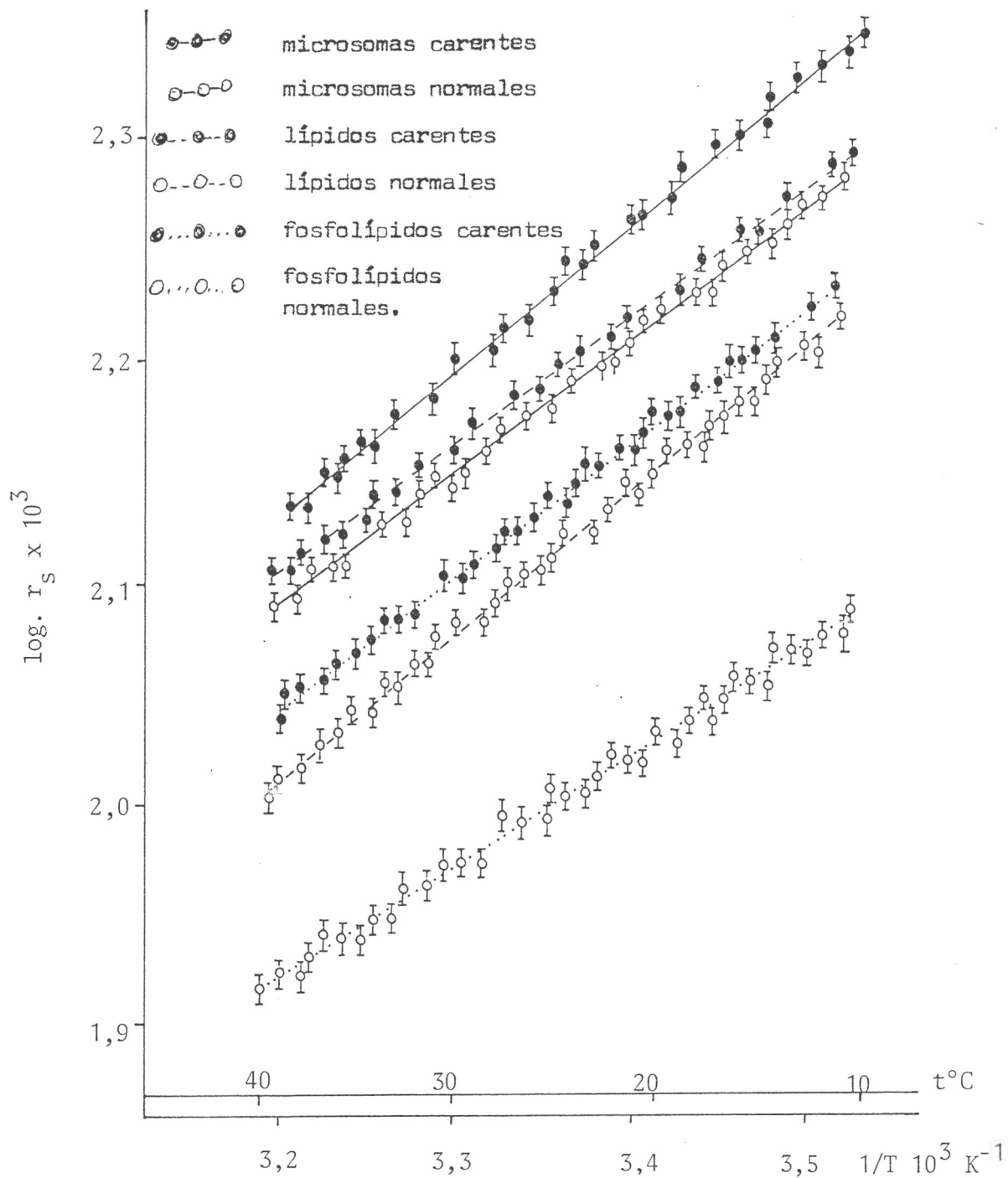


FIGURA 22 - Propiedades termotrópicas de la membrana microsomal y diversas fracciones lipídicas. Los resultados son la media de determinaciones en 3 animales procesados separadamente, con sus respectivas desviaciones estándar. Las condiciones experimentales son las mismas que en la Figura 1.



Las diferencias de  $r_s$  son mucho mayores entre los fosfolípidos comparados con los lípidos totales, y en éstos al compararlos con las membranas microsomales. Además, el orden de empaquetamiento que puede desprenderse de esta figura es el siguiente:

$$r_s \text{ membrana} > r_s \text{ lípidos totales} > r_s \text{ fosfolípidos}$$

lo que indica el efecto rigidizante de las proteínas y del colesterol, tal cual se explicó en el capítulo anterior.

En la Figura 23 se aprecia que la movilidad translacional está disminuida en los microsomas carentes respecto de los normales, ya que para cualquier concentración de pireno los valores de  $I_E/I_M$  son superiores en los microsomas normales respecto de los carentes.

Resumiendo, la carencia de ácidos grasos origina profundos cambios en la organización dinámica de la membrana microsomal, que se manifiestan en una disminución tanto de la movilidad rotacional, como de la movilidad translacional de los marcadores fluorescentes empleados.

#### Los fosfolípidos presentan una separación lateral de fases.

En la Figura 24 se puede apreciar el comportamiento de los ácidos  $\alpha$  y  $\beta$  parinárico en estudios termotrópicos. Los microsomas tanto normales como carentes manifiestan suaves ondulaciones en las representaciones de P versus la temperatura, lo que favorecería la idea de una transición enmascarada por ciertos componentes de la membrana, en especial la proteína. En efecto, si analizamos los lípidos vemos que la curvatura es algo mayor y finalmente al estudiar el termotropismo de los fosfolípidos se aprecia un cambio abrupto en la curva, típico de una separación de fases en un sistema heterogéneo. Es interesante destacar que el cociente de polari-

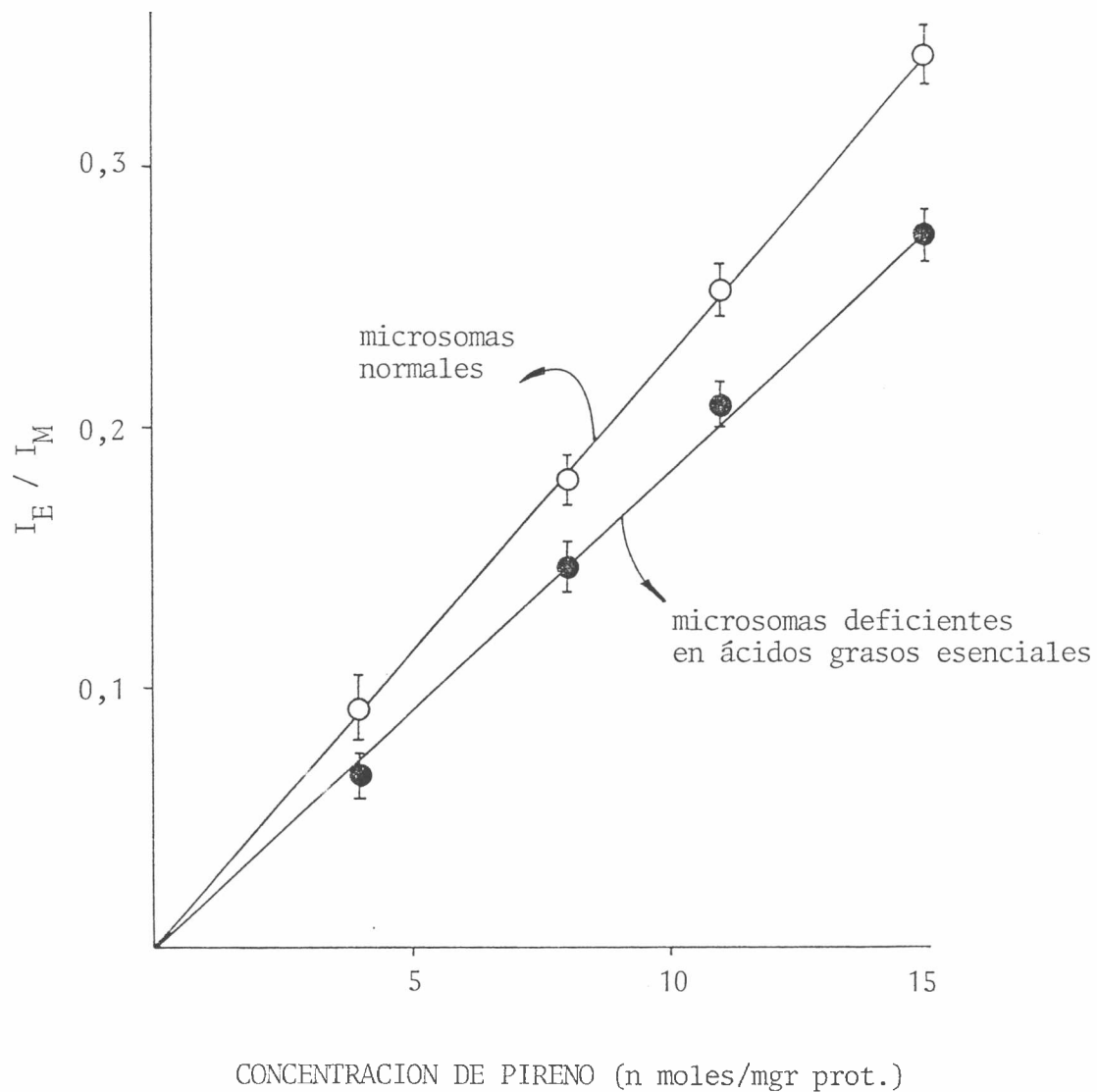


FIGURA 23 - Eficiencia en la formación del excímero del pireno. Los resultados son la media de determinaciones de 3 animales procesados separadamente con sus respectivas desviaciones estándar. Se siguió la metodología reseñada en la Figura 11.

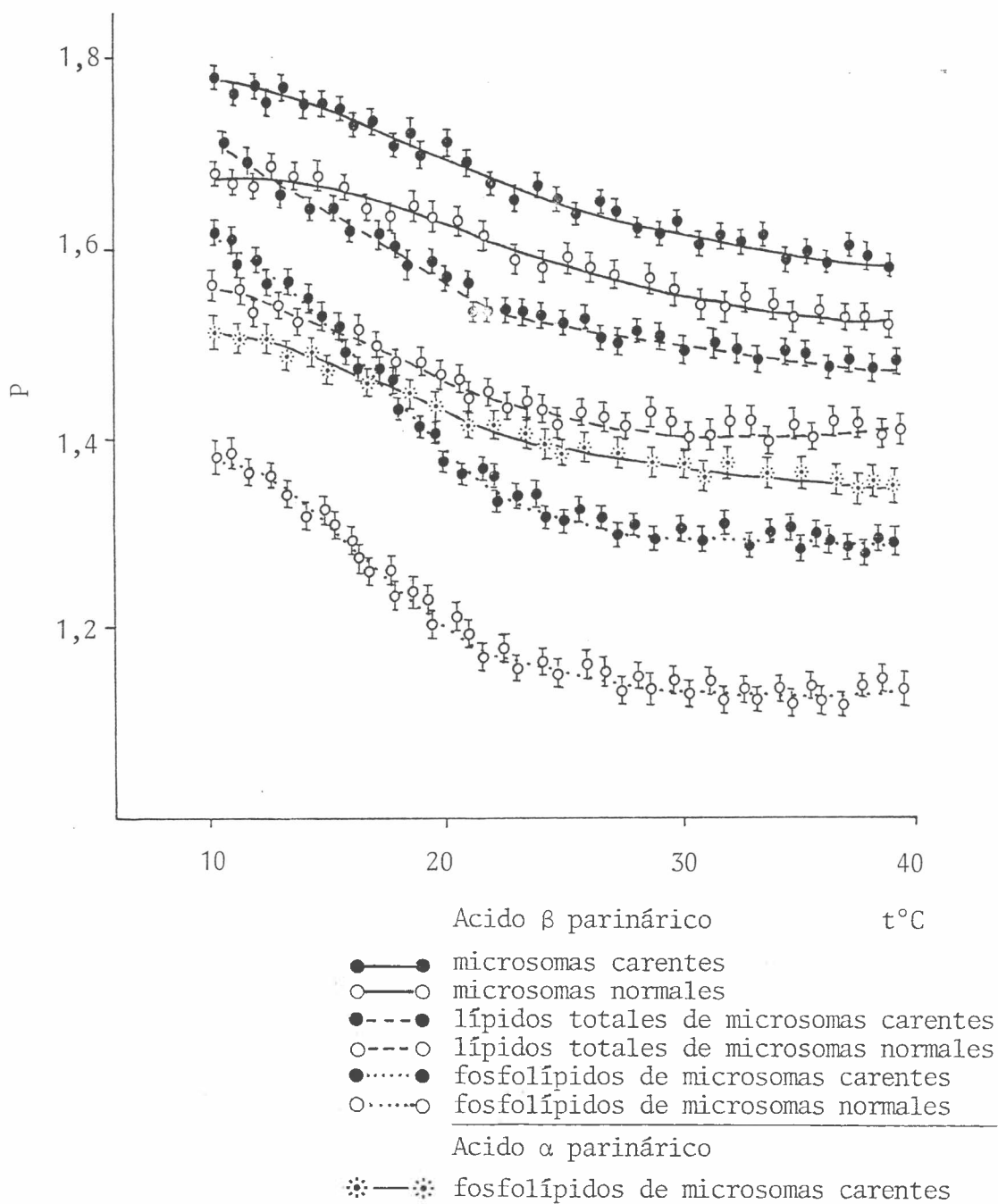


FIGURA 24 - Variación del cociente de polarización de los ácidos  $\alpha$  y  $\beta$  parinárico en función de la temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ). Los resultados son la media de determinaciones en 3 animales procesados individualmente. Se siguió la técnica detallada en Procedimientos Experimentales (págs. 90 y 94).

zación se mantiene prácticamente constante, por debajo de 20°C. Esto se explica suponiendo que al concluir la separación lateral de fases no se forma más fase sólida y el cociente de polarización, que depende de la cantidad de lípidos en fase gel, permanece constante (332). En la misma figura se puede observar que el ácido  $\alpha$ -parinámico es incapaz de detectar la separación de fases.

