

Tesis de Posgrado

Relación entre la estructura de la membrana y actividad de enzimas microsomales

Garda, Horacio Alberto

1982

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Garda, Horacio Alberto. (1982). Relación entre la estructura de la membrana y actividad de enzimas microsomales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1740_Garda.pdf

Cita tipo Chicago:

Garda, Horacio Alberto. "Relación entre la estructura de la membrana y actividad de enzimas microsomales". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1982. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1740_Garda.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

"RELACION ENTRE LA ESTRUCTURA DE LA MEMBRANA Y ACTIVIDAD
DE ENZIMAS MICROSOMALES"

AUTOR: Horacio Alberto Garda

DIRECTOR: Rodolfo R. Brenner

LUGAR DE TRABAJO: Instituto de Investigaciones Bioquímicas
de La Plata - CONICET - UNLP

1740

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR EN
CIENCIAS QUIMICAS.

- 1 9 8 2 -

1740
*j. 2

A Silvia María Paula

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Rodolfo R. Brenner por su constante guía y estímulo, cuyos consejos permitieron la concreción de los objetivos propuestos.

A la Dra. Leonor C. San Martín de Viale, Consejera - de estudios, por su valioso apoyo.

A los Dres. Raúl O. Peluffo y Aníbal M. Nervi por su invalorable apoyo humano.

A la Dra. Hilda Pezzano del Laboratorio de Resonancia Paramagnética del Dto. de Química Inorgánica, Analítica y Química-Física por su colaboración en los estudios de resonancia electrónica paramagnética.

Al Dr. César Gómez Dumm de la Cátedra de Histología y Embriología de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata por los controles de microscopía - electrónica.

A Ana M. Bernasconi por su eficiente colaboración.

A todos mis compañeros del Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata.

A Marcela F. de Tedesco, quien dactilografizó este - trabajo con gran esmero.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por las becas que me otorgó, las que permitieron la - realización de esta tesis.

CAPITULO I

I N T R O D U C C I O N

CAPITULO I: INTRODUCCION

I.1. GENERALIDADES.

Las membranas biológicas son capas formadas por proteínas y lípidos que permiten la compartimentación de la materia viviente. Un ejemplo simple es la membrana plasmática - que sirve como una barrera para evitar que se mezcle el contenido celular con el de su medio ambiente, pero al mismo tiempo permite el pasaje selectivo de metabolitos a través de ella. Las células eukarióticas generalmente contienen además membranas intracelulares que definen compartimientos dentro de la célula, como la membrana nuclear o las de mitocondrias. Estas células también contienen una red de canales y cisternas formados por membranas que constituyen el retículo endoplásmico y el sistema de Golgi. Todas estas membranas cumplen un importante rol en muchos procesos celulares. Por ejemplo, la membrana plasmática está íntimamente involucrada en las interacciones célula-célula, las cuales son importantes en procesos de diferenciación, división y reconocimiento celular. Las membranas de las organelas son los sitios de importantes funciones celulares. Por ejemplo las membranas de mitocondrias y cloroplastos son los sitios de la generación de ATP, la síntesis de proteínas ocurre en los polirribosomas unidos a la membrana del retículo endoplasmático y muchas actividades enzimáticas y procesos de transporte están asociados a estas membranas intracelulares.

Todos los diferentes tipos de membranas tienen la característica común de que contienen proteínas y lípidos, sin ningún otro componente mayoritario. Las membranas pueden contener una pequeña cantidad de carbohidratos en forma combinada - como glicolípidos o glicoproteínas, pero no como polisacáridos libres. La pared celular externa de bacterias, contiene como constituyente mayoritario un complejo proteína-polisacárido unido covalentemente. Si bien algunas veces esta pared es denominada como "membrana externa", esta estructura no está incluí

da dentro de las denominadas membranas biológicas, y presenta características estructurales, de composición y funcionales - completamente diferentes. En este capítulo se discutirán características estructurales de las membranas biológicas, especialmente la del retículo endoplásmico, y la influencia de la estructura sobre algunas funciones de la misma. Solo se considerarán algunos aspectos funcionales como algunas actividades enzimáticas y de transporte, dejando de lado otros procesos fundamentales como permeabilidad, transducción de energía, reconocimiento celular, síntesis proteica, etc, de las cuales son responsables las membranas biológicas. Primeramente se considerarán las características de los componentes fundamentales de las membranas biológicas, proteínas y fosfolípidos.

1.2. CARACTERISTICAS DE LAS PROTEINAS DE MEMBRANAS.

Las proteínas de membrana han sido clasificadas en periféricas e integrales. El criterio de esta clasificación es aún operativo. Las proteínas que son fácilmente separadas de la matriz lipídica de la membrana por simples tratamientos con soluciones de baja fuerza iónica, se piensa que están débilmente unidas a la membrana por interacciones iónicas con los grupos polares de los fosfolípidos, y se las considera como proteínas periféricas. Por otro lado, aquellas proteínas que necesitan tratamientos más drásticos para ser separadas de la membrana (por ejemplo detergentes o solventes orgánicos), se considera que están unidas fuertemente a la matriz lipídica por interacciones hidrofóbicas y se las denomina proteínas integrales.

Se han realizado varios intentos para diferenciar a las proteínas de membrana de las proteínas solubles en base a la polaridad de los aminoácidos que las constituyen (1-3). En estos estudios, los aminoácidos fueron clasificados en polares intermedios y no polares; y en base a la composición de aminoácidos se asignó un valor de porcentaje de polaridad a las dis

///

tintas proteínas. Wallach y Gordon (1), llegaron a la conclusión de que las proteínas de membrana no difieren en polaridad de las proteínas solubles, pero ellos obtuvieron sus resultados calculando la polaridad de preparaciones de proteínas totales de membranas, sin considerar que ellas contienen proteínas integrales y periféricas. Algo después, Vanderkooi y Capaldi (2), analizando un gran número de proteínas llegaron a la conclusión de que la gran mayoría de las proteínas solubles tienen alrededor de un 46% de residuos polares, y que la mayor parte de las proteínas de membrana consideradas integrales tienen una polaridad menor del 46%, mientras que aquellas consideradas periféricas tienen un valor de polaridad mayor que las proteínas solubles.

Sin embargo, algunas proteínas que se comportan como integrales presentan un porcentaje de aminoácidos polares igual o mayor que el promedio de las proteínas solubles (por ejemplo el citocromo b5), y así el valor de polaridad no puede ser usado inequívocamente para decir si se trata de una proteína integral o periférica.

Un intento más sofisticado fue asignar un índice de hidrofobicidad a cada aminoácido individualmente, sobre la base de su solubilidad en solventes de diferentes polaridades y así obtener un valor de hidrofobicidad promedio para las distintas proteínas (3). Pero tampoco de esta manera se han obtenido diferencias consistentes entre las proteínas integrales y las periféricas o las solubles.

Aparentemente, no es tan importante el contenido de residuos hidrofóbicos para que una proteína pueda integrarse en una bicapa lipídica, sino que lo importante sería la distribución especial de esos residuos en la cadena polipeptídica, de tal manera que puedan agruparse entre sí un número de residuos no polares que interactúen fuertemente con la membrana. Así, las superficies hidrofóbicas resultarían de la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas, y no son fácilmente detectables de la composición de aminoácidos, ya que los segmentos hidrofó-

///

bicos contínuos pueden ser relativamente cortos y pueden estar balanceados por secuencias hidrofílicas externas.

En los últimos años, muchas proteínas integrales de membrana han sido altamente purificadas, y la determinación de su estructura primaria reveló características diferenciales con respecto a las proteínas citosólicas. Algunas proteínas de membrana son anfipáticas, es decir contienen dominios polares y dominios no polares, y de esta manera se asemejan a los detergentes y a los fosfolípidos. Algunos ejemplos son la aminopeptidasa y maltasa intestinal (4), el citocromo P450 (5), el citocromo b₅(6,7) y la citocromo b₅ reductasa (8). Estas proteínas se localizan con su dominio hidrofóbico sumergido en la bicapa lipídica y exponen hacia la fase acuosa sus superficies polares. Cuando el segmento hidrofóbico es eliminado por proteólisis parcial, estas proteínas pierden la capacidad de unirse a bicapas lipídicas.

La glicoforina de la membrana de eritrocito es especial ya que consta de un segmento hidrofóbico en el medio y en ambos extremos tiene segmentos hidrofílicos (9). Esta estructura permite su localización transmembrana, exponiendo a cada lado de la bicapa lipídica una superficie hidrofílica. Otras proteínas de membrana con estructura cuaternaria tienen una naturaleza anfipática debido a la presencia de sub-unidades hidrofóbicas como en algunas ATPasas (10), y la β -glucuronidasa microsomal (11). Esta última se encuentra en lisosomas como tetrámero libre, y en retículo endoplásmico se encuentra formando un complejo con una a cuatro moléculas del polipéptido no polar egasina, lo que le permite fijarse a la membrana.

Otras proteínas de membrana tienen una excepcionalmente alta hidrofobicidad total, como la C-55 isoprenoide alcohol kinasa (12), la rodopsina (13), y la bacteriorodopsina (14). Y aún otras proteínas contienen residuos de ácidos grasos o fosfolípidos unidos covalentemente, lo que les da una mayor hidrofobicidad para permitir su fijación a la membrana. Entre ellas la

///

lipoproteína mureína de *E. coli* (15), los proteolípidos de mielina (16) y de la ATPasa de retículo sarcoplásmico (17), y la penicilinasasa de membrana de *Bacillus licheniformis* (18) que tiene fosfatidilserina unida covalentemente.

En principio por lo menos, una estructura anfipática también podría surgir por algún plegamiento especial de la cadena polipeptídica en una proteína de composición de aminoácidos normal.

I.3.- ESTRUCTURAS LIQUIDO-CRISTALINAS. CARACTERISTICAS DE LOS LIPIDOS DE MEMBRANAS.

Los lípidos constituyentes de las membranas forman estructuras del tipo líquido-cristalinas. Los cristales líquidos presentan ciertas características de los líquidos y ciertas propiedades de los sólidos. Por un lado, pueden ser tan fluidos como el agua, y por otro lado, las moléculas que los constituyen están ordenadas regularmente en forma similar a una red cristalina.

Los cristales líquidos han sido clasificados en dos grandes grupos de acuerdo a su composición (19): a) Termotrópicos, los cuales consisten de un solo componente, y en ellos la fase líquido-cristalina es formada al calentar por encima de una cierta temperatura crítica; y b) Liotrópicos, los cuales son formados al tratar ciertas sustancias anfipáticas con una cierta cantidad de agua u otro solvente. Los cristales líquidos liotrópicos pueden consistir de dos o más componentes. Ambas clases de cristales líquidos pueden presentar variadas estructuras o mesofases.

Los cristales líquidos termotrópicos son clasificados en tres tipos de mesofases: esméctica, nemática y colestérica. Los cristales líquidos esmécticos consisten de una serie de capas de moléculas alargadas, en las cuales el eje mayor de las moléculas queda alineado perpendicularmente al plano de la capa y más o menos paralelo al de las otras moléculas como se ilus-

///

tra en la figura 1a). Las moléculas pueden rotar alrededor de su eje mayor y difundir libremente dentro del plano de la capa (difusión lateral), pero la rotación perpendicular al eje mayor está severamente reprimida. En los cristales líquidos nemáticos los ejes mayores de las moléculas se ordenan paralelamente entre sí, pero las moléculas no se separan en capas (figura 1b). Los cristales líquidos colestéricos se forman esquemáticamente por superposición de capas de cristales líquidos nemáticos con una variación uniforme de la orientación del eje mayor de las moléculas como se ilustra en la figura 1c). Esta estructura helicoidal da origen a una actividad óptica intensa.

Las mesofases liotrópicas se forman de moléculas anfipáticas. Dependiendo del tipo de sustancia anfipática y de la cantidad de agua presente, las fases liotrópicas pueden asumir una gran variedad de estructuras. Este polimorfismo es mayor aún que para los cristales líquidos termotrópicos. Las dos clases de estructuras liotrópicas más importantes son la mesofase lamelar y la mesofase hexagonal. En la fase lamelar, las moléculas anfifílicas se ordenan en dobles capas separadas entre sí por capas de agua. Los grupos polares están en contacto con el agua, mientras que las cadenas hidrocarbonadas no polares forman el interior hidrofóbico de la doble capa (figura 2a). En analogía a los cristales líquidos termotrópicos, la fase lamelar también es denominada cristal líquido liotrópico esméctico.

La fase hexagonal consiste en partículas cilíndricas alargadas con un interior hidrofóbico en un medio ambiente acuoso (figura 2b). Los grupos polares quedan en la superficie externa de los cilindros. Los cilindros se agrupan entre sí de manera que cada cilindro se halla rodeado de otros seis cilindros. De aquí el origen del nombre para esta mesofase. Pueden formarse también una fase hexagonal similar pero invertida. En este caso se la denomina hexagonal II.

Las micellas pueden ser considerados como precursores primitivos de los cristales líquidos. Ciertas clases de moléculas

cristales líquidos termotrópicos

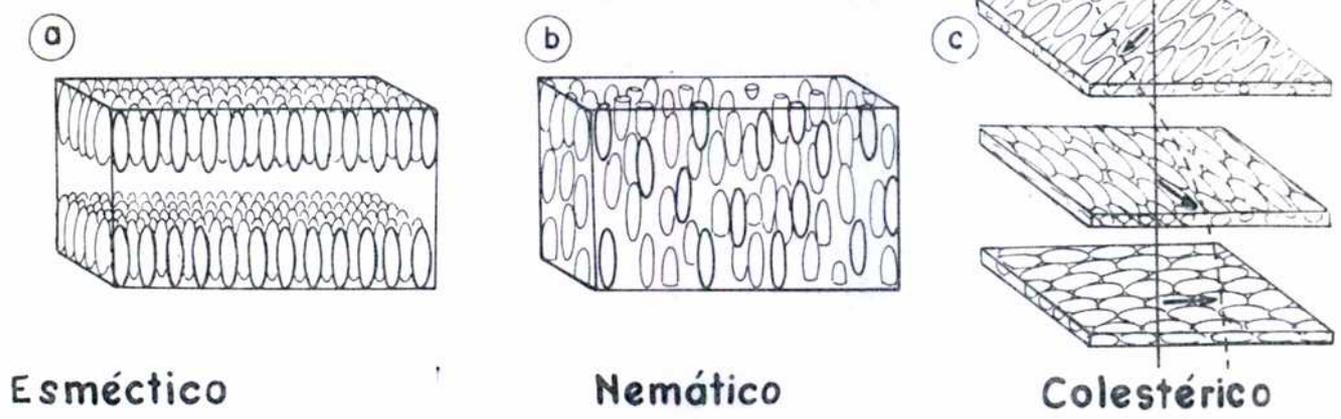
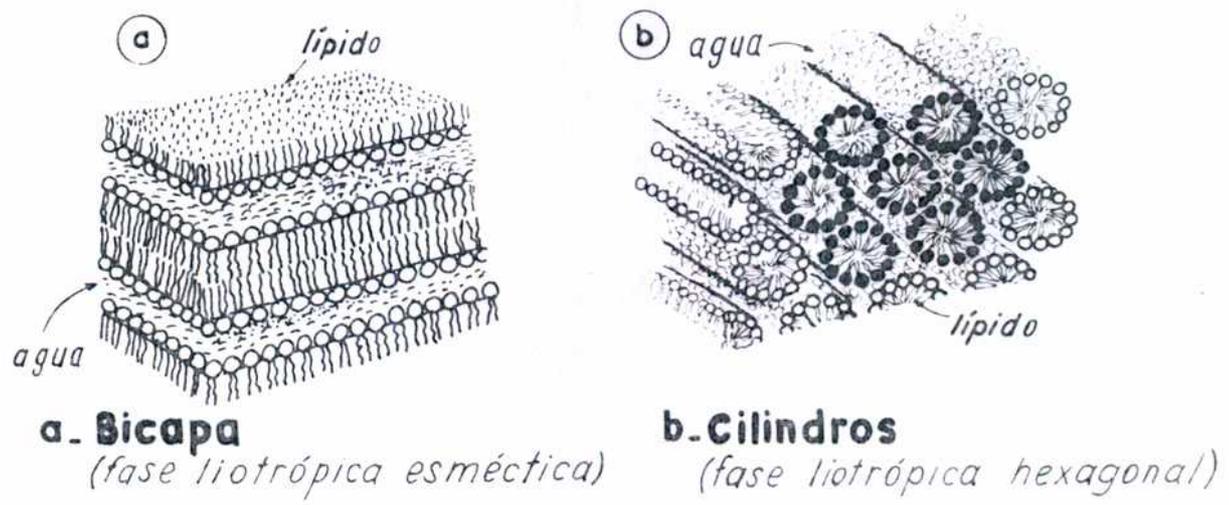


FIGURA 1

cristales líquidos liotrópicos



a. Bicapa
(fase liotrópica esméctica)

b. Cilindros
(fase liotrópica hexagonal)

FIGURA 2

///

las anfipáticas, como jabones o ácidos grasos, pueden ser disueltas en agua como sales normales. Si la concentración es incrementada por encima de cierto nivel crítico, la concentración micelar crítica, las porciones lipofílicas se asocian para minimizar el contacto con el agua. Las micelas son sistemas rápidamente fluctuantes. El tiempo de vida de una micela individual es mas bien corto y nunca tienen una forma geométrica bien definida, ni un alto grado de ordenamiento de las moléculas que las constituyen.

Las micelas deben ser distinguidas de las vesículas - (20). Estas últimas son estructuras esféricas con una única bicapa de moléculas lipídicas como una membrana externa. El interior de tales vesículas está rigurosamente separado del exterior. Las vesículas pueden considerarse como una mesofase lamelar formando una estructura globular.

Los cristales líquidos son sensibles a fuerzas externas como el calor, la luz, presión mecánica, y composición química del medio ambiente. Son lo suficientemente fluídos para permitir una rápida difusión lateral y la distribución de la materia y la energía. Además, los cristales líquidos se ajustan a una multiplicidad de formas requeridas por la geometría del sistema, mientras que al mismo tiempo mantienen un alto grado de ordenamiento al nivel molecular. Estas razones hacen que los cristales líquidos jueguen un importante rol en los sistemas vivientes (21). La bicapa lipídica, esto es la mesofase liotrópica esméctica, es la estructura líquido-cristalina más importante asociada con el estado de vida, ya que es la estructura básica de la mayoría de las membranas biológicas.

Los fosfolípidos son los constituyentes lipídicos cuantitativamente más importantes de las membranas biológicas. Estos

///

al igual que los detergentes, son típicos compuestos anfifílicos. En general cuando se los coloca en exceso de agua por encima de cierta concentración y temperatura crítica forman espontáneamente estructuras de bicapa (22). Este proceso es energéticamente dirigido por las interacciones hidrofóbicas de las cadenas hidrocarbonadas y las interacciones entre los grupos polares. Las interacciones entre los grupos polares han sido caracterizadas como repulsivas (23 y 24), ya que la solubilidad en agua de las sales de Na^+ y Ca^{++} de fosforil colina, fosforiletanolamina y fosforilserina es menor que la concentración calculada para los grupos polares en bicapas de los correspondientes fosfolípidos (24). Ambos tipos de interacciones entre las cadenas hidrocarbonadas y los grupos polares parecen ser esenciales para el mantenimiento de la estructura de bicapa.

La capacidad para formar bicapas también depende del tamaño y carga del grupo polar. La fosfatidil colina forma bicapas muy fácilmente, pero otros fosfolípidos lo hacen con mayor dificultad. La fosfatidiletanolamina por sí sola a temperatura ambiente prefiere una estructura hexagonal (25), pero es obligada a formar bicapas en presencia de fosfatidilcolina (26) cuando la relación molar es 1:1. La fosfatidiletanolamina tendría tendencia a formar micelas invertidas en membranas biológicas en presencia de proteínas (27,28), y en membranas modelo de fosfatidilcolina-fosfatidiletanolamina en relaciones adecuadas (26). En presencia de Ca^{++} , una mezcla de PC, cardiolipina, monoglucosildiglicérido, y PE, se caracterizó por una señal de resonancia magnética nuclear isotrópica y se visualizó como partículas en réplicas de fracturas por congelamiento, lo cual se interpretó como la presencia de micellas invertidas (29).

La esfingomiolina a bajas temperaturas forma una fase lamelar, pero a temperaturas fisiológicas y mayores, según Usher y col., esta fase es inestable y se forma una fase hexagonal. La PC y el colesterol estabilizan las bicapas de esfingomiolina (30). Sin embargo, Cullis y De Kruijff (31) reportaron

que la esfingomielina se estabiliza en una configuración lamelar. Debajo de la Tt, todos los fosfolípidos adquieren una estructura lamelar (31).

Así, los lípidos podrían dividirse en lamelofílicos (la mayoría de los fosfolípidos), y lamelofóbicos (principalmente PE, lisofosfátidos y triglicéridos)(28). Los requerimientos básicos para la formación de bicapas parecen ser un grupo polar adecuadamente hidratable (23,32,33), y la presencia en una misma molécula de dos cadenas hidrocarbonadas de suficiente longitud (23), ya que los fosfolípidos de cadena corta, al igual que los detergentes y lisofosfátidos tienden a formar micelas. La concentración del fosfolípido debe ser superior a concentración micelar crítica, y la temperatura debe ser superior a la temperatura micelar crítica o punto de Kraft (34), para que pueda formarse la estructura de bicapa. En el caso de los fosfolípidos, el punto de Kraft coincide con la temperatura de transición de fase (22,35).

La capacidad para formar bicapas también depende del grado de saturación de las cadenas hidrocarbonadas, de la presencia de colesterol, del pH y de la concentración y el tipo de iones en la fase acuosa (36).

Además de fosfolípidos, muchas membranas como la membrana de eritrocito, de mielina y membrana plasmática contienen colesterol en grandes cantidades, entre 0,8 y 1,3 moles/mol de fosfolípido. Mientras que otras membranas como las de mitocondria, retículo endoplásmico y membrana nuclear, contienen menores cantidades, entre 0,1 y 0,3 moles/mol de fosfolípido (37). El colesterol en concentraciones por encima de 10^{-8} M en agua forma agregados semejantes a micelas (38), y a 10^{-6} M ya forma una fase separada. Sin embargo, el colesterol es capaz de incorporarse a micelas o bicapas de fosfolípidos hasta cantidades equimolares muy fácilmente, alineando sus grupos -OH con los grupos polares de los fosfolípidos, mientras que la cola hidrofóbica ramificada se orienta hacia el interior de la bicapa (39).

Se ha propuesto que el colesterol forma complejos equimoleculares con la PC. Bicapas de PC-colesterol, con contenidos de colesterol por debajo del 50%, consistirían de complejos PC-colesterol 1:1, PC libre y PC en los límites de los dominios formados por PC libre y PC acomplejada (37). Los ésteres de colesterol, por el contrario, presentan una gran dificultad para incorporarse en bicapas de PC (40). Estas moléculas son muy voluminosas y carecen de un grupo polar, por lo que su incorporación en el interior de la bicapa probablemente expondría restos hidrocarbonados a la fase acuosa.

Además de fosfolípidos y colesterol, algunas membranas contienen pequeñas cantidades de lípidos con una sola cadena hidrocarbonada por grupo polar, como lisofosfátidos y ácidos grasos libres, y aún triglicéridos. Sin embargo como todas las moléculas hidrofóbicas o anfifílicas tienden a ser incorporadas en micelas o bicapas formadas por otras sustancias anfipáticas, la presencia de estos componentes menores puede ser simplemente una consecuencia de su presencia en el medio en el que se halla la membrana (23).

I.4.- MOVILIDAD Y ORDEN. (TRANSICIONES DE FASE)

En los últimos años ha habido un gran adelanto en el conocimiento de la físico-química de los fosfolípidos y de la dinámica de estos en bicapas lipídicas (6,23,35,41,42). El adelanto en el estudio de la dinámica de los fosfolípidos fue debido al gran desarrollo de métodos sensitivos como calorimetría de barrido diferencial (43), métodos de difracción de rayos X y neutrones (44,45); y una variedad de métodos espectroscópicos como resonancia magnética nuclear (46), resonancia electrónica paramagnética (47,19), y técnicas de fluorescencia y polarización de fluorescencia (48,49).

Los fosfolípidos anhidros puros son sólidos de muy alto punto de fusión, y estos no están relacionados con la longitud de la cadena hidrocarbonada ni con el grado de insaturación (23). Esto sugiere que las cadenas hidrocarbonadas se en-

///

cuentran ya en un estado semejante al líquido en el punto de fusión. Evidencias de esto se obtienen por la observación de una transición de fase dentro del estado sólido a temperaturas inferiores al verdadero punto de fusión. Al ocurrir dicha transición puede observarse un aumento en el espaciamiento entre las cadenas hidrocarbonadas de 4,2 a 4,6^o Å cuando se realizan mediciones de difracción de rayos X en función de la temperatura, y esto es considerado que refleja una transición de un estado ordenado a uno desordenado de las cadenas hidrocarbonadas dentro del sólido (23). Transiciones de fases similares pueden observarse en mezclas de fosfolípidos con agua y en dispersiones sonificadas, pero ocurren a temperaturas muy inferiores que en el sólido anhidro (50).

Tanto las membranas artificiales como también ciertas membranas biológicas son capaces de sufrir esta transición reversible de un estado ordenado, casi cristalino, a un estado desordenado, líquido-cristalino, a una temperatura característica (T_t). Al pasar del estado ordenado al estado líquido-cristalino ocurren cambios en el empaquetamiento o acomodamiento de las cadenas de los ácidos grasos y de los grupos polares (51), y hay un aumento en el área ocupada por molécula. A temperatura ambiente, las bicapas de DPPC se encuentran en el estado ordenado, y muestran por difracción de rayos X un espaciamiento entre las cadenas hidrocarbonadas de 4,2^o Å, lo cual corresponde a cadenas totalmente extendidas y estrechamente empaquetadas. Por el contrario, en bicapas de lecitina de huevo, que presentan un alto contenido de ácidos grasos insaturados y se encuentran en el estado desordenado a temperatura ambiente, el espaciamiento es de 4,6^o Å, y las cadenas hidrocarbonadas presentan una movilidad considerable (52). En la transición del estado ordenado al desordenado, también ocurre un aumento en la permeabilidad de la bicapa, y aumenta la movilidad de las cadenas hidrocarbonadas. En el estado ordenado todos los enlaces C-C están en la disposición trans y no presentan libre rotación, y en el estado

///

líquido cristalino hay libre rotación en los enlaces C-C debido al menor empaquetamiento de las cadenas hidrocarbonadas. El espesor de la bicapa disminuye por encima de la T_t debido a la formación de estructura gauche en las uniones C-C. Por encima de la T_t también aumenta la hidratación de los grupos polares y la capacidad de incorporar compuestos extraños en la bicapa. La incorporación de colesterol exógeno en la membrana celular de *Mycoplasma* es rápida cuando la bicapa está en el estado líquido-cristalino, y muy lenta cuando la membrana está en el estado cristalino (53).

La transición de fase en bicapas de fosfolípidos ocurre a través de la formación de "clusters", y estos no son dominios estáticos sino entidades altamente fluctuantes en tamaño, lo que produce fluctuaciones de volumen y de densidad localizadas. La magnitud de estas fluctuaciones es afectada por el radio de curvatura de la bicapa y por la adición al sistema de compuestos de bajo peso molecular (54). Las transiciones de fase de bicapas de fosfolípidos ocurren en un rango de temperatura de ancho variable. Así, las transiciones son definidas por la temperatura del punto medio de la transición (T_t) y el ancho de la transición (ΔT). Al aumentar progresivamente la temperatura de una suspensión de fosfolípidos en el estado de bicapa ordenada, cuando se entra en el rango de la transición comienzan a formarse dominios fluídos en el seno de la fase ordenada que van aumentando progresivamente de tamaño hasta alcanzar la totalidad de la superficie de la bicapa (41). Así, en la zona de temperatura en que ocurre la transición coexisten ambas fases. La transición es un fenómeno altamente cooperativo, es decir que al ir transformándose unas pocas moléculas de lípidos del estado ordenado al estado fluído, la energía necesaria para que las moléculas circundantes sufran la transición se va haciendo cada vez menor (41,55). Las transiciones de fase en sistemas lipídicos también se caracterizan por el fenómeno de "histéresis", es decir que la transición del estado ordenado al desor-

denado ocurre a una temperatura algo mayor que la transición a la inversa del estado desordenado al ordenado, existiendo una cierta "inercia" al cambio de fase (41).

Existen además fenómenos de "pre-fusión" y de "pre-congelamiento". Por calorimetría de barrido diferencial y otras técnicas es posible observar a temperaturas inferiores a la transición principal, una pretransición, la cual es generalmente atribuída a los grupos polares (41). En dispersiones de DOPC ha podido demostrarse la formación de "clusters" de corta vida aún hasta 50°C por encima de su T_t (56). La mayoría de las membranas biológicas se hallarían a temperaturas fisiológicas - en el estado de pre-congelamiento.

Los valores de ΔH y ΔS para la transición de fase de fosfolípidos son considerablemente menores que los valores para la fusión de hidrocarburos puros de la misma longitud de cadena (50), lo cual indica que las cadenas hidrocarbonadas en la bicapa "fundida" no están tan desordenadas como en un hidrocarburo líquido puro. Sin embargo, los efectos de la longitud de las cadenas hidrocarbonadas y del grado de insaturación son similares sobre el punto de fusión de hidrocarburos y sobre la T_t de fosfolípidos. Ambos aumentan con la longitud y disminuyen con el grado de insaturación y con la ramificación de las cadenas hidrocarbonadas. Las cadenas cis-insaturadas tienen una T_t más baja que las trans-insaturadas, debido a que por su geometría presentan mayores problemas de empaquetamiento, lo que dificulta la formación de la fase ordenada. Las cadenas trans-insaturadas se comportan de manera similar a las cadenas saturadas.

La transición involucra también a los grupos polares además de las cadenas hidrocarbonadas, ya que la T_t disminuye con el grado de hidratación de los grupos polares (35), y además hay una considerable diferencia entre la T_t de fosfolípidos con diferente grupo polar e idénticas cadenas hidrocarbonadas. Por ejemplo, la T_t de DPPE es aproximadamente 20°C más alta que

///

la de DPPC en condiciones experimentales comparables. Esto puede ser explicado en términos de la formación de pares iónicos intramoleculares entre los grupos fosfato y amino (57). Evidencias directas de que ocurre un debilitamiento en la organización de los grupos polares acompañando a la transición de las cadenas hidrocarbonadas fueron obtenidas por Trauble (55). Sin embargo, la transición de fase en dispersiones de PE es muy diferente a la de dispersiones de PC o de mezclas PE-PC. Al incrementar la temperatura, la PE muestra una transición reversible de una fase de bicapa a una fase hexagonal (58). Algo similar ocurre con dispersiones de esfingomiélin (59), como se mostró por ^{31}P y ^{13}C -NMR. La PC y el colesterol parecen estabilizar las bicapas de esfingomiélin. A menores temperaturas ocurre una nueva transición gelificante de las cadenas hidrocarbonadas.

La Tt de bicapas de fosfolípidos, particularmente los cargados negativamente, también es influenciada por factores como pH, fuerza iónica, grado de hidratación y por el binding de cationes divalentes (41,60,61). La PC tiene una Tt constante entre pH 3 y 12, a pH menor de 3 aumenta la Tt por neutralización del grupo fosfato. Al contrario la PE tiene una Tt constante hasta pH 9, y por encima de pH 9 disminuye la Tt por neutralización del grupo amino. La Tt de la PS decrece al aumentar el pH. El Ca^{++} aumenta la Tt de fosfolípidos cargados negativamente, igualmente el Mg^{++} pero con menor efecto. En el caso de la PS, el Ca^{++} se une directamente al grupo fosfato, neutralizando al menos una parte de su carga negativa y restringiendo la movilidad del grupo polar. El Mg^{++} también se une al grupo fosfato, pero no tan fuertemente como el Ca^{++} , y no afecta tanto a la movilidad del grupo polar (62). Se ha postulado que el Ca^{++} en concentraciones altas formaría puentes entre grupos fosfatos vecinos de PS y PG, dando origen a complejos poliméricos (42). Los efectos de los cationes monovalentes son mucho menores. Es posible inducir transiciones de fase a temperatura cons

tante variando estos parámetros (63).

La incorporación en bicapas de fosfolípidos de sustancias extrañas como anestésicos y distintas drogas (63,64,65), derivados bencénicos (66) o alcoholes (67,68), también puede alterar la T_t o el grado de empaquetamiento y la movilidad de las cadenas hidrocarbonadas.

La T_t parece aumentar al ir de la región externa, semipolar, hacia la región interna de la bicapa como se mostró con marcadores de ESR con el grupo paramagnético en diferentes posiciones (69). La T_t determinada con marcadores que se ubican bien en el interior hidrofóbico concuerda bastante bien con la transición principal determinada por calorimetría. En cambio, la T_t determinada con marcadores que se ubican en la zona cercana a la región polar de la membrana es similar a la temperatura de la pretransición calorimétrica(69).

Aparte del problema de la región donde se ubica el marcador, todos los métodos físico-químicos utilizados para la detección de las transiciones de fase concuerdan bastante bien entre sí, y en particular no dejan lugar a dudas sobre la naturaleza líquido-cristalina de las bicapas por encima de T_t . Esto es evidente por ejemplo del espectro de $^1\text{H-NMR}$ de dispersiones de lecitina de huevo (70). La T_t de estas bicapas está por debajo de 0°C . A temperatura ambiente, los espectros observados son muy similares a los que se obtienen para verdaderas soluciones de fosfolípidos en un solvente orgánico como cloroformo.

Por encima de la T_t , las bicapas de fosfolípidos presentan un gradiente de movilidad. Por $^1\text{H-NMR}$ se observó que mientras que los grupos $-\text{CH}_3$ tienen una gran movilidad, no todos los grupos $-\text{CH}_2-$ presentan tal libertad de movimiento (71). Levine y col. (72), observaron individualmente cada átomo de carbono de la estructura enriqueciendo específicamente cada posición con ^{13}C , y llegaron a la conclusión de que la movilidad es mayor en los $-\text{CH}_3$ terminales, va decreciendo hasta llegar a un mínimo cerca del glicerol, e incrementa nuevamente algo en -

el grupo polar.