Debe destacarse que la variación en la composición de ácidos grasos, motivado por la dieta, no introduce cambios en la temperatura de la separación de fases, que osciló alrededor de los 20°C.

#### La merocianina 540 también detecta separaciones de fase.

La Figura 25 muestra el espectro de fluorescencia de la merocianina 540, en solución acuosa y en la membrana microsomal. Puede verse el gran incremento cuántico y el corrimiento del máximo de fluorescencia cuando se emplean entornos menos polares que el agua (51).

La Figura 26 muestra como puede emplearse la fluorescencia de la merocianina para evidenciar separaciones de fase. Los microsomas presentan una suave curvatura, mientras que los fosfolípidos normales o carentes presentan un cambio abrupto en las pendientes.

Hacemos especial hincapié en este hecho, porque la literatura muestra el uso muy extendido de la espectroscopía de absorción de la merocianina 540 (51), como método sensible capaz de evidenciar las transiciones y separaciones de fase en sistemas biológicos. Sin embargo, no se han hecho prácticamente estudios empleando la espectroscopía de fluorescencia de este marcador.

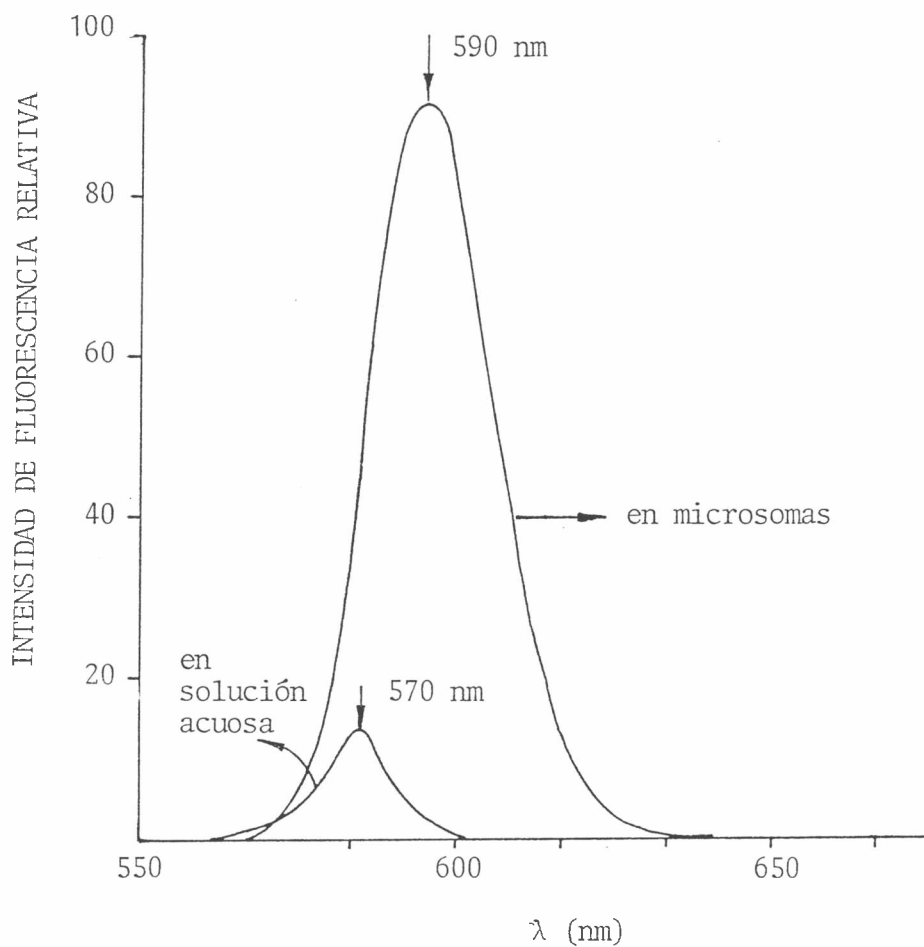


FIGURA 25 - Espectros de fluorescencia de la merocianina 540. La longitud de onda de excitación fue 540. Para incorporar la merocianina 540 se siguió la técnica detallada en Procedimientos Experimentales (pág. 97).

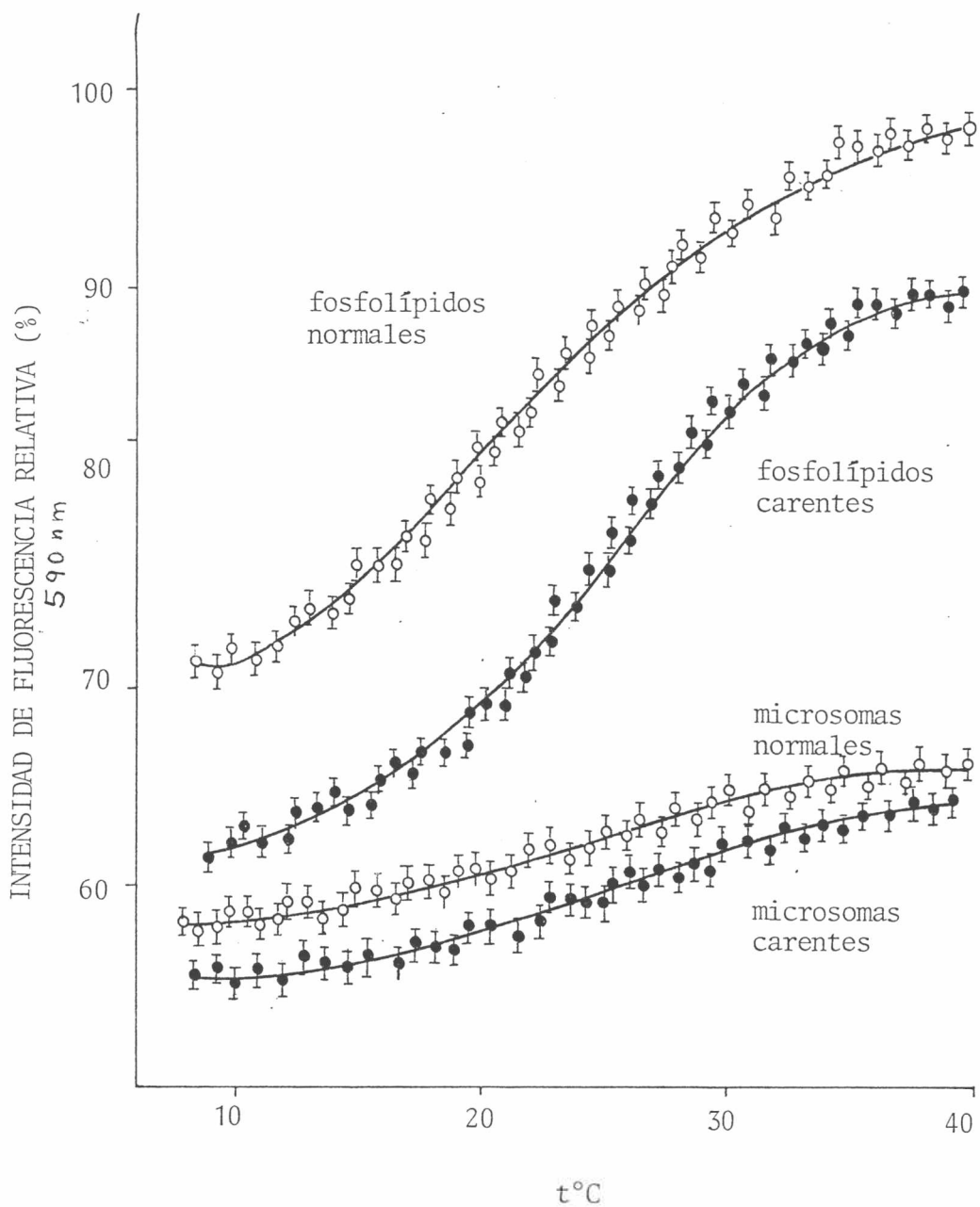


FIGURA 26 - Variación de la intensidad de fluorescencia relativa de la merocianina en función de la temperatura (°C).

Los resultados son la media de determinaciones en 3 animales con sus respectivas desviaciones estándar.

Se siguió la técnica detallada en Procedimientos Experimentales (pág. 97).

Las curvas de Arrhenius de la UDP-glucuronil transferasa de microsomas normales y carentes muestran discontinuidades a distintas temperaturas.

La temperatura de discontinuidad en la curva de Arrhenius de microsomas carentes se presenta a temperaturas inferiores respecto de la correspondiente a los microsomas normales (Figura 27). Este efecto coincide con el observado en el caso de los microsomas enriquecidos con colesterol. Podría pensarse que ambas discontinuidades están relacionadas con la  $T_t$  o con la temperatura de separación de fases de la membrana total. Sin embargo, esta hipótesis no podría dar cuenta de la distinta temperatura de discontinuidad, presente en las membranas normales. Una explicación posible sugiere que, tanto la carencia de ácidos grasos, como la incorporación de colesterol, provocan reordenamientos en los lípidos que orientan a los compuestos más insaturados, con menores temperaturas de transición, hacia el entorno enzimático. Una prueba indirecta de ello se obtiene midiendo las propiedades termotrópicas de FC normales y carentes, es decir, más y menos fluidas.

La Figura 28 muestra tales estudios con el ácido  $\beta$  parinámico y la merocianina 540. Se puede apreciar que ambas fosfatidilcolinas presentan cambios termotrópicos, cuya naturaleza no puede evidenciarse en estos experimentos. Si pueden calcularse las temperaturas que caracterizan dichas transiciones.

En la Figura 29 se grafica la velocidad de cambio de la intensidad con la temperatura en función de la temperatura para la merocianina 540. Se aprecia claramente que las FC normales presentan una discontinuidad a temperaturas menores (a 18°C) que la FC carentes (a 27°C), lo que serviría insistimos, como evidencia indirecta para nuestras hipótesis previas.