Usando ácidos doxil-esteáricos como marcadores de ES: con el grupo doxilo en diferentes posiciones, se llegó a conclusiones similares (73,75). Hubbell y McConell, con 5-doxil esteárico observaron en dispersiones de lecitina de huevo que el movimiento de las cadenas hidrocarbonadas en esa posición es altamente anisotrópico, con una gran movilidad alrededor del eje perpendicular a la superficie de la membrana y una movilidad mucho menor en otras direcciones. Sin embargo, con 10-doxilesteárico, se observaron espectros similares a aquellos obtenidos en soluciones del mismo marcador en un medio líquido isotrópico (74,75). El gradiente de fluidez fue también comprobado por polarización de fluorescencia con n-(9-antroiloxi) derivados de ácidos grasos, con n variando de 2 a 16 (76). Cerca de los grupos polares, la movilidad de las cadenas es similar ya sea si la bicapa se encuentra en el estado ordenado o en el estado desordenado, pero en los segmentos del interior de la bicapa, la movilidad es muy superior en el estado líquido-cristalino que en el estado ordenado (35).

Un problema asociado con el incremento en desorden al ir desde el exterior al interior de la bicapa es que los segmentos de las cadenas hidrocarbonadas con mayor movilidad ocupan un volumen mayor por unidad de masa que las cadenas ordenadas paralelas, ya que la densidad de un hidrocarburo en el estado líquido es menor que en el estado sólido cristalino. Esto significa que en una bicapa no puede haber un ordenamiento paralelo de las cadenas hidrocarbonadas en una región y cadenas al estado líquido en otra, ya que esto dejaría espacios libres en la región ordenada. McFarland y McConell (77), han sugerido que las cadenas hidrocarbonadas podrían estar inclinadas en la región ordenada cercana a la superficie hidrofóbica, así el espesor de esta región disminuiría y desaparecerían los espacios libres. Estos autores han calculado un ángulo de desviación promedio de 25 a 30°C para el segmento externo de las -

///

cadenas hidrocarbonadas, utilizando ácidos doxil esteárico con el grupo doxilo en posiciones cercanas al grupo carboxilo. Cuando el grupo doxilo fue unido en posiciones cercanas al $-CH_3$ terminal, la desviación promedio llegó a ser nula. La misma información pudo ser obtenida utilizando marcadores fluorescentes - (78). Debido a esta inclinación de las cadenas hidrocarbonadas en la región externa, la densidad de átomos de carbono llega a ser un 12% mayor que en la región de los $-CH_3$ terminales (35).

En bicapas ordenadas de DPPC, por debajo y cerca de T_t , no se observa tal inclinación (52), y las cadenas hidrocarbonadas se encuentran alineadas en paralelo en una configuración totalmente extendida, con todos los enlaces C-C en la disposición trans.

El uso de marcadores fluorescentes y paramagnéticos - en estudios estructurales de membranas ha sido criticado por la razón de que estas sustancias podrían perturbar significativamente la estructura de la bicapa (79). Sin embargo, la coincidencia general con los resultados obtenidos por difracción de rayos X o NMR sugieren que las perturbaciones no son demasiado grandes. Además, la incorporación de pequeñas cantidades de marcadores con grupos doxilo en dispersiones de DPPC no altera su transición de fase (75).

En bicapas vesiculares de lecitina de huevo, se observó que el área promedio por molécula y la longitud efectiva de los lípidos son mayores en la monocapa externa que en la interna (80). También se ha mostrado una no equivalencia entre las cadenas 1 y 2 en bicapas de DPPC (81). Debajo de la pretransición se observó por espectroscopía Raman, que la conformación de las cadenas 2 fue en promedio algo menos "todos-trans" que la conformación de las cadenas 1.

La difusión lateral de moléculas de fosfolípidos en el plano de la bicapa es muy rápida. El coeficiente de difusión lateral de fosfatidilcolina marcada con un grupo doxilo en bicapas de dihidroesterculilfosfatidilcolina fue estimada en $1,8 \pm$

$0,6 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{seg.}$ a 25°C (82). En vesículas de lecitina de huevo se obtuvieron valores similares (83). Trauble y Sackmann obtuvieron un coeficiente de difusión lateral de aproximadamente $10^{-8} \text{ cm}^2/\text{seg}$ para un esteroide marcado con un radical libre en vesículas monolamelares de DPPC por encima de la T_t de éste fosfolípido (84). Experimentos similares por debajo de la T_t indicaron que el rápido movimiento en el plano de la membrana no tiene lugar cuando las cadenas hidrocarbonadas se encuentran en el estado ordenado (85). La difusión lateral de los lípidos es dependiente del grado de hidratación y disminuye al aumentar la longitud de cadena (86).

En contraste con la rápida difusión de los fosfolípidos en el plano de la bicapa, el movimiento de intercambio entre uno y otro lado de la bicapa (flip-flop) es muy lento en bicapas artificiales. Este proceso requiere el pasaje de los grupos polares a través del interior hidrofóbico de la bicapa y por lo tanto está asociado con una energía de activación muy alta. En vesículas de lecitina de huevo, a 30°C , el tiempo de vida medio del proceso fue estimado en 6,5 horas (87), correspondiendo a una probabilidad de 0,07/hora para el pasaje de una dada molécula de un lado al otro de la bicapa.

La velocidad de intercambio de moléculas de fosfolípidos entre la bicapa y el medio también es muy baja, al igual que el intercambio entre vesículas, habiéndose estimado un tiempo de intercambio promedio de 24 horas (83).

1.5.- SEPARACIONES DE FASE.

Cuando se determina el estado físico de bicapas lipídicas con la ayuda de sustancias marcadoras, usualmente se observa un movimiento lateral y la agregación de estas moléculas por debajo de T_t . Este tipo de separación de fase lateral ha sido demostrado en membranas modelo que contenían un derivado esteroideo con un radical libre unido (84). También puede ocurrir una separación de fase vertical debajo de T_t , por una par-

///

tición preferencial del marcador en la fase acuosa, al ser excluido de la bicapa en el estado ordenado. Este fenómeno ha sido demostrado con marcadores fluorescentes como N-fenil-1-naftilamina y 8-anilino-1-naftalenosulfonato (88), y con marcadores con radical libre como TEMPO (89).

Cuando se estudian mezclas binarias de fosfolípidos, por calorimetría o ESR, usualmente se observa un fenómeno de cocrystalización debajo de T_t . Sin embargo, cuando los fosfolípidos son estructuralmente lo suficientemente diferentes de manera que surgen problemas de empaquetamiento, ocurrirá una separación de fase lateral y la cristalización individual de ambas especies, esto es, hay inmiscibilidad de las fases sólidas. Ha sido posible construir diagramas de fase para sistemas de lípidos binarios o más complejos por métodos como calorimetría o ESR (90,92). En general, cuando los lípidos difieren levemente en la longitud de las cadenas hidrocarbonadas, son miscibles en ambas fases. Al hacerse mayor la diferencia en la longitud de la cadena disminuye la miscibilidad (93). Lo mismo sucedería si ambos componentes difieren en sus grupos polares (93). Aunque se reportó que para una dada diferencia en la longitud de cadena para componentes saturados, el cambio del grupo polar PE por PC en el componente de menor T_t no incrementó la tendencia a la separación de fase (91).

La inmiscibilidad de las fases sólidas es bastante común, pero si los lípidos son estructuralmente muy diferentes entre sí, también puede ocurrir inmiscibilidad de las fases fluidas. Desde el punto de vista biológico, las separaciones de fase que ocurren en el estado fluido son más interesantes ya que la mayoría de las membranas biológicas se encuentran por encima de T_t a temperaturas fisiológicas. Una miscibilidad limitada por encima de T_t es observada generalmente en mezclas de fosfolípidos y lípidos no hidratables como triglicéridos y ésteres de colesterol. Small (32), dio una clasificación muy útil de lípidos hidratables y no hidratables. Una separación de fase late

ral en el estado fluído fue también observada para una mezcla binaria de DPPE y dielaidoilfosfatidilcolina (90).

Las proteínas integrales de membrana también pueden sufrir separación de fase lateral por debajo de la T_t de la bicapa de fosfolípidos, como ha sido mostrado por microscopía electrónica de réplicas de fracturas por congelamiento (94), sin embargo algunas proteínas parecen no agregarse por debajo de la T_t de la bicapa (95). En un sistema dielaidoilfosfatidilcolina-DPPC, en el cual la DPPC se separa en dominios ordenados del otro fosfolípido al estado desordenado, la glicoforina fue excluida de los dominios cristalinos (96).

1.6.- EFEECTO DE LA INCORPORACION DE COLESTEROL EN BICAPAS LIPIDICAS.

El efecto de la incorporación de colesterol o de otros esteroides sobre las propiedades físico-químicas de sistemas lipídicos ha sido muy estudiado (37,97,98). En general el colesterol presenta un efecto condensante cuando se incorpora en bicapas de fosfolípidos por encima de su T_t , pero tiene un efecto fluidificante si su incorporación se realiza en bicapas en el estado ordenado. Ha sido reportado que por encima de T_t , el área de una monocapa mixta de fosfolípidos-colesterol a una dada presión, es menor que el área que se predice de la suma de las áreas de los dos componentes individuales (99). Por el contrario, la incorporación de colesterol en monocapas condensadas de fosfolípidos con largas cadenas hidrocarbonadas saturadas, reduce las interacciones y actúa como liquificante (37). El espectro de ESR de marcadores paramagnéticos en multicapas orientadas de lecitina de huevo mostraron un incremento en la anisotropía angular por el agregado de colesterol, lo que indica un aumento en el grado de orden (36,100). También ocurre un incremento en el tiempo de correlación que caracteriza la movilidad del marcador, indicando que una significativa disminución en la fluidez acompaña al incremento en el grado de orden (101), y

///

una disminución en la velocidad de difusión lateral de marcadores lipídicos (82), al incorporar colesterol en multicapas de lecitina. En multicapas de lecitina de huevo, el colesterol aumentó el grado de extensión de las cadenas hidrocarbonadas, disminuyendo la probabilidad de conformaciones gauche. En cambio, con DPPC por debajo de T_t , el grado de orden disminuyó y la amplitud del movimiento de las cadenas hidrocarbonadas aumentó, mientras que la probabilidad de las conformaciones gauche no fue muy afectada por la incorporación de colesterol (102).

Estudios de difracción de rayos X y de ESR, indican que el colesterol aumenta el empaquetamiento de los fosfolípidos insaturados restringiendo el movimiento térmico de las cadenas hidrocarbonadas. Por otro lado también impide la cristalización y el ordenamiento de dichas cadenas por debajo de la T_t (35,37). En bicapas orientadas de lecitina de huevo, el colesterol en cantidades equimolares incrementa el espaciamiento promedio en la dirección del plano de la bicapa de 4,6 a 4,75 Å (103). El espesor de la bicapa es significativamente incrementado y también hay una considerable agudización en la densidad electrónica en el centro de la bicapa, indicando que los grupos $-CH_3$ terminales se localizan sobre un espacio más reducido. Estos estudios concuerdan con observaciones hechas en otros sistemas (39) y sugieren que el anillo esteroideo se ubica en la porción externa de la bicapa, con el $-OH$ hidrofílico en la capa ocupada por el grupo polar fosforil colina, y la cola alifática ramificada en la región central de la bicapa.

El anillo esteroideo no solamente es rígido, sino que además tiene una sección transversal más gruesa que la cola alifática (104), y el requerimiento de que el área total en el plano de la bicapa sea el mismo en todos los niveles, sugiere que en la parte externa de la bicapa que contiene al anillo esteroideo las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos estarán totalmente extendidas casi perpendicular a la superficie de la membrana; mientras que la región central de la bicapa tendrá -

///

que ser muy fluída, con muchas porciones de las cadenas hidrocarbonadas a un ángulo considerable de la dirección perpendicular a la superficie. Estos detalles estructurales sugeridos por razones puramente geométricas han sido confirmados por resultados experimentales.

La incorporación de aproximadamente un 10% de colesterol en bicapas de fosfolípidos elimina la inclinación de 25° de las cadenas hidrocarbonadas y las hace perpendicular al plano de la bicapa, y hace a su vez que aumente el grosor de la bicapa (37). La movilidad del anillo esteroideo en bicapas de DPPC es mucho menor que la de la cola alifática, esta última es considerable aún por debajo de la Tt del fosfolípido. La restricción de la movilidad de las cadenas hidrocarbonadas de bicapas de fosfolípidos fluídas impuesta por la incorporación de colesterol afecta solo a los primeros 8-10 átomos de C de la cadena, mientras que los segmentos terminales quedan relativamente libres (35,37). También se ha mostrado por ^{31}P -NMR que el efecto condensante del colesterol no afecta significativamente la movilidad del grupo fosforilcolina, pero debido al efecto liquificante, la movilidad del grupo polar es incrementada debajo de la Tt (37).

La Tt de una bicapa de fosfolípidos no parece ser modificada por la incorporación de colesterol, pero sí aumenta el rango de la transición (ΔT) y disminuye la cooperatividad del proceso (37). Sin embargo, experiencias más recientes con ^2H -NMR indicaron que además del ensanchamiento de la transición ocurre una leve disminución de la Tt, que fue dependiente de la localización del deuterio en el lípido (105). La entalpía de la transición en bicapas de DMPC decreció gradualmente al incorporar cantidades crecientes de colesterol hasta desaparecer completamente con una relación de colesterol a fosfolípido de 1:2 (37). Esto pareció indicar que cada molécula de colesterol elimina a dos moléculas de fosfolípidos de la fase que sufre la transición. Sin embargo, experiencias de Laser-Raman y de ESR mues-

///

tran que la transición es ensanchada mas bien que eliminada, y por encima de 33% de colesterol ocurre en un rango muy amplio de temperatura y que es un fenómeno no cooperativo (37).

El colesterol puede incorporarse fácilmente en dispersiones de fosfolípidos, formando una fase mixta hasta una relación 1:1 de colesterol a fosfolípido, pero a concentraciones superiores forma una fase separada (106). El colesterol no tiene la misma afinidad por todos los fosfolípidos. En mezclas de PC saturadas que difieren en solo dos átomos de C y cocrystalizan juntas, el colesterol se distribuye al azar. Pero cuando las PC difieren en 4 o mas átomos de C y muestran separación de fase, el colesterol interactúa preferentemente con la especie de PC de menor Tt (37). En mezclas de DOPE-DPPC, el colesterol interactúa preferentemente con la PC, ya sea a temperaturas en las cuales ambas especies están en el estado fluido, o a temperaturas donde ocurrió una separación de fase (107). En mezclas de PS y PE, o de PS y PC, el colesterol mostró mayor afinidad por el fosfolípido de menor Tt. Sin embargo, en mezclas de esfingomielina-PC, el colesterol mostró mayor afinidad por la esfingomielina sin importar cual sea el de menor Tt (108).

Se ha propuesto que la función biológica del colesterol sería estabilizar la fluidez de las membranas, ya que disminuye la fluidez de lecitinas fluidas y fluidifica a las lecitinas que están debajo de su Tt. La presencia de colesterol u otros esteroides en bicapas lipídicas hace que cambios relativamente grandes de temperatura produzcan cambios no muy grandes en viscosidad, evitando las transiciones de fase bruscas. Es sorprendente el hecho de que organismos como hongos y levaduras que contienen grandes cantidades de esteroides en sus membranas puedan crecer fácilmente en un amplio rango de temperaturas (37). Los lípidos de membrana de eritrocitos y de mielina, al separarlos del colesterol, sufren una transición entre 2-20°C, pero al agregarles nuevamente el colesterol, la transición es eliminada y no se detecta hasta por lo menos -20°C (35,37).

1.7.- INTERACCIONES ENTRE LIPIDOS Y PROTEINAS.

La incorporación de proteínas en bicapas de fosfolípidos puede producir muy diversos efectos sobre la organización y el grado de movilidad de los lípidos circundantes, dependiendo de la proteína en particular y de la composición lipídica de la bicapa. Algunos de estos efectos han sido revisados por Lee(93). Las proteínas de membrana pueden alterar también las propiedades de permeabilidad de bicapas de fosfolípidos (109).

Ninguna correlación importante ha podido ser obtenida entre la hidrofobicidad de las proteínas y sus efectos sobre capas de lípidos orientadas (110,111). En cambio, sobre fosfolípidos negativamente cargados, se observó un efecto inmovilizante mayor para proteínas con carga positiva, el que dependió del pH del medio (110), y se postuló que podrían actuar como cationes multivalentes. Las proteínas periféricas como el citocromo C parecen tener efectos muy leves sobre las propiedades del interior hidrofóbico de las bicapas lipídicas (112).

Por medio de métodos espectroscópicos o por técnicas de titulación con lípidos, se ha podido demostrar que varias - proteínas integrales se rodean por una capa de lípidos con propiedades diferentes al resto de los lípidos de la membrana (ó, 113-118). Este anulus se ha mostrado por ejemplo en la citocromo oxidasa purificada y reconstituída con fosfolípidos, por técnicas de ESR. Se pudo observar que a bajas relaciones de fosfolípido a proteína, el marcador fue altamente inmovilizado, pero con contenidos mayores de fosfolípidos apareció un nuevo componente en el espectro característico de bicapas fluídas (113-115). Esto se interpretó como una capa de lípidos inmovilizados rodeando a la proteína, permaneciendo el resto de los lípidos - en el estado de bicapa fluída; y se calculó que la cantidad de lípidos inmovilizados sería la necesaria para cubrir la superficie hidrofóbica de esta proteína. Este anulus se mostró tanto - en organizaciones micelares como lamelares de la citocromo oxidasa (119), y también fue observado por técnicas de NMR (120).

Por otro lado, hay evidencias de que el lípido en contacto con la proteína estaría más desordenado que en el resto de la bicapa (113). Los grupos $-CH_3$ están menos ordenados en los lípidos del anulus que en los lípidos libres en forma de bicapa, en cambio el ordenamiento del grupo $\delta-CH_2-$ fue menos afectado por la proteína (121). En multicapas orientadas de fosfolípidos se pudo observar que la incorporación de melitina, produjo una orientación más al azar de un marcador esteroideo, y que incrementó la amplitud, pero redujo la velocidad del movimiento del ácido 5-doxil esteárico (122). Así, las proteínas, además de una inmovilización de los lípidos circundantes, produciría un desordenamiento de la orientación de las cadenas hidrocarbonadas debido a la superficie irregular de la proteína en contacto con el lípido. Aunque en algunas experiencias el intercambio entre los lípidos del anulus y los del resto de la bicapa pareció ser más bien lento (114,123), en otros casos pareció ser relativamente rápido (121). En bicapas de palmitoil-oleilfosfatidilcolina, experiencias de 2H y ^{31}P -NMR parecieron indicar un desordenamiento de los lípidos de toda la bicapa por la incorporación de la citocromo oxidasa (124), y se postuló que el desorden de los lípidos del anulus podría ser extendido a todas las moléculas de lípidos conduciendo a una bicapa más desordenada, debido al rápido intercambio entre los lípidos del anulus y aquellos más lejanos a la proteína.

Un anulus de lípidos inmovilizados por la proteína se ha encontrado también para citocromo b5 (116), para el sistema de la citocromo P450 oxigenasa (117), y para la apolipoproteína C III (93). Lípidos inmovilizados fueron también encontrados en membranas de *Torpedo marmorata* ricas en receptores de acetilcolina por técnicas de ESR (125), y en membranas de bacterias se mostró por técnicas de fluorescencia que cierta cantidad de lípidos no se encuentra en el estado de bicapa fluida (126). En membranas del segmento externo de bastoncitos de retina, una fracción sustancial de fosfolípidos tienen restringida su movilidad por la interacción con la rodopsina (127).

Si bien algunas proteínas pueden hacer desaparecer la estructura de bicapa de los lípidos que la circundan, como por ejemplo la apolipoproteína C III en bicapas de DMPC (93), otras proteínas no parecen afectar la estructura bilaminar. Algunas proteínas como la $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPasa (128) y la Ca^{++} ATPasa mitocondrial (129), luego de ser purificadas por tratamientos con detergentes, retienen fosfolípidos y muestran las reflexiones de rayos X características de las estructuras de bicapa. El citocromo P450 en cambio, parece inducir la formación de micelas invertidas formadas principalmente por PE (32,31).

El efecto de las proteínas parece ser dependiente de la cantidad de proteína incorporada. El agregado de bajas cantidades de proteínas de la membrana externa de *Proteus mirabilis* a dispersiones de los lípidos de esa membrana disminuyó la movilidad de los ácidos 5 y 12-doxilesteáricos, sin embargo a altas relaciones de proteína a lípido, la fluidez fue incrementada especialmente en la región del 5-doxilestearato, indicando que podría ser un fenómeno de superficie (130).

La Ca^{++} ATPasa incorporada en bicapas de DPPC en una relación molar de lípido a proteína menor de 30, produjo la desaparición de la transición de fase a 41°C característica de la DPPC (123), lo cual se interpretó como evidencia de un anulus - de unas 30 moléculas de fosfolípido por molécula de proteína, que al interactuar con la proteína no pueden sufrir la transición de fase. La perturbación de la DPPC no se extiende más allá del anulus, por lo que se sugirió que las proteínas de membrana interactúan solo con los lípidos inmediatos causando una mínima perturbación del resto de la bicapa. Por difracción de rayos X en bicapas de lecitina de huevo, también se observó que distintas proteínas solo afectaron a los lípidos en su inmediato entorno, preservando la organización del resto de la bicapa (131).

Las proteínas al igual que el colesterol parecen tener efectos diferentes y opuestos sobre la movilidad de las cadenas hidrocarbonadas, según si la bicapa lipídica se encuentra

en el estado líquido-cristalino o en el estado ordenado. Cuando la glicoforina fue incorporada en dispersiones de DPPC, se observó por ^{13}C -NMR que la movilidad de las cadenas hidrocarbonadas, a temperaturas por debajo de la T_t de la DPPC, fue mayor en el anulus que en el resto de la bicapa (132). Por ^2H -NMR se mostró que por debajo de la T_t de la membrana, las proteínas tienen un gran efecto desordenante y previenen la cristalización de las cadenas hidrocarbonadas (133).

Dependiendo de la influencia sobre los lípidos, las proteínas fueron agrupadas en tres clases (134): a) aquellas que causan una disminución en el ΔH y en la T_t del lípido (citocromo C); b) aquellas que no influyen sobre T_t pero disminuyen ΔH (gramicidina A, copolímero lisina-fenilalanina) y c) aquellas que incrementan ΔH con o sin un incremento en T_t (ribonucleasa, polilisina).

La Ca^{++} Mg^{++} ATPasa incorporada en vesículas de DMPC produjo un incremento en el rango de la transición al aumentar la relación proteína/lípido. Por encima de T_t , la fluidez disminuyó al incrementar la relación proteína/lípido (135). La clootricina, un antibiótico proteico, reduce el calor de la transición de la fase lipídica, pero no cambia la T_t de los lípidos que no pertenecen al anulus; los lípidos del anulus no sufren la transición de fase (93). Otro antibiótico proteico, la gramicidina S, causa un gradual decrecimiento de la T_t de los fosfolípidos y el anulus no cristaliza (93). La T_t de la DMPC es desviada de 24 a 30°C en complejos con las apolipoproteínas A I, A II, C I y C III, mientras que la cooperatividad de la transición es disminuída. A temperaturas menores que T_t la microviscosidad de los complejos es menor que la de la DMPC sola, y lo opuesto ocurre a temperaturas mayores que T_t (136). La melitina por encima de cierta concentración elimina la pretransición de la PC, y aumenta el rango y reduce el calor de la transición principal, pero sin desviar la T_t (93). La espectrina produjo una disminución en el cambio de entalpía de la transición de fase de vesículas de DMPS (137).

Por un tratamiento teórico de la interacción lípido-proteína, se mostró la posibilidad de que las proteínas puedan afectar a la movilidad de dos a cuatro capas de moléculas de fosfolípidos circundantes (138). La movilidad de los lípidos del anulus sería menor que el resto de los lípidos a temperaturas superiores a T_t (inmovilización por interacciones lípido-proteína), pero por debajo de T_t el grado de orden del anulus sería menor y la movilidad mayor, que en el resto de la bicapa, debido a que problemas de empaquetamiento dificultarían la formación de la fase ordenada. La transición de fase de los lípidos de la bicapa afectaría a los lípidos del anulus, pero dependiendo de las fuerzas relativas de las interacciones lípido-proteína y lípido-lípido, los lípidos del anulus podrían sufrir la transición de fase a mayor o menor temperatura que el resto de los lípidos.

En sistemas lipídicos artificiales mixtos o en membranas naturales, algunas proteínas han mostrado interaccionar preferentemente con determinadas especies de fosfolípidos, lo que puede dar lugar a la formación de un anulus de composición diferente a la del resto de la bicapa. En un sistema diclaidoilfosfatidilcolina-DPPC, la glicoforina se asocia preferentemente con la especie lipídica insaturada (127), y en estudios en monocapas mostró una preferencial interacción con fosfolípidos negativamente cargados (139). Estas interacciones fueron decrecidas en presencia de colesterol. En membranas de *E. coli*, en la región de los grupos $-CH_3$, las proteínas interactúan preferentemente con los lípidos en el estado fluido (140).

Varias proteínas retienen fosfolípidos aún luego del tratamiento con exceso de detergentes. En algunos casos los fosfolípidos retenidos son de composición muy similar a la de la membrana total, como en el caso de la Ca^{++} ATPasa de retículo sarcoplásmico (141). Otras proteínas, por el contrario retienen específicamente ciertas especies de fosfolípidos, como por ejemplo fosfatidilglicerol o cardiolipina en el caso de la citocromo oxidasa (142). La NADH-ubiquinona reductasa (143) y la ace-

tilcolinesterasa (144) también retienen específicamente cardiolipina. La glicoforina retiene PS (139) o difosfoinositósidos (145). Ha sido reportado también que la 5'-nucleotidasa retiene preferencialmente esfingomiéline (146), pero sin embargo otros autores reportaron lo contrario (147).

Estas asociaciones preferenciales entre proteínas y lípidos pueden estar relacionadas con el concepto del anulus lipídico. Ciertos lípidos pueden ser unidos preferencialmente para minimizar los defectos de empaquetamiento de los lípidos del anulus alrededor de la superficie irregular de la proteína. La composición lipídica heterogénea de las membranas biológicas podría ser necesaria para satisfacer los diferentes requerimientos de empaquetamiento de las distintas proteínas integrales.

Al ocurrir una separación o transición de fase en bicapas lipídicas, ciertas proteínas parecen distribuirse de manera diferente en ambas fases. La glicoforina y la $\text{Ca}^{++} \text{Mg}^{++}$ ATPasa se particionan casi exclusivamente en la fase líquido-cristalina (93). Las proteínas responsables del transporte de β -glucósidos y β -galactósidos en E.coli parecen particionarse de 2 a 20 veces más favorablemente en los dominios fluidos, dependiendo del sistema de transporte y de la composición lipídica de la membrana (148). También fue sugerido que la β -hidroxibutirato deshidrogenasa en mezclas de PC-PE se particionaría preferencialmente en la fase líquida al ocurrir la transición de fase (93).

I.8.- ESTRUCTURA DE LAS MEMBRANAS BIOLÓGICAS.

La presencia de una bicapa lipídica en las membranas biológicas fue propuesta ya en el año 1925 por Gorter y Grendel (149), quienes al extraer los lípidos de la membrana de eritrocito y al comprimirlos en una interfase agua-aire, encontraron que ocupaba un área cercanamente igual al doble de la superficie externa del eritrocito. Posteriormente, Danielli y Davson (150) propusieron también la presencia de una bicapa lipídica y

además para explicar la baja tensión superficial de las membranas biológicas, postularon que la bicapa lipídica estaría ubicada entre dos capas de proteínas. Más tarde se pudo demostrar - que los fosfolípidos solos pueden mostrar una baja tensión superficial como las membranas biológicas naturales.

Con el desarrollo de la microscopía electrónica, se encontró que las membranas biológicas de muchas fuentes muestran una estructura típica trilaminar, similar a las estructuras de cristales de lípidos puros. Las evidencias de difracción de rayos X son también dimensionalmente compatibles con una estructura de bicapa. Estos hechos condujeron a Robertson (151) a formular la hipótesis de la bicapa lipídica.

Estudios pioneros de difracción de rayos X en mielina (152); también demostraron la estructura de bicapa, y los resultados fueron similares a los obtenidos para fosfolípidos hidratados (153). Estos estudios indican un espaciamiento de $4,7 \text{ \AA}$ en la dirección paralela al plano de la bicapa, que ahora es sabido que es característica de cadenas hidrocarbonadas paralelas. Estudios más recientes con mejor precisión y resolución confirmaron inequívocamente la estructura bilaminar de la membrana de mielina (154, 155).

También se han hecho estudios en membranas del segmento externo de los bastoncitos de retina. Esta es considerada una membrana más clásica, debido a que contiene un 50% de proteína íntimamente asociada con la membrana; al contrario de la membrana de mielina que solo contiene un 18% de proteínas, y la proteína que se encuentra en mayor proporción, la proteína básica de mielina, es fácilmente extraída de la membrana y está localizada presumiblemente sobre la superficie externa de la membrana. Estos estudios (156, 157) mostraron dos picos de alta densidad electrónica separados por 40 \AA que corresponden a los grupos polares de los fosfolípidos, y una región central de menor densidad electrónica que el agua, la cual corresponde a los grupos $-\text{CH}_3$ terminales de las cadenas hidrocarbonadas, lo cual

///

provee evidencias convincentes de que la estructura predominante de esta membrana es una bicapa similar a la formada por fosfolípidos solos. Blaurock y Wilkins (156) concluyeron que la cantidad de lípidos por unidad de área en la membrana del segmento externo de los bastoncitos de retina es insuficiente para una bicapa de lípido puro con la distancia pico a pico observada por difracción de rayos X. Esta distancia tendría que ser de 22 a 28 Å en lugar de 40 Å si los fosfolípidos fueran los únicos responsables del patrón de difracción observado. Estos autores primeramente interpretaron esta discrepancia especulando que la rodopsina, la proteína mayoritaria de esta membrana, podría estar asociada íntimamente con los grupos polares de los fosfolípidos, de manera que los picos de densidad electrónica corresponderían al centro de un área conteniendo a las proteínas y a los grupos polares de los fosfolípidos. Pero más tarde reinterpretaron sus datos en términos de la penetración de la bicapa por una porción sustancial de las moléculas de rodopsina, y que la separación de 40 Å representaría a la separación entre los grupos polares de los fosfolípidos solamente (158).

Se ha demostrado que la estructura de bicapa predomina también en otras membranas como la de eritrocitos y de microorganismos como *Mycoplasma laidlawii* (159), y también en las membranas presentes en ciertos virus (160).

El mayor problema en la estructura de las membranas fue el de la localización de las proteínas. Si bien las similitudes entre las membranas biológicas y la de bicapas lipídicas puras son notables, es necesario tener en cuenta la permeabilidad de las membranas biológicas a una gran variedad de sustancias a las cuales las bicapas de lípidos puros son impermeables o poco permeables. Es necesario además, encontrar un lugar en la estructura para las proteínas, las cuales en muchos casos comprenden el 50% o más de la masa total de la membrana.

El hecho de que muchas proteínas pueden ser extraídas de la membrana por tratamientos suaves indica que algunas pro-

///

teínas están unidas a la superficie externa de la membrana por interacciones con los grupos polares de los fosfolípidos de acuerdo al modelo de Danielli-Davson-Robertson (150, 151). Estas proteínas son denominadas proteínas extrínsecas o periféricas y un ejemplo de ellas podría ser la proteína básica de mielina. El modelo de Danielli-Davson-Robertson pudo explicar muchas propiedades de las membranas, especialmente la observación de una estructura trilaminar por microscopía electrónica. Hoy se conoce sin embargo que la mayoría de las proteínas de membrana no son proteínas periféricas, sino que únicamente pueden ser extraídas de la membrana, mediante la disrupción de la misma por el uso de detergentes o solventes orgánicos. Tales proteínas deben interactuar mas íntimamente con los lípidos de la membrana y presumiblemente penetran en la región de la bicapa.

Consideraciones termodinámicas también condujeron a rechazar el modelo de Danielli-Davson-Robertson. En efecto, muchas proteínas de membrana contienen segmentos con altos contenidos en residuos no polares, los cuales según este modelo serían expuestos hacia la fase acuosa o quedarían en contacto con los fosfolípidos. Estas consideraciones condujeron a la sugerencia de que las membranas podrían tener una estructura mosaico, con proteínas globulares empotradas o atravesando una bicapa lipídica. Es decir, las membranas presentarían regiones ricas en proteínas responsables de las propiedades funcionales, y regiones esencialmente puras en lípidos que servirían par mantener la integridad y cohesividad de la estructura. Estas ideas fueron sugeridas muchos años atrás por algunos investigadores (161), y fue mas recientemente evocada por Lenard y Singer en 1966 (162). Según este modelo, los residuos hidrofóbicos de las proteínas se hallarían en un medio no polar, dejando expuestos a la fase acuosa a los residuos polares como se puede observar en la figura 4. De esta manera resultaría un sistema de energía libre mucho menor que en el modelo anterior.

La prueba mas convincente de la existencia de proteí-

nas empotradas en la membrana proviene de experiencias de microscopía electrónica de fracturas por congelamiento o técnica de congelación-grabado (163). Por esta técnica se logran separar ambas monocapas de la membrana, y se pueden obtener réplicas de la topografía de la cara hidrofóbica interna. Cuando es las réplicas son observadas en el microscopio electrónico, se obtiene una matriz suave sin interrupciones, en sistemas lipídicos puros y también en la membrana de mielina (164). Sin embargo, la mayoría de las membranas biológicas producen superficies rugosas sugiriendo que la fractura ocurrió sobre obstáculos particulados. Generalmente pueden distinguirse ambas capas ya que la capa conectada al interior de la célula da superficies convexas, mientras que la conectada al exterior da superficies concavas. Algunas veces pueden observarse superficies complementarias con depresiones en una superficie correspondiendo a protuberancias en la otra. Este tipo de datos han sido obtenidos para una gran variedad de membranas como de mitocondria (165) y de eritrocito (166), y otras. Aunque no ha podido establecerse si las partículas observadas representan simples moléculas de proteínas o agrupaciones de moléculas proteicas, ellas representan distorsiones severas del interior de la bicapa de las cuales las proteínas que penetran en la bicapa deben ser directa o indirectamente responsables. Hoy, sin embargo se sabe que sistemas lipídicos puros también pueden dar tales réplicas cuando parte de los lípidos se hallan en la forma de micellas invertidas entre ambas monocapas (29).

Algunas proteínas atravesarían completamente la bicapa lipídica de la membrana como la sugieren experiencias que muestran que algunas proteínas son accesibles a reactivos a ambos lados de la membrana (167).

Podría haber una aparente contradicción entre una estructura esencialmente lipídica y el alto contenido en proteínas para algunas membranas. Sin embargo, hoy se conoce que para varias proteínas de membrana solo es necesario un segmento

hidrofóbico pequeño para que puedan empotrarse en la bicapa lipídica. Un segmento de solo 23 aminoácidos es suficiente para unir a la glicoproteína principal de eritrocito a la membrana (168), y esta proteína parece atravesar completamente a la bicapa lipídica. Para la asociación del citocromo b5 a la membrana del retículo endoplásmico solo es necesario un segmento de no mas de 44 aminoácidos (7). El resto de las moléculas proteicas se proyecta hacia la fase acuosa, por lo que la cantidad de proteína realmente dentro del dominio de la bicapa es mucho menor que el contenido proteico total obtenido por los métodos analíticos.

El modelo mosaico fue ampliado posteriormente por Singer y Nicolson (169, 170) incluyendo los aspectos dinámicos de la estructura de las membranas. Ellos describieron a las membranas como soluciones bidimensionales de proteínas globulares orientadas en una bicapa lipídica fluída. En virtud de la presencia de cadenas hidrocarbonadas insaturadas, las regiones de bicapa de la estructura mosaico serían generalmente fluídas y las porciones ricas en proteína serían como "icebergs" flotando en un mar de lípidos. Aunque las regiones ricas en proteínas pueden ser rígidamente estructuradas, ellas serán móviles en la membrana como resultado del flujo de los lípidos a su alrededor. En el caso de proteínas tales como citocromo b5, que tienen sus regiones funcionales en el exterior de la bicapa, los "icebergs" pueden ser muy pequeños, consistiendo de un corto segmento polipeptídico y presumiblemente de algunas moléculas de lípidos involucradas en la unión de la proteína a la bicapa. Por otro lado, otras proteínas o complejos proteicos, podrían formar "icebergs" mucho mas grandes que contendrían partes de varias cadenas polipeptídicas.

Hay grandes evidencias experimentales de la movilidad de las proteínas en la membrana. Ha sido demostrado que la proteína fotorreceptora rodopsina posee una gran libertad de rotación en la membrana, por medio del discroismo asociado con la -

///

absorción de luz polarizada (171). La movilidad lateral de las proteínas fue demostrada por Frye y Edidin (172), quienes marcaron con anticuerpos fluorescentes a proteínas integrales de células de cultivos de tejido de origen humano y de ratón, e indujeron la fusión de ambos tipos de células. Luego de incubar un cierto período de tiempo a 37°C, observaron que los componentes de ambas células se distribuían al azar sobre la superficie total de la célula híbrida. Blasie y col. (173), por medio de estudios de difracción de rayos X de la membrana del segmento externo de los bastoncitos de retina, observaron una reflexión difusa espaciada unos 50 Å en el plano de la bicapa que atribuyeron a la distancia promedio entre las moléculas móviles de rodopsina, y encontraron que la reflexión correspondiente a este espaciamiento fue agudizada cuando la membrana fue tratada previamente con anticuerpos específicos para la rodopsina, indicando que la combinación con el anticuerpo reduce la movilidad de la proteína. La difusión lateral de las proteínas en la membrana puede ocurrir tanto para moléculas proteicas individuales como para agrupamientos proteicos de mayor tamaño. Se ha mostrado que la citocromo oxidasa puede difundir lateralmente en la membrana mitocondrial, ya sea independiente, o en unión física con una o más de las otras proteínas integrales de esa membrana (174).

Scandella y col. (175) han mostrado que moléculas de fosfolípidos con radicales libres, son capaces de sufrir difusión lateral en membranas de retículo sarcoplásmico a una velocidad comparable a la observada en bicapas de fosfolípidos puros. Derivados fluorescentes de proteínas incorporados en vesículas de DMPC presentaron una velocidad de difusión lateral comparable a los marcadores lipídicos (176). La difusión lateral de proteínas en membranas ha sido estimada por una variedad de métodos en el orden de 10^{-10} a 10^{-9} cm²/seg. Para los lípidos se han obtenido generalmente valores algo menores, del orden 10^{-8} cm²/seg., como puede esperarse en base a consideraciones de tamaño (177).

La movilidad de las regiones de la membrana ricas en proteínas, y la posibilidad de que la cantidad de proteína realmente dentro del dominio de la bicapa sea baja, podrían ser responsables de la incapacidad de detectar regiones de alta densidad electrónica correspondientes a las proteínas de membrana - por difracción de rayos X, y hacer que el patrón de difracción sea muy similar en membranas biológicas que en bicapas lipídicas libres de proteínas (23). En el modelo mosaico fluido, las regiones ricas en proteína contribuirían tanto a la densidad electrónica del interior hidrofóbico como a la del área ocupada por los grupos polares. Debido a la movilidad, esta densidad electrónica se esperaría que estuviera distribuida uniformemente a lo largo del plano de la membrana, y así constituiría un fondo mas o menos constante sobre el cual se vería el patrón de densidad electrónica debido a las regiones de bicapa de la estructura mosaico. Considerando la baja resolución de los datos de difracción de rayos X, es posible que el perfil de densidad electrónica resultante no pueda ser distinguido del que se observa en bicapas lipídicas puras. La presencia de proteínas solo llegaría a ser aparente a través de una discrepancia entre el contenido lipídico analítico y la masa requerida para llenar el espacio ocupado por la bicapa, como se observó en membranas de bastoncitos de retina (156, 158).

La movilidad de las cadenas hidrocarbonadas también parece ser sustancial. Hubbell y Mc Conell (178, 179) mostraron que marcadores de ESR incorporados en membranas de axones de nervios de langosta tienen un rápido movimiento anisotrópico similar a cuando estos marcadores son incorporados en vesículas de fosfolípidos, y también observaron un incremento en la fluidez local cuando el grupo con el radical libre fue movido a lo largo de la cadena hidrocarbonada desde el grupo polar hacia el grupo $-CH_3$ terminal.

La fluidez de la membrana parece tener una fundamental importancia en muchos procesos, como por ejemplo en el ensamblaje de las membranas (180), en la fusión de membranas (172),

en la movilidad rotacional y traslacional de componentes de membrana en la respuesta inmune (181), y en la transducción sensorial (171)

Si bien la estructura básica de la mayoría de las membranas parece ser la estructura de bicapa fluida, en algunas membranas ciertos lípidos podrían adoptar otras estructuras. En el retículo endoplásmico parece haber regiones de micellas invertidas ricas en PE en equilibrio con los lípidos en forma de bicapa (27). En membranas de *Mycoplasma laidlawii* crecidas en presencia de altas cantidades de ácidos grasos saturados, se puede observar una transición de fase de la bicapa por calorimetría. La transición ocurre a la misma temperatura en la membrana completa que en las dispersiones de los lípidos libres de proteína, extraídos de la membrana (182). Además, la disminución en la T_t al sustituir los ácidos grasos saturados por insaturados fue la misma en ambos sistemas. Sobre la base de estos experimentos, las proteínas de membrana y las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos parecerían ser componentes independientes y no relacionados. Sin embargo, el calor total absorbido en la transición lipídica por mol de lípido es un 25% menor en la membrana total que en las dispersiones de lípidos puros, y esto podría indicar que una fracción de los lípidos en la membrana total no participa en la transición quizá debido a que se encuentra en una conformación diferente a la de la bicapa, mantenida por las interacciones con las proteínas y no sujeta a cambios con la temperatura. También fue reportado por Lenard y Singer (183) que solo el 70% de los fosfolípidos de la membrana de eritrocito son susceptibles a la acción de la fosfolipasa C, y en un trabajo posterior del mismo laboratorio (184) se sugirió que el fenómeno de la sustracción de lípidos de la estructura de bicapa por la interacción con proteínas podría ser un fenómeno general.

La formación de estructuras no lamelares podría ser importante en procesos como flip-flop y fusión de membranas, y

serían consecuencia del polimorfismo característico de las distintas especies de lípidos (31).

Si bien la membrana es básicamente fluída, hoy se conoce que la organización bidimensional de muchas membranas es heterogénea y parece haber áreas de movilidad restringida causadas por especiales interacciones lípido-lípido, lípido-proteína, o proteína-proteína (169, 170, 185, 186). La movilidad de las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos de la membrana de eritrocito parece ser más restringida que en sistemas lipídicos puros como se mostró por ESR (179) y NMR (187). La distribución de receptores de superficie en la membrana plasmática es frecuentemente no al azar, y a menudo también se observan asociaciones locales de proteínas de membrana como complejos multienzimáticos. También es conocido que muchas proteínas de membrana se hallan rodeadas de un anulus de lípidos de características diferentes al resto de la membrana.

Algunos de los mecanismos que restringen la movilidad de los lípidos y las proteínas en ciertas áreas de la membrana han sido clasificados por Nicolson (177). Entre ellos se pueden distinguir: a) Asociación o agregación de ciertas clases de lípidos o de proteínas en el plano de la membrana; b) Formación de dominios de lípidos con secuestación o exclusión de proteínas; c) La movilidad puede ser restringida en algunos casos por la interacción con componentes periféricos como proteínas o lipopolisacáridos y d) Algunas proteínas de membrana pueden tener una movilidad limitada por la interacción con componentes del citoesqueleto, en particular el sistema de microfilamentos y microtúbulos.

Muchos procesos que ocurren en la membrana podrían ser regulados por estos mecanismos. Ha sido demostrado por ejemplo que los mecanismos de reconocimiento celular y control de crecimiento serían mediados por receptores de superficie y que alteraciones en la movilidad lateral de estos receptores podrían regular estos procesos (185).

Además de la heterogeneidad en el plano de la membrana, tanto las proteínas como los lípidos también se encuentran asimétricamente distribuidos sobre ambas capas de la membrana (170, 187, 188). La asimetría de las proteínas es absoluta, ya que una proteína se encuentra siempre de un lado o el otro, pero nunca sobre ambas capas de la membrana. Esto permite su clasificación en endo y ectoproteínas. Para los fosfolípidos la asimetría es relativa, ya que si bien todas las clases de lípidos se encuentran sobre ambos lados de la membrana, lo hacen en diferentes proporciones. Esta asimetría transmembrana es mantenida debido a la baja velocidad con que ocurre el movimiento transmembrana (flip-flop) (187). Este movimiento es indetectable para las proteínas y es muy bajo para los fosfolípidos en relación a la difusión lateral en membranas modelo (87), y en varias membranas biológicas como la de eritrocito (189) y de la envoltura de algunos virus (190). Sin embargo, en ciertas membranas el flip-flop parece ocurrir con mayor rapidez como es el caso en retículo endoplásmico (191, 192) y en membrana citoplasmática de bacterias (193), y se piensa que podría ser mediado por proteínas o por estructuras lipídicas no lamelares (187, 194).

Se ha sugerido que la asimetría en la distribución de los fosfolípidos sería una consecuencia de la distribución asimétrica de las proteínas y sus particulares preferencias por determinadas especies de lípidos (187).

1.9.- ENZIMAS DE MEMBRANA. REGULACION DE SU ACTIVIDAD POR LIPIDOS.

Los efectos de los lípidos sobre la actividad de enzimas son muy diversos y complejos, (51, 195). Algunas enzimas pueden tener un requerimiento obligatorio de lípidos, y son completamente inactivas en su ausencia; y en otros casos los lípidos pueden actuar como moduladores de su actividad. La dependencia de lípidos ha sido mostrada generalmente por medio de la observación de la pérdida de actividad al eliminar los lípidos y

///

la reactivación por el agregado de estos (34, 195).

Para algunas enzimas, el requerimiento de lípidos se observa únicamente en reacciones que involucran sustratos no polares, como en el caso de la succinato deshidrogenasa mitocondrial. La enzima altamente purificada y libre de lípidos es activa con sustratos solubles en agua (196), pero existe una dependencia de lípidos, sin embargo, cuando la enzima purificada es usada para la reconstitución de reacciones parciales de la fosforilación oxidativa, donde se utilizan como aceptores de electrones a ubiquinonas y citocromos insolubles en agua. En este caso el lípido es requerido como agente "solubilizante" de sustratos insolubles en agua. Esto ocurre generalmente, en reacciones de biosíntesis de lípidos y glicolípidos, en reacciones redox que involucran ubiquinonas o plastoquinonas de cadena larga, o en reacciones de transferencia de glicosilos que involucran a carriers poliisoprenicos. En muchas de estas reacciones se ha observado una dependencia de lípidos (195), y a menudo ciertos detergentes fueron capaces de sustituir a los fosfolípidos.

El término "solubilización" usado aquí no tiene el sentido de "hacer soluble en agua" o "que no sedimente por ultracentrifugación", sino que se refiere a la incorporación de una sustancia extraña no polar en una bicapa lipídica o en una micela de detergente, por un proceso análogo a la formación de micelas mixtas.

Los lípidos de membrana también en algunos casos pueden activar por la solubilización de productos lipofílicos de la reacción. Esto es conocido por ejemplo para el sistema soluble de la ácido graso sintetasa, en donde los productos Cl₆ y Cl₈-CoA son inhibidores, y la inhibición es eliminada por el agregado de liposomas (180), los cuales actuarían secuestrando a estos productos.

En otros casos el lípido puede ser requerido para la solubilización de la enzima misma. El uso de lecitinas de cade-

///

na corta, que poseen una concentración micellar crítica relativamente alta, permitió demostrar que en algunos casos la activación ocurre cerca de la c.m.c. del fosfolípido, como se observó para la ATPasa (197), y para la β -hidroxibutirato deshidrogenasa (198) mitocondriales. Las proteínas anfipáticas generalmente unen detergentes cerca de la c.m.c. por un proceso cooperativo, y este proceso estaría relacionado con la superficie hidrofóbica expuesta de estas proteínas (6).

El uso de lecitinas de cadena corta o detergentes conduce a la formación de complejos micellares, los cuales son a menudo adecuados para la demostración de actividades enzimáticas no vectoriales. Las enzimas vectoriales, por el contrario, requerirán de fosfolípidos de cadena larga que forman vesículas bilaminares (34). La solubilización de ciertas proteínas puede ser particularmente favorecida por sistemas de fosfolípidos con teniendo límites de fase. Se ha sugerido que tales sistemas presentan fuertes fluctuaciones de densidad y una alta compresibilidad lateral (41, 199).

Hay fuertes evidencias de que la solubilización por sí misma no es suficiente para la reactivación de ciertas enzimas. Por ejemplo el detergente Triton X-100 ha demostrado ser un buen agente solubilizante, y sin embargo falló para activar a la C55-isoprenoide alcohol kinasa. Pero la adición de pequeñas cantidades de fosfolípidos resultó en una completa activación (200). Observaciones similares han sido hechas para otras enzimas como la citocromo oxidasa (142) y la Ca^{++} ATPasa (201). Esto indica que además de los requerimientos físicos para la solubilización, también existen requerimientos estructurales para una apropiada interacción lípido-proteína, como podría ser para la formación del "anulus" lipídico antes mencionado.

En el caso de algunas otras enzimas, ciertos lípidos podrían ejercer algunos efectos cinéticos. Esto ha sido estudiado en una enzima periférica, la piruvato oxidasa de E.coli(202). Esta enzima une lípidos en forma monomérica en sitios de alta -

///

afinidad y los efectos cinéticos inducidos por los lípidos serían similares a efectos alostéricos.

Muchas enzimas y sistemas de transporte de membranas utilizan sustratos solubles en agua y la reacción tiene lugar - cerca de la interfase agua-grupos polares de los fosfolípidos. Estas reacciones son influenciadas por parámetros del microambiente, debido por ejemplo a efectos de carga o de concentración local. Estos efectos y su tratamiento cinético han sido revisados (203).

En algunos pocos casos, el camino de la reacción total de enzimas anfipáticas dependientes de lípidos ha sido resuelto y se ha encontrado que el cofactor lipídico está involucrado solamente en reacciones parciales, como en la β -hidroxibutirato deshidrogenasa, en la cual la etapa dependiente de lípidos parece ser la unión de NADH (204). En el sistema citocromo P450 oxigenasa, la transferencia de electrones entre el citocromo P450 y la reductasa sería la etapa lípido dependiente (205). Y en el caso de la citocromo oxidasa requiere lípidos la transferencia de electrones entre los citocromos a y a_3 (206).

Parece no haber ningún ejemplo de una enzima dependiente de lípidos que posea una estricta especificidad por la - estructura química de las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos. Por el contrario, se ha dado mucho énfasis a la especificidad por grupos polares químicamente definidos (195). Sin embargo, para muchas enzimas en las que se había reportado que - presentaban una especificidad por ciertos grupos polares, trabajos mas recientes han demostrado lo contrario. Estas contradicciones han sido revisadas por Sandermann (51), y han sido atribuidas a posibles fallas experimentales allí enumeradas. La β -hidroxibutirato deshidrogenasa mitocondrial parece ser el único caso en que se ha confirmado una estricta especificidad por un determinado grupo polar, el de la lecitina (207). Sin embargo, ni siquiera esta enzima fue específica por la estructura de bicapa, las uniones esterés o la estructura detallada del grupo -

polar de la PC (198). Además se ha observado que mezclas de lípidos reactivan mas eficientemente que especies únicas (208). Cuando la PC es presentada en micelas mixtas con lípidos inactivos, solamente se requieren de 2,5 a 4 moléculas de PC por cada una polipeptídica (198). Posiblemente esta enzima requiera lípidos de una manera no específica para la solubilización, y además requiera de la unión específica de PC en sitios de alta afinidad.

El hecho de que mezclas de lípidos son mas eficaces - que especies únicas para reactivar a enzimas de membrana purificadas, ha sido observado también para una serie de reacciones - de la fosforilación oxidativa (142, 143, 196, 209, 210), lo - cual puede ser de interés con respecto a la heterogeneidad de - lípidos de las membranas biológicas.

I.10.- EFFECTO DE LA FLUIDEZ DE LA MEMBRANA SOBRE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS INTEGRALES. TRANSICIONES DE FASE Y CURVAS DE ARRHENIUS.

Kimelberg y Papahadjopoulos (211, 212), designaron - con el término de "regulación visotrópica" a la influencia de - la fluidez de las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos sobre el funcionamiento de enzimas unidas a membrana. A menudo, una - correlación entre la actividad de enzimas de membrana y parámetros de movilidad de la fase lipídica circundante han sido obtenidos por comparación de sus dependencias de la temperatura.

Los efectos de la temperatura sobre la velocidad de - reacciones enzimáticas son extremadamente complejos (213, 214). Estos efectos son a menudo evaluados en términos de la energía de activación calculada de la curva de Arrhenius. La mayoría de las reacciones catalizadas por enzimas dan una curva de Arrhenius lineal. Sin embargo, algunas enzimas solubles (215, 216) y especialmente un gran número de enzimas de membrana dan curvas bi o trifásicas (148, 213, 217, 222). En algunos casos se encuentra experimentalmente una quebradura abrupta entre dos rectas, mientras que en otros casos muestran curvaturas suaves.

Tales curvas han sido discutidas desde hace muchos años (217, 223, 224), pero sin que se alcance un acuerdo general sobre la causa de la no linealidad.

Las enzimas son susceptibles a la temperatura y algunas son fácilmente inactivadas a determinadas temperaturas. Además las reacciones enzimáticas son generalmente complejas y de varias etapas, cada una de las cuales tiene su propia dependencia de la temperatura. Estas características causan dificultades para la interpretación de las anomalías en las curvas de Arrhenius de reacciones enzimáticas.

En un proceso multienzimático involucrando dos o más reacciones sucesivas con diferentes energías de activación, podría ocurrir una quebradura por cambiar la etapa determinante de la velocidad total. En estos casos la E_a será mayor a menor temperatura. Sin embargo, tales quebraduras también ocurren en reacciones que consisten de una única etapa y a veces se han observado curvas con E_a menor a menor temperatura (218).

Por mucho tiempo las quebraduras en las curvas de Arrhenius han sido interpretadas como debidas a una desviación de una reacción dominante a otra a una temperatura crítica en la cual ocurre la discontinuidad. Por ejemplo en el caso de dos reacciones paralelas, catalizadas por enzimas distintas o por distintos sitios activos de la misma enzima, que tienen diferentes E_a . La velocidad de la reacción con mayor E_a incrementa más rápidamente con la temperatura y así predomina a altas temperaturas. A menor temperatura predominará la reacción con menor coeficiente de temperatura. En estos casos la curva de Arrhenius presentará una dobladura hacia arriba, es decir una E_a menor a menor temperatura, y el cambio de pendiente debería ser más bien gradual. Enzimas que pueden existir en dos formas diferentes con distintas E_a también podrían dar este tipo de curvas (223).

Estas teorías han sido muy criticadas debido a que tales procesos deberían producir un suave cambio en la pendiente y no una quebradura abrupta (213, 225). También se señaló -

///

que para que se manifieste una quebradura, los procesos en ambas zonas de temperatura deberían diferir en sus E_a en al menos 16 - Kcal/mol (225). Muchos de los datos disponibles sobre quebraduras en curvas de Arrhenius muestran cambios en E_a considerablemente menores.

Han (214) atribuyó la no linealidad de las curvas de Arrhenius a factores termodinámicos, los cuales incluyen reacciones de equilibrio secundarias que pueden alterar la velocidad del proceso catalítico. No habría quebraduras abruptas, sino que habría una curvatura continua que conecta a dos asíntotas lineales. Pero si el cambio de entalpía que acompaña a las reacciones de equilibrio que modifican el proceso es grande, sería posible observar curvaturas relativamente grandes.

Ha sido demostrado que en algunos casos, como por ejemplo si hay inhibición por sustrato, podrían aparecer curvas de Arrhenius con quebraduras aparentes, que se deberían a artificios por la forma de medir la velocidad en función de la temperatura, y que no se deben a un cambio real en la E_a (226).

El hecho de que en curvas de Arrhenius de muchas reacciones enzimáticas se observan quebraduras muy agudas, y que en algunos casos se observaron curvas de Arrhenius con dos rectas con diferente pendiente pero que no se cortan (199, 227), condujeron a Kumamoto y col. a la formulación de la teoría del cambio de fase para explicar este comportamiento (217), la cual se basó en las propuestas anteriores de Lyons y Asmundson (228). Esta teoría concuerda con las anteriores en que dos procesos independientes se requieren para producir una discontinuidad o quebradura, pero además estipula que cada proceso debe funcionar exclusivamente en su respectivo rango de temperatura. Esto es justificado sobre bases termodinámicas considerando que el sistema sufre un cambio de fase a una temperatura crítica. Las propiedades isotérmicas de un cambio de fase, según estos autores, explicaría por que los dos procesos independientes operan exclusivamente, inmediatamente después de una desviación de la temperatura a la

cual ocurre el cambio de fase. Los cambios de fase que explicarían este comportamiento podrían ocurrir en el estado de uno de los reactivos, en la enzima o en el solvente. Se han reportado cambios de fase por ejemplo en soluciones de polipéptidos (229). Una importante consideración de esta teoría es que los cambios de fase en componentes de la reacción pueden ser determinados por cambios de fase en componentes estructurales asociados a la enzima, pero remotos del sitio de catálisis.

En las curvas de Arrhenius que presentan dos rectas que se cortan en un punto, es decir que a la temperatura crítica hay un cambio en E_a pero no en la velocidad de la reacción, se requiere una compensación exacta entre la entropía y la entalpía de activación. El efecto de una ley de compensación ha sido discutido (230).

Kumamoto y col. (217), propusieron que si el cambio de fase es dominado por eventos remotos del sitio de catálisis como puede ser el caso de las reorganizaciones mayores involucradas en el cambio de fase de la porción lipídica de una lipoproteína o una membrana, la compensación entalpía-entropía puede no ser exacta y en este caso se observarían dos rectas con diferentes pendientes que no se cortan, y habrá entonces un punto de discontinuidad. Muchos ejemplos de tales discontinuidades sin intersección son conocidos (199, 227, 231, 232), pero en todos los casos la diferencia en la constante de velocidad a temperaturas infinitésimamente por encima y por debajo de la temperatura de la discontinuidad, nunca exceden 0,5 unidades de logaritmo. De consideraciones termodinámicas se argumentó que diferencias mucho mayores serían de esperar, por lo que hay una compensación entropía-entalpía muy grande aún en estos casos (217, 219), y que una compensación casi exacta sería la regla mas bien que la excepción.

El hecho de que la gran mayoría de las enzimas que muestran curvas de Arrhenius no lineales son enzimas de membrana hizo pensar que este comportamiento podría estar relaciona-

///

do con las propiedades de los lípidos de la membrana. Generalmente estas curvas no lineales han sido atribuidas a cambios de fase o alteraciones estructurales en los lípidos de la membrana. Sin embargo, no necesariamente una curva de Arrhenius no lineal de una actividad de membrana indica una alteración en la estructura de los lípidos, ya que en algunos casos tal comportamiento parece ser una propiedad intrínseca de la enzima, independiente de los lípidos, como parece ser el caso de la 5' nucleotidasa de hígado de rata (233). La ATPasa de *Acholeplasma laidlawii* sufre dos cambios de pendiente en su curva de Arrhenius, uno es agudo y parece depender de un cambio de fase de los lípidos de la membrana; mientras que el otro es gradual, ocurre en un rango amplio de temperatura, no parece depender de los lípidos y afecta a la afinidad de la enzima por el ATP (234).

Que un cambio de fase en los lípidos de la membrana es la causa de una curva de Arrhenius no lineal ha sido deducido de diferentes experiencias. A menudo se ha demostrado que las quebraduras o discontinuidades ocurren a temperaturas en que los lípidos sufren una alteración en su estructura, la cual ha sido detectada por diferentes métodos físicos (56, 148, 199, 235, 236). La Manipulación de la composición lipídica de la membrana directamente usando técnicas de fusión o de substitución de lípidos (237, 239), o indirectamente por la suplementación de dietas o medios de cultivo (88, 240, 241), mostraron que los cambios en E_a aparente en ciertas curvas de Arrhenius están relacionadas a la composición y por lo tanto a las propiedades físicas de la bicapa lipídica. En animales poikilotermeos y en microorganismos, es conocido que el efecto de la temperatura de adaptación sobre las propiedades físicas de las membranas es compensado por cambios adaptativos en los lípidos (242, 243), y que en algunas actividades enzimáticas, las quebraduras de las curvas de Arrhenius tiene una dependencia de la temperatura de adaptación que se correlaciona con los cambios de composición lipídica (221, 244). El tratamiento de las membranas con sustan

///

cias que se conoce que alteran la estructura de la membrana como detergentes (245, 246), ciertos anestésicos (247) o alcoholes - (248), o el tratamiento con fosfolipasas (249), permitió en algunos casos atribuir las curvas de Arrhenius no lineales a cambios de fase en los lípidos de la membrana. En algunos casos, ciertos sistemas enzimáticos purificados fueron reconstituídos con determinadas especies de lípidos, y las temperaturas a las que ocurrió un cambio de pendiente en las curvas de Arrhenius se correlacionaron con la T_t de los lípidos usados en la reconstitución (197, 211, 250-252).

Si bien se conocen algunas enzimas que dan curvas de Arrhenius con dos rectas que no se intersectan (199, 227, 231, 232), es más común encontrar un cambio abrupto en la E_a aparente sin un cambio en la velocidad de la reacción, a una temperatura particular. Si bien en un principio esto fue interpretado como una compensación entropía-entalpía, tal compensación es difícil de que ocurra en eventos lejanos al sitio activo como en alteraciones de la estructura de la fase lipídica de la membrana.

En lugar de asumir una estrecha relación entalpía-entropía, Wynn-Williams (253) propuso que el sitio activo no es mayormente afectado por los cambios de fase de los lípidos, y dio dos posibles explicaciones para los cambios en E_a aparente:

A) En este modelo consideró a una membrana como una única fase (solución de enzima en lípido), y supuso que la formación del estado activado requiere de la transferencia de n moléculas lipídicas a otro estado Z , diferente del estado líquido-cristalino (Y) y del estado cristalino (X). A T_t , las moléculas de lípidos tienen la misma energía libre en ambos estados (X e Y) ya que están en equilibrio. La velocidad de la reacción depende de la diferencia de energía libre (ΔG^{\ddagger}) entre el estado de equilibrio y el estado activado. Si la energía libre del centro activo es incrementada por un valor $\Delta G'$ al formarse el estado activado, la variación de energía libre total será: $\Delta G^{\ddagger} - \Delta G' + n \cdot (G_z - G_{x,y})$, siendo G_z la energía libre del lípido en el estado Z ,

necesario para la formación del estado activado; y G_x , la energía libre del lípido en el estado X o en el estado Y, que son idénticas únicamente a T_t . La velocidad de la reacción será

$$V = B e^{-\Delta G^*/RT} = B e^{-\frac{\Delta G' + n(G_z - G_{x,y})}{RT}} = (B e^{\Delta S' + n(S_z - S_{x,y})}) .$$

$$e^{-\frac{\Delta H' + n(H_z - H_{x,y})}{RT}}$$

donde B es constante, por lo tanto la E_a será $= \Delta H' + n(H_z - H_{x,y})$.

Como $G_x = G_y$ a T_t , la velocidad será la misma en las dos fases a T_t . La E_a aparente cambiará a T_t por un valor igual a $n(H_y - H_x)$, o sea n veces el calor latente de transición del lípido.

B) En este modelo se supone que la enzima y el lípido son solo parcialmente miscibles, por lo que la membrana contendrá dos fases a todas las temperaturas, excepto a T_t , donde habrá tres. Una fase será una solución de enzima y lípido, y la otra (o las otras dos) serán de lípido puro en uno u otro estado. La energía libre de una molécula de lípido será la misma en su fase pura estable que en una solución saturada con ella. Para el lípido en la solución enzima-lípido, G será una función continua de la temperatura y de la concentración del lípido; y para el lípido puro será una función continua de la temperatura, aún cuando sufra una transición de fase. Así, la solubilidad del lípido en la solución enzima-lípido debe ser una función continua de la temperatura a través de la T_t del lípido puro. La variación de solubilidad con la temperatura es dada por: $d(\ln S)/dT = \Delta H''/RT^2$, donde $\Delta H''$ es el calor de solución. Para rangos de temperatura dentro de los cuales $\Delta H''$ puede ser tomada como una constante, $\ln(S/S_0) = \Delta H''(1/T_0 - 1/T)/R$; $\Delta H''$ cambiará cuando el lípido sufra un cambio de fase, siendo menor por encima ($\Delta H_y''$) que por debajo ($\Delta H_x''$) de la T_t . La diferencia $\Delta H_x'' - \Delta H_y''$ es igual al calor latente de la transición de fase.

Así, la solubilidad será una función continua de la temperatura

///

tura, y la pendiente $d(\ln S)/dT$ cambiará repentinamente a la T_t del soluto. Si se supone que la velocidad máxima de la reacción enzimática es proporcional a la n -ésima potencia del contenido de lípido C de la solución enzima-lípido, a concentración de lípido constante C_0 la velocidad variará como $V=V_0 \cdot e^{-\Delta H^*/RT}$: Cuando C varía, $V=V_0 e^{-\Delta H^*/RT} (C/C_0)^n$. Si está presente la fase de lípido puro, de manera que la solución enzima-lípido está saturada con lípido, $C=S$ y $V=V_0 e^{-\Delta H^*/RT} (S/C_0)^n = V_0 e^{-\Delta H^*/RT} (S_0/C_0)^n$.

$$e^{-n\Delta H^*(1/T-1/T_0)/R} = V_0(S_0/C_0)^n e^{n\Delta H^{**}/RT_0} e^{-(\Delta H^*+n\Delta H^{**})/RT}$$

Así, la E_a aparente de la reacción será $\Delta H^* + n \Delta H^{**}$, y esta cambiará a la T_t del lípido, siendo n veces el calor latente de transición mayor por debajo que por encima de T_t .

Para DPPC a $41,8^\circ\text{C}$, el calor latente de la transición del estado cristalino al estado líquido-cristalino es de $40,5$ KJ/mol ($9,7$ Kcal/mol) (254). En experiencias en las que se incorporó a la ATPasa de retículo sarcoplásmico en vesículas de DPPC, se encontró una quebradura en la curva de Arrhenius a 41°C (T_t de la DPPC), y la E_a aparente disminuyó aproximadamente $9,7$ Kcal/mol por encima de 41°C (255). Así, según el primer modelo el número de moléculas de lípidos requeridas para formar el estado activado sería igual a 1, y según el segundo modelo la actividad sería proporcional al contenido de lípido de la solución enzima-lípido ($n=1$ en ambos casos). Si bien el primer modelo conduce a una curva de Arrhenius de la forma correcta, es difícil ver por que la enzima actuaría por ese mecanismo, y el segundo modelo sería mas probable (253). Según esta teoría, la E_a de la etapa limitante de una reacción enzimática no puede deducirse de la curva de Arrhenius, a menos que la composición de todas las fases sean independientes de la temperatura. Además, esta teoría predice que el cambio de fase que causa el cambio aparente en E_a puede no ocurrir en la fase que contiene a la enzima, ya que la solución enzima-lípido será afectada por un cambio en la fase lipídica pura.

Si bien esta teoría permite explicar el comportamiento de algunas enzimas como el de la ATPasa de retículo sarcoplásmico (255, 256), muchos otros comportamientos no pueden ser explicados por esta teoría. Algunas enzimas presentan curvas de Arrhenius quebradas con una E_a aparente mayor por encima de la quebradura que por debajo (268). Además, los cambios abruptos de pendiente siguen siendo difícil de entender, ya que requerirían un cambio de fase isotérmico a la temperatura crítica, lo cual es difícil de conciliar con el ancho de las transiciones de fase de los lípidos.