Por último, la Tabla XXIII resume las propiedades cinéticas de la UDP-

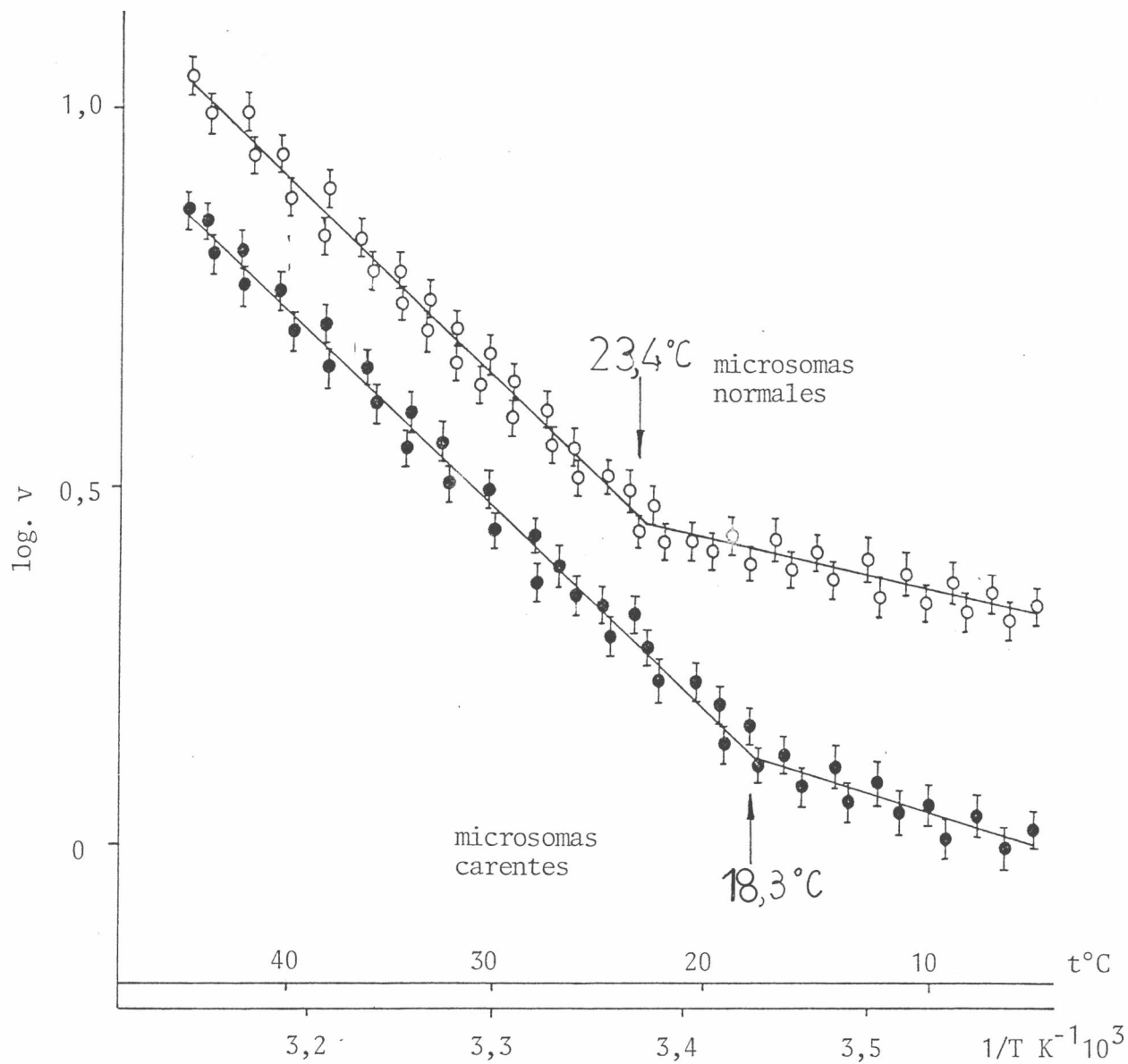


FIGURA 27 - Gráfico de Arrhenius para la UDP-glucuronil transferasa.

Se empleó el método descrito en la Figura 21.

Las concentraciones de los sustratos fueron:

$[A \text{ UDP G}] = 25 \text{ mM}$   
 $[p\text{-NF}] = 0,4 \text{ mM}$  para 1 mgr prot.en 0,6 ml vol.final



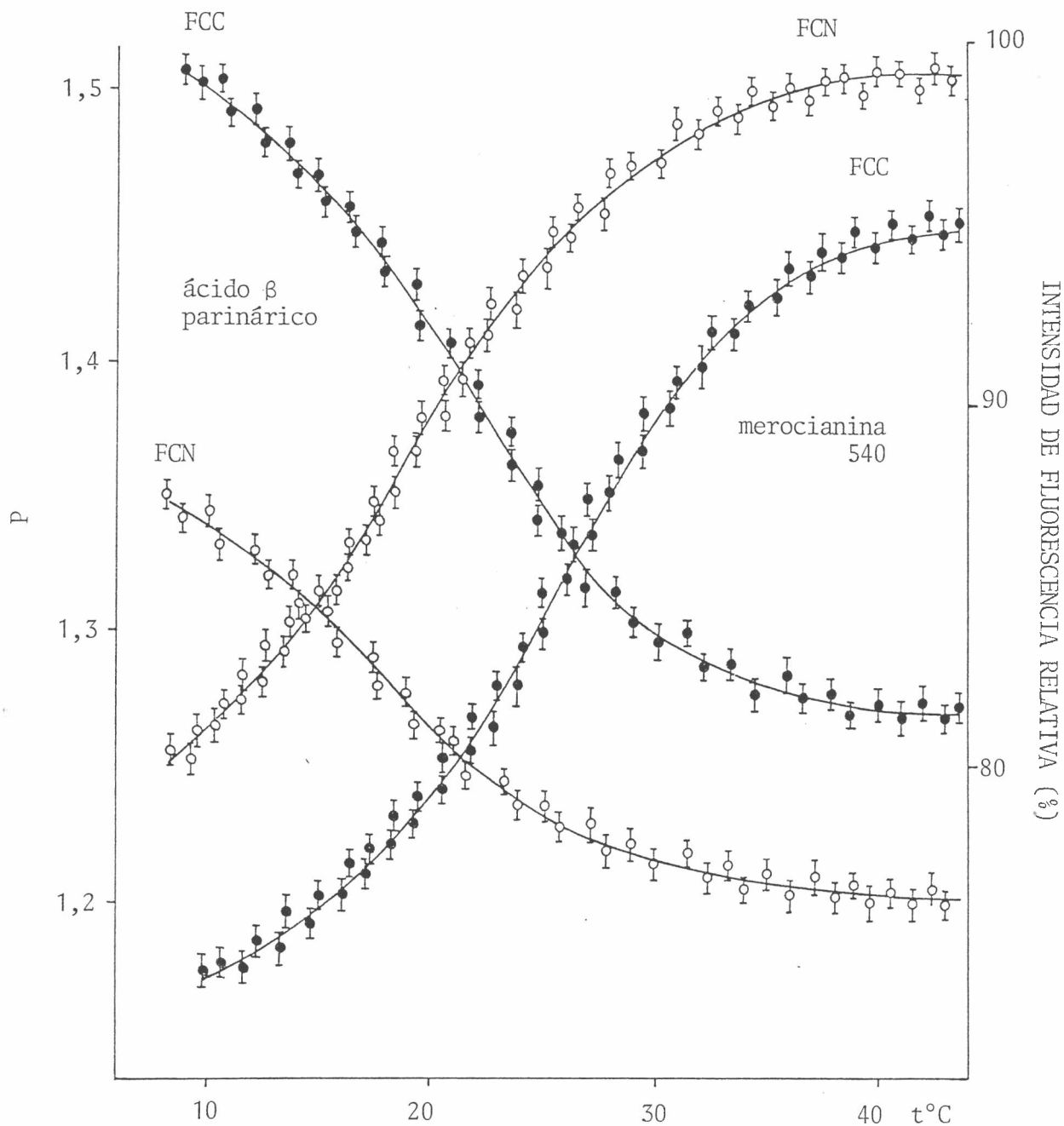


FIGURA 28 - Propiedades termotrópicas de la FC de animales normales y deficientes de ácidos grasos, medidas con merocianina 540 y ácido  $\beta$  parinámico.

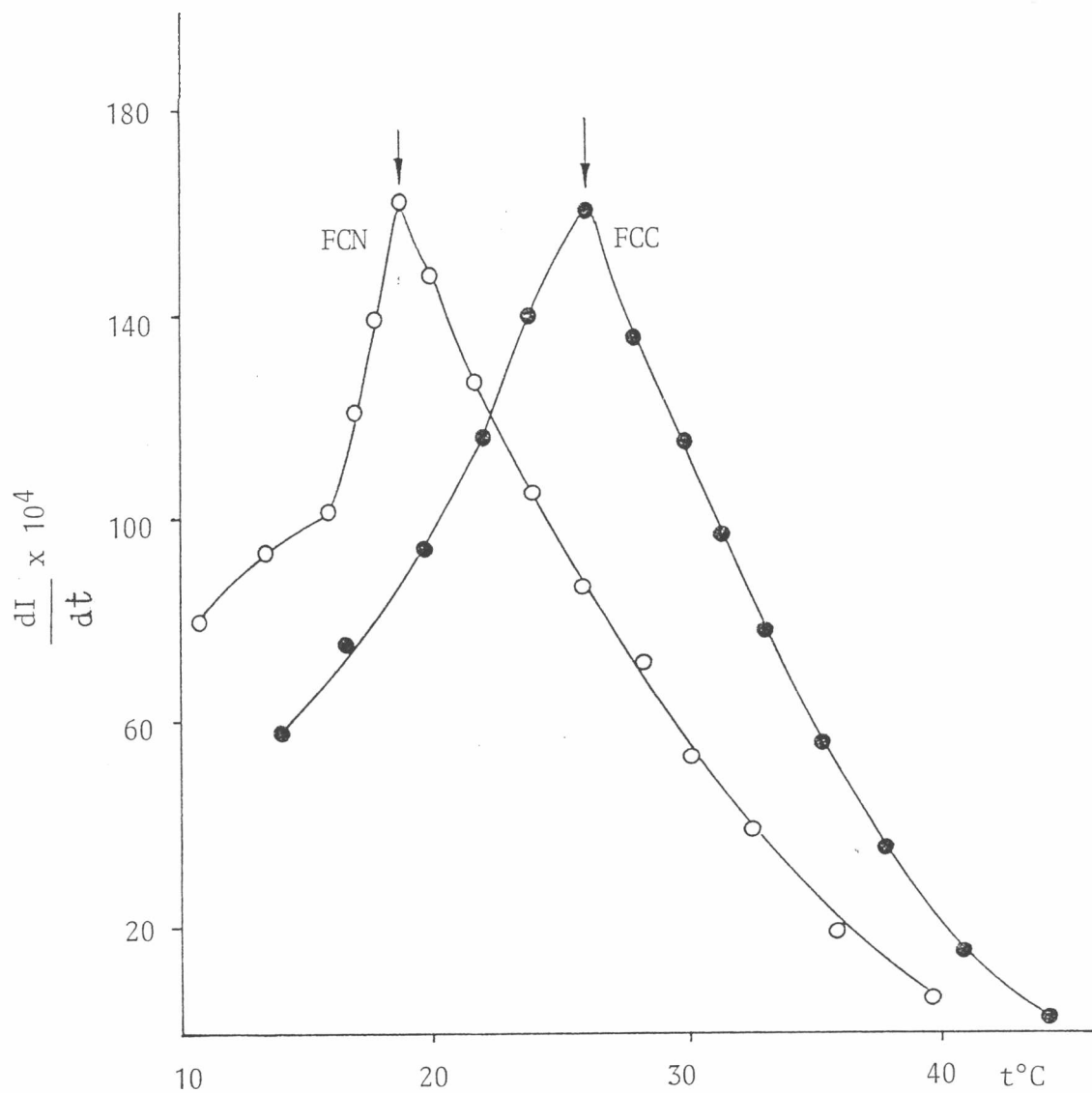


FIGURA 29 - Gráfico de  $\left(\frac{dI}{dt}\right)$  en función de la temperatura para la merocianina 540 en vesículas de FC de microsomas normales y deficientes de ácidos grasos esenciales.

T A B L A X X I I I

## RESUMEN DE LAS PROPIEDADES CINÉTICAS DE LA UDP-GLUCURONIL TRANSFERASA.

	K AUDPG (mM)	K <sup>*</sup> AUDPG (mM)	K p-NF (mM)	K <sup>*</sup> p-NF (mM)	V <sub>max</sub>	Cooperatividad Aparente
N	11,9 ± 0,2	10,0 ± 0,1	0,09 ± 0,01	0,10 ± 0,02	10,3 ± 0,9	0,41 ± 0,02
C	14,2 ± 0,30	13,6 ± 0,20	0,14 ± 0,020	0,13 ± 0,01	7,2 ± 0,50	0,87 ± 0,030

Símbolos: N = microsomas normales

C = microsomas carentes

⊙ = Existen diferencias significativas para  $p < 0,005$ .

glucuronil transferasa en estos experimentos.

Puede observarse que, si bien la cooperatividad aparente se modifica en el mismo sentido que al incorporar colesterol "in vitro", las otras constantes cinéticas muestran una variación inversa: la carencia de ácidos grasos provoca una disminución de la  $V_{\max}$  y un aumento de los  $K_m$  para todas las etapas estudiadas.

CAPITULO VI.EPILOGO

En este capítulo resumiremos las conclusiones particulares que fuimos explicando en cada experimento, para luego enfocar el modelo de regulación lipídica propuesto y sus evidencias experimentales.