Ha sido reportado que en membrana plasmática de hígado de hamsters (222), varias enzimas presentan una quebradura - todas a la misma temperatura, que corresponde a la T_t de la membrana. Sin embargo, en otros casos varias enzimas presentaron - quebraduras a temperaturas significativamente diferentes, a pesar de formar parte de la misma membrana (257, 258). Este comportamiento ha sido atribuido en varios casos a que la transición de fase responsable de las quebraduras en las curvas de Arrhenius, ocurriría en el anulus lipídico que rodea a la enzima. Ciertas enzimas podrían exhibir una respuesta apropiada a los cambios en el estado físico de su anulus que podrían enmascarar aquellos que ocurren en el resto de los lípidos de la membrana (237, 259). La influencia del anulus lipídico sobre el funcionamiento de las proteínas fue observado también en algunos sistemas reconstituídos (239). La Ca^{++} ATPasa de retículo sarcoplásmico, cuando es insertada en una bicapa de DPPC, exhibe dos quebraduras, una a 29 y la otra a 39°C, las que fueron atribuidas a la transición de los lípidos del anulus y a la del resto de la bicapa respectivamente (250). Esto indicaría que al menos esta proteína es capaz de "sentir" tanto los cambios en el estado físico de los lípidos del anulus como de los de los lípidos fuera del anulus.

Para el transporte de azúcares en membranas de E.coli los primeros estudios habían revelado una forma bifásica para las curvas de Arrhenius (88, 260).

El número de puntos experimentales mas bien limitado condujo a una extrapolación que sugería un cambio abrupto en la pendiente a una temperatura crítica. En trabajos mas recientes (199, 230), se mostró que hay un cambio mas bien gradual y continuo de una pendiente a otra. Sin embargo, aún el cambio de pendiente gradual ocurrió en un rango de temperatura mas bien angosto, y difícil de correlacionar con el ancho significativamente mayor (ΔT) de la transición de fase de los lípidos. En la mayoría de estos trabajos, la actividad no había sido medida con suficiente exactitud bien por debajo del límite inferior de la transición de fase de los lípidos (T_i). Cuando se determinó exactamente la dependencia de la temperatura para la velocidad del transporte de azúcares bien por encima y por debajo de los límites T_s y T_i de la transición de la fase lipídica, se encontró que la curva es en realidad trifásica (148). Además del cambio de pendiente observado en los trabajos anteriores, (con una E_a aparente mayor a menor temperatura), aquí se observó un segundo cambio de pendiente a menores temperaturas, pero ahora con una disminución en la pendiente al bajar la temperatura.

Este comportamiento del transporte de azúcares en *E. coli* fue interpretado en términos de la partición de las proteínas entre dominios de lípidos fluidos y dominios ordenados, dando origen a un interesante modelo para explicar los cambios de pendiente en las curvas de Arrhenius de enzimas de membrana durante el transcurso de la transición orden-desorden de la fase lipídica (148). Dentro del rango de la transición, entre T_s y T_i , la membrana está compuesta de dominios ordenados y dominios fluidos. El curso de la transición puede ser cuantificado por un parámetro ρ , de manera que:

$$\rho = \frac{F_{fl}}{F_{fl} + F_{or}} \quad 1$$

donde F_{fl} y F_{or} son las áreas de los dominios lipídicos fluidos y ordenados respectivamente, que coexisten entre T_i y T_s .

ρ cambiará de $\rho=1$ a $T > T_s$, a $\rho=0$ a $T > T_i$. La coexistencia de - ambos dominios no implica una situación estática, pero puede considerarse como que hay límites de fase atravesando la matriz lipídica. A un tiempo dado, una molécula de proteína se encontraría ya sea en un dominio ordenado o en uno fluido, y el total de las moléculas de un determinado tipo de proteína estará distribuido entre ambos dominios. Esta partición puede ser cuantificada por un coeficiente de partición K , de manera que:

$$\frac{P_{fl}}{P_{or}} = K \frac{F_{fl}}{F_{or}} \quad 2$$

donde P_{fl} y P_{or} son el número de moléculas de un determinado - tipo de proteínas que se encuentra en los dominios fluidos y ordenados respectivamente. Un valor de $K > 1$ implica una partición preferencial de la proteína en los dominios fluidos, y $K < 1$ significa una partición preferencial en los dominios ordenados.

La ecuación de Arrhenius puede entonces ser escrita - como:

$$V = P \nu e^{-E_a/RT} \quad 3$$

donde P es la concentración de enzima, el factor preexponencial ν tiene las dimensiones de frecuencia y multiplicado por la función exponencial da la constante de velocidad k de la etapa limitante. Si se asignan energías de activación E_{fl} y E_{or} a las partes lineales de las curvas de Arrhenius por encima y por debajo respectivamente de la transición de fase de los lípidos, la pendiente pronunciada de la parte intermedia de las curvas - será interpretada como un cambio en la constante de velocidad k y/o en la concentración efectiva de la enzima P , mas bien que - como un cambio en la E_a . La enzima podría funcionar con una o - dos constantes de velocidad k_{fl} y k_{or} , dependiendo de si se encuentra en un dominio fluido u ordenado respectivamente. Así, la velocidad de la reacción puede ser expresada como la suma de dos contribuciones:

$$V = P_{fl} \nu_{fl} e^{-E_{fl}/RT} + P_{or} \nu_{or} e^{-E_{or}/RT} \quad 4$$

La combinación de las ecuaciones anteriores conduce a una expresión de la velocidad de reacción en función del curso de la transición de fase ρ :

$$v = \frac{v_{f1}'}{1 + \rho(k-1)} \left[K\rho + (1-\rho) \frac{v_{or}}{v_{f1}} e^{(E_{f1}-E_{or})/RT} \right] \quad 5$$

donde $v_{f1}' = P_{tot} k_{f1}$, es la velocidad de reacción cuando todas las moléculas de enzima, $P_{tot} = P_{f1} + P_{or}$, funcionan en dominios lipídicos fluídos (hipotético para $T > T_s$). Si la enzima no funciona cuando esta en dominios ordenados, ocurrirá un cambio en la concentración efectiva P de la enzima. En este caso $k_{or} = 0$ (esto es $v_{or}=0$). La actividad remanente a $T < T_i$ podría ser debida a un número residual de moléculas de enzima P_r , que continúa funcionando debajo de la transición de fase. Si esta fracción funciona con la misma constante de velocidad k_{f1} que por encima de la transición de fase, la combinación de las ecuaciones anteriores conduce a:

$$v = \frac{v_{f1}'}{1 + \rho(k-1)} \left[K\rho + (1-\rho) \frac{P_r}{P_{tot}} \right] \quad 6$$

donde ahora $P_{tot} = P_{f1} + P_{or} + P_r$.

Ambas ecuaciones 5 y 6 conducen a una forma trifásica correcta de la curva de Arrhenius. La ecuación 5 explica el comportamiento en función de un cambio en la constante de velocidad k , al pasar la enzima de un dominio fluído a uno ordenado. La ecuación 6 en cambio explica el comportamiento en términos de un cambio en la concentración efectiva P al ocurrir la transición de fase. E_{f1} , E_{or} , y v_{or}/v_{f1} o P_r/P_{tot} pueden calcularse de las partes lineales de la curva de Arrhenius por encima y por debajo de la transición, y ρ puede ser calculado de curvas de fluorescencia. El coeficiente de partición K es variado para obtener una óptima concordancia con los valores experimentales. Solo en el caso en que uno solo de los dos parámetros k o P cambie durante el transcurso de la transición, podrá calcularse K ,

///

pero en general no podrá distinguirse entre un cambio en la constante de velocidad k o en la concentración efectiva de la enzima P . Si ambos parámetros cambian en el transcurso de la transición de fase, K no podrá ser calculada de estos datos experimentales.

Una consecuencia de esta teoría es que según el valor de K , los cambios en pendiente de las curvas de Arrhenius pueden ser observados a mayor o menor temperatura que los límites de la transición de fase lipídica. Solo para $K=1$, ambos cambios de pendiente serán observados a las temperaturas T_s y T_i , pero para $K > 1$ y para $K < 1$, la zona intermedia de pendiente pronunciada de la curva de Arrhenius se observaría desplazada hacia zonas de temperaturas menores o mayores, respectivamente, del rango de temperatura de la transición de fase. Los valores de K son generalmente mayores que 1, lo cual está de acuerdo con los datos de microscopía electrónica de fracturas por congelamiento, que indican una tendencia de las proteínas a ser excluidas de los dominios ordenados (260, 261).

Muchas otras reacciones enzimáticas han mostrado curvas de Arrhenius trifásicas (208, 251). Además Thilo y col. (148) han propuesto que muchas curvas de Arrhenius de reacciones enzimáticas observadas como bifásicas serían en realidad trifásicas, pero uno de los cambios de pendiente podría permanecer sin detectarse por ocurrir fuera del rango de temperatura en que se mide la reacción. Esto podría explicar algunas curvas de Arrhenius en las que se encuentra una disminución en la pendiente a menor temperatura (218, 222). En el caso del transporte de azúcares en membranas de *E. coli*, E_{fl} fue aproximadamente igual a E_{or} , lo cual conduce a una curva de similar pendiente por encima y por debajo de la transición con una pendiente más pronunciada en la zona de la transición (148). Sin embargo han sido observadas en algunos casos curvas de Arrhenius trifásicas con ambos cambios de pendiente en la misma dirección, con un incremento en la E_a aparente al disminuir la temperatura (222, 220).

Si bien en muchos casos, los cambios de pendiente en curvas de Arrhenius de enzimas de membrana, han sido interpretados como una consecuencia de una transición de fase cristalino-líquido cristalino; últimamente se ha dado mucho énfasis a los fenómenos de separación de fase, los cuales son más factibles de ocurrir a temperaturas fisiológicas (262, 263). La citocromo C oxidasa presenta una quebradura a 16-18°C, la cual se correlaciona con cambios en la movilidad de marcadores de ESR, pero no con la transición de fase observada por calorimetría (264). Se ha sugerido que los cambios en las propiedades cinéticas de esta enzima y en la movilidad de los marcadores podrían estar relacionados con una interacción lípido-proteína impulsada por un cambio inducido térmicamente en el estado físico de los lípidos que no involucra a una transición cristalino-líquido cristalino (264). En varias enzimas mitocondriales y microsomales se han observado quebraduras en sus curvas de Arrhenius (219, 265, 266), que en algunos casos se han correlacionado con cambios en parámetros de movilidad o fluidez de la fase lipídica, pero no fueron acompañados por una transición detectable por calorimetría. Se ha sugerido (218, 235) que alteraciones como estas no serían producidas por verdaderas transiciones de fase orden-desorden de los lípidos, sino más bien por la formación de agrupamientos de lípidos "quasicristalinos" en la bicapa de la membrana. Estos agrupamientos se formarían por moléculas de lípidos adyacentes aún en el estado líquido-cristalino, en un ordenamiento de corta vida y más densamente compactados, dentro de un medio ambiente de lípidos en el estado líquido cristalino y libremente dispersos.

También se ha intentado establecer una correlación entre la E_a de algunas reacciones enzimáticas con el grado de fluidez de los lípidos de la membrana. Los lípidos de membranas de poikiloterms presentan un mayor porcentaje de ácidos grasos insaturados que los de homeoterms (267). La E_a para la succinato oxidasa de mitocondrias de pez y sapo, es mucho menor que la observada para la misma enzima en membranas de homeoterms -

(231). Por medio de la administración de dietas ricas en ácidos grasos insaturados, Mc Murchie y Raison (220) alteraron la composición de la membrana mitocondrial de ratas y ovejas y reportaron que un aumento en fluidez se corresponde con un incremento de la Ea de la succinato oxidasa por encima de la quebradura. Sin embargo, para esta enzima se encuentra una Ea aparente menor por debajo de la quebradura, lo que indicaría que un aumento en el grado de orden aumentaría la Ea. Algo similar fue encontrado en mitocondrias de levaduras (268). Esta aparente contradicción fue interpretada como que la fluidez de los lípidos sería capaz de afectar a la estructura terciaria de la enzima, y la Ea sería una indicación de la conformación del centro activo (220). El incremento en Ea aparente al bajar la temperatura por debajo de la temperatura crítica fue atribuido a que la enzima se separaría lateralmente con las especies de lípidos mas fluídos. Al ir disminuyendo la temperatura, los lípidos de mayor punto de fusión se separarían lateralmente formando dominios sólidos, y los dominios desordenados remanentes llegarían a ser cada vez mas fluídos debido al enriquecimiento con lípidos de bajo punto de fusión, lo cual sería responsable del aumento de la Ea por debajo de la temperatura crítica, ya que las proteínas se particionarían preferiblemente en los dominios fluídos.

En algunos casos como en la membrana plasmática de hígado de hamster (222) se ha mostrado que una misma membrana presenta dos alteraciones termotrópicas diferentes en la estructura de los lípidos, las cuales fueron atribuidas a dos separaciones de fase laterales ocurriendo independientemente en ambas capas de la bicapa lipídica. Esto no sería sorprendente debido a la distribución asimétrica de los lípidos sobre ambas capas de la membrana. Las ecto y las endoenzimas respondieron a la transición de la capa externa o la interna respectivamente con una quebradura en sus curvas de Arrhenius a la temperatura correspondiente. Mientras que enzimas que se conoce que atraviesan -

///

completamente la membrana presentaron dos quebraduras, y así pa
recieron responder a las separaciones de fase de ambas capas.

Muchas membranas biológicas presentan transiciones o separaciones de fase en la matriz lipídica en el rango de temperatura de 5 a 40°C, las cuales han sido detectadas por diversos métodos físicos (219, 218, 236, 235). En algunos casos - como en E.coli, la Tt de su membrana externa incrementó al aumentar la temperatura de crecimiento, y el rango de temperatura en el cual la célula puede mantener a los lípidos de esta membrana en una fase mixta, se correlacionó con el rango de temperatura sobre el cual puede ocurrir el crecimiento (269).

Sin embargo, la mayoría de las membranas biológicas - se encuentran por encima de la Tt a temperaturas fisiológicas. Además, los cambios de fase inducidos por cambios en temperatura solo podrían tener importancia en la regulación de actividades enzimáticas en animales poikilotermos, pero no en homeotermos. Pero, por otro lado, fenómenos de separación de fase bien podrían ocurrir a temperaturas por encima de la transición cristalino-líquido cristalino. Las membranas biológicas parecen con tener varias fases a temperaturas fisiológicas (96, 260), ya - sea de lípidos puros de diferentes tipos, los cuales pueden no ser completamente miscibles aún en el estado líquido cristalino (90), o de soluciones proteína-lípido. Cambios en el pH (42,270 271) o en la concentración de iones metálicos como Ca⁺⁺ (42,271 272) o Mg⁺⁺ (270), o en la concentración de proteínas (273), pueden afectar la composición y el estado físico de estas fases. Ha sido propuesto que por estos mecanismos la célula podría afectar la composición de ciertas fases de la membrana y así la actividad de sus enzimas y proteínas de transporte (253). Estas enzimas no necesariamente serían todas afectadas en la misma extensión o en el mismo sentido, lo que provee un mecanismo simple para un sistema de control complejo de la actividad celular.

Además, ciertas enzimas pueden ser sensibles a cambios menores de la fluidez del entorno lipídico sin que ocurran

///

cambios abruptos como en una transición orden-desorden, como se ha observado para la hidrólisis de gangliósidos (274), la Ca^{++} ATPasa (275)(276), la adenil ciclasa (277) y su acoplamiento - con receptores β -adrenérgicos (278). También se mostró que cambios en la fluidez y composición lipídica de la membrana puede tener influencia sobre la cooperatividad de enzimas alostéricas de membrana (279, 280). Cambios en la fluidez de la membrana - pueden ser producidos isotérmicamente por ciertos anestésicos (247, 274), hormonas (281, 282) y distintas drogas (283, 284), además del pH, fuerza iónica o concentración de cationes divalentes (285), los cuales pueden ejercer influencia sobre la actividad de sus enzimas.

La fluidez y el estado físico de la membrana parece - tener importancia en procesos como el ensamblaje de las proteínas de membrana (286) y la actividad fagocítica de macrófagos - (287); y también parece modificar la captación de hexosas y la acción de la insulina sobre los adipocitos de ratas (288). Variaciones en la fluidez de membranas han sido observadas en función de la edad (289, 290) y por la transformación celular inducida por infección viral (291). Fluctuaciones cíclicas en la - fluidez de membranas intracitoplasmáticas han sido observadas - durante el ciclo de división celular (292), y variaciones de - fluidez transitorias se detectaron durante la excitación de nervios (293), y en la activación de las plaquetas sanguíneas por trombina (294). Aunque es posible que estos cambios de fluidez no cumplan realmente un rol primario y sean consecuencia de otros eventos.

I.11.- ESTRUCTURA Y FUNCION DE LA MEMBRANA DEL RETICULO ENDOPLASMICO.

En el retículo endoplásmico se hallan una gran variedad de enzimas con funciones muy relevantes en la biosíntesis y conversión de varios metabolitos, ya sea para la propia economía celular o para ser segregados fuera de la célula. Los micro

somas son activos metabolizadores de drogas, juegan un papel - muy importante en la biosíntesis de ácidos grasos insaturados y lípidos, de prostaglandinas y glicoproteínas, y también en la - biotransformación de esteroides endógenos y otras moléculas (295).

La microscopía electrónica del hepatocito de rata revela que el retículo endoplásmico se presenta en el citoplasma como una extensa red de túbulos, vesículas y laminillas (296, 297). La superficie citoplasmática del 60% del retículo endoplásmico lleva normalmente ribosomas unidos. Estas regiones, de nominadas retículo endoplásmico rugoso, generalmente se encuentran como amplios sacos o cisternas aplanadas dispuestas en formaciones paralelas. El retículo endoplásmico liso, el cual es a menudo encontrado en la región del aparato de Golgi, consiste de túbulos y vesículas ampliamente dispersas, y a veces asociadas con depósitos de glucógeno (296, 297). Las membranas del retículo endoplásmico tienen un espesor de $50-80 \text{ \AA}$ (298). El lumen del retículo endoplásmico rugoso es de unos $200-300 \text{ \AA}$ de diámetro y el lumen del retículo endoplásmico liso es de unos $300-600 \text{ \AA}$ de diámetro. Estas características pueden variar de región a región del lóbulo hepático (296). En promedio, el volumen del retículo endoplásmico es de 756 \mu m^3 por hepatocito, o sea el 15% del volumen celular total (297). La superficie abarcada por el retículo endoplásmico es de unos 63.000 \mu m^2 , esto es unas 37,5 veces la superficie de la membrana plasmática y 8,5 veces la de la membrana mitocondrial externa (297).

El retículo endoplásmico de 1 gramo de hígado (peso húmedo) contiene entre 40-50 mg de proteína y alrededor de 15 mg de fosfolípidos (299). Se estima que el retículo endoplásmico contiene el 19% de las proteínas, el 48% de los fosfolípidos y el 58% del ARN del hepatocito de rata (298), lo que muestra la importancia cuantitativa de esta organela. Los estudios de composición de microsomas aislados muestran que el retículo endoplásmico contiene un 70% de proteínas y un 30% de lípidos (el

85. los cuales son fosfolípidos) por peso (300). Usando un peso molecular promedio de 800 para los fosfolípidos y de 50.000 para las proteínas, puede calcularse que hay unas 23 moléculas de fosfolípidos por molécula de proteína. Los fosfolípidos microsomales consisten de aproximadamente el 55% de PC, 20-25% de PE, 5-10% de PS, 5-10% de PI y 4-7% de esfingomielina (300-301). Los ácidos grasos de estos fosfolípidos son principalmente las especies 16:0, 16:1, 18:0, 18:1, 18:2, 20:4 y 22:6 (302) las cantidades relativas de estas especies son dependientes de la dieta (303). Los microsomas también contienen colesterol (0,6 mg/gr de hígado), triglicéridos (0,5 mg/gr de hígado) y pequeñas cantidades de esteres de colesterol, ácidos grasos libres (300), y de vitamina K (304). La casi totalidad de los triglicéridos encontrados en microsomas, sin embargo, no forma parte de la membrana sino que se hallaría incluido en el interior de las vesículas microsomales, formando parte de lipoproteínas nacientes que son englobadas durante el proceso de ruptura de la célula (305). Estas lipoproteínas nacientes pueden ser eliminadas sometiendo a los microsomas a un shock osmótico.

Al contrario de otras organelas como mitocondrias y lisosomas, el retículo endoplásmico se rompe al homogeneizar el tejido, y sus fragmentos quedan en la forma de vesículas selladas, que se denominan microsomas (306). Las vesículas pueden tener o no ribosomas unidos a su superficie externa, según provengan del retículo endoplásmico rugoso o del liso. La superficie externa de la membrana microsomal corresponde a la superficie citoplasmática del retículo endoplásmico, mientras que la superficie interna corresponde a la superficie luminal. La única gran diferencia entre los microsomas rugosos y los lisos parece ser la presencia o la ausencia, respectivamente, de ribosomas unidos (307). Ambos tipos de microsomas parecen contener los mismos tipos de proteínas (308). Los fosfolípidos (300) y los ácidos grasos de los fosfolípidos (302) también presentan una -

///

composición similar en ambos tipos de microsomas. Ha sido reportado, sin embargo, que los microsomas lisos contienen el doble de colesterol (300) y alrededor de 1,4 veces más vitamina K - (304) que los microsomas rugosos.

Ninguna actividad enzimática asociada con la membrana del retículo endoplásmico parece localizarse exclusivamente en uno u otro tipo de microsomas (307). Se han reportado sin embargo varias diferencias cuantitativas, pero generalmente estas son relativamente pequeñas. Además, el nivel y la distribución de la actividad de enzimas en microsomas lisos y rugosos puede ser afectada drásticamente por el estado fisiológico del animal. Estas diferencias parecen ser debidas a que las enzimas son sintetizadas en el retículo endoplásmico rugoso y luego llegan al retículo endoplásmico liso por difusión lateral, o bien por la desunión de los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso para dar retículo liso luego de la síntesis proteica (307).

Una distribución heterogénea en el plano lateral del retículo endoplásmico ha sido mostrada para varias enzimas del retículo endoplásmico por medio del subfraccionamiento de los microsomas por sus diferencias en tamaño y/o densidad. Estos estudios han sido realizados en microsomas totales (309), en microsomas rugosos (310), y en microsomas lisos (311); y una distribución heterogénea ha sido encontrada para citocromo P450, citocromo P450 reductasa, citocromo b5, citocromo b5 reductasa, glucosa-6-fosfatasa, nucleósido difosfatasa, UDP-glucuronil transferasa, y estearasa. Esta heterogeneidad probablemente este presente en la red del retículo endoplásmico de un hepatocito individual, pero no puede excluirse la posibilidad de que sea debida a diferencias entre el retículo endoplásmico de diferentes hepatocitos.

También se ha mostrado que al igual que en la mayoría de las membranas, las proteínas del retículo endoplásmico se distribuyen asimétricamente en ambas superficies de la membrana (194, 307). Esto ha sido deducido de diferentes experiencias co

///

mo tratamiento con proteasas (312), por el uso de anticuerpos - (313), por la accesibilidad del sustrato (314), y por la localización del producto de la reacción (315, 316). Así, ha podido - demostrarse que el citocromo b5 (312, 313), la citocromo b5 reductasa (312), citocromo P450 reductasa (312, 315), por ejemplo, se encuentran ubicadas en la superficie citoplasmática; mientras que por ejemplo la glucosa-6-fosfatasa (316), y nucleósido difosfatasa (314) se encuentran sobre la superficie luminal.

Con respecto a la asimetría de la distribución transversal de los fosfolípidos, los reportes son contradictorios. Por un lado Nilsson y Dallner (317, 318) encontraron que el tratamiento de microsomas intactos con fosfolipasa A2 en presencia albúmina, hidrolizó toda la PE y PS, pero solo la mitad de la PC. Ellos concluyeron que los aminofosfolípidos se localizarían principalmente sobre la superficie externa y que la PC se distribuiría parejamente entre ambas superficies. Sin embargo, se ha demostrado que la fosfolipasa A2 no puede ser utilizada para el estudio de la distribución de los fosfolípidos en los microsomas por originar lisoderivados que alteran la estructura de la membrana. Otros grupos (319, 320) reportaron una distribución que contradice a estas conclusiones. Al contrario de lo que ocurre en bicapas lipídicas puras y en algunas membranas biológicas (87, 189, 190), el movimiento transversal (flip-flop) de los fosfolípidos es bastante alto en el retículo endoplásmico (191, 192), y se ha sugerido que esta podría ser la causa de tales contradicciones (194). Se ha sugerido que la asimetría transversal de los fosfolípidos en la membrana microsomal no se debería a la preferencia de las distintas proteínas, localizadas sobre uno u otro lado de la membrana, por determinadas especies de lípidos; sino que debería ser interpretado como un estado estacionario resultante de dos movimientos: la eliminación de una especie de lípidos de un lado de la bicapa y su reemplazo del otro lado (28). Ha sido mostrado que los sistemas enzimáticos encargados de la síntesis de fosfolípidos se hallan

localizados en la superficie citoplasmática de la membrana del retículo endoplásmico (194). La metilación de la PE, por ejemplo, podría crear gradientes opuestos de PE y PC entre ambas capas de la membrana lo que causaría el flujo de lípidos transmembrana (28).

La organización lateral de los lípidos en la membrana del retículo endoplásmico parece ser no homogénea y exhibir la dinámica de un sistema multifásico. La mayor parte de los lípidos se hallaría en una estructura de bicapa con un alto grado de fluidez, como se determinó en experiencias con marcadores de ESR, en las que se calculó un parámetro de orden que fue relativamente bajo al compararlo con otras membranas biológicas (117, 321, 322). Sin embargo se ha sugerido que otros lípidos podrían existir en dominios de menor fluidez, los cuales sufrirían un cambio de estado a alrededor de 35°C (117). Estas áreas de lípidos inmovilizados no se observan en dispersiones de los lípidos extraídos de los microsomas, por lo que parecen ser inducidas por las proteínas microsomales (322), especialmente por el sistema del citocromo P450 (321). De Kruijff y col. (323) observaron por ^{31}P -NMR, que una porción considerable de los fosfolípidos podrían formar configuraciones transitorias distintas de la bicapa. Estos fosfolípidos sufren un movimiento isotrópico y se intercambian rápidamente con los fosfolípidos en forma de bicapa. Estas configuraciones isotrópicas se formarían por la presencia de las proteínas microsomales, ya que el espectro de los lípidos libres de proteínas es el característico de bicapas líquido-cristalinas. Por otro lado, Stier y col. (27), mostraron que parte de los lípidos estarían en una configuración de micelas invertidas, las cuales estarían formadas predominantemente por PE y sufriendo un rápido intercambio con los lípidos en la estructura de bicapa (28). Las proporciones de una y otra fase serían afectadas por la presencia de cationes divalentes, ya que se observó que la fase lamelar es estabilizada por Mg^{++} (28).

Estas estructuras no lamelares favorecidas por ciertas proteínas microsomales como el citocromo P450, podrían ser responsables del rápido movimiento transmembrana de los fosfolípidos en la membrana microsomal en relación a otras membranas biológicas (28, 194).

Algunas correlaciones funcionales de las transiciones de fase de los lípidos se han demostrado en membranas de retículo endoplásmico de células cultivadas (324). Se mostró por ESR que estas membranas presentan cuatro temperaturas características de transición de fase de los lípidos, y además dos procesos de transporte que serían catalizados por componentes que atravesarían completamente la membrana son afectados a esas cuatro temperaturas. Se sugirió de evidencias físicas y fisiológicas que estas cuatro temperaturas características serían atribuibles a dos separaciones de fase independientes en las dos mitades de la bicapa. En microsomas de corteza adrenal también se encontraron por polarización de fluorescencia cuatro temperaturas críticas atribuibles a transiciones de fase de los lípidos, y se encontraron a esas cuatro temperaturas discontinuidades en el gráfico de Van't Hoff para la hidroxilación de un esteroide (325). La curva de Arrhenius para esta reacción, por el contrario mostró una única quebradura a 24°C. En membrana de retículo endoplásmico de *Tetrahymena pyriformis* (235) se encontró una quebradura en la curva de Arrhenius de la glucosa-6-fosfatasa a aproximadamente 17°C, y también en la intensidad de fluorescencia de 8-anilino-1-naftalenosulfonato, en la partición del marcador de ESR 4-doxil decano, y en la separación de las líneas hiperfinas externas del espectro de ESR del ácido 5-doxil esteárico en esa membrana. Por microscopía de congelación-grabado se observó el surgimiento de áreas suaves libres de partículas presumiblemente proteicas por debajo de 17°C. La ¹H-NMR de los lípidos extraídos de esa membrana también indicó una abrupta disminución en la movilidad de las cadenas hidrocarbonadas por debajo de 17°C, pero sin embargo no fue debido a una transición -

de fase cristalino-líquido cristalino. La ausencia de una transición de fase también fue observada por calorimetría, y las alteraciones termotrópicas observadas fueron atribuidas a la formación de agrupamientos de lípidos "rígidos" pero aún en el estado líquido cristalino que excluyen a las proteínas.

Ha sido reportado que la membrana microsomal de hígado de rata no muestra ninguna transición o separación de fase asignable a los lípidos por calorimetría, entre 0 y 50°C (232). En presencia de glicerol 50%, los microsomas hepáticos de rata mostraron una transición de fase de los lípidos por debajo de 0°C (326). Sin embargo, utilizando un calorímetro muy sensible, se sugirió que estos microsomas presentarían también una segunda transición en la región de 18-40°C, de mucho menor cambio entálpico que la primera transición por debajo de 0°C (134). Esta transición se desplazó a 10-20°C cuando se midió en los lípidos extraídos libres de proteínas. Por microscopía de congelación-grabado (327) se observó a bajas temperaturas un agrupamiento de partículas en esta membrana.

Si bien varias enzimas de esta membrana presentan curvas de Arrhenius lineales entre 0-40°C, se ha reportado la presencia de quebraduras en las curvas de Arrhenius a alrededor de 20°C para reacciones de oxidación y dealkilación de varios sustratos liposolubles, catalizadas por el sistema del citocromo P450 (117, 266, 328, 329). También se reportó en microsomas de hígado de rata una quebradura para la reducción del citocromo P450 por NADPH (330), sin embargo, esta reacción presenta una cinética bifásica con una fase lenta y otra rápida, y se demostró que solo la fase lenta presenta una quebradura en la curva de Arrhenius. Utilizando marcadores de ESR como sustratos se observó que solamente ocurrió una quebradura en la curva de Arrhenius de la reacción de reducción si el sustrato es liposoluble (doxil estearato), pero no cuando el sustrato fue hidrosoluble (TEMPO) (117). Se ha sugerido (117, 321) que la NADPH-citocromo P450 reductasa estaría rodeada de un anulus de fosfolí-

///

pidos que difiere del resto de los lípidos de la membrana, y sufre una transición de fase a 35°C.

También se han reportado quebraduras en las curvas de Arrhenius de la glucosa-6-fosfatasa y de la UDP-glucuronil transferasa en microsomas de hígado de rata y cobayo, las cuales se han correspondido con alteraciones termotrópicas en los lípidos detectadas por ESR y por marcadores fluorescentes (218, 331). Estas alteraciones termotrópicas parecen ocurrir en el interior hidrofóbico de la membrana (218), ya que fueron detectadas por el marcador fluorescente N-fenil-1-naftilamina (ubicado en el interior hidrofóbico de la membrana), pero no se detectaron con el marcador 8-anilino-1-naftaleno sulfonato que se localiza en la región de la bicapa cercana a los grupos polares. Con marcadores de ESR (doxil estearatos) se ha reportado que ocurrió una transición a aproximadamente 22°C detectada por 12-doxil o 13-doxil esteárico (265, 332-334), mientras que el 5-doxil estearato fue incapaz de detectar algún cambio estructural (117). El brusco incremento observado en la fluidez de la membrana fue atribuido en algunos casos a una transición de fase cristalino-líquido cristalino (335). Sin embargo, la ausencia de transición de fase detectable por calorimetría (232, 326-336) sugiere que podría tratarse de la formación a esas temperaturas críticas de agrupamientos de "lípidos rígidos" en el estado líquido-cristalino, separándose lateralmente de los lípidos más fluidos y formando dominios discretos. Una transición de fase va acompañada de un cambio en el número de sitios de unión para N-fenil-1-naftilamina, pero sin que cambie significativamente la constante de disociación K_d , como se mostró en bicapas de DPPC (126). En los microsomas de hígado de rata, las alteraciones termotrópicas fueron acompañadas por un incremento en K_d sin un cambio significativo en el número de sitios de unión para la N-fenil-1-naftilamina (218), lo cual también sugiere que no se trataría de una verdadera transición de fase cristalino-líquido cristalino.

I.12.- SISTEMA DESATURANTE DE ACIDOS GRASOS.

Tanto los microsomas de células animales como las de vegetales con capaces de convertir ácidos grasos saturados en monoetilénicos por una desaturación oxidativa que forma un doble enlace entre los carbonos 9 y 10 ($\Delta 9$ desaturasa). Por este proceso son sintetizados los ácidos oleico y palmitoleico en hígado de rata (337) o en levaduras (338). La actividad de la $\Delta 9$ desaturasa es modificada por la dieta (339-341). La especificidad de las desaturasas es tal que ellas reconocen el número de dobles ligaduras, la distancia entre el grupo carboxilo y el doble enlace preexistente, y la longitud de la cadena hidrocarbonada (342, 343). Distintas enzimas 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 (344).

La $\Delta 6$ desaturasa es la primera enzima en la secuencia de reacciones de la biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados en los microsomas de células animales. Ella convierte los $\Delta 9$ enoil-CoA monoinsaturados, palmitoil- y oleil-CoA, a los $\Delta 6$, 9 16:2 y $\Delta 6$, 9 18:2 acil-CoA respectivamente. Además, también convierte los tioésteres de los ácidos grasos esenciales linoleico y α -linolénico a γ -linolénico y $\Delta 6$, 9, 12, 15 18:4 respectivamente. El orden de actividad es α -linolénico > linoleico > oleico (342). La enzima no actúa sobre ácidos con un doble enlace trans (343). La actividad de la $\Delta 6$ desaturasa es sensible al ayuno y a la composición de la dieta (345, 346), y a hormonas como epinefrina (347), glucagón (348) e insulina (345). Esta enzima sería la encargada de regular la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados (342)

En la rata, el camino preferencial para la biosíntesis del ácido araquidónico y otros ácidos polietilénicos tanto de la serie linoleica como α -linolénica, comienza con la $\Delta 6$ desaturasa, sigue con una elongación a ácidos de 20 carbonos y luego una nueva desaturación por la $\Delta 5$ desaturasa (295, 342). La $\Delta 5$ desaturasa es una enzima microsomal muy activa (344, 349), y es mas bien insensible a cambios en la dieta y a efectos hor-

///

monales (344, 349).

En animales, la desaturación del ácido esteárico a oleico ha sido extensivamente estudiada. La reacción requiere primero de la síntesis del tioéster estearil-CoA y luego procede de la desaturación que utiliza O_2 (338, 350), y un donador de electrones que puede ser NADH o NADPH, aunque se ha mostrado que el NADH funciona mejor que el NADPH (350). Se mostró también que la desaturación también puede ocurrir con L-ascorbato como donador de electrones (351). La caracterización del sistema de la estearil-CoA desaturasa de microsomas de hígado, por medio de métodos espectroscópicos y empleando componentes parcialmente purificados (352-354), mostró que la formación del oleil-CoA involucra una secuencia de transporte de electrones del NADH a la flavoproteína citocromo b5 reductasa, de esta al citocromo b5, y de este a un factor sensible al cianuro, el cual finalmente los cede al O_2 . Posteriormente se sugirió que este factor sensible al cianuro sería la misma desaturasa (355). Sin embargo se ha mostrado que la desaturación de estearil-CoA no es inhibida por cianuro en hígado de conejo, en tiroides de cerdo, y en corteza adrenal bovina, al contrario de lo que ocurre en microsomas de hígado de rata y paloma, y en pulmón de rata o cobayo (356). Así, esto sugiere que puede haber dos mecanismos diferentes para la $\Delta 9$ desaturación, y el factor sensible al cianuro no sería la única enzima involucrada.

Las tres proteínas componentes del sistema de la $\Delta 9$ desaturasa han sido aisladas y caracterizadas (7, 8, 357). Tanto la flavoproteína como el citocromo b5 son proteínas anfipáticas conteniendo un segmento hidrofílico donde se encuentra el sitio catalítico, y un segmento hidrofóbico involucrado en la unión con la bicapa lipídica de la membrana microsomal (358), y también a liposomas (359, 360). La $\Delta 9$ desaturasa, por otro lado es un polipéptido de unos 53.000 daltons, que contiene un 62% de aminoácidos no polares y un átomo de hierro no hemínico catalíticamente activo (357).

En la figura 3 se muestra un esquema hipotético del sistema desaturante con su cadena de transporte de electrones. La velocidad de las distintas etapas del transporte de electrones pueden ser evaluadas por medio de la utilización de aceptores de electrones exógenos con potenciales de reducción adecuados. Utilizando ferricianuro como aceptor exógeno (NADH-ferricianuro reductasa), la flavoproteína cede los electrones al ferricianuro en lugar de cederlos al citocromo b₅, y así puede medirse la actividad de esta flavoproteína. Si en cambio se utiliza citocromo c como aceptor exógeno de electrones (NADH-citocromo c reductasa), el citocromo c aceptará los electrones del citocromo b₅ reducido, y la etapa limitante de esta reacción es la reducción del citocromo b₅ por la flavoproteína.

En base a experiencias donde se observó la cinética del transporte de electrones de la reductasa al citocromo b₅, luego de eliminar selectivamente gran parte de la reductasa con catepsina D, ha sido propuesto que estas dos proteínas formarían un gran complejo formado por aproximadamente 5 moléculas de flavoproteína y 50 moléculas de citocromo b₅ (361). Por otro lado, sin embargo, en base a estudios del binding del citocromo b₅ a microsomas, el grupo de Strittmatter (362) propuso un modelo para la interacción del citocromo b₅ con la reductasa, en el cual ambas proteínas están distribuidas al azar sobre la superficie externa de las vesículas microsomales, y sufren difusión lateral en el plano de la membrana previamente a la interacción catalítica, y esta difusión traslacional sería el paso limitante de la reacción. Estudios subsiguientes del binding de la reductasa y del citocromo a vesículas lipídicas, y también estudios de la cinética de la interacción de ambas proteínas tanto en microsomas como en vesículas de lecitina de huevo proveyeron mas datos concordando con esta hipótesis (363-365).

Por otro lado, el mecanismo de la formación del doble enlace aún no está completamente aclarado. Se ha demostrado usando ácido esteárico deuterado que la reacción es estereoespecífica y el doble enlace se forma por la separación de los áto-

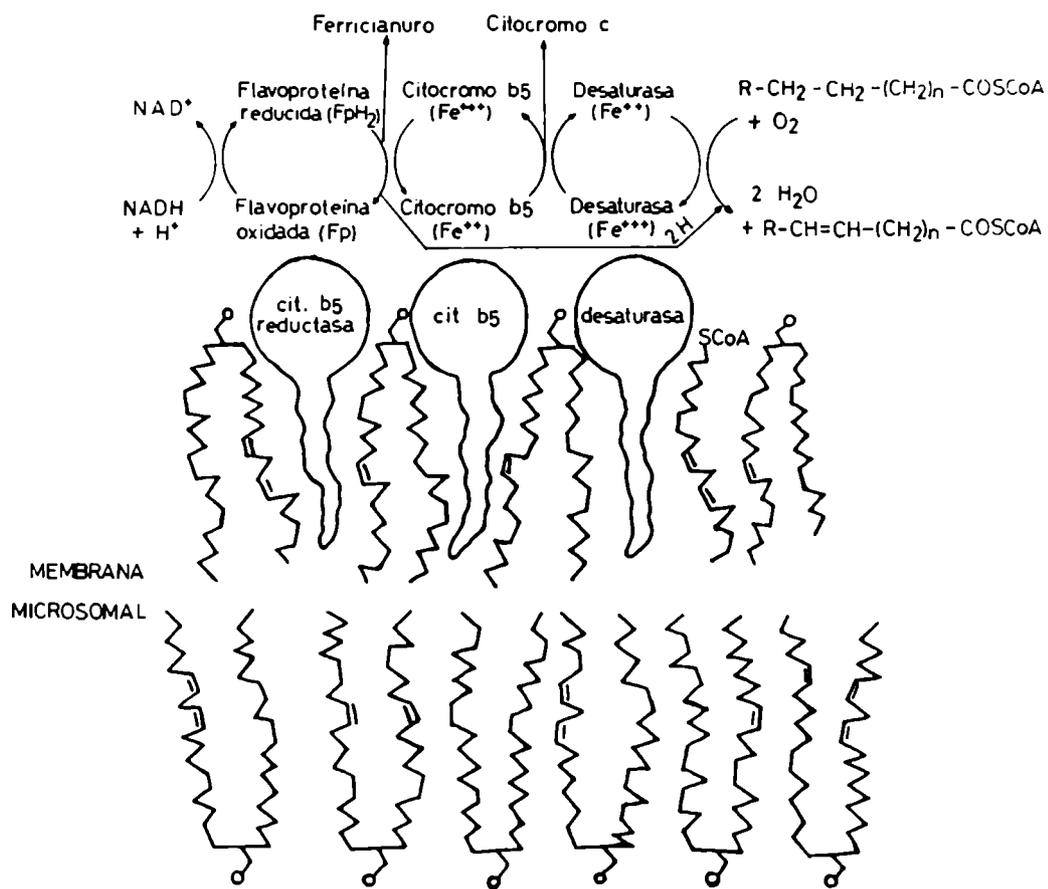


FIGURA 3: Esquema hipotético del sistema desaturante de ácidos grasos. Los aceptores de electrones exógenos ferricianuro y citocromo c reciben los electrones de la flavoproteína y del citocromo b5 respectivamente.

///

mos de hidrógeno de una manera concertada (366). Se ha sugerido que la eliminación de los hidrógenos es la etapa limitante en la reacción total de desaturación, sobre la base de experimentos que muestran discriminación isotópica con ácido esteárico -deuterado o tritiado en las posiciones 9 y 10, tanto en sistemas bacterianos, como en algas y en animales (366-368). Estudios de inhibición con isómeros cis y trans de derivados acil-CoA 9,10 sustituidos (252), mostraron que los derivados cis son inhibidores competitivos, mientras que los derivados trans muestran inhibición no competitiva o ninguna inhibición. Esto sugiere que el estearil-CoA al interaccionar con la enzima puede asumir una conformación similar a la de la cadena del ácido oleico, es decir las cadenas que salen de los carbonos 9 y 10 estarían en una conformación eclipsada (gauche).

La desaturación de los ácidos grasos insaturados se realiza también en presencia de NADH o NADPH y O_2 , y la reacción también es inhibida por cianuro (369). Así, es razonable considerar que las otras desaturasas también utilizarían un sistema de transporte de electrones similar al utilizado por la Δ^9 desaturasa.

Se ha propuesto que el sistema microsomal desaturante de ácidos grasos necesita de lípidos para su pleno funcionamiento (358, 370). La reducción del citocromo b5 por la reductasa también ha demostrado depender de lípidos y ha sido reportada una dependencia de PC (358). Estudios del binding del citocromo b5 y de la flavoproteína a microsomas y a liposomas de lecitina (251, 358, 360), y también estudios con la desaturasa (252, 357) indicaron que este requerimiento de lípidos está, al menos parcialmente, relacionado con la capacidad de las regiones hidrocarbonadas apolares de la bicapa lipídica para actuar como sitios de binding para las regiones hidrofóbicas de las moléculas proteicas, las cuales se agregan en soluciones acuosas puras (7,8).

Cuando se incorporaron en liposomas de DMPC, distintas cantidades de citocromo b₅ y de citocromo b₅ reductasa se encontró una brusca disminución en la velocidad de transferencia de electrones desde la reductasa al citocromo b₅ (medida como NADH-citocromo c reductasa), por debajo de la T_t de la DMPC (251). Esta caída en actividad no ocurrió al medir la transferencia de electrones del NADH a la flavoproteína (NADH-ferricinauro reductasa). El decrecimiento en la actividad de la NADH-citocromo c reductasa fue dependiente de la cantidad de proteína incorporada en las vesículas de DMPC. La disminución de actividad por debajo de T_t es mínima a altas concentraciones de proteína. Estos resultados fueron interpretados como que la reacción necesita de la difusión lateral de las proteínas en la bicapa lipídica y la caída en actividad sería debida a la brusca disminución en la difusión traslacional cuando los lípidos están en el estado ordenado. A concentraciones de proteína altas, la distancia promedio entre la reductasa y el citocromo es menor y por lo tanto el efecto de la transición de fase también es mínimo. Estos autores observaron que el efecto es casi imperceptible cuando la distancia promedio entre ambas proteínas es de unos 5 Å. La interacción entre citocromo b₅ y citocromo b₅ reductasa solubilizadas de microsomas exhibió una cinética de reducción bifásica en el rango de 15-25°C en etilen glicol acuoso como solvente, mientras que en microsomas intactos el proceso llegó a ser cada vez mas heterogéneo debajo de 0°C, reflejando heterogeneidades en la estructura de la membrana observables como distribuciones en velocidades de reacción y energías de activación aparentes (371).

El sistema completo de la estearil-CoA desaturasa fue también reconstituido en liposomas de DMPC, y para la reacción de desaturación se encontró una quebradura en la curva de Arrhenius a aproximadamente la T_t de la DMPC (252). Sin embargo, aquí ocurrió un cambio brusco en la E_a aparente sin discontinuidad en la velocidad de reacción, y también se encontró una disminución en el efecto isotópico sobre la velocidad con ácidos 9,10

///

deuterados, lo cual indicaría que otra etapa de la desaturación distinta a la eliminación de los hidrógenos llega a ser limitante de la velocidad por debajo de la Tt. La transición de fase de los lípidos podría imponer una alteración estructural o rigidez ya sea en el sustrato o en la desaturasa que altera la etapa limitante de la reacción. Al respecto, Seelig (372) encontró que la concentración de conformaciones "gauche" de las cadenas hidrocarbonadas disminuye marcadamente por debajo de la Tt de las bicapas de fosfolípidos.

I.13.- DESATURACION Y COMPOSICION LIPIDICA DE LA MEMBRANA.

La deficiencia en ácidos grasos esenciales provoca cambios en la composición de ácidos grasos de los lípidos de la membrana del retículo endoplásmico de hígado de rata (373). Estos cambios serían en parte debidos al cambio de composición de la dieta y en parte serían provocados por cambios en la actividad de las enzimas encargadas de la biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados (342). Las dietas libres de grasa, deficientes en ácidos grasos esenciales o pobres en ácidos poliinsaturados provocan un incremento en la actividad de la $\Delta 9$ desaturasa (374) y de la $\Delta 6$ desaturasa (349, 373). Este mecanismo podría conducir a mantener la fluidez apropiada de las membranas por medio de una síntesis incrementada de ácidos monoenoicos y de polienoicos de la serie no esencial, cuando la dieta no suministra los ácidos necesarios para la síntesis de aquellos de las series esenciales.

Si bien la $\Delta 9$ desaturasa ha mostrado diferente actividad cuando se la incorpora en vesículas de PC con diferentes ácidos grasos (252), se ha propuesto que la activación de esta enzima provocada por la carencia de ácidos grasos esenciales en la dieta no sería una consecuencia directa de la diferente composición en ácidos grasos de los fosfolípidos de la membrana (375). Por otro lado, la inyección de estrógenos produjo una disminución en el grado de insaturación de los fosfolípidos de

///

microsomas de hígado de gallo, lo cual incrementó la microviscosidad de la membrana y paralelamente se observó un incremento en la actividad de la $\Delta 9$ desaturasa (282). Para la $\Delta 6$ desaturasa se mostró que el incremento en actividad provocado por la carencia en ácidos grasos esenciales fue acompañado por un incremento en el K_m aparente (373). Sin embargo estos cambios en las propiedades cinéticas solo fueron bien evidentes luego de un largo período de carencia, mientras que el cambio en composición de ácidos grasos ocurre mas tempranamente. Estos cambios en la cinética de la $\Delta 6$ desaturación ocurrieron simultáneamente con un incremento en el nivel de triglicéridos y una disminución en el contenido de PC en los microsomas (373).

Numerosos estudios han mostrado que la temperatura ambiental está estrechamente relacionada con la composición lipídica de la membrana en muchos organismos diferentes (376). Varios tipos de organismos, desde bacterias a plantas superiores y animales poikiloterms, responden a alteraciones en la temperatura del medio ambiente modificando la composición lipídica, y así las propiedades físicas de sus membranas celulares. En principio, estos organismos responden a una disminución en la temperatura ambiental, mediante la acumulación de un mayor porcentaje de ácidos grasos insaturados en los fosfolípidos de sus membranas. El mayor requerimiento para esta adaptación parece ser el mantenimiento de las propiedades físicas óptimas de la membrana (377). Sin embargo, el mecanismo regulatorio para este proceso aún no es muy claro. En animales poikiloterms superiores como peces, se ha mostrado un efecto de la temperatura sobre la absorción selectiva de ácidos grasos por el intestino (378). Sin embargo, también ha podido demostrarse que la actividad de la $\Delta 6$ desaturasa en microsomas de hígado del pez *Pimelodus maculatus* es mayor en animales adaptados a menores temperaturas, en relación a animales adaptados a mayor temperatura (379). El incremento en la actividad de la $\Delta 6$ desaturasa se correlacionó con el incremento en el grado de insaturación de las

///

cadena hidrocarbonada de los fosfolípidos.

En plantas y microorganismos, la adaptación se debería principalmente a controles metabólicos que cambian la actividad de las enzimas desaturantes. Sin embargo, diferentes organismos parecen ejecutar esta adaptación por mecanismos diferentes. En levaduras y plantas superiores, el incremento en la desaturación de ácidos grasos inducido por bajas temperaturas de adaptación, puede ser explicado simplemente por la mayor disponibilidad de oxígeno (380). Otro tipo de mecanismo regulatorio, que opera en ciertos sistemas bacterianos, involucra una síntesis adicional de moléculas de desaturasas, inducida por la baja temperatura (376). En protozoarios como *Tetrahymena pyriformis* algunos estudios parecieron indicar que la adaptación de las membranas a la temperatura sería debida a una inducción de la síntesis de la enzima desaturante (381), ya que el aumento en la actividad desaturante fue inhibido en presencia de cicloheximida, pero estos resultados han sido refutados (382). Por otro lado, ha sido propuesto que en este organismo, el incremento en la desaturación que ocurre a bajas temperaturas de adaptación sería el resultado de una activación de las moléculas de desaturasas ya existentes, producido por la disminución de la fluidez de su entorno lipídico inmediato (383, 384).

1.14.- SISTEMA DE LA GLUCOSA-6-FOSFATASA.

La G-6-fosfatasa tiene un rol esencial en el mantenimiento de los niveles de glucemia ya que cataliza las reacciones terminales de la gluconeogénesis y de la glucogenolisis. La G-6-Pasa fue considerada como un sistema multifuncional, ya que no solo cataliza la hidrólisis de G-6-P, sino que hidroliza también pirofosfato inorgánico (385), y es también capaz de sintetizar G-6-P de glucosa y una serie de donores de fosfato que incluyen pirofosfato inorgánico (385), M-6-P (386), fosfoenolpiruvato -- (387), carbamifosfato (388) y varios nucleósidos di y trifosfatos (387, 389). El significado fisiológico de estas actividades

///

fosfotransferasas no se conoce muy bien aún, aunque ha sido postulado que la actividad sintética podría tener un rol en la reabsorción de glucosa en el hígado diabético (390) y como una forma compensatoria de fosforilación de glucosa en la diabetes (389). Las actividades fosfotransferasas y las fosfohidrolasas asociadas son muy pobremente manifestadas, a menos que las preparaciones microsomales sean tratadas con detergentes (389-391) o expuestas a pH alto (392). Luego de estos tratamientos, la actividad PPI-glucosa fosfotransferasa es incrementada entre 3 y 4 veces, mientras que la G-6-Pasa solo es estimulada en un 30% (393). Del mismo modo, una inhibición significativa por una variedad de metabolitos celulares solo ocurre luego de tales tratamientos preliminares (385, 394). Estos agentes han sido utilizados en estudios del mecanismo por el cual factores hormonales (395, 396) y nutricionales (397) alteran "in vivo" los niveles de G-6-Pasa. La fracción de la actividad fosfotransferasa total que es manifestada es marcadamente influenciada por cambios en el estado endócrino y nutricional del animal. El grado de latencia aumenta con el ayuno (397) y la diabetes (396) y disminuye en respuesta a la administración de glucocorticoides (395).

En estudios mas cuidadosos se ha podido demostrar (398, 399), que en microsomas "intactos", la actividad fosfotransferasa es completamente latente y que la glucosa-6-fosfatasa es específica para G-6-P. Los microsomas frescos, no tratados, contendrían dos formas: a) estructuras intactas en las cuales una selectiva barrera de permeabilidad restringe la especificidad únicamente a la G-6-P, y b) estructuras alteradas que carecen de una barrera de permeabilidad, en las cuales la enzima cataliza ambas reacciones hidrolíticas y sintéticas utilizando un amplio rango de compuestos dadores de fosfato. La exposición a medios hipotónicos, a extremos de pH, detergentes o ultrasonido incrementa la proporción de la forma alterada. La hidrólisis de la G-6-P sería la única actividad catalizada por este sistema que presenta un bajo nivel de latencia (de aproxima-

///

damente un 30%), y todas las otras actividades presentan niveles de latencia superiores al 85% (398). El K_m para la hidrólisis de G-6-P disminuye al alterar los microsomas mientras que el K_m para los otros sustratos no es afectado. Los compuestos que son buenos sustratos en preparaciones alteradas (M-6-P, PPI, y carbamil-P) son inhibidores débiles de la hidrólisis de G-6-P en microsomas no tratados. Al contrario, la G-6-P es un inhibidor igualmente potente de la hidrólisis de la M-6-P ya sea en preparaciones alteradas o no tratadas. La alteración de la estructura de los microsomas también reduce la E_a aparente para la hidrólisis de G-6-P, sin alterar el valor de la E_a aparente de la hidrólisis de la M-6-P (398).

Se ha propuesto que la G-6-Pasa está localizada en la superficie interna (luminal) de la membrana microsomal como se muestra en el esquema de la figura 4. Esto es soportado por evidencias de que el fosfato liberado en la reacción es encontrado dentro de la vesícula microsomal (316, 400, 401). Aparentemente, la parte interna del retículo endoplásmico también posee las actividades fosfotransferasas hacia los demás sustratos (402). Hoy es conocido que las G-6-Pasas hepática y renal de rata son sistemas multicomponentes. Al menos dos componentes del retículo endoplásmico participan en el proceso de hidrólisis de la G-6-P (399, 403-407): a) Un transportador específico para G-6-P, que la transporta desde el exterior al interior de la vesícula microsomal, o "in vivo" desde el citoplasma al lumen del retículo endoplásmico a través de la membrana; y b) Un componente catalítico relativamente no específico fosfohidrolasa-fosfotransferasa, unido a la superficie luminal del retículo endoplásmico (o a la superficie interna microsomal). Este modelo es soportado por una variedad de datos cinéticos (399, 403-405), y mediciones de la penetración de la G-6-P en vesículas microsomales "intactas" han provisto evidencias definitivas para la existencia de un transportador para G-6-P (406). La localización luminal del sitio catalítico es soportada por correlaciones entre la especificidad -

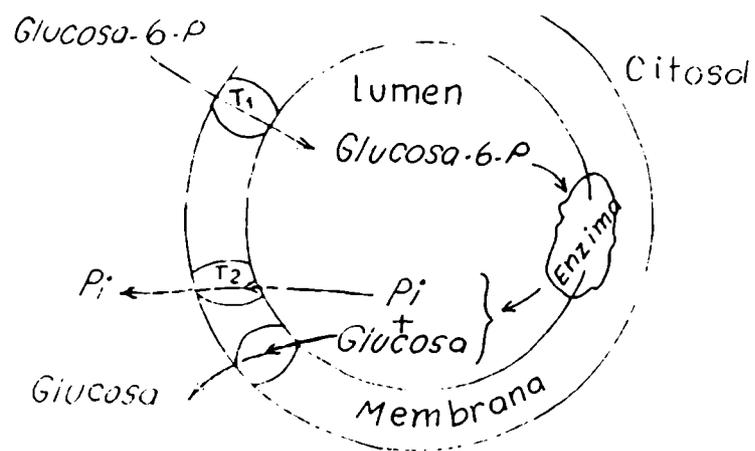


FIGURA 4: Modelo hipotético del sistema de la glucosa-6-fosfataza. Se indican la localización de los componentes traslocadores de G-6-P (T1), y de fosfato inorgánico (T2). También se indica la posible presencia de un componente para el transporte de la glucosa. De referencia 408.

de sustrato y la permeabilidad selectiva de la membrana microsomal (398, 399, 403), y por investigaciones de la topología transversal de la membrana usando marcadores enzimáticos y químicos no penetrantes (407, 318). El fosfato liberado en la superficie luminal sería traslocado al medio externo por otra traslocasa diferente a la encargada de transportar a la G-6-P (408), y que también podría traslocar otros sustratos alternativos como PPI y carbamil-P pero a bajas velocidades. En microsomas de hígado de cobayo, sin embargo, se mostró por mediciones cinéticas a tiempos muy cortos, que ocurre una rápida liberación de glucosa antes de alcanzarse el estado estacionario, y en base a esto, la teoría de la proteína traslocadora de G-6-P fue criticada (409).

Ha sido reportado frecuentemente que la G-6-Pasa es dependiente de fosfolípidos. Aunque en un trabajo se ha propuesto que los fosfolípidos restringen la máxima actividad (410), en muchas otras investigaciones se llegó a la conclusión de que los fosfolípidos activan a la G-6-Pasa (411-413). Los datos sobre la naturaleza de los lípidos necesarios para la reactivación son contradictorios. Se ha comunicado que la G-6-Pasa solubilizada es reactivada por PC (412), mientras que luego del tratamiento de los microsomas con fosfolipasa C, la inhibición puede ser revertida mas eficientemente por la adición de PE (411), o por PS mas PC (413). Mas recientemente ha sido propuesto que la PE y PS serían requeridas para la máxima eficiencia de la proteína traslocadora de G-6-P y que la PC sería requerida para la fosfohidrolasa ubicada en la superficie interna de las vesículas microsomales (414).

En algunos estudios realizados con microsomas de hígado de cobayo (218, 331) y en retículo endoplásmico de Tetrahyme na pyriformis (235), la actividad G-6-Pasa presentó una quebradura en su curva de Arrhenius. Estas quebraduras ocurrieron a una temperatura en la cual se encontraron alteraciones en distintos parámetros de movilidad o fluidez de la fase lipídica.

Estas alteraciones fueron atribuidas en un principio a una transición de fase orden-desorden (331), pero posteriormente fueron interpretadas en términos de una separación de fase en el estado líquido-cristalino (235, 218). En microsomas de hígado de rata, sin embargo, han sido reportadas curvas de Arrhenius completamente lineales entre 10 y 40°C, tanto para microsomas no tratados (actividad de la proteína traslocadora), como para microsomas cuya barrera de permeabilidad fue destruída con detergentes (actividad hidrolítica) (398). Así, el efecto de la fluidez y la estructura de la fase lipídica sobre la actividad de este sistema aún es poco conocida.

1.15.- RESUMEN Y OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO.

Es generalmente aceptado que la membrana del retículo endoplásmico es en su mayor parte una bicapa lipídica que constituye una matriz fluída para las proteínas que se hallan mas o menos empotradas en la misma, de acuerdo con el modelo de Singer (169), aunque existen evidencias de que parte de los lípidos podrían adoptar estructuras distintas a la bicapa (27,323).

Para un cierto número de enzimas de membrana se ha podido demostrar que su actividad es dependiente de la estructura y de la "fluidez" de la matriz lipídica (51), y en algunos casos se ha postulado que la "fluidez" de la membrana podría ser un factor de regulación de estas enzimas, lo que ha sido denominado como regulación viscotrópica (211). Las propiedades de las enzimas integrales de membranas pueden ser afectadas por las interacciones lípido-proteínas. Para estas enzimas, la membrana es un comportamiento bidimensional, y esta limitación debe influir sobre la cinética de las reacciones, apartándose del comportamiento de las enzimas homogéneamente distribuídas en un espacio tridimensional. Una de estas desviaciones es debida a la fluidez de los lípidos de la membrana, la cual puede afectar el grado de movilidad de los componentes de la membrana y por lo tanto los choques entre enzimas, sustratos y cofactores. La dependencia de la difusión lateral para proteínas (176), y para -

///

otros componentes como los lípidos o marcadores incorporados en la membrana (69), de la fluidez y la estructura de la membrana ha sido bien demostrada.

Las membranas biológicas parecen ser heterogéneas y - contener varias fases de diferente composición, y las distintas proteínas podrían particionarse diferentemente entre esas fases. Muchos factores como temperatura, pH, cationes divalentes, etc, podrían afectar la composición de las diferentes fases, pro- veer un mecanismo de regulación complejo (253). La fluidez de - la membrana puede depender de la composición lipídica y princi- palmente del grado de insaturación de los ácidos grasos de los fosfolípidos. La membrana del retículo endoplásmico presenta la particularidad de que es capaz de sintetizar sus propios ácidos grasos insaturados por medio de desaturasas localizadas especí- ficamente en esa membrana (295), e incorporarlos en los fosfolí- pidos que la componen.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la dependen- cia de la actividad de algunas enzimas microsomales de la es- tructura y fluidez de dicha membrana. Estos estudios se realiza- ron sobre dos sistemas enzimáticos no relacionados entre sí di- rectamente, localizados en esta membrana: a) El sistema desatu- rante de ácidos grasos, con su cadena transportadora de electro- nes; y b) El sistema de la Glucosa-6-Fosfatasa. El estudio de - la dependencia de la fluidez de la membrana para el sistema de- saturante de ácidos grasos es de particular interés ya que a su vez por medio de la síntesis de ácidos poliinsaturados y su pos- terior incorporación en los fosfolípidos de la membrana, este - sistema podría intervenir en la regulación de la fluidez de la bicapa lipídica. Con el estudio del sistema de la G-6-Pasa se - persigue obtener información sobre el comportamiento de un sis- tema no relacionado directamente con la síntesis de componentes de la membrana, y por lo tanto incapaz por sí mismo de regular su composición y fluidez. Por otro lado, como este sistema tie- ne al menos un componente localizado sobre la superficie lumi-

///

nal de la membrana (407), al contrario del sistema desaturante que se halla sobre la superficie citoplasmática (307), esto permite estudiar ambas superficies de la membrana.

El sistema desaturante, especialmente su cadena transportadora de electrones, aparentemente requiere de la difusión lateral de las proteínas, lo que posibilita las colisiones entre ellas y la transferencia de electrones (251). El sistema de la G-6-Pasa, por otro lado, requiere del transporte del sustrato a través de la bicapa lipídica (403-407). Así, con estos dos sistemas se estudió la influencia de la fluidez de la fase lipídica sobre dos procesos diferentes, como son la difusión lateral y el transporte a través de la membrana.

A menudo, ha sido posible obtener una correlación entre la actividad de enzimas de membrana y parámetros de movilidad o fluidez de la fase lipídica, por medio de la comparación de sus dependencias de la temperatura (curvas de Arrhenius)(148, 219). En la zona de temperatura donde se produce una transición de fase en la membrana, ocurre un brusco cambio en la estructura y fluidez de la misma (23). Muchas enzimas y funciones de membrana son afectadas por estos cambios de fase y son alteradas sus propiedades cinéticas (148, 235, 325). Por este motivo, el estudio de las curvas de Arrhenius es de gran importancia para detectar posibles relaciones entre actividad enzimática y fluidez de la matriz lipídica.

En este trabajo se estudió la estructura de la membrana microsomal por medio de métodos físicos como resonancia electrónica paramagnética y técnicas espectrofluorométricas, y la dependencia de la temperatura de ciertos parámetros de movilidad obtenidos por estos métodos. Se estudió además la dependencia de la temperatura (curvas de Arrhenius) de la actividad de la glucosa-6-fosfatasa, y de enzimas del sistema desaturante de ácidos grasos. El objeto de estos primeros estudios fue fundamentalmente investigar la presencia o ausencia de una transición de fase o alteración estructural en la membrana microsomal

///

inducida por la temperatura.

La composición de ácidos grasos de los lípidos de la membrana del retículo endoplásmico fue alterada mediante la administración de dietas carentes en ácidos grasos esenciales, y se observó el efecto de las variaciones en composición sobre la estructura y fluidez de la fase lipídica, y el comportamiento de estos sistemas enzimáticos. La composición lipídica de los microsomas, fue también alterada "in vitro" mediante la incorporación de lecitinas saturadas exógenas, con el objeto de obtener membranas que presenten una transición orden-desorden en el rango de temperatura medible, y el efecto de la transición de fase sobre el comportamiento de los sistemas enzimáticos nombrados fue estudiado.

La fluidez de la fase lipídica fue también incrementada por la incorporación de alcoholes alifáticos de bajo peso molecular, y se estudió su efecto sobre la actividad de estos sistemas enzimáticos. Esto permitió estudiar la influencia de menores variaciones de fluidez, al contrario de los cambios bruscos que ocurren en una transición de fase, los cuales son más factibles de ocurrir fisiológicamente.

CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

CAPITULO II: MATERIALES Y METODOS.

II.1.- PROCEDENCIA DEL MATERIAL UTILIZADO.

a) Sustratos y cofactores.

Acido linoleico (Hormel Inst., Austin, Minn)
Acido palmítico (Hormel Inst., Austin, Minn.)
ATP (Boehringer Mannheim)
Citocromo c (Sigma Chemical Company)
Co A (Boehringer Mannheim)
G-6-P (Sigma Chemical Company)
M-6-P (Sigma Chemical Company)
NADH (Sigma Chemical Company)

b) Radiactivos.

Acido 1-C¹⁴ linoleico (Amersham International LTD, Amersham UK).
Acido 1-C¹⁴ palmítico (Amersham International LTD, Amersham UK).

c) Fluoróforos marcadores.

1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (Aldrich Chemical Company LTD)
N-fenil-1-naftilamina (Baird & Tatlock LTD, London)

d) Marcadores de ESR.

Acido 5-doxil esteárico (Syva, Palo Alto, California)
Acido 16-doxil esteárico (Syva, Palo Alto, California)

e) Lípidos.

DMPC (Sigma Chemical Company)
DPPC (Sigma Chemical Company)

f) Material de cromatografía

Sílica gel G (Merk G A, Darmstadt)
SP-2330 10% sobre Chromosorb WAW 100/120 (Supelco Inc.)
EGSS-X 15% sobre Chromosorb WAW 80/100 (Supelco Inc.)

g) Otros.

Todos los solventes y drogas utilizadas en este trabajo fueron de grado analítico.

II.2.- ANIMALES Y DIETAS.

En estos estudios se utilizaron ratas Wistar, machos. En los estudios con microsomas normales, estos fueron obtenidos de ratas de unos dos meses de edad, pesando entre 100-150 gramos, alimentadas con una dieta standard. Los mismos animales fueron utilizados para las experiencias de modificación "in vitro" de los microsomas. En los estudios de los efectos de la carencia de ácidos grasos esenciales, luego del destete, las ratas fueron alimentadas por distintos períodos con alguna de las siguientes dietas:

Dieta standard: alimento balanceado Purina.

Dieta libre de grasa: composición en calorías (almidón 70%, caseína desengrasada 30%, minerales y vitaminas).

Dieta control: composición en calorías (almidón 55%, caseína 20%, aceite de semillas de girasol 25%, minerales y vitaminas).

Dieta libre de ácidos grasos esenciales: como la dieta control, pero reemplazando el aceite de girasol por palmitato de metilo.

II.3.- OBTENCION DE LA FRACCION MICROSOMAL.

Las ratas se mataron por decapitación y los hígados fueron extraídos. El tejido hepático fue homogeneizado con un homogeneizador rotatorio con émbolo de teflón. El homogeneizado fue centrifugado a 10.000 xg durante 20 minutos en una centrífuga Sorvall, y el precipitado fue descartado. El sobrenadante fue centrifugado a 100.000 xg durante 1 hora en una ultracentrífuga Spinco o MSE. El precipitado (microsomas) fue resuspendido por medio de un homogeneizador manual en un volumen aproximado al doble del volumen del precipitado obtenido. Todo el procedimiento fue realizado a 4°C. En algunos casos los microsomas fueron utilizados inmediatamente (determinaciones de actividad desaturante), o de lo contrario fueron congelados a -40°C hasta -

///

el momento de su uso.