## CONCLUSIONES

- 1) La membrana microsomal nativa de hígado de cobayos no presenta temperatura de transición en el rango entre 10° y 40°C, y por lo tanto se encuentra en un estado líquido cristalino de alta movilidad.
- 2) La carencia de ácidos grasos provoca cambios en la composición de ácidos grasos y en el índice de dobles ligaduras sin que se modifique la distribución de fosfolípidos ni la relación colesterol:fosfolípido.
- 3) La carencia de ácidos grasos disminuye la movilidad rotacional y translacional de los marcadores fluorescentes.
- 4) La carencia de ácidos grasos modifica la cooperatividad aparente de la UDP-glucuronil transferasa desde una cinética no michaeliana a otra michaeliana en forma progresiva con el tiempo de carencia.
- 5) La incorporación de colesterol "in vivo" va acompañada de un aumento compensatorio de la relación FC: FE en la membrana microsomal.
- 6) La incorporación de colesterol "in vivo" no modifica la composición de ácidos grasos totales ni la de los fosfolípidos.
- 7) La UDP glucuronil transferasa pierde su cooperatividad aparente en microsomas enriquecidos con colesterol.
- 8) La incorporación de colesterol origina un aumento de la  $V_{max}$  y una disminución de los  $K_m$  de la UDP-glucuronil transferasa.
- 9) Debido al aumento compensatorio de la relación FC:FE no es posible atribuir los cambios en las distintas propiedades de la membrana exclusivamente a la molécula de colesterol.

- 10) El ácido  $\beta$ parinárico detecta separaciones de fases en membranas biológicas.
- 11) La extracción e incorporación de colesterol "in vitro" en la membrana microsomal permite la modificación selectiva en el contenido del esteroles sin que se produzcan alteraciones en otros componentes de la membrana.
- 12) Los cambios en las propiedades cinéticas de la UDP-glucuronil transferasa son similares cuando se incorpora colesterol "in vivo" y cuando se incorpora colesterol "in vitro".
- 13) La emisión de fluorescencia de la merocianina 540 también sirve para detectar las separaciones de fase.
- 14) Las FC normales y carentes presentan cambios termotrópicos a distintas temperaturas.
- 15) Las curvas de Arrhenius de la UDP-glucuronil transferasa presentan quebraduras que dependerían del "ánulus" lipídico.

#### CONSIDERACIONES FINALES

El modelo de Singery Nicolson nos transmitió una imagen fluída, pero homogénea de las membranas biológicas, que expresamente ignoró las conocidas propiedades químicas de sus constituyentes. Dijimos antes que durante algún tiempo nuestros pensamientos estuvieron gobernados en cierta forma por las ideas de Singer, pero en mayor medida por las de Shinitzky. Es así que comenzamos nuestro trabajo tratando de ver como respondía la enzima a

los cambios de fluidez originados por la carencia de ácidos grasos. En un segundo experimento todavía quedaba algo de esa propuesta inicial. Pero la profundización del conocimiento de las propiedades del colesterol nos mostró un sistema altamente específico, diferenciado y con interacciones capaces de provocar verdaderas separaciones de fase. Nuestra visión del problema fue cambiando hasta llegar a plantear un modelo regulatorio basado en evidencias experimentales acerca del comportamiento de lípidos y enzimas y sustentado también en los experimentos de Zakim. Si bien pretendimos que ese modelo fuera general, se basaba principalmente en interacciones en las que participaba el colesterol. Suponíamos que el colesterol interaccionando con las FC saturadas "enviaba" las FC insaturadas al "ánulus" de la enzima. Recientemente, experimentos con la carencia de ácidos grasos esenciales, contribuyeron a generalizar el fenómeno descrito.

Como los microsomas carentes y los enriquecidos en colesterol presentaban corrimientos similares en sus temperaturas de discontinuidad, respecto de los normales, supusimos que la composición del "ánulus" sería el factor común que regiría tales efectos. Y como los corrimientos antes mencionados, implicaban una disminución de la temperatura, atribuible a las FC más insaturadas, estudiamos los comportamientos de fase de dos fosfatidilcolinas con distinto grado de fluidez que teníamos muy cerca nuestro: la



FC normal y la proveniente de animales carentes. No queremos con esto significar que esas FC estén en contacto con la enzima en el "ánulus" o que las transiciones de los lípidos del entorno sean iguales a las transiciones de los lípidos generales. Simplemente es otra evidencia indirecta que sustenta el modelo propuesto con anterioridad. Por otra parte creemos que toda la evidencia que se puede alcanzar en un sistema nativo es de tipo indirecta.

Seguramente, el mejor conocimiento de estas estructuras biológicas se alcance mediante una amplia confrontación de estudios en membranas nativas y en membranas reconstituídas.

De todas formas, no debe creerse que todos los fenómenos enzimáticos pueden ser explicados mediante el concepto de "ánulus". Las variaciones de los  $K_m$  y la  $V_{max}$  de la UDP-glucuronil transferasa no parecen deberse a los lípidos del entorno.

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS UTILIZADOS

A B N	ácido ribonucleico
A T P	5' adenosinatrifosfato
A UDP G	ácido UDP glucurónico
$\beta$ - OH	oxhidrilo en configuración $\beta$
C - C	enlace simple carbono-carbono
C MC	concentración micelar crítica
$^{13}$ C RMN	Resonancia magnética nuclear de $^{13}$ C
D E F C	dieste <del>ar</del> oilfosfatidilcolina
D E 1 FC	dielaidoilfosfatidilcolina
DL1FC	dilinoleil fosfatidilcolina
D P F C	dipalmitoilfosfatidilcolina
D P F S	dipalmitoilfosfatidilserina
D P H	1,6 difenil-1,3,5-hexatrieno
D M F C	dimiristoilfosfatidilcolina
E M	esfingomieline
Ea	energía de activación
F C	fosfatidilcolina
F E	fosfatidiletanolamina
F I	fosfatidilinositol
$^2$ H RMN	resonancia magnética nuclear de deuterio
I D L	índice de doble ligaduras
M-6-P	manosa-6-fosfato
P O F C	palmitoiloleil fosfatidilcolina
R P E	resonancia paramagnética electrónica
$r_s$	anisotropía de fluorescencia estacionaria
UDP-VAGA	UDP-N-acetilglucosamina

## B I B L I O G R A F I A

1. Tanford, C. (1980) en *The Hydrofobic Effect. Formation of Micelles and Biological Membranes*. John Wiley and Sons, New York.
2. Harrison, R. y Lunt, G. (1980) en *Biological Membranes*. Blackie and Sons, Glasgow, London.
3. Demel, R.A. y De Kruijff, B. (1976). *Biochim. Biophys. Acta* 457, 109-132.
4. Ladbrooke, B.D., Williams, R.M. y Chapman, D. (1968). *Biochim. Biophys. Acta* 150, 333-340.
5. Freeman, R. y Finean, J.B. (1975). *Chem. Phys. Lipids*, 14, 313-320.
6. Franks, N.P. (1976). *J. Mol. Biol.*, 100, 345-353.
7. Yeagle, P.L. (1985). *Biochim. Biophys. Acta* 822, 267-287.
8. Janiack, M.J., Loomis, C.R., Shipley, G.G. y Smatl, D.M. (1974). *J. Mol. Biol.* 86, 325-339.
9. Gruner, S.M., Cullis, P.R., Hope, M.J. y Tilcock, C.P.S. (1985). *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 14, 211-236.
10. Berliner, L. (1976) en *Spin Labeling*. Academic Press, New York.
11. Luzzati, V., Gulik-Kryzwicki, T. y Tardieu, A. (1968). *Nature* 218, 1031-1034.
12. Nagarajan, R., Shah, K.M. y Hammond, S. (1982). *Coll. and Surf.* 4, 147-162.
13. Cullis, P.R. y De Kruijff, B. (1979). *Biochim. Biophys. Acta* 559, 399-420.
14. Killian, J.A. y De Kruijff, B. (1986). *Chem. Phys. Lipids* 40, 259-284.
15. Luzzati, V. (1968) en *Biological Membranes* (Chapman Ed.), Academic Press, New York.
16. Cullis, P.R. (1976). *FEBS Lett.* 68, 173-176.

17. Israelachvili, J.N., Mitchell, J.D. y Ninham, B. (1977). *Biochim. Biophys. Acta* 470, 185-201.
18. Schreier-Mucillo S., Butler, K.W. y Smith, I.C.P. (1973). *Arch. Biochem. Biophys.* 159, 297-311.
19. Hope, M.J., Ballay, M.B., Mayer, L.D., Janoff, A.S. y Cullis, P.R. (1986). *Chem. Phys. Lipids* 40, 89-107.
20. Gregoriadis, G. (1983) en *Liposome Technology*, Vol. I CRC Press, Boca Raton, Florida.
21. Bangham, A.D., Standish, M.M. y Watkins, J.C. (1965). *J. Mol. Biol.* 13, 238-252.
22. Huang, C.H. (1969). *Biochemistry* 8, 344-352.
23. Boni, L.T. y Hui, S.W. (1983). *Biochim. Biophys. Acta* 731, 177-185.
24. Cullis, P.R., Van Dijck, P.W.M., De Kruijff, B. y De Gier, J. (1978). *Biochim. Biophys. Acta* 513, 21-30.
25. Cullis, P.R. y De Kruijff, B. (1978). *Biochim. Biophys. Acta* 507, 207-218.
26. Cullis, P.R. y Hope, M.J. (1980). *Biochim. Biophys. Acta* 597, 533-542.
27. Tilcock, C.P.S. y Cullis, P.R. (1981). *Biochim. Biophys. Acta* 641, 189-201.
28. Nayar, R., Schmid, S.L., Hope, M.J. y Cullis, P.R. (1982). *Biochim. Biophys. Acta* 688, 169-176.
29. Verkleij, A.J., Mommers, C., Leunissen-Bijvelt, J. y Ververgaert, P.H.J.T. (1979). *Nature* 279, 162-163.
30. Verkleij, A.J., Van Echteld, C.J.A., Gerritsen, W.J., Cullis, P.R. y De Kruijff, B. (1980). *Biochim. Biophys. Acta* 600, 620-624.

31. Demel, R.A., Jansen, J.W.C.M., Van Dijck, P.W.M. y Van Deenen, L.L.M. (1976). *Biochim. Biophys. Acta* 465, 1-10.
32. Tilcock, C. (1986). *Chem. Phys. Lipids* 40, 109-125.
33. De Kruijff, B., Verkley, A.J., Van Echteld, C.J.A., Gerritsen, W.J., Mengers, C., Noordam, P.C. y De Gier, J. (1979). *Biochim. Biophys. Acta* 555, 200-209.
34. Israelachvili, J.N., Mitchell, D.J. y Ninham, B.W., (1976). *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 272, 1525-1534.
35. Kirk, G.L., Gruner, S.M. y Stein, D.L. (1984). *Biochemistry* 23, 1093-1102.
36. Borovjagin, V.L., Vergara, J.A. y McIntosh, T.J. (1982). *J. Membr. Biol.*, 69, 199-212.
37. Siegel, D.P. (1984). *Biophys. J.* 45, 399-411.
38. Warren, G.S., Houslay, M.D., Metcalfe, J.C. y Birdsall, N.J.M. (1975). *Nature* 255, 684-686.
39. Cullis, P.R., Hope, M.J. y Tilcock, C.P.S. (1986). *Chem. Phys. Lipids* 40, 127-144.
40. Silvius, J.R. (1972) en *Lipid-Protein Interactions*. (Jost, P.C. y Griffith O.H. Eds.), Wiley and Sons, New York.
41. Oldfield, E. y Chapman, D. (1972). *FEBS Lett.* 23, 285-297.
42. Lee, A.G. (1977). *Biochim. Biophys. Acta* 472, 237-281.
43. Jacobson, K. y Papahadjopoulos, D. (1975). *Biochemistry* 14, 152-161.
44. Hui, S.W. (1977). *Biochim. Biophys. Acta* 472, 345-371.
45. Schoenborn, B.P. (1976). *Biochim. Biophys. Acta* 457, 41-55.

46. Estep, T.N., Mountcastle, D.B., Barenholz, Y., Biltonen, R.L. y Thompson, T.E. (1979). *Biochemistry* 18, 2112-2117.
47. Wallach, D.F.H., Verma, S.P. y Fookson, J. (1979). *Biochim. Biophys. Acta* 649, 471-480.
48. Brown, M.F. y Williams, G.D. (1985). *J. Biochem. Biophys. Methods* 11, 71-81.
49. Keith, A.D., Sharnoff, M. y Cohn, G.E. (1973). *Biochim. Biophys. Acta* 300, 379-419.
50. Shinitzky, M. y Barenholz, Y. (1978). *Biochim. Biophys. Acta* 515, 367-394.
51. Williamson, P., Mattocks, K. y Schlegel, R.A. (1983). *Biochim. Biophys. Acta* 732, 387-393.
52. Jain, M.K. y Wagner, R.C. (1980), en "Introduction to Biological Membranes". John Wiley and Sons., New York-Toronto.
53. Kreissler, M. y Bothorel, P. (1978). *Chem. Phys. Lipids* 22, 261-277.
54. Ladbroke, B.D. y Chapman, D. (1973). *Chem. Phys. Lipids* 3, 304-367.
55. Chapman, D., (1975). *Q. Rev. Biophys.* 8, 185-235.
56. Kimelberg, H.K. y Papahadjopoulos, D. (1974). *J. Biol. Chem.*, 249, 1071-1079.
57. Brenner, R.A. (1984), *Prog. Lipid Res.* 23, 69-96.
58. Phillips, M.C. y Chapman, D. (1968). *Biochim. Biophys. Acta* 163, 301-313.
59. Jain, M.K. y Wu, N.M. (1977). *J. Membrane Biol.* 34, 157-201.
60. Mouritsen, O.G. (1983). *Biochim. Biophys. Acta* 731, 217-221.
61. Jain, M.K. y White, H.B. (1977). *Adv. Lipid Res.* 15, 1-60.
62. Trauble, H. (1971). *Naturwissenschaften* 58, 277-284.