Cuando los microsomas fueron utilizados para determinar G-6-Pasa, la solución de homogeneización y de resuspensión fue sacarosa 0,25 M - EDTA 1mM pH 7,0. Si en los microsomas se determinó actividad desaturante de ácidos grasos, se utilizó la siguiente solución homogeneizadora: sacarosa 0,25 M; KCl 0,15 M; $MgCl_2$ 5mM; y buffer fosfato 62 mM. Cuando en los microsomas se determinó NADH-ferricianuro reductasa o NADH-citocromo c reductasa, se utilizó cualquiera de las soluciones de homogeneización mencionadas, sin que se haya notado ningún efecto sobre estas actividades.

II.4.- DETERMINACIONES ANALITICAS.

II.4.1.- Determinación de proteínas.

En muestras cuyo contenido proteico fue suficientemente grande, este fue determinado por el método de Biuret modificado (415). En los casos en que el material fue escaso, como cuando se alteró la composición lipídica "in vitro", las proteínas fueron cuantificadas por la microtécnica de Lowry y col. (416). Estas últimas muestras presentaron generalmente una elevada turbidez debido a su alto contenido de lípidos, y esta fue eliminada particionando con el mismo volumen de cloroformo. En todos los casos se utilizó albúmina bovina como standard.

II.4.2.- Análisis de lípidos.

a) Extracción:

Los lípidos fueron extraídos de la fracción microsomal por el procedimiento de Folch y col. (417), y cuantificados por pesada de una fracción del extracto evaporando el solvente hasta peso constante. El resto del extracto fue guardado bajo atmósfera de N_2 a $-40^{\circ}C$ para posteriores análisis.

b) Cuantificación de fosfolípidos:

Los fosfolípidos se cuantificaron mineralizando el extracto lipídico con ácido perclórico a $120^{\circ}C$, y determinando el fosfato por el método de Chen y col. (418), que se basa en la

///

reducción del complejo fosfomolibdico a oxido moliboso.

c) Composición de lípidos:

La composición de lípidos fue determinada por cromatografía en capa delgada de sílica gel G. Para el análisis de lípidos neutros, el solvente de desarrollo fue: éter de petróleo-éter etílico (libre de peróxidos)-ácido acético en la proporción 90:10:1(v/v/v). Para el análisis de los lípidos polares el solvente fue: cloroformo-metanol-agua 65:25:4(v/v/v). Luego de desarrollada la cromatografía, los restos de solvente se eliminaron, las placas se rociaron con una solución saturada de $\text{Cr}_2\text{O}_7\text{K}_2$ en SO_4H_2 al 70%, y se colocaron a 280°C para carbonizar la materia orgánica. Las manchas fueron cuantificadas por densitometría (419), en un fotodensitómetro Zeiss a 540 nm, registrándose los picos con un registrador Sargent Welch. El área de los picos es proporcional a la cantidad de carbono en las manchas. Las áreas de los picos fueron obtenidas por triangulación y para transformar los porcentajes en peso de carbono en los porcentajes en peso de los lípidos, se multiplicó por un factor de conversión (el contenido relativo de carbono por unidad de peso de lípido) para cada una de las distintas especies de lípidos. Estos factores fueron: lisofosfátidos 1,64; PC 1,50; PE 1,52; ácidos grasos libres 1,27; Triglicéridos 1,30; colesterol 1,19; ésteres de colesterol 1,17; diglicéridos 1,33; y esfingomiolina 0,70.

d) Composición de ácidos grasos:

Una fracción del extracto de los lípidos microsomales fue interesterificada con metanol-HCl 3 N anhidro a 64°C durante 180 minutos, en ambiente de N_2 . El HCl y el metanol se eliminaron por partición con 3 ml de cloroformo y 2 ml de agua, eliminando la fase acuosa y repitiendo la operación tres veces. La fase clorofórmica fue evaporada a seco y los ésteres metílicos de los ácidos grasos fueron disueltos en éter de petróleo y guardados en atmósfera de N_2 y a -40°C hasta el momento del análisis. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos fueron anali-

///

zados por cromatografía gas-líquido. Se utilizó un aparato Hewlett Packard 5840 A, equipado con un sistema de detección por ionización de llama y con un terminal integrador y procesador de datos que indica automáticamente la composición de la muestra. La columna utilizada fue de SP-2330 10% sobre Chromosorb WAW 100/120. Se utilizó N_2 como gas carrier. La temperatura de la columna fue programada para ser mantenida a $140^\circ C$ durante el primer minuto, y luego incrementada a una velocidad de $3^\circ C$ por minuto hasta los $220^\circ C$. La identificación de los picos se hizo directamente de sus tiempos de retención relativos.

De la composición de ácidos grasos obtenida de esta manera se calculó el "índice de dobles ligaduras", que fue utilizado como un índice del grado de insaturación (282). Con los pesos moleculares de los ésteres metílicos de los ácidos grasos se calculó la composición molar, y el "índice de dobles ligaduras" se calculó de:

$$\text{"índice de dobles ligaduras"} = \frac{\sum (\text{n}^\circ \text{ de moles de ácidos insat.} \times \text{n}^\circ \text{ de d. lig})}{\sum \text{n}^\circ \text{ de moles de ácidos saturados}}$$

11.4.3.- Determinación de citocromo b5 y citocromo b5 reducida.

La cantidad de citocromo b5 en las preparaciones microsomales se estimó de la diferencia de absorción entre el estado reducido y el estado oxidado. El espectro de diferencia entre microsomas a los que se agregó NADH para reducir al citocromo b5, y microsomas sin NADH en los que el citocromo b5 se halla completamente oxidado, se muestra en la figura 5. Este espectro fue registrado en un espectrofotómetro de doble haz Beckman DK-2, con una concentración de microsomas de 2 mg de proteína/ml. El incremento en diferencia de absorbancia entre 409 y 424 nm es proporcional a la concentración de citocromo b5, con un coeficiente de extinción de $163 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (420). Para las medidas de rutina, sin embargo, un espectrofotómetro de simple haz

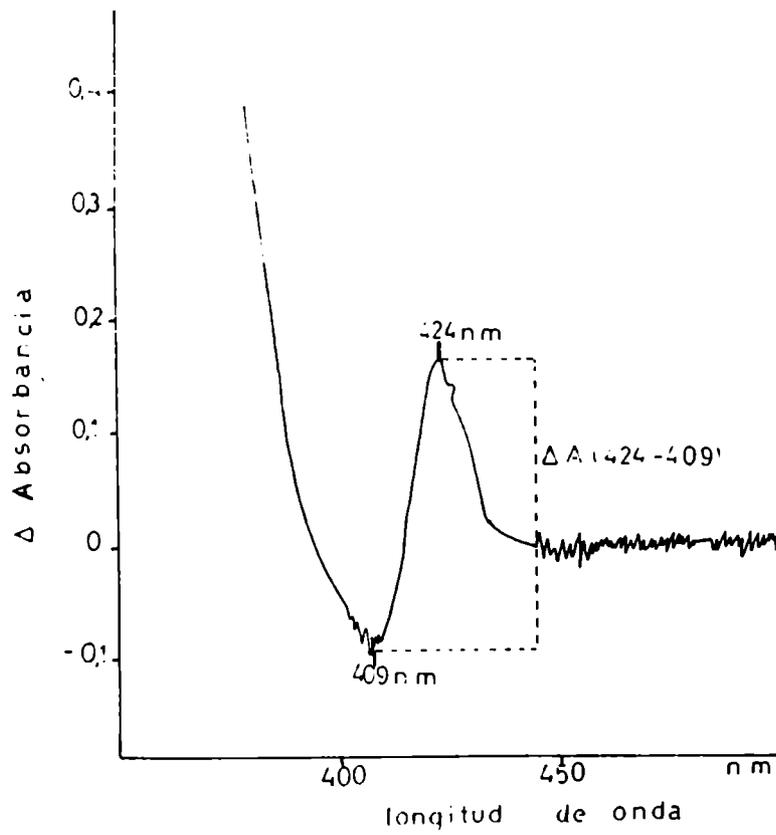


FIGURA 5: Espectro de diferencia entre microsomas con el citocromo b5 reducido (con NADH) y microsomas con el citocromo b5 oxidado (sin NADH). El incremento en absorbancia entre 409 y 424 nm es proporcional a la concentración de citocromo b5.

///

Zeiss PMQ II fue usado. Para esto, en dos cubetas se colocaron 0,24 ml de la suspensión microsomal de entre 1-2,5 mg de proteína/ml en buffer de tris-acetato 50mM pH 8,1 EDTA 1 mM. A una de las cubetas se le agregó 10 μ l de una solución de NADH 5 mM (reducido), y a la otra 10 μ l de agua (oxidado), y la diferencia en absorbancia fue registrada a 424 y a 409 nm. Los valores obtenidos de esta manera para el contenido de citocromo b₅ en las preparaciones microsomales, no difirieron significativamente de los obtenidos cuando se registró el espectro de diferencia con el espectrofotómetro de doble haz. Cuando las muestras contenían una baja cantidad de citocromo b₅ y un alto contenido de lípidos, como en el caso de los microsomas modificados, por la incorporación de lípidos exógenos, la gran turbidez de las suspensiones molestó en las determinaciones. En estos casos se agregó previamente a las mediciones de densidad óptica, 0,1% de desoxicolato de sodio. En microsomas sin tratar, las concentraciones de citocromo b₅ obtenidas con y sin el agregado de detergente fueron similares.

La cantidad de citocromo b₅ reductasa en las preparaciones microsomales fue estimada de la actividad NADH-ferricianuro reductasa a 25°C, asumiendo una actividad molecular de 23.000 μ moles de NADH oxidados por minuto por μ mol de enzima - (364).

II.5.- DETERMINACIONES ENZIMATICAS.

II.5.1.- Actividad de las enzimas desaturantes de ácidos grasos.

La actividad de las enzimas desaturantes fue determinada utilizando como sustrato los ácidos libres palmítico y linoleico, para la Δ^9 y la Δ^6 desaturasas respectivamente siguiendo la técnica descrita por Brenner (421, 373). Los sustratos radiactivos (1-C¹⁴) palmítico y (1-C¹⁴) linoleico (57 y 56 μ Ci/ μ mol respectivamente, 99% puros) fueron diluídos con los respectivos ácidos no marcados de manera de incubar 0,25 μ Ci por cada

///

tubo. La concentración de sustratos utilizada fue de 66 μ M, a menos que otra concentración se indique. En los casos en que se incubó una cantidad de sustrato menor, se mantuvo la misma cantidad de ácido marcado de manera de mantener la misma cantidad de radiactividad para poder detectarla por radiocromatografía. El volumen final del medio de incubación fue de 1,5 ml y su composición la siguiente: sacarosa 0,25 M, buffer fosfato potásico 41 mM pH 7,0; N-acetil cisteína 1,87 mM; NaF 41 mM; KCl 0,15 M; ATP 1,3 mM; CoA 0,06 mM; NADH 0,87 mM; $MgCl_2$ 5 mM; y nicotinamida 0,33 mM. Los sustratos fueron agregados al medio de incubación disueltos en propilenglicol (10 μ l de propilen glicol como máximo fueron agregados). La reacción se largó con el agregado de los microsomas (5 mg de proteína microsomal por tubo), con excepción de los experimentos en los que se estudió el efecto de alcoholes alifáticos en los que se largó por el agregado de los sustratos, y se incubó por 15 minutos a 37°C con agitación constante. Cuando se incubó a diferentes temperaturas, los tiempos de incubación fueron mayores a bajas temperaturas para mantener un nivel de conversión detectable. La reacción fue detenida por el agregado de 2 ml de KOH 10% en etanol.

Las muestras fueron saponificadas a 80°C durante 45 minutos en ambiente de N_2 . El medio fue acidificado con 0,5 ml de HCl concentrado, y los ácidos grasos fueron extraídos por medio de tres extracciones con 2 ml de éter de petróleo (30-40°C p.e.). El éter de petróleo fue evaporado y los ácidos grasos se esterificaron con 2 ml de metanol-HCl 3 N anhidro a 64°C durante 60 minutos bajo N_2 . El HCl y el metanol fueron eliminados por partición con agua y cloroformo como se indicó en la sección II.4.2.

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos fueron analizados por radiocromatografía gas-líquido. Para esto se utilizó un radiocromatógrafo Packard equipado con un contador proporcional. Aquí los compuestos son separados en la columna cromatográfica (EGSS-X 15% sobre Chromosorb WAW 80/100), mantenida a -

///

180°C cuando se midió la conversión de 18:2 a 18:3 y a 160°C para determinar la conversión de 16:0 a 16:1. Como gas carrier se utilizó argón, el que a su vez actúa como gas ionizable en la cámara del contador proporcional. A medida que son eluidos de la columna cromatográfica, los ésteres metílicos de los ácidos grasos son oxidados a CO_2 y H_2O en un horno de combustión a 900°C con CuO como oxidante. Al salir del horno de combustión, el agua es retenida en un tubo con $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ anhidro. Antes de ingresar en la cámara de conteo, al CO_2 y Ar se les suma propano seco en una proporción del 10% que actúa como gas extinguidor. El registro se realiza en forma diferencial en un registrador Honeywell. El porcentaje de sustrato convertido en producto fue calculado de las áreas de los picos obtenidas por triangulación. Con el porcentaje de conversión se calcula entonces, la actividad enzimática en pmoles de sustrato convertidos por minuto.

II.5.2.- Actividad del sistema de transporte de electrones.

La actividad de la flavoproteína citocromo b5 reductasa se determinó utilizando ferricianuro como aceptor exógeno de electrones (NADH-ferricianuro reductasa). La velocidad de reducción del citocromo b5 por la citocromo b5 reductasa, por otra parte, fue determinada con citocromo c como aceptor exógeno de electrones (actividad NADH-citocromo c reductasa). Estas actividades se determinaron espectrofotométricamente en un espectrofotómetro Carl Zeiss PMQ II, equipado con un sistema automático de registro del cambio de densidad óptica en función del tiempo. La termostatación de las cubetas donde se llevó a cabo la reacción se hizo con un termostatizador Lauda, a distintas temperaturas entre 5 y 40°C, manteniendo la temperatura constante dentro de $\pm 0,2^\circ\text{C}$.

La actividad NADH-ferricianuro reductasa se determinó siguiendo a 340 nm la oxidación del NADH. El volumen final de la reacción fue de 0,25 ml; y el medio de reacción contenía:

///

buffer tris-acetato 50 mM pH 8,1; EDTA 1mM; ferricianuro de potasio 3,0 mM; NADH 0,12 mM; y microsomas, entre 0,5-2,5 μ g de proteína por ml. La reacción se largó por el agregado del ferricianuro de potasio. Las pendientes de las curvas obtenidas (variación de absorbancia con el tiempo) fueron convertidas en velocidad de reacción utilizando un coeficiente de extinción de $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (358).

Para la determinación de la actividad NADH-citocromo c reductasa, se siguió en función del tiempo la reducción del citocromo c a 550 nm (358). El medio de incubación contenía: buffer tris-acetato 50 mM pH 8,1; EDTA 1 mM; NADH 0,12 mM; citocromo c 0,08 mM; y microsomas 0,5-2,5 μ g de proteína microsomal por ml; en un volumen final de 0,25 ml. En este caso la reacción fue largada por el agregado de NADH y para el cálculo de actividad se utilizó un coeficiente de extinción de $18,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

II.5.3.- Actividad del sistema de la glucosa-6-fosfatasa.

La actividad de la G-6-P fosfohidrolasa se determinó por el método de Baginsky y col. (422), midiendo el fosfato liberado en la reacción con molibdato de amonio, usando ácido ascórbico como agente reductor. El medio de incubación contenía: sacarosa 0,125 M; buffer cacodilato de sodio 25 mM pH 6,5; EDTA 0,5 mM; G-6-P 25 mM; y 0,1 mg de proteína microsomal por ml. El volumen final fue de 0,4 ml. La reacción se largó por el agregado de los microsomas con excepción de los estudios del efecto de alcoholes alifáticos en los que la reacción se largó por el agregado del sustrato. Cuando se determinó la actividad a menores temperaturas, el tiempo de incubación y/o la cantidad de microsomas fueron incrementados hasta 15 minutos y 0,3 mg de proteína por ml. La reacción fue detenida por el agregado de 2 ml de una solución de ácido tricloroacético 10% - ácido ascórbico 2%. De la misma manera se prepararon: un blanco de la misma composición con la excepción de que no se le agregó microso-

///

mas, un control en el cual los microsomas fueron agregados después de la solución tricloroacético-ascórbico (para descontar el fosfato proveniente de la preparación microsomal), y testigos en los que en lugar de microsomas se agregaron cantidades de fosfato conocidas.

Para la determinación del fosfato liberado en la reacción, las muestras se centrifugaron a 2.000 xg durante 10 minutos para precipitar las proteínas; y 0,5 ml de sobrenadante fueron transvasados a otro tubo. Al sobrenadante se le agregó en este orden: 0,25 ml de molibdato de amonio 1%; y 0,5 ml de una solución compuesta por arsenito de sodio 2% (p/v) - citrato de sodio 2% (p/v) - ácido acético 2% (v/v). Esta última solución tiene la función de estabilizar el sistema, eliminando el exceso de molibdato de manera que este no pueda reaccionar con los ésteres de fosfato, o con fosfato formado por hidrólisis ácida del sustrato. Se dejó desarrollar el color durante 20 minutos, y entonces se leyó la densidad óptica a 700 nm.

Para determinar la actividad del componente hidrolítico del sistema G-6-Pasa (407), los microsomas fueron previamente tratados con Triton X-100 o con desoxicolato de sodio para romper la barrera de permeabilidad de las vesículas microsomales. A 9 volúmenes de suspensión microsomal (5 mg de proteína/ml), se le agregó un volumen de Triton X-100 1% o de desoxicolato de sodio 1%. Se dejó durante 10 minutos a 4°C, y luego se determinó la actividad de hidrólisis de G-6-P de la misma manera que en microsomas intactos.

11.5.4.- Curvas de Arrhenius.

Para construir las curvas de Arrhenius, las actividades enzimáticas fueron determinadas a distintas temperaturas entre 10 y 40°C. La temperatura fue medida con una exactitud de $\pm 0,2^\circ\text{C}$, con un termómetro digital con el sensor sumergido en una cubeta testigo en el caso de las determinaciones espectrofotométricas, o en un tubo testigo para las otras determinaciones

Las curvas fueron trazadas por el método de los cuadrados mínimos. Mediante el análisis estadístico de las regresiones, se calculó el error standard y el intervalo de confianza del 95% para las pendientes de las curvas y las energías de activación aparentes obtenidas de las mismas.

11.5.5.- Latencia de la actividad manosa-6-fosfatasa.

Aún las preparaciones microsomales no tratadas, contienen dos tipos de estructuras: a) vesículas intactas y b) estructuras rotas que carecen de una barrera de permeabilidad (398, 399). La actividad de bajo Km de la M-6-P fosfohidrolasa, únicamente es expresada en los microsomas rotos, ya que los microsomas "intactos" son completamente impermeables a la M-6-P a esta concentración (399). Así, la proporción de los dos tipos de estructuras puede ser fácilmente determinada midiendo la actividad M-6-Pasa antes y después del tratamiento de los microsomas con detergentes.

La actividad M-6-Pasa fue determinada en microsomas no tratados y en microsomas tratados con triton X-100 0,1% de la misma manera como se determinó la actividad G-6-Pasa, con la excepción de que la G-6-P 25 mM en el medio de incubación fue reemplazada por M-6-P 1 mM. En algunos casos, se utilizó desoxicolato de sodio 0,1% en lugar de Triton X-100, para romper la barrera de permeabilidad. El porcentaje de latencia es la proporción de actividad que es expresada únicamente después de romper la barrera de permeabilidad de las vesículas microsomales, y corresponde a la proporción de enzima que se encuentra en vesículas "intactas".

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

II.6.- DETECCION DE LA TRANSICION DE FASE ORDEN-DESORDEN POR LIGHT SCATTERING (88).

El uso de este método para la detección de transiciones de fase orden-desorden en sistemas lipídicos se basa en la diferente capacidad que presentan las estructuras lipídicas para dispersar la luz, cuando se hallan en el estado ordenado o cuando se hallan en el estado desordenado. La intensidad de luz dispersada aumenta notoriamente cuando la estructura de los lípidos cambia del estado fluido al estado cristalino. Esto sería debido al aumento del grado de empaquetamiento de las cadenas hidrocarbonadas que acompañan a este cambio de estado.

La luz dispersada en un ángulo de 90° , fue medida en función de la temperatura. Para esto se utilizó un espectrofluorómetro Aminco-Bowman y las mediciones se hicieron con ambos monocromadores de excitación y de emisión a 400 nm. La temperatura fue regulada con un termostatizador Lauda y fue variada entre 5 y 40°C a razón de $0,5-1^\circ\text{C}$ por minuto. La temperatura fue medida directamente en la cubeta con un termómetro digital con salida para un registrador, con el sensor ubicado en la cubeta en un lugar que no interfiere el paso de luz. La intensidad de light scattering a 90° y la temperatura fueron ambas registradas continuamente en un registrador de doble canal Packard. Un canal fue conectado a la salida del fotomultiplicador del espectrofotómetro, y el otro a la salida del termómetro digital. Debido a que la variación de temperatura no fue lineal con el tiempo fue necesaria la transformación de las curvas obtenidas. Además, por conveniencia para la comparación con las curvas de Arrhenius, la intensidad de light scattering se graficó en función de la inversa de la temperatura absoluta.

Las determinaciones se hicieron en suspensiones de microsomas (normales o modificados) de aproximadamente $0,25$ mg de proteína/ml, en un volumen de $1,5$ ml. Para las determinaciones en dispersiones de los lípidos microsomales libres de proteína, los lípidos fueron extraídos como se indicó en la sección II.4.2, y los liposomas se prepararon haciendo una dispersión de $1,5$

///

mg de lípido por ml de agua, sonicando 3 minutos a 32°C bajo un flujo de N₂. Esta dispersión se diluyó 15 veces para hacer las determinaciones.

II.7.- DETECCION DE LA TRANSICION DE FASE POR LA FLUORESCENCIA DE N-FENIL-1-NAFTILAMINA (88, 236).

La N-fenil-1-naftilamina presenta la propiedad de que es altamente fluorescente cuando se halla en un medio hidrofóbico, pero su rendimiento cuántico es prácticamente nulo en un medio de alta polaridad como el agua. Además, este compuesto es muy soluble en estructuras lipídicas en el estado fluído, pero es bastante menos soluble cuando los lípidos se hallan en el estado ordenado. Así, en dispersiones acuosas de estructuras lipídicas líquido-cristalinas, este compuesto se particiona de manera muy favorable en la fase lipídica con respecto a la fase acuosa, presentando una alta intensidad de fluorescencia. Cuando los lípidos sufren un cambio de estado y forman una fase ordenada, gran parte de la N-fenil-1-naftilamina es excluida de esos dominios y pasa a la fase acuosa donde no es fluorescente. De esta manera se observa una brusca disminución en la emisión de fluorescencia al cambiar los lípidos del estado fluído al estado cristalino.

Por encima o por debajo del rango de la transición de fase, la intensidad de fluorescencia es dependiente de la temperatura aún sin que haya un cambio de fase. La dependencia es de tipo exponencial, y es rectificada graficando el logaritmo de la intensidad de fluorescencia emitida en función de la inversa de la temperatura absoluta. Así, estas curvas son lineales en los rangos de temperatura donde no hay cambio de fase, y se alejan de la linealidad presentando cambios de pendiente en el rango de temperatura en que ocurre una transición de fase.

Para la preparación de las muestras, a 5 ml de la suspensión microsomal conteniendo 0,5 mg de proteína por ml., se agregaron 5 µl de una solución metanólica de N-fenil-1-naftil-

///

amina (1mg/ml), para dar una concentración final de $4,5 \cdot 10^{-6}$ M. El contenido de metanol fue mantenido siempre debajo del 3% (v/v) para evitar alguna influencia sobre la estructura de los lípidos de la membrana. Las muestras se sonicaron en un sonicador Ultrasonics por 10 segundos a 0°C e incubadas durante 10 minutos a 37°C bajo N₂, antes de hacer las determinaciones. Cuando las determinaciones se hicieron con liposomas de los lípidos microsomales, estos se prepararon como para las determinaciones de light scattering. La incorporación del marcador se realizó - agregando la solución metanólica de N-fenil-1-naftilamina a una suspensión de liposomas de 0,15 mg de lípidos por ml, de manera que el marcador quede en una concentración final de $4,5 \cdot 10^{-6}$ M, y entonces se incubó por 15 minutos a 42°C bajo N₂.

La dependencia de la temperatura de la fluorescencia emitida por la N-fenil-1-naftilamina fue medida en un espectrofluorómetro Aminco Bowman a una longitud de onda de 350 nm para el monocromador de excitación, y de 420 nm para el monocromador de emisión. Un filtro de NO₂Na 2,0 M, que deja pasar únicamente la luz de longitud de onda superior a 390 nm, fue colocado a la salida del monocromador de emisión para eliminar la posible intensidad debida a light scattering. El registro de las curvas - se realizó de la misma manera que para las determinaciones de light scattering en un registrador de doble canal. Las curvas - obtenidas de esta manera fueron convertidas en logaritmo de la intensidad de fluorescencia en función de la inversa de la temperatura absoluta.

II.8.- POLARIZACION DE FLUORESCENCIA.

II.8.1.- Teoría general.

Las aplicaciones de la polarización de fluorescencia a estudios de sistemas biológicos se han expandido rápidamente desde el trabajo pionero de Weber (423). En todos estos estudios se utilizan generalmente fluoróforos aromáticos, en los - cuales los procesos de excitación y de emisión involucran dipo-

///

los de transición electrónica exclusivamente. Estos dipolos de transición presentan una orientación bien definida en la molécula del fluorómetro. Cada banda de absorción tiene un determinado dipolo de excitación, pero la fluorescencia está asociada generalmente a un único dipolo de emisión. Ambos dipolos, de excitación y de emisión, están en el plano del anillo aromático de la molécula y están desplazados entre sí por un determinado ángulo α

Para una molécula individual del fluoróforo, iluminada con luz monocromática totalmente polarizada, la probabilidad de absorción es proporcional al coseno del ángulo formado entre el dipolo de excitación y el plano que coincide con el campo eléctrico de la luz polarizada. Así, la probabilidad de absorción es máxima cuando el dipolo de excitación está en el plano del campo eléctrico de la luz polarizada con que se excita, y es nula cuando el dipolo de excitación es perpendicular a dicho plano. De la misma manera, la probabilidad de que la fluorescencia de una molécula individual del fluoróforo excitada, sea emitida con el plano de su campo eléctrico coincidente con la dirección del dipolo de emisión es máxima, y es nula la probabilidad de que sea emitida con el plano de su campo eléctrico perpendicular a la dirección del dipolo de emisión. La probabilidad de que la luz emitida tenga el plano del campo eléctrico orientado a un ángulo determinado con respecto a la dirección del dipolo de emisión es proporcional al coseno de dicho ángulo.

Para una solución del fluoróforo, la absorción solo puede ser polarizada si las moléculas presentan una orientación preferencial. Si las moléculas están orientadas completamente al azar en un medio isotrópico, la absorción será completamente depolarizada, e independiente de la dirección de iluminación. Sin embargo, si una solución isotrópica del fluoróforo, es iluminada con luz polarizada, debido a que son excitadas preferencialmente aquellas moléculas que presentan una orientación adecuada, la fluorescencia emitida puede ser parcialmente polarizada

///

da.

Comúnmente, la polarización de fluorescencia se mide por medio de la excitación con luz monocromática polarizada verticalmente. La intensidad de emisión es detectada a un ángulo de 90° con respecto a la excitación, a través de un segundo polarizador (analizador), orientado paralelo (I_{||}) o perpendicular (I_⊥) a la dirección de la polarización de la luz de excitación. Los valores absolutos para la polarización de fluorescencia son comúnmente expresados como I_{||}/I_⊥, P, o r, los cuales se definen a continuación:

$$P = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + I_{\perp}} = \frac{I_{||}/I_{\perp} - 1}{I_{||}/I_{\perp} + 1} = \text{grado de polarización de fluorescencia}$$

1

$$r = \frac{I_{||} - 2I_{\perp}}{I_{||} + 2I_{\perp}} = \frac{I_{||}/I_{\perp} - 2}{I_{||}/I_{\perp} + 2} = \frac{2P}{3-P} = \text{anisotropía de fluorescencia}$$

La intensidad de fluorescencia total está dada por: $F = I_{||} + 2I_{\perp}$

La polarización de fluorescencia emitida por un fluoróforo en un medio isotrópico depende del ángulo α entre las direcciones de los dipolos de excitación y de emisión (propiedad característica para cada fluoróforo), y de la pérdida de orientación que sufren las moléculas durante el tiempo de vida del estado excitado. La pérdida de orientación, a su vez depende de la velocidad de rotación de la molécula del fluoróforo y del tiempo de vida medio del estado excitado.

En una solución congelada, en la cual las moléculas excitadas mantienen su orientación durante el tiempo de vida del estado excitado, los valores de polarización límite son (48):

$$\frac{I^{\circ}_{||}}{I^{\circ}_{\perp}} = \frac{2 \cos^2 \alpha + 1}{2 - \cos^2 \alpha} \quad P^{\circ} = \frac{3 \cos^2 \alpha - 1}{\cos^2 \alpha + 3} \quad r^{\circ} = \frac{3 \cos^2 \alpha - 1}{5} \quad 2$$

De estas ecuaciones se pueden calcular los límites entre los cuales puede variar la polarización límite en un medio congelado. Como en un medio fluido la rotación de las moléculas contribuirá a una disminución de la polarización, los valores de polarización en cualquier medio siempre se encontrarán dentro de estos límites:

$$\frac{1}{2} < \frac{I_{\parallel}}{I_{\perp}} < 3 ; \quad -\frac{1}{3} < P < \frac{1}{2} ; \quad -\frac{1}{5} < r < \frac{2}{5}$$

En el caso en que los dipolos de absorción y de emisión sean paralelos, como ocurre en el caso en que la excitación se realice en la última banda de absorción del fluoróforo, lo cual ocurre en la mayoría de las mediciones de fluorescencia, $\alpha = 0$ y los valores límites de polarización en un medio congelado son:

$$I_{\parallel}^{\circ}/I_{\perp}^{\circ} = 3 ; \quad P^{\circ} = 1/2 ; \quad r^{\circ} = 2/5$$

Sin embargo, estos valores teóricos de polarización límite son raramente alcanzados, debido a un gran número de causas (424). Las ecuaciones anteriores son válidas únicamente cuando la orientación de las moléculas del fluoróforo es completamente al azar. En los casos de fluoróforos incorporados en un medio anisotrópico, como por ejemplo en membranas biológicas o artificiales, el fluoróforo puede presentar ciertas orientaciones preferenciales dentro de la bicapa lipídica. Sin embargo, la orientación de las mismas membranas en una suspensión acuosa es completamente al azar, lo que hace que las ecuaciones anteriores sean válidas.

II.8.2.- Polarización de fluorescencia en medios fluidos.

El análisis de la fluorescencia en sistemas dinámicos puede ser realizado por mediciones del decaimiento de la polarización de fluorescencia luego de una excitación con un pulso, o por medio de determinaciones con una excitación continua. En -

///

el segundo caso, el cual es el mas común y el utilizado en nuestras experiencias, los resultados obtenidos son un promedio de las características de todo el sistema; en cambio las determinaciones del primer tipo pueden dar información de la heterogeneidad del sistema y en algunos casos permiten la resolución de subpoblaciones.

La depolarización rotacional de la fluorescencia ocurre cuando las moléculas excitadas se desplazan de su orientación original durante el tiempo de vida del estado excitado. En las mediciones con excitación continua, la ecuación que describe la relación general entre la depolarización de la fluorescencia de un fluoróforo y las propiedades hidrodinámicas del medio en que se encuentran, es conocida como la ecuación de Perrin:

$$\frac{r^0}{r} = 1 + \frac{3K}{\lambda} = 1 + \frac{3\tau}{\rho} \quad 3$$

donde λ , la velocidad de emisión, es la recíproca del tiempo de vida medio del estado excitado τ ; y K es la constante de velocidad de intercambio de orientación entre dos ejes definidos, y ρ es la recíproca del tiempo de relajación rotacional ρ

Para una estructura esférica, el tiempo de relajación rotacional ρ está dado por la ecuación de Stokes-Einstein:

$$\rho = \frac{3v\eta}{kT} \quad 4$$

donde v es el volúmen efectivo de la esfera, η es la viscosidad del medio, k es la constante de Boltzmann y T es la temperatura absoluta. Por lo tanto al reemplazar, la ecuación de Perrin queda:

$$\frac{r^0}{r} = 1 + \frac{kT\tau}{v\eta} \quad 5$$

Sin embargo, la estructura de los fluoróforos se aleja bastante de lo que es una esfera, y tienen una serie de modos rotacionales, los cuales influyen de manera diferente en el proceso de depolarización de la fluorescencia. Además, la contribución de cada modo de rotación puede variar a su vez considerablemente al variar la velocidad de rotación. La ecuación de Perrin puede ser escrita como:

$$\frac{r^o}{r} = 1 + C(r) \frac{\tau}{\eta} \quad 6$$

donde $C(r)$ es un parámetro que depende de la forma y del tamaño de la molécula del fluoróforo, y varía con el grado de polarización. Así, para una esfera, $C(r)$ es constante e igual a k/v , pero para casi todas las demás estructuras, $C(r)$ no es constante y puede variar considerablemente con r .

La ecuación de Perrin fue usada para la determinación de ρ y de los parámetros hidrodinámicos relacionados, principalmente en proteínas (425). En principio, también puede ser usada la determinación de τ o η . La última posibilidad ha sido últimamente ampliamente explotada en estudios de la dinámica de estructuras lipídicas naturales o artificiales. Para este propósito, un marcador fluorescente con propiedades espectrales bien conocidas (426) es introducido selectivamente en la región analizada y la polarización de fluorescencia del sistema marcado es medida por excitación con luz monocromática polarizada verticalmente. Con la ayuda de los demás parámetros en la ecuación de Perrin, es posible calcular η , o más específicamente, la viscosidad promedio que se opone a las rotaciones del marcador (microviscosidad).