63. Janiak, M.J., Small, D.M. y Shipley, G.G. (1979). *J.Biol. Chem.* 254, 6068-6078.
64. Stümpel, J., Eibl, H. y Nicksch, A. (1983), *Biochim. Biophys. Acta* 727, 245-254.
65. Marcelja, S. (1974). *Biochim. Biophys. Acta* 367, 165-176.
66. Chapman, D., Williams, R.M. y Ladbrooke, B.D. (1967). *Chem.Phys.Lipids* 1, 445-475.
67. Phillips, M.C., Williams, R.M. y Chapman, D. (1969). *Chem.Phys.Lipids* 3, 234-246.
68. Szoka, F. y Papahadjopoulos, D. (1980). *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9, 457-508.
69. Barton, P.S., y Gunstone, F.D. (1975). *J.Biol.Chem.* 250, 4470-4475.
70. Shapiro, E. y Ohki, S. (1974). *J.Colloid.Int. Sci.* 47, 38-49.
71. Coolbear, K.P., Berde, C.B. y Keough, K.M.W. (1983). *Biochemistry* 22, 1466-1473.
72. Michaelson, D.M., Horwitz, A.F. y Kelin, M.P. (1974). *Biochemistry* 13, 2605-2612.
73. Kurland, R.J., Hammoudah, M., Nir, S. y Papahadjopoulos, D. (1979). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 88, 927-932.
74. Cullis, P.R. y Verkleij, A.J. (1979). *Biochim. Biophys. Acta* 552, 546-551.
75. Lee, A.G. (1978). *Biochim. Biophys. Acta* 514, 95-104.
76. Seelig, A. y Seelig, J. (1975). *Biochim. Biophys. Acta* 406, 1-5.

77. Van Deenen, L.L.M. (1965). *Prog.Chem. Fats* 8, 1-127.
78. Stockton, G.W., Polnaszek, C.F., Tullock, A.P., Hasan, F. y Smith, I.C.P. (1976). *Biochemistry* 15, 954-966.
79. Hitchcock, P.B., Mason, R., Thomas, K.M. y Shipley, G.G. (1974). *Proc. Natl.Acad. Sci. U.S.A.* 71, 3036-3040.
80. Pearson, R.H. y Pascher, I. (1979). *Nature* 281, 499-501.
81. Smith, I.C.P. (1984). *en Membrane Fluidity* (Kates M. y Manson L.Eds.) Plenum Publishing Co., New York.
82. Yellin, M. y Levin, I.W. (1977). *Biochemistry* 15, 542-547.
83. Seelig, J. (1977). *Q.Rev. Biophys.* 10, 353-418.
84. Seelig, J. y Seelig, A. (1980). *Q.Rev. Biophys.* 13, 19-51.
85. Hubbell, W.L. y Mc.Connell, H.M. (1971). *J.Am. Chem. Soc.* 93, 314-325.
86. Seelig, A. y Seelig, J. (1974). *Biochemistry* 13, 4839-4845.
87. Jost, P.C., Libertini, L.J., Hebert, V.C. y Griffith, O.H. (1971). *J. Molec. Biol.* 59, 77-98.
88. Mc Farland, B.G. y Mc Connell, H.M. (1971). *Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68, 1274-1278.
89. Seelig, J. y Seelig, A. (1974). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 57, 405-411.
90. Tardieu, A. Luzzati, V. y Reman, F.C. (1973). *J.Mol. Biol.* 75, 711-733.
91. Rand, P.R., Chapman, D. y Larson, K. (1975). *Biophys. J.* 15, 1117-1124.



92. Browning, J.L. y Seelig, J. (1980). *Biochemistry* 19, 1262-1270.
93. Hauser, H., Pascher, I., Pearson, R.H. y Sundell, S. (1981). *Biochim. Biophys. Acta* 650, 21-51.
94. Hauser, H., Pascher, I. y Sundell, S. (1980). *J.Mol. Biol.* 137, 243-264.
95. Zaccai, G., Blasie, J.K. y Schoenborn, B.P. (1975). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72, 376-380.
96. Boggs, J.M. (1980). *Can. J.Biochem.* 58, 755-770.
97. Brown, M.F., Seelig, J. y Häberlen, U. (1979). *J.Chem. Phys.* 70, 5045-5053.
98. Devaux, P. y Mc Connell, H.M. (1972). *J.Am. Chem. Soc.* 94, 4475-4481.
99. Kornberg, R.D. y Mc Connell, H.M. (1971). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68, 2564-2568.
100. Rubenstein, J.L.R., Barton, A.S. y Mc Connell, H.M. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 15-18.
101. Kornberg, R.D. y Mc Connell, H.M. (1971). *Biochemistry* 10, 1111-1120.
102. Singer, S.J. y Nicolson, G.L. (1972). *Science* 175, 720-731.
103. Stubbs, C.D. y Smith, A.D. (1984). *Biochim. Biophys. Acta* 779, 89-137.
104. Lakowicz, J.R., Prendergast, F.G. y Hogen, D. (1979). *Biochemistry* 18, 508-519.
105. Evans, R.W. y Tinoco, J. (1978). *Chem. Phys. Lipids* 22, 207-220.
106. Seelig, A. y Seelig, J. (1977). *Biochemistry* 16, 45-50.

107. Stubbs, C.D., Kouyama, T., Kinoshita, K.Jr. e Ikegami, A. (1981).  
Biochemistry 20, 4257-4262.
108. Michaelson, D.M., Horwitz, A.F. y Klein, M.P. (1974). Biochemistry,  
13, 2605-2612.
109. Jähnig, F., Harlos, K., Vogel, H. y Eibl, H. (1979), 18, 1459-1468.
110. Shimshick, E.J. y Mc Connell, H.M. (1973). Biochemistry 12, 2351-2360.
111. Gilmore, R., Cohn, N. y Glaser, M. (1979). Biochemistry 18, 1050-1056.
112. Lentz, B.R., Barenholz, Y. y Thompson, T.E. (1976). Biochemistry 15,  
4529-4537.
113. Phillips, M.C., Hauser, H. y Paltauf, F. (1972). Chem. Phys.Lipids 8,  
127-133.
114. Mabrey, S. y Sturtevant, J.M. (1976). Proc.Natl. Acad.Sci. U.S.A. 73,  
3852-3866.
115. Matubayasi, N., Shigematsu, T., Iehara, T., Kamaya, H. y Ueda, I.  
(1986). J.Membrane Biol. 90, 37-42.
116. Lee, A.G. (1977). Biochim. Biophys.Acta 472, 285-344.
117. Wu, S.H. y Mc Connell, H.M. (1975). Biochemistry 14, 847-854.
118. Silvius, J.R. (1986). Biochim.Biophys. Acta 857, 217-228.
119. Davis, P.J., Coolbear, K.P. y Keough, K.M.W. (1980). Can.J.Biochem. 58,  
851-858.
120. Von Dreele, P.H. (1978). Biochemistry 17, 3939-3943.
121. Chapman, D., Urbina, J. y Keough, K.M. (1974). J.Biol.Chem. 249,  
2512-2521.

122. Stewart, T.P., Hui, S.W., Portis, A.R. y Papahadjopoulos, D. (1979).  
Biochim. Biophys. Acta 555, 1-16.
123. Untracht, S.H. y Shipley, G.G. (1977). J. Biol. Chem. 252, 4449-4457.
124. Berden, J.A., Barker, R.W. y Radda, G.K. (1975). Biochim. Biophys.  
Acta 375, 186-208.
125. Massari, S., Pascolini, D. y Gradenigo, G. (1976). Biochemistry 17,  
4465-4469.
126. Nordlund, J.R., Schmidt, C.F., Dicken, S.N. y Thompson, T.E. (1981).  
Biochemistry 20, 3237-3241.
127. Litman, B.J. (1975). Biochim. Biophys. Acta 413, 157-162.
128. Lentz, B.R. y Litman, B.J. (1978). Biochemistry 17, 5537-5543.
129. Lecuyer, H., Dervichian, D.G. (1969). J. Mol. Biol. 45, 39-57.
130. Demel, R.A., Bruckdorfer, K.R. y Van Deenen, L.L.M. (1972). Biochim.  
Biophys. Acta 255, 311-320.
131. Stockton, G.W. y Smith, I.C.P. (1976). Chem. Phys. Lipids 17, 251-263.
132. Demel, R.A., Geurts Van Kessel, W.S.M. y Van Deenen, L.L.M. (1972).  
Biochim. Biophys. Acta 266, 26-40.
133. Dresdner, G. (1982). J. Membrane Biol. 64, 145-153.
134. Mc Intosh, T.J. (1978). Biochim. Biophys. Acta 513, 43-58.
135. Estep, T.N., Mountcastle, D.B., Biltonen, R.L. y Thompson, T.E. (1978).  
Biochemistry 17, 1984-1989.
136. Mabrey, S., Mateo, P.L. y Sturtevant, J.M. (1978). Biochemistry 17,  
2464-2468.

137. Engelman, D.M. y Rothman, J.E. (1972). *J. Biol. Chem.* 247, 3694-3697.
138. Hui, S.W. y Parsons, D.F. (1975). *Science* 190, 383-384.
139. Darke, A., Finer, E.G., Flook, A.G. y Phillips, M.C. (1972). *J. Mol. Biol.* 63, 265-279.
140. Shimshick, E.J. y Mc Connell, H.M. (1973). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 53, 446-451.
141. Brockerhoff, H. (1974). *Lipids* 9, 645-650.
142. Huang, C.H. (1976). *Nature* 259, 242-244.
143. Yeagle, P.L., Hutton, W.C., Huang, C. y Martin, R.B. (1976). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72, 3477-3481.
144. De Kruyff, B., Demel, R.A., Slotboom, L.L.M., Van Deenen, L.L.M. y Rosenthal, A.F. (1973). *Biochim. Biophys. Acta* 307, 1-19.
145. Presti, F.T., Pace, R.J. y Chan, S.I. (1982). *Biochemistry* 21, 3831-3835.
146. Yeagle, P.L. y Young, J.E. (1986). *J. Biol. Chem.* 261, 8175-8181.
147. Van Dijck, P.W.M. (1979). *Biochim. Biophys. Acta* 555, 89-101.
148. Schroeder, F. (1984). *Prog. Lipid. Res.* 23, 97-113.
149. Gruyer, W. y Bloch, K. (1983). *Chem. Phys. Lipids* 33, 313-322.
150. Helenius, A. y Simons, K. (1975). *Biochim. Biophys. Acta* 415, 29-79.
151. Capaldi, R.A. y Vanderkooi, G. (1972). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69, 930-932.
152. Nozak, Y. y Tanford, C. (1971). *J. Biol. Chem.* 246, 2211-2217.
153. Spatz, L. y Strittmatter, P. (1971). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68, 1042-1046.

154. Spatz, L. y Strittmatter (1973). *J.Biol. Chem.* 248, 793-799.
155. Haugen, D.A., Armes, L.G., Yasunobu, K.T. y Coon, M.J. (1977). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77, 967-973.
156. Marchesi, V.T. (1979). *J.Membrane Biol.* 51, 101-103.
157. Nelson, N. (1976). *Biochim.Biophys. Acta* 456, 314-338.
158. Luisis, A.J., Tonino, S. y Paigen, K. (1976). *J.Biol.Chem.* 251, 7753-7760.
159. Zorn, M. y Futterman, S. (1971). *J.Biol. Chem.* 246, 881-886.
160. Henderson, R., Unwin, P.N.T. (1975). *Nature* 257, 28-32.
161. Mac Lennan, D.H. (1975). *Can. J.Biochem.* 53, 251-261.
162. Braun, V. (1975). *Biochim.Biophys. Acta* 415, 335-377.
163. Urry, D. (1972). *Biochim.Biophys. Acta* 265, 115-168.
164. Kaplan, J.H. (1973). *Biochim. Biophys. Acta* 311, 1-5.
165. Butler, K.W., Hanson, A.W., Smith, I.C.P. y Schneider, H. (1973). *Can.J.Biochim.* 51, 980-989.
166. Van, S.P. y Griffith, O.H. (1975). *J.Memb.Biol.* 20, 155-170.
167. Jost, P.C., Griffith, O.H., Capaldi, R.A. y Vanderkooi, G. (1973). *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 70, 480-484.
168. Hesketh, T.R., Smith, G.A., Houslay, M.D., Mc Gill, K.A., Birdsall, N.J.M., Metcalfe, J. y Warren, G.B. (1976). *Biochemistry* 15, 4145-4151.
169. Marsh, D., Watts, A., Pates, R.D., Uhl, R., Knowles, P.F. y Esmann, M. (1982). *Biophys. J.* 37, 265-274.

170. Kang, S.Y., Gutowsky, H.S., Hsung, J.C., Jacobs, R., King, T.E., Rice, D. y Oldfield, E. (1979). *Biochemistry* 18, 3257-3267.
171. Jähnig, F. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 6361-6365.
172. Pink, D.A., Chapman, D., Laidlaw, D.J. y Wiedmer, T. (1984). *Biochemistry* 23, 4051-4058.
173. Novosad, Z., Knapp, T.D., Gotto, A.M., Pownall, H.J. y Morrisett, J.D. (1975). *Biochemistry* 15, 3176-3183.
174. Böstlerling, B., Trudell, J.R. y Galla, H.J. (1981). *Biochim. Biophys. Acta* 643, 547-556.
175. Mendelsohn, R., Dluhy, R.A., Crawford, T. y Mantsch, H.H. (1984). *Biochemistry* 23, 1498-1504.
176. Ellena, J.F., Blazing, M.A. y Mc Namee, M.G. (1983). *Biochemistry* 22, 5523-5535.
177. Freire, E., Markello, T., Rigell, C., y Holloway, P.W. (1983). *Biochemistry* 22, 1675-1680.
178. Rigell, C.W., De Saussure, C. y Freire, E. (1985). *Biochemistry* 24, 5638-5646.
179. Bach, D., Bursuker, I. y Goldman, R. (1977). *Biochim. Biophys. Acta* 469, 171-179.
180. Brulet, P. y Mc Connell, H.M. (1976). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 68, 353-358.
181. Grant, C.W.M. y Mc Connell, H.M. (1974). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71, 4653-4657.

182. Kleeman, W. y Mc Connell, H.M., (1976). *Biochim.Biophys. Acta* 419, 206-222.
183. Rice, D.M., Meadows, M.D., Scheinman, A.O., Sani, F.M., Gómez, J.C., Moscarello, M.A., Chapman, D. y Oldfield, E., (1979) *Biochemistry* 18, 5893-5898.
184. Brown, M.F., Miljanich, G.P. y Dratz, E.A. (1977). *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 74, 1978-1982.
185. Thilo, L., Traüble, H. y Overath, P. (1977). *Biochemistry* 16, 1283-1290.
186. Devaux, P.F. y Seigneuret, M. (1985). *Biochim. Biophys. Acta* 822, 63-125.
187. Esmann, M. y Marsh, D. (1985). *Biochemistry* 24, 3572-3578.
188. Knowles, P.F., Watts, A. y Marsh, D. (1981). *Biochemistry* 20, 5888-5894.
189. Beauregard, G. y Roufogalis, B.D. (1977). *Biochem.Biophys. Res. Commun.* 77, 211-219.
190. Ong, R.L. (1984). *J.Membrane Biol.* 78, 1-8.
191. Cortese, J.D. y Vidal, J.C. (1983). *Arch.Biochim.Biophys.* 224, 351-357.
192. Rehorek, M., Dencher, N.A. y Heyn, M.P. (1985). *Biochemistry* 24, 5980-5988.
193. Markello, T., Zlotnick, A., Everett, J., Tennyson, J. y Holloway, P.W. (1985). *Biochemistry* 24, 2895-2901.
194. Gorter, E. y Grendel, F. (1925). *J.Exp.Med.* 41, 439-443.
195. Danielli, J.F. y Davson, H. (1935). *J.Cell Comp. Physiol.* 5, 495-507.
196. Robertson, J.D. (1966). *Ann., N.Y. Acad.Sci.* 137, 421-440.
197. Finean, J.B. y Burge, R.E. (1963). *J. Mol. Biol.* 7, 672-682.

198. Blaurock, A.E. y Wilkins, M.H.F. (1969). *Nature* 223, 906-909.
199. Corless, J.M. (1972). *Nature* 237, 229-231.
200. Lenard, J. y Singer, S.J. (1966). *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 55,  
1828-1835
201. Bretscher, M.S. (1971). *J.Mol.Biol.* 59, 351-357.
202. Verkleij, A.J. y Ververgaer, T.P.H. (1978). *Biochim.Biophys. Acta* 515,  
303-327.
203. Wrigglesworth, J.M., Packer, L. y Branton, D. (1970). *Biochim.Biophys.*  
*Acta* 205, 125-135.
204. Frye, L.D. y Edidin, M. (1970). *J.Coll.Sci.* 7, 319-335.
205. Nicolson, G.L. (1976). *Biochim.Biophys. Acta* 457, 57-108.
206. Hubbel, W.L. y Mc Connell, H.M. (1969). *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 64,  
20-27.
207. Rothman, J.E. y Lenard, J. (1977). *Science* 195, 743-753.
208. Bluemink, J.G. y Delaat, S.W. (1977), en *Cell.Surface Reviews* (Poste, G.  
y Nicolson, G.L. Eds.) Amsterdam.
209. Collard, J.G., De Wildt, A., Comen-Meulemans, E.P.M., Smeekens, J.  
Emmelot, P. e Inbar, M. (1977). *Febs Lett.* 77, 173-178.
210. Stein, J.M., Edner, O.J. y Bargoot, F.G. (1968). *Science* 162, 909-911.
211. Bretscher, M.S. (1972). *Nature New Biol.* 236, 11-12.
212. Op den Kamp, J.A.F. (1979). *Ann.Rev.Biochem.* 48, 47-71.
213. Storch, J. y Kleinfeld, A.M. (1985). *Trends Biochem.Sci.* 10, 418-421.



214. Bergmann, W.L., Dressler, V., Haest, C.W.M. y Deuticke, B. (1984). *Biochim. Biophys. Acta* 769, 390-398.
215. Zilversmit, D.B. y Hughes, M.E. (1977). *Biochim. Biophys. Acta* 469, 99-110.
216. Coleman, R. (1973). *Biochim. Biophys. Acta* 300, 1-30.
217. Sanderman, H.Jr. (1978). *Biochim. Biophys. Acta* 515, 209-237.
218. Yu, L., Yu, C.A. y King, T.E. (1973). *Biochemistry* 12, 540-546.
219. Müller, E., Hinckley, A. y Rothfield, L. (1972). *J. Biol. Chem.* 247, 2614-2622.
220. Gatt, S. y Barenholz, Y. (1973). *Annu. Rev. Biochem.* 42, 61-90.
221. O'Brien, T.A., Blake, R. y Gennis, R.B. (1977). *Biochemistry* 16, 3105-3109.
222. Jurtshuk, P.Jr., Sekuzu, I. y Green, D.E. (1961). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 6, 71-75.
223. Fleischer, S., Brierley, G., Klown, H. y Slautterback, D.B. (1962). *J. Biol. Chem.* 237, 3264-3272.
224. Kimelberg, H.K. y Papahadjopoulos, D. (1972). *Biochim. Biophys. Acta* 282, 277-292.
225. Arion, W.J. y Walls, H.E. (1962). *J. Biol. Chem.* 257, 11217-11220.
226. Garda, H.A. y Brenner, R.R. (1984). *Biochim. Biophys. Acta* 769, 160-170.
227. Garda, H.A. y Brenner, R.R. (1985). *Biochim. Biophys. Acta* 819, 45-54.
228. Farías, R.N. *Adv. Lipid Res.* (1980) 17, 261-282.
229. Farías, R.N., Morero, R.D., Bloj, B., Siñeriz, F. y Trucco, R.E. (1975). *Biochim. Biophys. Acta* 415, 231-251.

230. Dixon, M. y Webb, E.C. (1964), en "Enzymes". Longmans, London.
231. Han, M.H. (1972). *J.Theoret.Biol.* 35, 543-568.
232. Levy, H.M., Sharon, N., Ryan, E.M. y Koshland, D.E.Jr. (1962). *Biochim. Biophys. Acta* 56, 118-126.
233. Zeylemaker, W.P., Jansen, H., Veeger, C. y Slater, E.C. (1971). *Biochim. Biophys. Acta* 242, 14-22.
234. Kumamoto, J., Raison, J.K. y Lyons, J.M. (1971). *J.Theoret.Biol.* 31, 47-51.
235. Houslay, M.D. y Palmer, R.W. (1978). *Biochem.J.* 174, 909-919.
236. Stanley, K.K. y Luzio, J.P. (1978). *Biochim.Biophys. Acta* 514, 198-205.
237. Houslay, M.D., Hesketh, T.R., Smith, G.A., Warren, G.B. y Metcalfe, J.C. (1976). *Biochim.Biophys.Acta* 436, 495-504.
238. Wunderlich, F., Ronai, A., Speth, V., Seelig, J. y Blume, A. (1975). *Biochemistry* 14, 3730-3735.
239. Thilo, L. y Overath, P. (1976). *Biochemistry* 15, 328-334.
240. Esko, J.D., Gilmore, J.R., Glaser, M. (1977). *Biochemistry* 16, 1881-1890.
241. Morrisett, J.D., Pownall, H.J., Plumlee, R.T., Smith, L.C., Zehner, Z. E., Esfahani, M. y Wakil, S.J. (1975). *J.Biol.Chem.* 250, 6969-6976.
242. Sato, N., Murata, N., Miura, Y. y Veta, N. (1979). *Biochim.Biophys. Acta* 572, 19-28.
243. Njus, D., Sulzman, F.M. y Hastings, J.W. (1974). *Nature* 248, 116-120.

244. Danks, S.M. y Tribe, M.A. (1979). *J. Therm. Biol.* 4, 183-191.
245. Bruni, A., Van Dijck, P.W.M. y De Gier, J. (1975). *Biochim. Biophys. Acta* 406, 315-323.
246. Strittmatter, P. y Rogers, M.J. (1975). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72, 2653-2654.
247. De Kruyff, B., Van Dijck, P.W.M., Goldbach, R.W., Demel, R.A. y Van Deenen, L.L.M. (1973). *Biochim. Biophys. Acta* 330, 269-282.
248. Marcelja, S. (1976). *Biochim. Biophys. Acta* 455, 1-7.
249. Houslay, M.D., Hesketh, T.R., Smith, G.A., Warren, G.B. y Metcalfe, J. C. (1976). *Biochim. Biophys. Acta* 436, 495-504.
250. Dipple, I. y Houslay, M.D. (1978). *Biochem. J.* 174, 179-190.
251. Denes, A.S. y Stanacev, N.Z. (1979). *Can. J. Biochem.* 57, 238-249.
252. Richardson, T., Tappel, A.L. y Gruger, E.H. Jr. (1961). *Arch. Biochem. Biophys.* 94, 1-6.
253. Lyons, J.M. y Raison, J.K. (1970). *Comp. Biochem. Physiol.* 37, 405-411.
254. Mc Murchie, E.J. y Raison, J.K. (1979). *Biochim. Biophys. Acta* 554, 364-374.
255. Lyons, J.M. y Raison, J.K. (1970). *Plant. Physiol.* 45, 386-389.
256. Wynn-Williams, T. (1976). *Biochem. J.* 157, 279-281.
257. De Pierre, J.W. y Dallner, G. (1975). *Biochim. Biophys. Acta* 415, 411-472.
258. Brenner, R.R. (1977). *Drugs Metabolism Reviews* 6, 155-181.
259. Wibo, M., Amar-Costesee, A., Berthet, J. y Beaufay, H. (1971). *J. Cell. Biol.* 51, 52-57.