11.8.3.- Viscosidad en estructuras líquido-cristalinas. Concepto de microviscosidad.

La viscosidad de un líquido isotrópico es la fuerza friccional intermolecular que se opone al flujo. El coeficiente

///

de viscosidad η , o simplemente la viscosidad, es definida como la fuerza longitudinal por unidad de area f (dinas. cm^{-2}) que es requerida para mantener una diferencia de una unidad en la velocidad de flujo ($\text{cm} \cdot \text{seg}^{-1}$) entre dos capas paralelas separadas por una unidad de longitud (cm):

$$\eta = \frac{f \cdot l}{\Delta v} \quad 7$$

En el sistema c.g.s., la unidad de η es 1 dina. seg/cm^2 , lo que se define como 1 P (poise). La recíproca de la viscosidad es llamada fluidez $\phi = 1/\eta$, y sus unidades son P^{-1} .

En estructuras líquido-cristalinas, como en bicapas lipídicas, la verdadera viscosidad no es por supuesto isotrópica, y existen diferentes viscosidades a lo largo de cada eje de simetría. Para relacionar estas viscosidades intrínsecas a la de un sistema isotrópico-macroscópico, es apropiado definir el término "microviscosidad", $\bar{\eta}$ como la media geométrica de las viscosidades aparentes a lo largo de los distintos ejes de simetría:

$$\bar{\eta} = \left(\prod_i^n \eta_i \right)^{1/n} \quad 8$$

La microviscosidad debe ser tomada como un término operacional que fue introducido para la aplicación de las ecuaciones hidrodinámicas clásicas a regiones fluídas microscópicas como las bicapas lipídicas de las membranas. Como ha sido mostrado por Shinitzky y Barenholz (48), la simulación entre micro- y macroviscosidad se sostiene excepcionalmente bien, lo que da una gran ventaja práctica al término $\bar{\eta}$. En sistemas heterogéneos, como son las membranas biológicas, la microviscosidad obtenida será un promedio de los distintos dominios, y por supuesto también dependerá de la partición del fluoróforo marcador entre las diferentes regiones. El 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH), sin embargo, parece particionarse igualmente en-

///

tre dominios fluídos y dominios ordenados (48), en cambio otros marcadores como el 12-(9-antioiloxi)-estearato se particionan - preferiblemente en los dominios fluídos (427).

11.8.4.- Cálculo de la microviscosidad del grado de polarización de fluorescencia.

Una determinación rigurosa de $\bar{\eta}$ requiere de procedimientos especiales para evaluar $C(r)$ y τ . En principio τ puede ser medido directamente por técnicas especiales, o indirectamente de la dependencia de la temperatura de la intensidad total de fluorescencia (427, 428). $C(r)$ puede ser calculada experimentalmente midiendo la dependencia de r^0/r de $T \cdot \tau / \eta$ en un solvente de referencia que tenga una constante dieléctrica y viscosidad similar a la de la región de la membrana en la cual se ubica el fluoróforo. La viscosidad debe ser exactamente conocida en un rango amplio de temperatura.

Sin embargo, afortunadamente, la variación de $C(r)$ o de τ entre una serie de sistemas marcados con el mismo fluoróforo con la temperatura es considerablemente menor que la variación de $\bar{\eta}$. Además, el incremento de la temperatura produce una disminución en $C(r)$ y τ de tal manera que el producto $T \cdot \tau \cdot C(r)$ permanece aproximadamente constante (48). Si la ecuación 6 es reordenada de la forma:

$$\left(\frac{r^0}{r} - 1\right)^{-1} = \frac{\bar{\eta}}{T \cdot \tau \cdot C(r)} \quad 9$$

podemos ver que el término $(r^0/r - 1)^{-1}$ puede ser utilizado como un parámetro de microviscosidad, que puede dar información relativa entre sistemas marcados con el mismo fluoróforo, o para estudiar la variación de $\bar{\eta}$ con la temperatura. El factor $T \cdot \tau \cdot C(r)$ ha sido evaluado experimentalmente (48), graficando $(r^0/r - 1)^{-1}$ versus $\bar{\eta}$ para una serie de valores publicados para diferentes tipos de liposomas y membranas a diferentes temperaturas, las -

///

cuales fueron marcadas con DPH. Este gráfico dio una línea recta cuya pendiente $C(r) \cdot T \cdot \tau$ dio 2,4 P. Si se substituye este valor en la ecuación 9, se obtiene la expresión simple:

$$\bar{\eta} = \frac{2,4 r}{r^0 - r} \quad 10$$

que permite estimar la microviscosidad de sistemas marcados con DPH, midiendo únicamente la polarización de fluorescencia.

II.8.5.- Grado de ordenamiento estructural en las membranas. Parámetro de orden (SDPH).

Según Shinitzky e Imbar (429), la pendiente del gráfico del $\log \bar{\eta}$ versus $1/T$, podría servir como una indicación del grado de orden en el interior de las bicapas lipídicas. Utilizando un fluoróforo planar (1-dimetilamino naftaleno-5-sulfoamida), fue posible resolver los modos de rotación en y fuera del plano, y la relación de las microviscosidades aparentes que se oponen a ambos modos de rotación fue usada como una estimación del grado de orden (430).

Ultimamente, mediciones del decaimiento de la anisotropía de fluorescencia en función del tiempo en el orden de nanosegundos luego de un corto pulso de luz polarizada, en membranas de lípidos puros (431-433), en membranas conteniendo colesterol (434, 435) y en membranas biológicas (436, 437), han mostrado lo siguiente: Inicialmente, debido a la fotoselección por la luz polarizada, los dipolos de emisión están orientados cercanamente paralelos a la dirección de la polarización de la luz de excitación (si se excita en la última banda de absorción), y la anisotropía de fluorescencia es alta, cercanamente igual al r^0 teórico. Debido a la difusión rotacional del fluoróforo, la orientación de los dipolos de emisión llega a ser cada vez mas desordenada y la anisotropía de fluorescencia decae exponencialmente. En solventes isotrópicos como aceites, la anisotro-

///

pía de fluorescencia decrece hasta cero, pero en membranas lipídicas se alcanza un nivel finito r_∞ , debido a que el fluoróforo no asume todas las orientaciones posibles con igual probabilidad luego de un prolongado período de tiempo, indicando que la distribución final de los dipolos de emisión es anisotrópica. Así, el valor de r_∞ da información sobre el ordenamiento estructural de la membrana.

La relación r_∞/r^0 , que fue llamada el grado de "restricción orientacional" por Kinosita y col. (438), fue posteriormente reconocida como el cuadrado del parámetro de orden S , (439, 440), deducido de estudios de ESR y NMR. Los valores de S pueden depender de la técnica, del tipo y la localización del marcador. En sistemas marcados con DPH, S_{DPH} se refiere a la posición media del marcador a lo largo de las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos (441), opuestamente a los parámetros de orden locales de un segmento particular de las cadenas hidrocarbonadas determinados por ESR y NMR, los cuales disminuyen hacia el final de la cadena de los restos acilos. Los valores de S_{DPH} calculados para liposomas de DPPC (439, 440), concuerdan con los valores de S determinados por NMR para el segmento de los carbonos 10-12 de las cadenas hidrocarbonadas, y se sugirió que esta podría ser la localización de las moléculas de DPH.

El valor de r_∞ , necesario para el cálculo del parámetro S_{DPH} , puede ser determinado directamente por mediciones de decaimiento de la anisotropía de fluorescencia, para lo cual son necesarios equipos sofisticados. Sin embargo, ha sido mostrado por Van Blitterwijk y col. (442), que r_∞ puede ser obtenido de mediciones con excitación continua. El decaimiento de la anisotropía de fluorescencia puede ser expresado como:

$$r(t) = (r^0 - r_\infty) e^{-(t/\rho)} + r_\infty \quad 11$$

en la cual r^0 es la máxima anisotropía de fluorescencia obtenida en la ausencia de movimiento rotacional del fluoróforo, y ρ

es el tiempo de correlación rotacional para la reorientación - del eje mayor de la molécula. La intensidad de fluorescencia t_0 tal sigue un decaimiento exponencial simple:

$$F(t) = 1/\tau e^{-t/\tau} \quad 12$$

entonces, la anisotropía de fluorescencia con iluminación contínua es:

$$r_s = \frac{\int_0^{\infty} r(t) F(t) dt}{\int_0^{\infty} F(t) dt} \quad 13$$

lo cual da:

$$r_s = \frac{r^0 - r_{\infty}}{1 + \tau/\rho} + r_{\infty} = r_f + r_{\infty} \quad 14$$

en la cual r_f representa el componente cinético o de rápido decaimiento y r_{∞} el componente de decaimiento infinitamente lento, que está determinado por la anisotropía o el orden estructural de la membrana. Del gráfico de los datos experimentales de r_s y r_{∞} para una gran variedad de membranas biológicas y artificiales marcadas con DPH, obtenidos de la literatura, pudo observarse que la resolución de r_s en r_f y r_{∞} es única en el sentido de que si dos membranas tienen el mismo r_s , ellas tienen - casi idéntico r_{∞} (442). La contribución de r_{∞} a r_s es nula para valores muy pequeños de r_s , y llega a ser cada vez mas importante al aumentar r_s , hasta alcanzar el 100% del valor de r_s para valores de r_s grandes. En la región $0,13 < r_s < 0,28$, la curvva es lineal siguiendo la ecuación:

$$r_{\infty} = 4/3 r_s - 0,10 \quad 15$$

Así, los valores de r_{∞} pueden calcularse con el valor de r_s obtenido de mediciones con excitación contínua con la ecuación 15 para valores de r_s entre 0,13 y 0,28; o con la curva empírica -

///

de Van Blitterswijk y col. (442) para valores de r_s que caen fuera de este rango. El parámetro de orden S_{DPH} es entonces calculado directamente de:

$$S_{DPH} = \sqrt{\frac{r_{\infty}}{r^{\circ}}} \quad 16$$

donde r° es el valor de polarización límite del fluoróforo en un medio congelado. Para el DPH se han reportado valores de r° de 0,395 (432); 0,390 (433); y de 0,362 (428). En nuestro caso usamos directamente el valor teórico de 0,4 tal como recomendaron Van Blitterswijk y col. (442).

II.8.6.- Procedimiento experimental.

En estos estudios de polarización de fluorescencia se utilizó DPH como fluoróforo marcador. Las ventajas del DPH para estudios en membranas han sido dadas por Shinitzky y Barenholz (48). Este presenta un alto rendimiento cuántico en medios hidrofóbicos y una fluorescencia despreciable en medios acuosos, como todos los fluoróforos aromáticos; y es fácilmente incorporado en sistemas lipídicos. Sus características espectrales (ver sección III-1.3.2) lo hacen muy ventajoso para este tipo de estudios.

Para realizar la incorporación del DPH en la membrana microsomal, a menos que otra cosa se indique, 1 μ l de una solución de DPH 10^{-3} M en tetrahidrofurano fueron agregados a 3,5 ml de una solución de sacarosa 0,25 M-EDTA 1,0 mM; agitando vigorosamente. Esto produce dispersiones claras, estables y prácticamente no fluorescentes del marcador en un medio acuoso. Sobre esta se agregó una cantidad de suspensión microsomal conteniendo 200 μ g de proteína, y se completó a un volumen de 4 ml con la solución de sacarosa-EDTA. De esta manera queda una concentración final de 0,25 μ M de DPH y de aproximadamente 25 a 30 μ M en lípidos. Cuando se realizaron mediciones con liposomas de -

///

DMPC, se utilizó la misma concentración de DPH, y una concentración de liposomas de 100 μg de lípido/ml; y los liposomas se prepararon por sonicación durante 5 minutos a 28°C de 2 mg de DMPC en 1 ml de sacarosa 0,25 M-EDTA 1,0 mM. La incorporación del DPH en la zona hidrofóbica de las membranas puede ser seguida por el incremento en la intensidad de fluorescencia (sección III.1.3.2). Se dejó agitando durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad antes de hacer las mediciones. Conjuntamente con cada muestra se preparó un blanco exactamente de la misma manera, con la excepción de que en lugar de la solución de DPH se agregaron 2 μl de tetrahidrofurano. Estos blancos sirvieron para descontar la contribución del light scattering a la señal de fluorescencia.

Las mediciones de polarización y los espectros de emisión y de excitación fueron realizados en un espectrofotómetro Aminco Bowman equipado con dos polarizadores "glan" desmontables y ubicables en posición vertical u horizontal, uno a la salida del monocromador de excitación y el otro a la entrada del monocromador de emisión (analizador). Los espectros fueron registrados con un registrador x - y Hewlitt-Packard, mientras que el seguimiento de la intensidad de fluorescencia con el tiempo se realizó con un registrador Sargent Welch. La temperatura fue mantenida con un termostatzador Lauda y medida con un termómetro digital con el sensor ubicado en un lugar de la cubeta sin que interfiera el haz de luz.

Para las mediciones de polarización se exitó a 352 nm con luz polarizada verticalmente, y la intensidad de fluorescencia fue medida a 435 nm con el analizador en posición vertical (I_{||}), o en posición horizontal (I_⊥). Una solución de NO_2Na 2,0 M fue utilizada como un filtro que permite pasar únicamente la luz de longitud de onda superior a 390 nm, la cual fue colocada a la salida del monocromador de emisión para disminuir la contribución del scattering de la luz de excitación a la señal de fluorescencia que llega al fotomultiplicador. Sin embargo, a pe

///

sar del filtro, fue necesario aplicar una corrección por light scattering a $I_{//}$ e I_{\perp} ; a las cuales se descontaron los respectivos $I_{//}$ e I_{\perp} de los blancos preparados sin DPH.

Dos tipos de errores en las mediciones de polarización son producidos por el light scattering (428). Uno es la contribución a la señal de fluorescencia por el scattering de la luz de excitación. Esta contribuirá principalmente a un incremento en $I_{//}$, y se corrige fácilmente como se indicó. El otro error es debido al scattering de la luz emitida por fluorescencia, el cual puede producir una depolarización adicional que puede ser importante en soluciones de gran turbidez, pero fue despreciable bajo nuestras condiciones de medición (ver sección III.1.3).

Fue necesario también aplicar una segunda corrección debida a factores instrumentales de error. Un factor de corrección G , fue calculado excitando con luz polarizada horizontalmente y midiendo la fluorescencia con el analizador en posición horizontal (I_{hh}) y vertical (I_{hv}) respectivamente. La relación I_{hh}/I_{hv} es el factor de corrección G . Bajo condiciones ideales, G sería igual a 1. Sin embargo, debido a imperfecciones en la geometría de la celda y otros factores instrumentales puede haber una cierta polarización no debida a las muestras. Este factor G es constante si se mantienen constantes las condiciones instrumentales como el ancho de los slits y usando las mismas cubetas, etc.; y fue de 0,92 en las condiciones normales de medición.

La polarización y la anisotropía de fluorescencia se calcularon de las siguientes ecuaciones:

$$p = \frac{I_{//} - G.I_{\perp}}{I_{//} + G.I_{\perp}} \quad r = \frac{I_{//} - G.I_{\perp}}{I_{//} + 2.G.I_{\perp}}$$

donde $I_{//}$ e I_{\perp} son las intensidades ya corregidas por la contribución del light scattering. Con estos valores de anisotro-

///

pía, se calcularon la \bar{n} y el parámetro S_{DPH} , mediante las ecuaciones 10, 15 y 16 utilizando un valor de 0,4 para r° (442).

11.9.- DETERMINACIONES DE RESONANCIA ELECTRONICA PARAMAGNETICA.

11.9.1.- Teoría general. Principios básicos.

La característica básica de la resonancia electrónica paramagnética es su capacidad para detectar electrones desapareados. La propiedad esencial detectada es el momento magnético asociado con el spin del electrón. La aplicación de un campo magnético externo a una muestra de una sustancia con electrones desapareados divide a estos electrones en dos grupos: aquellos con su spin alineado paralelo y aquellos con su spin antiparalelo a la dirección del campo magnético aplicado. Los electrones con su momento magnético alineado paralelo a la dirección del campo magnético tendrán su energía reducida en una cantidad $1/2 g\beta H$, mientras que los alineados antiparalelos tendrán su energía incrementada en la misma cantidad, y se producirán dos niveles de energía (niveles Zeeman). Aquí $1/2$ viene el número cuántico del spin electrónico igual a $\pm 1/2$, el factor β es llamado el magnetón de Bohr que convierte las unidades de momento angular en momento magnético, g es una constante adicional, el factor de separación espectroscópico, y H es la intensidad del campo magnético aplicado exteriormente.

Si conjuntamente con el campo magnético externo, se aplica una radiación electromagnética; esta será absorbida y se inducirá la transición del nivel de energía inferior al superior, si se produce la condición de resonancia de manera que la energía del cuanto de la radiación $h\nu$ sea igual a la diferencia de energía entre ambos niveles Zeeman, esto es:

$$h\nu = g\beta H \quad 1$$

Así, los espectros de ESR pueden ser determinados igualmente - manteniendo fija la intensidad del campo magnético aplicado H ,

y variando la frecuencia de la radiación electromagnética; o a la inversa, manteniendo fija la frecuencia de la radiación y variando H . De esta última manera es como funcionan la mayoría de los espectrómetros de ESR. De acuerdo con la ecuación 1, la condición de resonancia se podrá cumplir con una radiación electromagnética de cualquier frecuencia, simplemente aplicando la apropiada intensidad de campo magnético. Sin embargo, la intensidad de la absorción depende de la diferencia de población entre los niveles y según la ley de Maxwell-Boltzman, la distribución de población está dada por la diferencia de energía entre los niveles a una dada temperatura:

$$\frac{N_1}{N_2} = e^{-h\nu/kT} \quad 2$$

Así, para aumentar la intensidad de absorción y la sensibilidad del método, N_1/N_2 se hace lo mas grande posible utilizando altas intensidades de campo magnético y radiación de alta frecuencia. Algunos espectrómetros funcionan en la región de radiofrecuencia, y otros mas sensibles en la región de microondas.

Para un electrón completamente libre con ningún movimiento orbital, en el cual todo su momento angular surge de su spin, el factor g de la ecuación 1 es de 2,0023. Un gran número de radicales libres, en los cuales el electrón tiene un orbital molecular ampliamente deslocalizado, tienen valores de g cercanos a este, indicando muy poco acoplamiento a un orbital atómico. Por otro lado, si el electrón se está moviendo en un orbital atómico asociado con un único átomo, puede poseer un considerable momento angular orbital, y g estará dado por:

$$g = 1 + \frac{J(J+1) + S(S+1) - L(L+1)}{2J(J+1)} \quad 3$$

donde J , S , y L son los números cuánticos que definen el spin total y los momentos magnéticos orbitales. Si el electrón desa-

///

pareado no está asociado con un átomo libre, sino con un átomo contenido en una red cristalina sólida o en una estructura molecular, como casi siempre es el caso, los campos eléctricos actúan sobre los estados de los orbitales y pueden alterar radicalmente sus energías, y por lo tanto la ecuación 3 ya no es aplicable (443).

Varios tipos de interacciones pueden ocurrir en un sistema paramagnético. Estas se pueden manifestar dependiendo de la naturaleza del sistema y del medio en el que se halla. Las interacciones magnéticas pueden ser intra- o intermoleculares, sin embargo estas últimas pueden ser evitadas usando muestras en las que las moléculas paramagnéticas están suficientemente diluídas en una sustancia diamagnética. Una interacción Zeeman pura producirá únicamente dos niveles energéticos, por lo que el espectro de ESR consistirá de una única línea de absorción correspondiente a la transición del nivel inferior al nivel superior. Además de las interacciones Zeeman, pueden ocurrir interacciones entre el electrón y los momentos magnéticos del núcleo (acoplamiento hiperfino), y en el caso de moléculas con más de un electrón desapareado ocurren interacciones entre sus spins. En ambos tipos de interacciones se puede producir una separación (splitting) en varias líneas de absorción. Las interacciones entre los spin electrónicos no serán discutidas aquí, ya que los sistemas normalmente usados en técnicas de marcación son moléculas con un único electrón desapareado (radicales libres).

La separación hiperfina surge de la interacción del electrón desapareado con el momento magnético del núcleo de algún átomo con el cual su órbita esta asociada. Si bien no todos los núcleos poseen spin y momento magnético no nulo, los que lo poseen incluyen un gran número de átomos que son constituyentes normales de compuestos bioquímicos, como H ($I=1/2$), ($I=1$), y F ($I=1/2$). El carbono y el oxígeno en sus isótopos normales ^{12}C y ^{16}O tienen spin nuclear cero, pero los isótopos ^{13}C y ^{17}O tie

///

nen spin nuclear de $I=1/2$ e $I=5/2$ respectivamente. Si el electrón desapareado está confinado a un orbital atómico asociado con un solo átomo, entonces las interacciones serán con el momento magnético de ese átomo en particular. En el caso de electrones desapareados que se mueven en orbitales moleculares alrededor de varios átomos, la separación hiperfina puede ser producida por la interacción con varios núcleos diferentes. La estructura de múltiples líneas del espectro de ESR surge del hecho que el momento magnético del spin del electrón interactuando con el núcleo, "siente" un campo magnético total diferente de acuerdo a cual de las $2I+1$ orientaciones posibles es asumida por el spin nuclear en el campo magnético estático. Para un electrón desapareado interactuando con un núcleo de spin I , se producirá la separación de cada nivel Zeeman en $2I+1$ diferentes subniveles. Solo son posibles las transiciones electrónicas que conservan el spin nuclear ($\Delta M_I=0$), y así el espectro de ESR consistirá de $2I+1$ líneas de absorción.

Una valiosa información sobre el medio ambiente que rodea al electrón desapareado puede ser obtenida del ancho de las líneas de absorción. Existen dos tipos principales de interacciones que pueden contribuir al ensanchamiento de las líneas de absorción: las "interacciones spin-lattice" y las "interacciones spin-spin". El primer tipo representa las interacciones que pueden tener lugar entre el electrón desapareado y su medio ambiente, ya sea la red cristalina o el resto de la molécula en la que se halla. Estas interacciones son responsables de que la energía captada de la radiación electromagnética por el electrón se relaje en el medio o en el sistema molecular, y hace que el proceso de absorción sea continuo. Este proceso de relajación spin-lattice acorta el tiempo de vida de los niveles magnéticos. De acuerdo con el principio de incertidumbre de Heisenberg, si un sistema mantiene un estado particular por un tiempo no mayor que Δt , la incerteza en la energía del estado no puede ser menor que $\Delta E \simeq h/\Delta t$, y por lo tanto estos procesos produci-

///

rán un ensanchamiento de las líneas espectrales. El tiempo de relajación longitudinal o spin-lattice T1 es definido como el tiempo que le lleva al electrón para perder 1/e de la energía que recibió de la radiación electromagnética, y está inversamente relacionado con el ancho de la línea espectral. Sin embargo, en condiciones de baja intensidad de radiación electromagnética, para evitar problemas de saturación, los anchos de las líneas son causados por otros tipos de mecanismos que modulan la energía de los niveles sin causar transición entre ellos. Estos procesos mantienen constante la energía Zeeman total en contraste con los mecanismos de relajación spin-lattice y están caracterizados por un "tiempo de relajación transversal" T2. Estos procesos producen una curva de absorción Lorentziana en el espectro de ESR, del cual puede ser obtenido T2:

$$1/T2 = (3/2)\delta \quad 4$$

donde δ es la distancia pico a pico de la curva derivada, que corresponde al ancho de la línea de absorción en los puntos de máxima pendiente.

Las interacciones spin-spin agrupan a todos los mecanismos mediante los cuales los spin pueden intercambiar energía entre ellos mismos. Tales interacciones pueden producir un ensanchamiento en la línea de absorción ya sea por acción directa de los spins entre sí, o por la inducción de un menor tiempo de vida de los estados de spin. Una de las principales interacciones de este tipo es la interacción dipolo-dipolo ordinaria, la cual puede considerarse equivalente a la interacción clásica de dos barras magnéticas. Así, cada uno de los electrones desapareados reaccionará no solo al campo magnético aplicado externamente, sino también al campo producido por los otros electrones desapareados. Otro tipo de interacción que conduce a un ensanchamiento de la línea de absorción son el intercambio de energía que ocurre por colisiones entre moléculas paramagnéticas.

Estas interacciones son despreciables si la molécula que presenta el electrón desapareado está muy diluída en un solvente diamagnético. Pero pueden ser importantes a altas concentraciones de la sustancia paramagnética. El intercambio de energía por colisiones constituye la base del método utilizado en este trabajo para la determinación del coeficiente de difusión lateral.

II.9.2.- Efecto de la movilidad y el orden sobre el espectro de ESR.

Los espectros de moléculas paramagnéticas en solución difieren de aquellos para las mismas moléculas ordenadas en una estructura cristalina. La separación hiperfina consiste básicamente de dos tipos de interacciones. La primera puede asemejarse con la clásica interacción dipolo-dipolo entre los momentos magnéticos del spin electrónico y el spin nuclear. Esta interacción tendrá una variación angular dada por $(3 \cos^2 \theta - 1)$, y variará de un máximo de 2 a un mínimo de -1 al variar el ángulo de 0 a $\pi/2$. El segundo tipo de interacción es conocida como la interacción de contacto o de Fermi (19, 443), la cual es casi independiente del ángulo entre el campo magnético aplicado y la particular orientación molecular. Estas interacciones estarán presentes para cada núcleo cercano al sitio donde se encuentra el electrón desapareado, y en el estado sólido se tendrá una suma de todas estas interacciones. Así, en una estructura cristalina con las moléculas paramagnéticas perfectamente orientadas, tanto el valor de g como la separación hiperfina dependerá del ángulo entre la dirección del campo magnético aplicado y la del eje del campo eléctrico interno de la estructura cristalina u otro elemento determinante de simetría. Por lo tanto, al rotar el cristal en el campo magnético aplicado se obtendrán diferentes valores de la intensidad de campo de resonancia para las líneas de absorción, y diferente separación entre los componentes hiperfinos. Si por el contrario, las moléculas están orientadas completamente al azar en un medio sólido o de muy alta viscosidad, el espectro de ESR será la suma de los espectros individua

///

les para cada posible orientación y así se observará un gran en sanchamiento en las líneas de absorción.

En el caso de una solución al estado líquido, las moléculas están orientadas al azar con respecto a las otras moléculas y con respecto a la dirección del campo magnético aplicado. Podría suponerse que al promediarse al azar las diferentes posiciones de resonancia para las líneas de absorción y las diferentes separaciones hiperfinas asociadas, se produciría un es pectro desparramado sobre un amplio rango de intensidad de campo magnético. Sin embargo, este no es el caso general, y en el estado líquido se produce una promediación que resulta súma men te útil. En el estado líquido, todas las moléculas se están moviendo rápidamente, de manera que las moléculas cercanas a un determinado electrón desapareado cambian de posición rápidamente y usualmente en un tiempo mucho mas corto que el requerido para la transición del spin electrónico. Esto hace que la contribución del entorno al campo magnético experimentado por el electrón desapareado sea en efecto, un promedio de todas las in ter acciones producidas por las diferentes moléculas que estaban instantáneamente presentes en el curso de la transición del spin. Un promedio de $(3 \cos^2 \theta - 1)$ tomado sobre todos los ángulos posibles será de hecho igual a cero. Por lo tanto, si la mo vil idad de las moléculas paramagnéticas es suficientemente rápi da, todos los electrones desapareados experimentarán un mismo campo dipolar producido por su entorno, el cual ha sido promediado a cero por tales movimientos.

De esta manera el ancho de las líneas de absorción puede ser ampliamente reducido por este efecto de la movilidad, y esto explica por que de soluciones líquidas pueden obtenerse espectros con muy alta resolución, mientras en los espectros de los mismos compuestos en sólidos no orientados se observan líneas de absorción muy anchas. Condiciones intermedias de movili dad, de manera que las reorientaciones ocurran en un tiempo com parable con el tiempo requerido para la transición del spin,

///

producirán espectros intermedios. Estas son las razones que hacen que los espectros de ESR de sustancias paramagnéticas sean sensibles a la movilidad y al grado de orientación de las moléculas.

En ausencia de interacciones intermoleculares spin-spin, la energía de los distintos niveles está dada por la Hamiltoniana (47):

$$\hat{H} = \beta_e \bar{H} \bar{g} \hat{S} + \hat{S} \bar{T} \hat{I} + \beta_n \bar{H} \bar{g}_n \hat{I} \quad 5$$

donde el primer término representa a las interacciones Zeeman, el segundo se debe a la interacción hiperfina, y el tercero representa la interacción entre el spin nuclear y el campo aplicado y es despreciable bajo las condiciones usuales. En la ecuación 5, el vector \bar{H} es el campo magnético aplicado, β_e y β_n son los magnetones electrónico y nuclear respectivamente, \bar{g} es el tensor electrónico, \hat{S} es el operador spin electrónico, \hat{I} es el operador spin nuclear, y \bar{T} es el tensor de acoplamiento hiperfino. Si se define un sistema de coordenadas, los componentes de los tensores \bar{g} y \bar{T} en las tres principales direcciones (g_{xx} , g_{yy} , g_{zz} , T_x , T_{yy} , y T_{zz}) pueden calcularse introduciendo la sustancia paramagnética en cristales de una sustancia diamagnética, y determinando el espectro de ESR en las tres orientaciones principales con respecto al campo magnético aplicado. Conociendo estos componentes principales, se puede calcular el valor esperado de g y de la separación hiperfina para cualquier orientación (19). Esta anisotropía en \bar{g} y \bar{T} son la base del cálculo del parámetro de orden S en membranas (444).

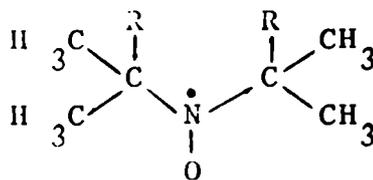
Si una molécula paramagnética en un solvente isotrópico sufre un movimiento isotrópico rápido en comparación con el tiempo de la transición spin-spin, pueden ser desarrolladas ecuaciones relativamente simples para calcular el tiempo de correlación τ para la rotación de la molécula, directamente del ancho de las líneas de absorción (47). Cuando el movimiento es

muy lento, otro método relativamente simple para el cálculo de τ es posible (47). El tiempo de correlación rotacional puede ser usado para calcular la microviscosidad aparente del medio de acuerdo a la ecuación de Stokes-Einstein, aunque esto solo será rigurosamente válido cuando el tamaño de las moléculas marcadoras es bastante mayor que las moléculas del solvente (47).

La condición de movimiento isotrópico, sin embargo, raramente es aplicable. Aún pequeñas moléculas en medios isotrópicos pueden sufrir un movimiento isotrópico (47, 445, 446), y así será caracterizado por al menos dos tiempos de correlación, uno que caracteriza el movimiento alrededor del eje principal de la molécula, y otro que caracteriza el movimiento de dicho eje (445). Otras posibles complicaciones para calcular τ han sido dadas por Schreier y col. (47). Estas complicaciones hacen inaplicable la derivación de valores de viscosidad de los tiempos de correlación. Además, en sistemas de membranas el cálculo de los tiempos de correlación será inexacto debido al ordenamiento molecular, lo cual contribuirá a errores en el cálculo de τ . Así, generalmente otros parámetros mas útiles que τ son calculados para caracterizar la fluidez de membranas biológicas y artificiales.

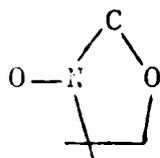
II.9.3.- Radicales nitroxilos.

Los radicales libres que contienen un grupo nitróxido con un átomo de N unido a un carbono terciario forman los marcadores de ESR mas adecuados (19), ya que tienen una gran estabilidad y presentan un espectro que varía con la orientación del radical. Estos radicales tienen la siguiente estructura:



Los cuatro grupos metilos ejercen un efecto protector que le confieren una gran estabilidad. El espectro de ESR de estos componentes comprende tres líneas hiperfinas que resultan del acoplamiento del spin del electrón desapareado con el spin nuclear del N ($I=1$).

Radicales nitroxilos han sido unidos a una gran variedad de compuestos con diferentes estructuras y propiedades. Para estudios en membranas, el grupo 4-4-dimetil-N-oxil oxazolidina:



es generalmente utilizado unido a ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, fosfolípidos o esteroides en diferentes lugares (19, 47).

Definiendo un sistema de coordenadas con el eje x a lo largo del enlace N-O y el eje z a lo largo del orbital $2p\pi$ del N, para muchos nitróxidos, los componentes de los tensores g y T a lo largo de las direcciones x, y, y z, generalmente son: $g_{xx} \approx 2,009$; $g_{yy} \approx 2,006$; $g_{zz} \approx 2,002$; $T_{xx} \approx T_{yy} \approx 6$ G; $T_{zz} \approx 32$ G (47). Estos valores pueden diferir en alguna extensión de un compuesto a otro con este radical, y también dependen de la polaridad del medio ambiente (19).

II.9.4.- Parámetro de orden S.

El parámetro de orden S en membranas ha sido definido como una medida de la distribución de las orientaciones moleculares en relación a un eje de referencia (47), el cual es generalmente elegido como perpendicular al plano de la membrana,

$$S = \frac{(3 \cos^2 \beta - 1)}{2} \quad 6$$

siendo β el ángulo entre la perpendicular a la superficie de la membrana y la dirección del eje z (a lo largo del orbital $2p\pi$ del N) del grupo nitroxilo. Debe notarse que la derivación del

parámetro de orden no involucra la velocidad de movimiento de los marcadores paramagnéticos, y asume que estos son suficientemente rápidos en relación al tiempo de la transición spin-spin.

Ha sido mostrado que el parámetro de orden S , en bicapas orientadas y cuando el eje z es paralelo al eje molecular (como ocurre en los doxil-ácidos grasos), puede ser calculado de (444):

$$S = \frac{T'_{//} - T'_{\perp}}{T_{zz} - (T_{xx} + T_{yy})/2} \quad (7)$$

donde $T'_{//}$ y T'_{\perp} son las separaciones hiperfinas medidas con la perpendicular a la superficie de la bicapa paralela y perpendicular respectivamente al campo magnético aplicado. Si los valores principales del tensor T no se conocen en el sistema bajo estudio, se pueden usar los valores de otro sistema, multiplicando por un factor de corrección por polaridad a_N/a' , donde $a_N = 1/3 (T_{xx} - T_{yy} - T_{zz})$ y $a' = 1/3 (T'_{//} + 2 T'_{\perp})$ (75).