260. Loud, A.V. (1968). *J.Cell.Biol.* 37, 27-35.
261. Weibel, E.R., Stäubli, W., Gnägi, H.R. y Hess, F.A. (1969). *J.Cell. Biol.* 51, 52-53.
262. Dallner, G. (1974). *Methods Enzymol.* 31, 191-201.
263. Kreibich, G., Ulrich, B.L. y Sabatini, D. (1978). *J.Cell.Biol.* 77, 464-487.
264. Welton, A.F. y Aust, S.D. (1974). *Biochem.Biophys. Res.Commun.* 56, 898-906.
265. Glaumann, H. y Dallner, G. (1968). *J.Lipid Res.* 9, 720-729.
266. Lee, T.C. y Snyder, F. (1973). *Biochim.Biophys. Acta* 291, 71-82.
267. Nilsson, G.S. y Dallner, G. (1977). *Biochim.Biophys. Acta* 464, 453-458.
268. Nilsson, G.S. y Dallner, G. (1977). *J.Cell.Biol.* 72, 538-575.
269. Higgins, J.A. y Dawson, R.M.C. (1977). *Biochim.Biophys. Acta* 470, 342-356.
270. Bollen, I.C. y Higgins, J.A. (1980). *Biochem.J.* 189, 475-480.
271. Hutson, J.L. y Higgins, J.A. (1982). *Biochim.Biophys. Acta* 587, 247-256.
272. Higgins, J.A. (1982). *J.Cell.Sci.* 53, 211-225.
273. Higgins, J.A. y Pigott, C.A. (1982). *Biochim.Biophys. Acta* 693, 151-158.
274. Finean, J.B. y Martonosi, A. (1965). *Biochim.Biophys. Acta* 98, 547-553.
275. Bell, R.M., Ballas, L.M. y Coleman, R.A. (1981). *J.Lipid.Res.* 22, 391-403.
276. Bishop, W.R. y Bell, R.M. (1985). *Cell.* 42, 51-60.

277. Van Meer, G. (1986). *Trends Biochem.Sci.* 11, 194-195.
278. Stier, A. (1976). *Biochem. Pharmacol.* 25, 109-117.
279. De Kruijff, B., Van der Besselaar, A.M.P.H., Cullis, P.R., Van den Bosch, H. y Van Deenen, L.L.M. (1978). *Biochim.Biophys.Acta* 514, 1-8.
280. Habrey, S., Powis, G., Schenkman, J.B. y Tritton, T.R. (1977). *J.Biol. Chem.* 252, 2929-2933.
281. Blazyk, .F. y Steim, I.M. (1972). *Biochim.Biophys. Acta* 266, 737-741.
282. Nilsson, O. y Dallner, G. (1975). *FEBS Lett.* 58, 190-193.
283. Oshino, N. y Omura, T. (1973). *Arch.Biochem.Biophys.* 157, 395-404.
284. Kuriyama, Y. (1972). *J.Biol.Chem.* 247, 2979-2988.
285. Lewis, J.A. y Tata, J.R. (1973). *Biochem. J.* 134, 69-78.
286. Zakim, D. y Vessey, D.A. (1976). en "The Enzymes of Biological Membranes" (Martonosi, A.Eds). Plenum Press, New York.
287. Yang, C.S., Strickhart, F.S. y Kicha, L.P. (1977). *Biochim.Biophys. Acta* 465, 362-371.
288. Pechey, D.T., Graham, A.B. y Wood, G.C. (1978). *Biochem. J.* 175, 115-124.
289. Eletr, S., Zakim, D. y Vessey, D.A. (1973). *J.Mol.Biol.* 78, 351-362.
290. Okada, Y., Frey, A.B., Guenther, T.M., Desch, F., Sabatini, D.D. y Kreibich, G. (1982). *Eur.J.Biochem.* 122, 393-402.
291. Dutton, G.C. (1965) en "Glucuronic Acid". Academic Press, New York.
292. Williams, R.T. (1959). "Detoxication Mechanism", 2° ed. Chapman and Hall, London.

293. Zakim, D., Goldenberg, J. y Vessey, D.A. (1973). *Biochim.Biophys.Acta* 309, 67-74.
294. Dutton, G.J. (1980) en "Glucuronidation of Drugs and Other Compounds".  
C.R.C. Press, Boca Raton, Florida.
295. Zakim, D. y Vessey, D.A. (1973). *Methods Biochem. Anal.* 21, 1-37.
296. Cummings, J., Graham, A.B. y Wood, G.C. (1984). *Biochim.Biophys. Acta* 771, 127-141.
297. Singh, O.M.P., Graham, A.B. y Wood, G.C. (1981). *Eur.J.Biochem.* 116, 311-316.
298. Tukey, R.H. y Tephly, T.R. (1981). *Arch.Biochem.Biophys.* 209, 565-578.
299. Hochman, Y., Kelley, M. y Zakim, D. (1983). *J.Biol.Chem.* 258, 6509-6516.
300. Singh, O.M.P., Graham, A.B. y Wood, G.C. (1982). *Biochim.Biophys. Res. Commun.* 107, 345-349.
301. Graham, A.B., Pechey, D.T., Wood, G.C. y Woodcock, B.G. (1974). *Biochem. Soc.Trans.* 2, 1167-1172.
302. Berry, C., Caldecourt, M. y Hallinan, T. (1976). *Biochem. J.* 154, 783-785.
303. Graham, A.B. y Wood, G.C. (1972). *Biochim.Biophys. Acta* 276, 392-398.
304. Graham, A.B. y Wood, G.C. (1974). *Biochim.Biophys. Acta* 370, 431-440.
305. Berry, C., Stellan, A. y Hallinan, T. (1975). *Biochim.Biophys. Acta* 403, 335-344.
306. Vessey, D.A. y Zakim, D. (1972). *J.Biol.Chem.* 247, 3023-3027.
307. Vessey, D.A., Goldenberg, J. y Zakim, D. (1973). *Biochim.Biophys. Acta* 309, 58-66.

308. Zakim, D. y Vessey, D.A. (1975). *Biochim. Biophys. Acta* 410, 61-73.
309. Zakim, D., Goldenberg, J. y Vessey, D.A. (1973). *Eur.J.Biochemistry* 38, 59-63.
310. Berry, C.S. y Hallinan, T. (1976). *Biochem.Soc.Trans.* 4, 650-652.
311. Vessey, D.A. y Zakim, D. (1971). *J.Biol.Chem.* 246, 4649-4655.
312. Erickson, R.H., Zakim, D. y Vessey, D.A. (1978). *Biochemistry* 17, 3706-3711.
313. Hochman, Y. y Zakim, D. (1983). *J.Biol.Chem.* 258, 4143-4146.
314. Puhakainen, E. y Hänninen, O. (1976). *Eur. J.Biochem.* 61, 165-169.
315. Reid, M.E. y Briggs, G.M. (1953). *J.Nutr.* 51, 341-354.
316. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951). *J.Biol.Chem.* 193, 265-275
317. Folch, J., Lees, M. y Sloane-Stanley, G.H. (1957). *J.Biol.Chem.* 226, 497-509.
318. Neskovic, N.M. y Kostic, D .M. (1968). *J.Chromatog.* 35, 297-300.
319. Chen, Jr. P.S., Toribara, T.Y. y Warner, H. (1956). *Anal.Chem.* 28, 1756-1758.
320. Blank, M.L., Schmit, J.A. y Privett, O.S. (1964). *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 41, 371-376.
321. Huang, T.C., Chen, C.P., Wefler, V. y Raftery, J. (1961). *Anal.Chem.* 33, 1405-1406.
322. Burchfield, H.P. y Storrs, E.E. (1970) en "Biochemical Applications of Gas Chromatography", Academic Press, London.

323. Stokes, G.S. (1852). *Phil.Trans. R.Soc. London* 142, 463-552.
324. Lakowicz, J.R. (1983). en "Principles of Fluorescence Spectroscopy".  
Plenum Press, New York. London.
325. Weber, G. (1977). *J.Chem.Phys.*66, 4081-4091.
326. Yguerabide, J. (1972). *Methods Enzymol.* 25, 498-576.
327. Van Blitterswijk, W.J., Van Hoeven, R.P. y Van Der Meer, B.W. (1981).  
*Biochim.Biophys. Acta* 644, 323-332.
328. Liparo, G. y Szabo, A. (1980). *Biophys.J.* 30, 480-506.
329. Lentz, B.R. (1979). *Biophys.J.* 25, 489-494.
330. Parente, R.A. y Lentz, B.R. (1985). *Biochemistry* 24, 6178-6185.
331. Davenport, L., Dale, R.E., Bisby, R.H. y Cundall, R.B. (1985). *Biochemistry* 24, 4097-4108.
332. Sklar, L.A., Miljanich, G.P. y Pratz, E.A. (1979). *Biochemistry* 18,  
1707-1716.
333. Vanderkooi, J.M. y Callis, J.B. (1974). *Biochemistry* 13, 4000-4006.
334. Arion, W.J., Wallin, B.K., Carlson.P.W. y Lange, A.J. (1972). *J.Biol. Chem.* 247, 2558-2565.
335. Brenner, R.R.,Garda,H., De Gómez Dumm,I.N.T. y Pezzano, H. (1981), en  
*Progress in Lipid Research. Essential fatty acids and  
prostaglandins. (Holman, R.T. eds.). Vol.20. Pergamon Press.  
Oxford. New York.*
336. Gómez Dumm,I.N.T.de, Alaniz M.J.T.de, y Brenner, R.R. (1976). *J.Lipid Res.* 17, 616-621.



337. Gómez Dumm, I.N.T. de, Alaniz, M.J.T. de y Brenner, R.R. (1979). *J. Lipid Res.* 20, 834-839.
338. Bernet, J.T. y Sprecher, H. (1975). *Biochim. Biophys. Acta* 398, 354-363.
339. Ninno, R.E., Torrenco, M.P. de, Castuma, J.C. y Brenner, R.R. (1974). *Biochim. Biophys. Acta* 360, 124-127.
340. Brenner, R.R. (1974). *Mol. Cell. Biochem.* (1974) 3, 41-49.
341. Peluffo, R.O., Gómez Dumm, I.N.T. de, Alaniz, M.J.T. de, y Brenner, R.R. (1971). *J. Nutr.* 101, 1075-1077.
342. Alaniz, M.J.T. de, y Brenner, R.R. (1976). *Mol. Cell. Biochem.* 12, 81-86
343. Shinitzky, M. y Barenholz, Y. (1974). *J. Biol. Chem.* 249, 2652-2657.
344. Narasimhulu, S. (1978). *Biochim. Biophys. Acta* 544, 381-387.
345. Koshland, D.E. (1970), en "The Enzymes" (Boyer, P.D. ed.). Vol. I. Academic Press, New York.
346. Levitzki, A. y Koshland, D.E. (1969). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 62, 1121-1128.
347. Seguel, E. (1975). en "Enzyme Kinetics". John Wiley and Sons, New York, London, Sydney, Toronto.
348. Spector, A.A., Kiser, R.E., Denning, G.H., Koh, S.W.M. y De Bault, L.E. (1979). *J. Lipid Res.* 20, 536-547.
349. Rintoul, D.A., Neungton, N. y Silbert, D.F. (1982). *J. Lipid Res.* 23, 405-409.
350. McGee, R. Jr. (1981). *Biochim. Biophys. Acta* 663, 314-328.
351. Poon, R. y Clark, W. (1982). *Biochim Biophys. Acta* 689, 230-240.
352. King, M.E. y Spector, A.A. (1978). *J. Biol. Chem.* 258, 6493-6501.
353. Rintoul, D.A., Sklar, L.A. y Simoni, R.D. (1978). *J. Biol. Chem.* 253, 7447-7452.

354. Wiener, J.R., Pal, R., Barenholz, Y. y Wagner, R. (1985). *Biochemistry* 24, 7651-7658.
355. Pownall, H.J. y Smith, L. (1973). *J. Am. Chem. Soc.* 95, 3136-3140.
356. Lim, P.M., Pritchard, P.H., Paddon, H.B. y Vance, D.E. (1983). *Biochim. Biophys. Acta* 753, 74-82.
357. Vance, D.E. y Pelech, S.L. (1984). *Trends. Biochem. Sci.* 9, 17-20.
358. Jähnig, F. (1981). *Biophys. J.* 36, 329-345.
359. Jähnig, F. (1981). *Biophys. J.* 36, 347-357.
360. Castuma, C.E. y Brenner, R.R. (1986). *Biochim. Biophys. Acta* 855, 231-235.
361. Lyte, M. y Shinitzky, M. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 812, 133-138.
362. Archakov, A.I., Borodin, E.A., Dobretsov, G.E., Karasevich, E.I. y Karyakin, A.V. (1983). *Eur. J. Biochem.* 134, 89-95.
363. Poorthuis, B.J.H.M. y Wirtz, K.W.A. (1982). *Biochim. Biophys Acta* 710, 99-105.

## I N D I C E

Pág.PARTE I. INTRODUCCION YREVISION BIBLIOGRAFICA¿QUE SON LAS MEMBRANAS BIOLOGICAS ? 2CAPITULO ILOS LIPIDOS DE LAS MEMBRANAS BIOLOGICAS 4POLIMORFISMO LIPIDICO 5

Los cristales líquidos comparten algunas propiedades con los líquidos y otras con los sólidos. 5

Los cristales liotrópicos presentan un polimorfismo mayor aún que el de los cristales termotrópicos. 8

Los lípidos pueden adoptar diversas estructuras según las condiciones de hidratación. 10

Las mezclas de lípidos de membrana tienden a adoptar una organización lamelar. 12

El conocimiento acabado del polomorfismo permitiría una predicción cuantitativa de la estructura del lípido a partir de su fórmula química. 13

¿Por qué existe tal diversidad de lípidos en las membranas biológicas, si la fosfatidilcolina por sí sola podría mantener la bicapa?. 15

ESTRUCTURA Y DINAMICA DE LOS LIPIDOS 16

Los métodos físicos contribuyen a dilucidar los mecanismos moleculares que rigen los sistemas biológicos. 16

Las bicapas experimentan cambios abruptos en su organización a una temperatura característica.	16
Algunas teorías describen detalladamente los mecanismos del cambio de estado.	17
Factores muy diversos modifican la temperatura de transición de los fosfolípidos hidratados.	19
Las cadenas hidrocarbonadas 1 y 2 de los fosfolípidos no son conformacionalmente equivalentes.	22
La flexibilidad de las cadenas en el estado líquido cristalino reside en las rápidas isomerizaciones "trans" "gauche" de los enlaces C-C.	22
El parámetro de orden no refleja las velocidades de los movimientos sino la orientación promedio de los segmentos de la cadena.	24
Las cabezas polares de la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina presentan distinto grado de empaquetamiento.	26
Las cadenas de ácidos grasos experimentan movimientos dentro y fuera del plano de la bicapa.	27
¿Qué es la fluidez?	30
Diversos factores modifican la fluidez de la bicapa lipídica.	32
<u>LA INTERACCION FOSFOLIPIDO-FOSFOLIPIDO.</u>	34
Las mezclas de fosfolípidos químicamente distintos presentan generalmente inmiscibilidad en la fase gel.	34
¿Cuáles son las fuerzas que promueven la separación lateral de fases?	35
Las interacciones entre moléculas de fosfolípidos determinan su distribución asimétrica en vesículas pequeñas.	36

<u>LA INTERACCION COLESTEROL-FOSFOLIPIDO.</u>	38
El colesterol ejerce una amplia variedad de efectos sobre las propiedades físicas de los sistemas lipídicos.	38
Algunos modelos describen el comportamiento del colesterol en bicapas lipídicas.	39
El colesterol no presenta la misma afinidad por todos los fosfolípidos.	41
 <u>CAPITULO II</u>	
<u>LAS INTERACCIONES LIPIDO-PROTEINA</u>	43
<u>LAS PROTEINAS DE MEMBRANA</u>	44
No existen diferencias marcadas de polaridad entre las proteínas integrales y las solubles.	44
Se presentan diferentes mecanismos de interacción entre las proteínas integrales y la bicapa lipídica.	46
<u>LAS PROTEINAS Y LAS BICAPAS LIPIDICAS</u>	47
¿Existe un microentorno lipídico para las proteínas integrales?	47
Las proteínas integrales modifican las propiedades físicas de la bicapa lipídica.	49
Las proteínas también presentan interacciones diferenciales.	50
<u>LA ORGANIZACION DE LAS MEMBRANAS BIOLOGICAS.</u>	52
Los modelos propuestos son generalizaciones estructurales útiles.	52
El ensamble de lípidos y proteínas en las membranas naturales genera mutuas restricciones en sus estructuras y movimientos.	53

Las membranas naturales también evidencian asimetría transversal. 55

LA CINÉTICA ENZIMÁTICA Y LOS LÍPIDOS DE MEMBRANA 56

Los lípidos modulan la actividad enzimática a través de distintos mecanismos. 56

Las propiedades cinéticas de algunas enzimas dependen de la fluidez de la membrana. 58

La mayoría de las enzimas de membrana presentan quebraduras en las curvas de Arrhenius. 59

Las discontinuidades en las curvas de Arrhenius no siempre coinciden con la  $T_t$  de los lípidos de la bicapa. 61

¿Cómo se explica la no linealidad de las curvas de Arrhenius? 62

LA MEMBRANA MICROSOMAL 64

La principal diferencia entre microsomas lisos y rugosos parece ser la presencia de ribosomas unidos a estos últimos. 64

Recientemente se ha descubierto una "flipasa" en el retículo endoplásmico. 66

En el rango fisiológico la membrana microsomal es una bicapa lípido cristalina altamente heterogénea. 67

Las proteínas de la membrana microsomal se distribuyen asimétricamente. 68

LA UDP-GLUCURONIL TRANSFERASA

La UDP-glucuronil transferasa participa en los mecanismos de detoxificación. 70

La función catalítica de la UDP-glucuronil transferasa está regulada por los fosfolípidos. 71

La UDP-glucuronil transferasa purificada presenta un requerimiento específico por fosfatidilcolina 73

#### LA FINALIDAD DE ESTAS INVESTIGACIONES 74

El objetivo general de este trabajo es contribuir al conocimiento bioquímico en el área de las membranas biológicas. 74

El objetivo específico de este trabajo es el estudio de la interacción de los lípidos con la UDP-glucuronil transferasa microsomal. 75

## PARTE II. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

### CAPITULO I

#### METODOLOGIA GENERAL 78

##### LA PROCEDENCIA DEL MATERIAL UTILIZADO 79

##### ANIMALES Y DIETAS 80

En todos los experimentos se emplearon cobayos. 80

Los animales fueron alimentados con una dieta de composición controlada 80

##### LA FRACCION MICROSOMAL 80

Los microsomas se obtuvieron por ultracentrifugación 80

##### ANALISIS LIPIDICO 81

Los lípidos microsomales se extrajeron mediante la técnica de Folch y col. (317). 81

Los lípidos polares se separaron por cromatografía en capa fina en silicagel H (318)	82
Los lípidos neutros se separaron por cromatografía en capa fina en silicagel G.	82
La composición de ácidos grasos se determinó por cromatografía gas-líquido.	83
El índice de dobles ligaduras se ha empleado como medida del grado de insaturación.	85
<u>LA ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA</u>	85
Porqué no fluorescen todas las sustancias.	85
Las características espectrales de las moléculas fluorescentes dependen del solvente y la temperatura.	87
Los espectros de absorción y emisión están relacionados.	88
<u>LA POLARIZACION DE FLUORESCENCIA</u>	88
Si no se pueden realizar mediciones dinámicas de la anisotropía de fluorescencia, conviene expresar los resultados como $P$ o $r_s$ simplemente.	88
La técnica experimental empleada intentó disminuir los errores en las mediciones de anisotropía de fluorescencia.	90
¿Qué condiciones deben reunir los marcadores fluorescentes?	92
Durante mucho tiempo se creyó que el DPH se particionaba por igual en la fase gel que en la líquido cristalino.	93
El ácido trans parinárico prefiere la fase gel.	94
La formación de excímeros del pireno es una prueba óptica para investigar la movilidad traslacional de membranas.	96



La merocianina 540 es un marcador fluorescente sensible al empaquetamiento de la membrana. 97

#### MEDICIONES ENZIMATICAS 97

La velocidad inicial se determinó extrayendo alícuotas de la mezcla de incubación a distintos tiempos. 97

Los  $K_m$  y la  $V_{max}$  se determinaron midiendo  $v$  a varias concentraciones de p-NF y A UDPG. 99

Mediante el gráfico de Hill se determinó la cooperatividad aparente. 102

Para detectar el grado de integridad de la membrana microsomal se midió la latencia de la manosa-6-fosfatasa. 104

## CAPITULO II

### METODOLOGIA ESPECIFICA 105

#### LA CARENCIA DE ACIDOS GRASOS ESENCIALES 105

#### LA INCORPORACION DE COLESTEROL "IN VIVO" 106

#### LA EXTRACCION E INCORPORACION DE COLESTEROL "IN VITRO" 106

Los lípidos polares y neutros se separaron con ácido silícico. 106

Se prepararon liposomas pequeños por sonicación. 106

¿Cómo se modificó el contenido de colesterol de los microsomas? 107

Pág.

<u>PARTE III - DESCRIPCION</u>	
<u>Y DISCUSION DE LOS</u>	
<u>RESULTADOS</u>	
<u>EXPERIMENTALES</u>	109
<u>CAPITULO I</u>	
<u>LA MEMBRANA MICROSOMAL NORMAL DE HIGADO DE COBAYOS</u>	110
<u>LA COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS</u>	111
El cobayo y la rata presentan diferentes composiciones de ácidos grasos.	111
<u>LAS PROPIEDADES DINAMICAS</u>	114
La selección de las condiciones experimentales permite disminuir los errores del método.	114
La membrana microsomal de hígado de cobayo no presenta una $T_t$ en el rango estudiado.	118
<u>LA UDP GLUCURONIL TRANSFERASA</u>	121
Los gráficos de Lineweaver Burk de la UDP glucuronil transferasa no son lineales en todo el rango de concentraciones.	121
<u>CAPITULO II</u>	
<u>LA CARENCIA DE ACIDOS GRASOS ESENCIALES</u>	128
<u>LA COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS</u>	129
La carencia de ácidos grasos esenciales altera significativamente la composición de ácidos grasos de la membrana microsomal.	129

Pág.

El índice de dobles ligaduras decrece continuamente con el período de deficiencia de ácidos grasos.	133
La carencia de ácidos grasos no modifica la relación molar colesterol:fosfolípido.	133
LAS PROPIEDADES DINAMICAS	134
La carencia de ácidos grasos provoca aumentos en la $r_s$	134
La carencia de ácidos grasos no origina la aparición de una $T_t$ entre 10° y 40°C	137
LA UDP-GLUCURONIL TRANSFERASA	139
La cooperatividad aparente del A UDP G desaparece al aumentar el período de carencia de ácidos grasos.	139
¿Pueden atribuirse los cambios en las propiedades cinéticas de la UDP-glucuronil transferasa a variaciones en la fluidez de la membrana?	142.

CAPITULO III

<u>LA INCORPORACION DE COLESTEROL "IN VIVO"</u>	147
ANALISIS LIPIDICO	147
La incorporación de colesterol no provocó cambios en la composición total de ácidos grasos de la membrana microsomal	147
La relación FC:FE disminuyó apreciablemente en los microsomas enriquecidos con colesterol	148
La FC y la FE tampoco presentan diferencias significativas en su composición de ácidos grasos.	151
LAS PROPIEDADES DINAMICAS	153
El colesterol disminuye la movilidad translacional y rotacional en la membrana microsomal.	153

El aumento de la relación FC-FE atenúa el efecto rigidizante del colesterol en la membrana microsomal.	156
EL COLESTEROL Y LA UDP-GLUCURONIL TRANSFERASA	159
La incorporación de colesterol modifica la cinética de la UDP-glucuronil transferasa.	159
¿Cuál es el mecanismo de acción del colesterol sobre la UDP-glucuronil transferasa?	160

#### CAPITULO IV

<u>LA INCORPORACION DE COLESTEROL "IN VITRO"</u>	168
ANALISIS LIPIDICO	169
La técnica empleada permite la extracción e incorporación específica de colesterol.	169
LAS PROPIEDADES DINAMICAS	171
La difusión lateral guarda una relación inversa con el contenido de colesterol.	171
La $r_s$ guarda una relación directa con el contenido de colesterol.	176
El ácido trans parinárico detecta una separación de fases en los fosfolípidos.	178
Integridad de la membrana microsomal	181
LA UDP-GLUCURONIL TRANSFERASA	181
El colesterol es el responsable de los cambios en la cinética de la UDP-glucuronil transferasa.	181
Las variaciones en el porcentaje de activación por la UDP-NAGA confirman el modelo propuesto.	183

La UDP-glucuronil transferasa presenta una quebradura en la curva de Arrhenius	183
--	-----

## CAPITULO V

<u>NUEVAMENTE LA CARENCIA DE ACIDOS GRASOS ESENCIALES</u>	187
---	-----

ANALISIS LIPIDICO	188
-------------------	-----

La carencia de ácidos grasos provoca cambios no sólo en la composición de ácidos grasos totales, sino también en la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos.	188
---	-----

LAS PROPIEDADES DINAMICAS	191
---------------------------	-----

La carencia de ácidos grasos disminuye la movilidad rotacional y translacional	191
--	-----

Los fosfolípidos presentan una separación lateral de fases.	196
---	-----

La merocianina 540 también detecta separaciones de fase	199
---	-----

Las curvas de Arrhenius de la UDP-glucuronil transferasa de microsomas normales y carentes muestran discontinuidades a distintas temperaturas.	202
--	-----

## CAPITULO VI

EPILOGO	208
---------	-----

CONCLUSIONES	209
--------------	-----

CONSIDERACIONES FINALES	210
-------------------------	-----

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS UTILIZADOS	213
------------------------------------	-----

BIBLIOGRAFIA .....	214
--------------------	-----