En dispersiones de lípidos distribuidas al azar, los espectros son la suma de los espectros de todas las posibles orientaciones de la normal a la superficie de la bicapa con respecto al campo aplicado. Aunque hay una distribución macroscópicamente isotrópica de los lípidos, el espectro es dependiente del ordenamiento local presente en la bicapa. En este caso, se pueden estimar $T'_{//}$ y T'_{\perp} de la separación de las líneas de absorción. La distancia entre el primer máximo y el último mínimo de la primera derivada del espectro es una muy buena estimación de $2 T'_{//}$ para parámetros de orden superiores a 0,2 (19). La distancia entre el primer mínimo y el último máximo, por otro lado, es una estimación aproximada pero no exacta de $2 T'_{\perp}$, y la divergencia se hace mayor al disminuir S (19). Esto hace que el cálculo de S de la separación de las líneas de absorción sea inexacta en muestras con bajo grado de orden. En sistemas muy ordenados, el último máximo no está bien definido, y esto imposi-

bilita la aplicación del método para $S > 0,8$. Existen otras maneras de calcular S en estos casos, pero exigen mediciones a temperaturas tan bajas como -196°C (19).

II.9.5.- Procedimiento experimental.

Como marcadores se utilizó ácido esteárico con el grupo doxilo (4,4 dimetil-N-oxil oxazolidina) unido en el carbono 5 o en el 16 de la cadena hidrocarbonada (5- y 16-doxil esteárico). Los marcadores fueron disueltos en etanol ($2 \cdot 10^{-2}$ M) y agregados a una suspensión microsomal en buffer fosfato 41,7 mM pH 7,4; sacarosa 0,25 M; KCl 48,6 mM y MgCl 1,6 mM para dar una concentración final de $2 \cdot 10^{-4}$ M. Las muestras fueron sonicadas por unos segundos a 4°C bajo atmósfera de N_2 e incubadas por 45 minutos a 37°C en oscuridad y bajo N_2 . Posteriormente las muestras fueron inmediatamente enfriadas a 0°C y mantenidas a esta temperatura hasta el momento de las determinaciones de los espectros (antes de las 24 horas). La concentración final de proteínas fue de 20 mg/ml y la relación en peso del marcador a lípido fue de aproximadamente 0,012. A esta relación, Sackman y col. (69) mostraron que las interacciones spin-spin son despreciables.

Para asegurar la incorporación del marcador, los microsomas incubados con estos fueron recentrifugados a 100.000 xg por 60 minutos. El sobrenadante fue separado y el precipitado resuspendido en la solución de buffer fosfato. La comparación de las intensidades de los espectros de ESR de ambas fracciones mostró que más del 90% del marcador se incorporó en los microsomas.

En algunos experimentos, los lípidos de los microsomas marcados con los ácidos doxil-esteáricos fueron extraídos por el método de Folch (417), sonicados en la solución de buffer fosfato, y el espectro de ESR fue registrado.

Los espectros fueron registrados a distintas temperaturas entre 4 y 45°C , en un espectrómetro Varian 4501 con un -

///

klystron como fuente de radiación de microondas, y equipado con un control de temperatura variable V 4540. La temperatura fue medida con una exactitud de $\pm 0,2^\circ\text{C}$ con un termómetro digital con transductor de estado sólido. La intensidad de campo magnético fue del orden de los 3510 gauss, la constante de tiempo de 0,3 y el sweeping range de 250.

Cálculo del parámetro de orden S: Estos fueron calculados de los espectros del ácido 5-doxil esteárico incorporado en los microsomas o en los lípidos microsomales de acuerdo a la ecuación 7. Como los valores de los tensores T no son conocidos en nuestro sistema (microsomas de hígado de rata), como fue recomendado por Schreier y col. (47), utilizamos los valores del sistema de Seelig (442) $T_{xx} = T_{yy} = 6,1 \text{ Gauss}$ $T_{zz} = 32,4 \text{ Gauss}$. Sin embargo fue necesario multiplicar la ecuación por el factor de corrección por polaridad a_N / a' , donde $a_N = 1/3 (T_{xx} + T_{yy} + T_{zz}) = 14,9 \text{ Gauss}$ y $a' = 1/3 (T'_{\parallel} + 2 T'_{\perp})$. $2 T'_{\parallel}$ fue estimada de la separación entre el primer mínimo y el último máximo y $2 T'_{\perp}$ se estimó de la separación entre el primer máximo y el último mínimo.

Espectros del ácido 16-doxil esteárico: Debido al bajo grado de ordenamiento en la región de la membrana "sentida" por el ácido 16-doxil esteárico, el parámetro de orden S no pudo ser calculado, ya que la separación entre el primer máximo y el último mínimo en este caso no es una buena estimación de $2 T'_{\perp}$. Con este ácido, la fluidez de la membrana fue caracterizada por la relación entre las intensidades de los picos de medio y alto campo - h_0/h_1-1 .

11.9.6.- Determinación del coeficiente de difusión lateral del ácido 5-doxil esteárico.

Para estas determinaciones se utilizó el método de Sackmann y col. (69), el cual se basa en la consideración de que la velocidad de difusión lateral de las moléculas lipídicas

///

está directamente relacionada con el número de choques por unidad de tiempo entre partículas difundiendo libremente. Un parámetro conveniente para medir esta difusión es el ensanchamiento del espectro de ESR producido por el intercambio de energía por colisiones entre moléculas paramagnéticas marcadoras. Esta interacción causa un ensanchamiento detectable del espectro a relaciones molares de label a lípido mayores de 0,025.

El ancho de la línea central (ΔH) del espectro del ácido 5-doxil esteárico incorporado en membranas puede ser expresado como:

$$\Delta H = \Delta H_0 + \Delta H_{dip} + \Delta H_{ex} \quad 8$$

donde ΔH_0 es el ancho de línea cuando las interacciones entre los marcadores son despreciables, es decir cuando la sustancia paramagnética está muy diluida, y se tomó para este el valor dado por Sackmann y col. (69) de $\Delta H_0 = 4$ gauss; ΔH_{dip} es el ensanchamiento de línea debido a las interacciones dipolo-dipolo, y se tomó para esta el valor de 1 gauss dado por los mismos autores (69). De estos datos se calculó la frecuencia de intercambio (ω_{ex}) por la ecuación (69):

$$\omega_{ex} = 1,4 \cdot 10^6 \cdot \Delta H_{ex} \quad 9$$

La frecuencia de intercambio ω_{ex} ha sido relacionada a la relación molar de marcador a lípido c por la siguiente ecuación (69):

$$\omega_{ex} = \frac{4 \cdot dc \cdot D_{diff}}{3 \cdot F \cdot \lambda} \cdot \frac{c}{1 + c} \quad 10$$

donde F es el área por molécula de lípido, dc es la distancia crítica para que se produzca la interacción de intercambio, y λ es la longitud de un salto difusional. Todos estos parámetros han sido evaluados por Trauble y Sackmann (84) y por Chapman y

///

col. (447), y la ecuación fue convertida a:

$$W_{ex} = 5,5 \cdot 10^{14} D_{diff} \frac{c}{1+c} \quad 11$$

W_{ex} es medida en Hz y D_{diff} tiene las dimensiones de cm^2/seg . Esta ecuación es lineal, por lo que midiendo W_{ex} de ΔH_{ex} es posible graficar W_{ex} en función de $c/1+c$ y calcular D_{diff} de la pendiente.

El espectro de ESR fue registrado a tres diferentes relaciones de marcador a lípido. La relación molar c fue calculada, con el peso molecular promedio de los lípidos microsomales obtenido de la composición lipídica y de la composición de ácidos grasos determinadas como se describió en la sección II. 4.2.

II.10.- INCORPORACION DE LIPIDOS EXOGENOS EN MICROSOMAS.

Para modificar la composición lipídica de los microsomas, se utilizaron tres métodos diferentes: fusión, sustitución y solubilización-reconstitución. Los primeros dos métodos son leves modificaciones de los descritos por el grupo de Metcalfe y col. (237, 239, 448).

a) Fusión: En este caso los microsomas (30 mg de proteína/ml) - fueron incubados durante 30 minutos a 30°C con cantidades variables de liposomas de DMPC en una solución de sacarosa 0,25 M; KCl 0,75 M y buffer tris-acetato 50 mM pH 8,0. Los liposomas de DMPC utilizados aquí fueron preparados esencialmente por el método de Barenholz y col. (449), por sonicación de la DMPC en el medio de incubación a 28°C (por encima de T_t) durante 12 minutos, seguido de ultracentrifugación a 160.000 xg durante 120 minutos, y descartando el precipitado y el tercio inferior del centrifugado. Ha sido mostrado que por este método se obtienen vesículas monolamelares de un tamaño bastante homogéneo, quedando en el tercio inferior del centrifugado los grandes liposomas multilamelares(449).

b) Substitución: En este caso, los microsomas (30 mg de proteína/ml) fueron incubados durante una hora a 2-4°C con diferentes cantidades de DMPC en una solución de sacarosa 0,25 M; KCl 0,75 M; ATP 10 mM; MgSO₄ 10 mM; y buffer tris-acetato 50 mM pH 8,0 que contenía cantidades variables de desoxicolato de sodio.

Luego de la incubación, en ambos casos, fusión y substitución, los microsomas fueron centrifugados a 100.000 xg durante 1 hora, resuspendidos en una solución de sacarosa 0,25 M EDTA 1,0 mM pH 7,0 y recentrifugando nuevamente, repitiendo - tres veces estos lavados.

c) Solubilización-reconstitución: En este caso los microsomas - fueron diluidos a aproximadamente 10 mg de proteína por ml en - una solución que contenía buffer tris-acetato 50 mM pH 7,5; di- tiotreititol; KCl 1,0 M; glicerol 10% y desoxicolato de sodio 0,5%. Se agitó durante 15 minutos a 2-4°C, y se centrifugó a 100.000 xg durante 1 hora y el pequeño precipitado fue descartado. El sobrenadante fue mezclado con diferentes cantidades de - DMPC o DPPC disueltas en desoxicolato 0,5% y dializado durante 24 horas contra 10 volúmenes de tris-acetato 50 mM pH 7,5 y di- tiotreititol 1,0 mM. El líquido de diálisis fue cambiado cada 8 horas. Luego de la diálisis, la suspensión fue centrifugada a - 100.000 xg durante una hora y el precipitado resuspendido en - una solución de sacarosa 0,25 M - EDTA 1,0 mM pH 7,0.

Los porcentajes de ácido palmítico (16:0) y ácido mi- rístico (14:0) exógenos fueron utilizados como una estimación - de la proporción de DPPC y de DMPC, respectivamente, que se in- corporó en los microsomas. El porcentaje de 16:0 exógeno fue - calculado de la composición de ácidos grasos determinada por - cromatografía gas líquido con la siguiente expresión:

$$\% \text{ de } 16:0 \text{ exógeno} = \% \text{ de } 16:0 \text{ final} - \left[\frac{\% \text{ de } 16:0 \text{ original}}{\% \text{ de } 18:0 \text{ original}} \times \right. \\ \left. \% \text{ de } 18:0 \text{ final} \right]$$

donde el % de 16:0 final y el % de 18:0 final son los porcentajes de esos ácidos en los microsomas tratados, y el % de 16:0 y de 18:0 original son los porcentajes de esos ácidos en los microsomas originales antes de someterlos a los tratamientos. De la misma manera se calculó el % de 14:0 exógeno, sin embargo, ya que el contenido endógeno en 14:0 de los microsomas es muy bajo, el de 14:0 exógeno es prácticamente el mismo que el % de 14:0 final.

II.11.- MICROSCOPIA ELECTRONICA.

Para los estudios de microscopía electrónica, el material fue fijado en tetróxido de osmio 1% durante 90 minutos, deshidratado en etanol y fijado en araldite. Secciones ultrafinas fueron montadas en rejillas de cobre y teñidas con uranil - acetato y citrato de plomo. Las preparaciones fueron observadas en un microscopio electrónico Elmiscop I.

II.12.- MODIFICACION DE LA FLUIDEZ DE LA MEMBRANA POR LA INCORPORACION DE ALCOHOLES DE BAJO PESO MOLECULAR.

Para estos estudios se utilizaron n-butanol e isoamilo1 $(\text{CH}_3)_2\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$. Estos alcoholes se incorporan espontáneamente y rápidamente en la membrana, lo cual pudo ser seguido por las variaciones producidas en la polarización de fluorescencia cuando los microsomas fueron marcados previamente con DPH (sección III.4.1). Para las determinaciones enzimáticas los alcoholes fueron agregados junto a los microsomas directamente al medio de incubación, y luego de 3 minutos las reacciones fueron largadas por el agregado del sustrato.

CAPITULO III

R E S U L T A D O S Y D I S C U S I O N

CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSION.

III.1.- ESTRUCTURA Y ACTIVIDAD ENZIMATICA DE MICROSOMAS DE HIGADO DE RATA.

III.1.1.- Composición lipídica de la membrana microsomal.

La composición lipídica de los microsomas de hígado de ratas aislados como se indicó en la sección II.3. se muestra en la tabla I. Puede verse en ella que los constituyentes más importantes son PC y PE. Además de fosfolípidos, los microsomas obtenidos de esta manera también contienen cantidades importantes de colesterol y de triglicéridos.

En la tabla II se muestra la composición de ácidos grasos de los lípidos microsomales, y en ella se puede ver la presencia importante de ácidos grasos saturados como palmítico y esteárico y de una abundante cantidad de ácidos grasos insaturados como araquidónico, linoleico y oleico.

III.1.2.- Determinaciones de resonancia electrónica paramagnética.

a) Movilidad de las cadenas hidrocarbonadas.

La primera derivada del espectro de ESR del grupo doxilo consiste de tres líneas; de alto, medio y bajo campo. Si el grupo doxilo puede moverse libremente en cualquier dirección como ocurre cuando se halla en un medio isotrópico como metanol a temperatura ambiente, las tres líneas son angostas y tienen a proximadamente la misma altura. La movilidad del radical libre es muy restringida si se encuentra en un medio congelado, y en este caso la distancia entre las líneas externas y la línea central aumenta mucho, y a su vez estos picos externos se encuentran distorsionados (450). Cuando el ácido esteárico es incorporado en microsomas o en dispersiones de lípidos microsomales, muestra un espectro intermedio (figuras 6 y 7).

En la figura 6 se ilustra la derivada del espectro de ESR del ácido 16-doxil esteárico incorporado en microsomas de hígado de rata, y es comparado con el espectro del mismo marcador en los lípidos extraídos de los microsomas y del marcador

TABLA I

COMPOSICION LIPIDICA DE MICROSOMAS DE HIGADO DE RATA

LIPIDO	PORCENTAJE EN PESO
FOSFATIDILCOLINA	34,1 ± 1,5
FOSFATIDILETANOLAMINA	20,7 ± 3,7
TRIACILGLICEROLES	10,4 ± 0,5
LISOFOSFATIDILCOLINA	6,4 ± 1,0
LISOFOSFATIDILETANOLAMINA	11,5 ± 2,7
ACIDOS GRASOS LIBRES	4,7 ± 0,2
COLESTEROL	9,5 ± 2,8
ESFINGOMIELINA	1,1 ± 0,1
ESTERES DE COLESTEROL	1,1 ± 0,1
DIACILGLICEROLES	0,5 ± 0,3

Se utilizaron ratas machos de dos meses de edad. Los valores indicados son la media de tres animales ± el error standard. Pequeñas cantidades de fosfatidilserina y de fosfatidilinositol son incluidas junto con fosfatidiletanolamina y esfingomielina respectivamente.

TABLA II

COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS DE LOS LIPIDOS TOTALES
DE MICROSOMAS DE HIGADO DE RATA

ACIDO GRASO	PORCENTAJE EN PESO
14:0	0,9 ± 0,3
16:0	30,3 ± 0,9
16:1	0,5 ± 0,3
18:0	25,6 ± 1,0
18:1	6,2 ± 0,8
18:2	10,8 ± 0,3
22:0	0,6 ± 0,2
20:4 (ω6)	20,0 ± 2,6
20:4 (ω3)	0,1 ± 0,1
20:5 (ω3)	0,7 ± 0,3
24:0	0,3 ± 0,1
22:4 (ω6)	0,3 ± 0,1
22:5 (ω6)	0,1 ± 0,1
22:5 (ω3)	0,2 ± 0,1
22:6 (ω3)	3,4 ± 0,3

Las determinaciones se realizaron en los microsomas de tres ratas machos de dos meses de edad. Los porcentajes se indican junto al error standard. Solo se indican aquellos componentes alcanzando por lo menos un nivel del 0,1 %

disuelto en metanol. Los tres espectros muestran las tres líneas típicas para el grupo doxilo. Los espectros del marcador - en los microsomas, y en la dispersión de los lípidos extraídos de los microsomas son muy similares, lo cual sugiere que el medio ambiente en el que se encuentra el grupo doxilo es esencialmente el mismo en ambos casos y sería fundamentalmente lipídico. El efecto de las proteínas constituyentes de los microsomas no es percibido.

En ambos espectros, la línea de alto campo es menos intensa y mas ancha que el pico correspondiente del espectro del marcador disuelto en metanol. Esto puede ser atribuido a una restricción en la movilidad impuesta al marcador por su ubicación en la bicapa lipídica como ha sido demostrado (75, 69).

En la figura 7 se muestra el espectro del ácido 5-doxil esteárico en metanol, en microsomas, y en liposomas de los lípidos extraídos de los microsomas. Puede observarse que también para este marcador, el espectro es prácticamente el mismo en los microsomas que en las dispersiones de los lípidos microsomales libres de proteína.

Por otro lado, sin embargo, al comparar los espectros de ambos marcadores en metanol con los correspondientes espectros en microsomas o en los lípidos microsomales en las figuras 6 y 7, se puede observar que la incorporación en microsomas o en los liposomas de los ácidos 5-doxil o 16-doxil esteárico provoca alteraciones en el espectro completamente diferentes para ambos ácidos. Para el ácido 16-doxil esteárico (fig.6) solo se observa un pequeño ensanchamiento de todas las líneas y un aplastamiento del pico de alto campo, indicando que la movilidad del grupo doxilo está poco restringida. Para el ácido 5-doxil esteárico, por el contrario, las dos líneas extremas de bajo y alto campo son muy alteradas cuando se los incorpora en microsomas o en los liposomas, en comparación con el espectro en metanol (fig. 7), dando espectros típicos de marcadores moderadamente inmovilizados. Así, esto indica una mayor restricción a la movi



FIGURA 6: Primera derivada del espectro de ESR del ácido 16-doxil esteárico en diferentes medios. A) en metanol. B) en microsomas de hígado de rata. y C) en liposomas preparados con los lípidos microsomales.

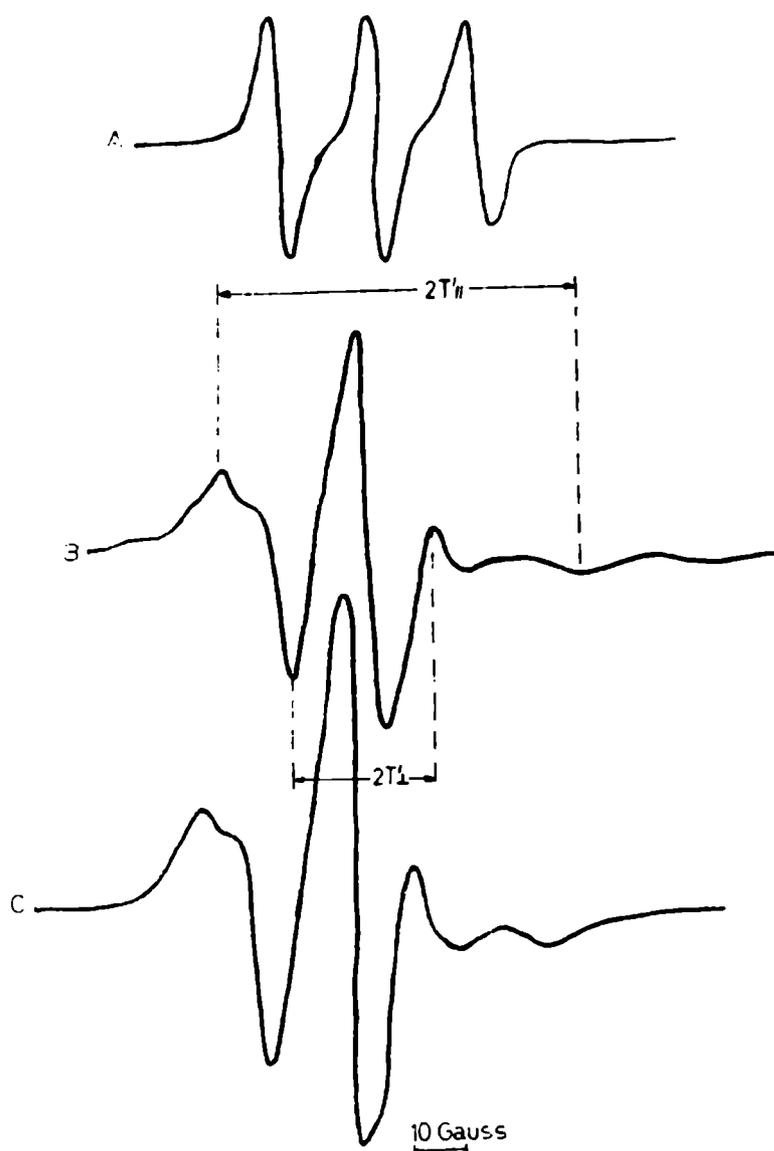


FIGURA 7: Primera derivada del espectro de ESR del ácido 5-doxil esteárico en diferentes medios. A) en etanol. B) en microsomas de hígado de rata. y C) en liposomas preparados con los lípidos extraídos de microsomas.

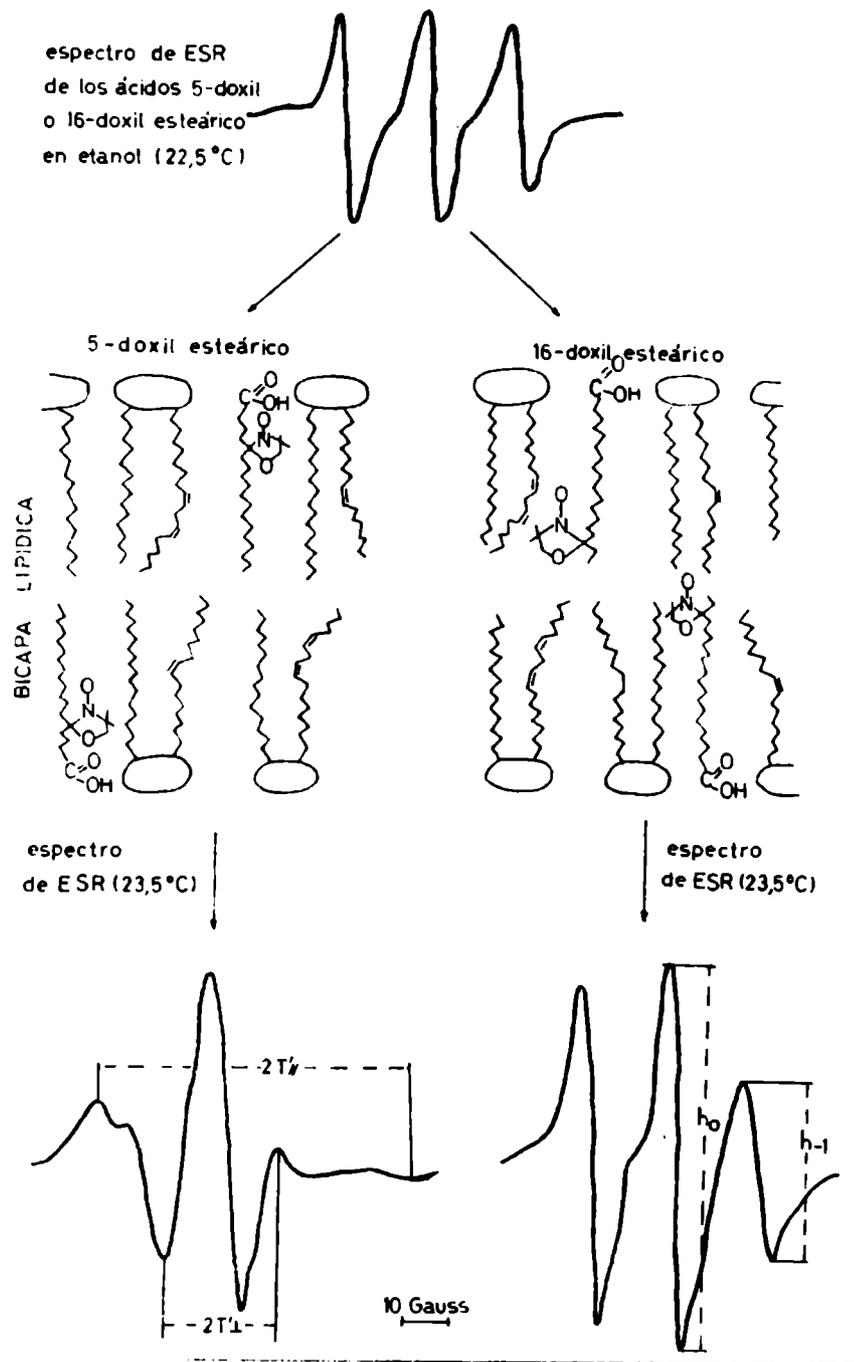


FIGURA 8: Localización de los marcadores 5- y 16-doxil esteárico en bicapas lipídicas y los espectros de ESR resultantes.

lidad cuando el grupo doxilo ~~se~~ encuentra en la posición 5 que cuando está en la posición 16, cuando el marcador se encuentra incorporado en la membrana microsomal o en vesículas preparadas con los lípidos microsomales libres de proteína.

Ya que el grupo N-O, responsable del espectro, está rígidamente unido a la cadena hidrocarbonada del ácido esteárico, el espectro refleja la libertad de movimiento de la cadena del marcador. Por lo tanto, esto indica que la movilidad está mas restringida en el carbono 5 que en el carbono 16 de la cadena del ácido esteárico.

Ha sido demostrado que los marcadores derivados de ácidos grasos como los usados en estas experiencias se orientan con su eje mayor aproximadamente perpendicular a la superficie de ciertas membranas (451) y de interfases agua-fosfolípido (452), ubicándose su grupo carboxilo en la región de los grupos polares de los fosfolípidos que constituyen la membrana. Así, como fue demostrado (69), el ácido 5-doxil esteárico es sensible a los cambios estructurales y de movilidad de la región polar de la membrana, mientras que el ácido 16-doxil esteárico explora el interior hidrofóbico de la bicapa lipídica. En consecuencia como se ilustra en la figura 8, la libertad de movimiento es mayor en el interior hidrofóbico de la membrana microsomal que en la zona mas cercana a la interfase agua-lípido.

b) Parámetro de orden S.

Del espectro obtenido con 5-doxil esteárico se calculó el parámetro de orden S, por el procedimiento descrito en el capítulo II. Este dio un valor de $S=0,58$ a 37°C y de $S=0,65$ a 23°C para microsomas de hígado de ratas de un mes de edad. Un valor de $S=0,71$ fue calculado para microsomas de hígado de conejo (321). Estos valores caen en el extremo mas bajo del rango de valores del parámetro de orden S determinados por este método en membranas biológicas. Por ejemplo, se han calculado valores de $S=0,8$ para sarcosomas, $S=0,83$ para eritrocitos humanos,

y $S=0,80$ para linfocitos humanos (453).

Los valores del parámetro de orden S para los liposomas preparados con los lípidos microsomales como se mencionó anteriormente, muestra valores de $S=0,56$ a 37°C y de $S=0,63$ a 23°C , los cuales son prácticamente los mismos que para los microsomas completos. Así, la alta fluidez de la membrana microsomal de hígado de rata, a temperatura fisiológica, estaría fundamentalmente determinada por sus constituyentes lipídicos, ya que la presencia de las proteínas microsomales no influye mayormente.

c) Influencia de la temperatura sobre la movilidad y el grado de orden.

En la figura 9 se muestran los espectros del ácido 16-doxil esteárico incorporado en los microsomas medidos a diferentes temperaturas. Puede observarse un progresivo agudizamiento y enangostamiento de todas las líneas del espectro al incrementar la temperatura, indicando un aumento en la "fluidez" de la región hidrofóbica de la membrana al aumentar la temperatura. Algo similar se observó cuando los microsomas fueron marcados con 5-doxil esteárico (fig. 10), por lo que el incremento en movilidad por la temperatura también ocurre en la región mas cercana a la superficie hidrofílica de la membrana microsomal.

La dependencia de la temperatura del parámetro experimental $h_0/h-1$ del espectro de ESR de microsomas y dispersiones de lípidos microsomales marcados con 16-doxil esteárico se muestra en la figura 11. Ninguna quebradura o cambio brusco de pendiente que pueda indicar una transición de fase puede reconocerse en esas curvas, ni en los microsomas completos ni en los liposomas preparados con los lípidos microsomales. Así, esto mostraría que en el rango de temperatura medido, no ocurre ninguna transición de fase líquido cristalino-cristalino o cambio de una estructura ordenada a un estado desordenado en la región hidrofóbica de la membrana microsomal. Los microsomas y los lí-

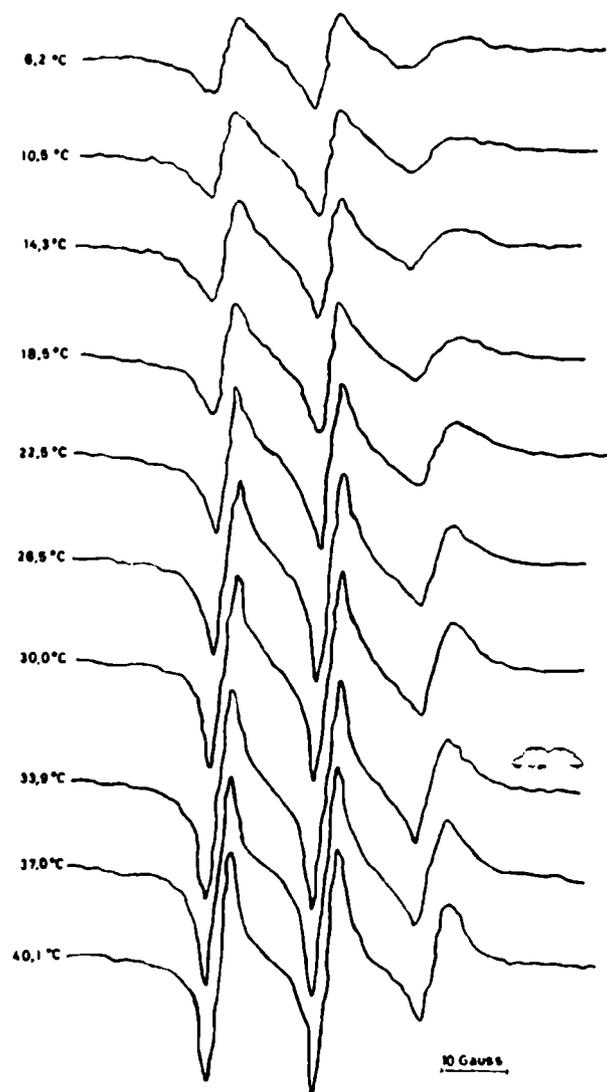


FIGURA 2: Efecto de la temperatura sobre el espectro de ESR del ácido 16-doxil esteárico incorporado en microsomas de hígado de rata.

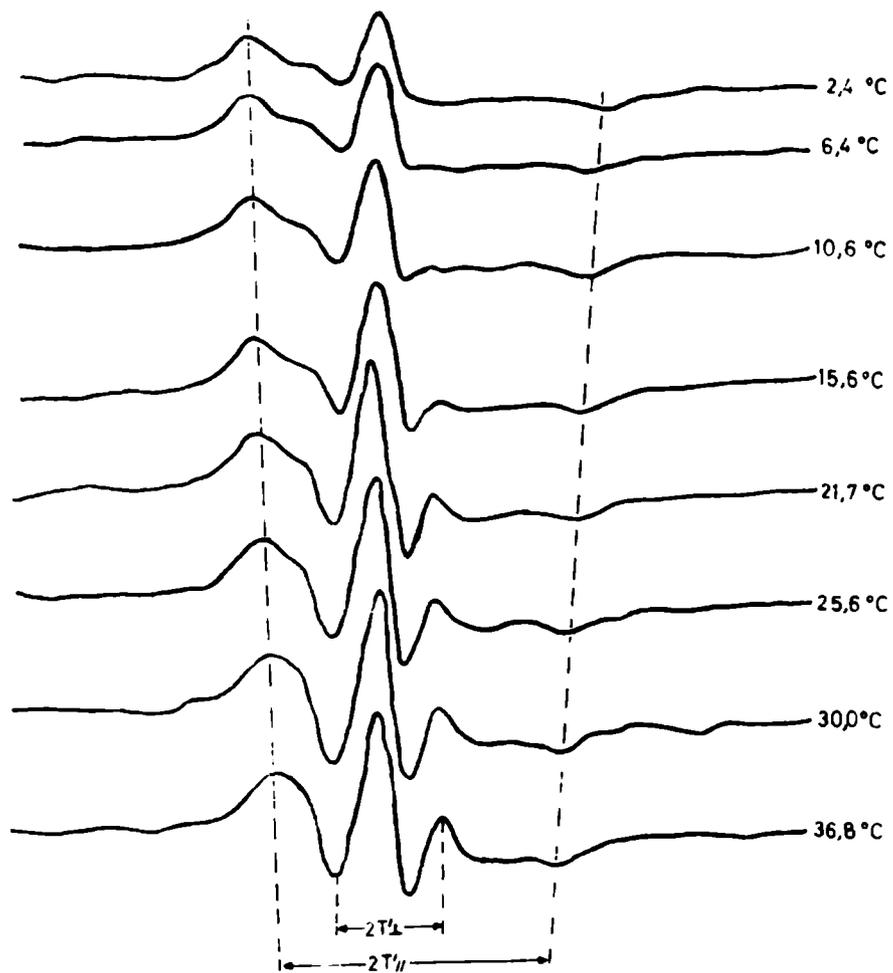


FIGURA 10: Efecto de la temperatura sobre el espectro de ESR del ácido 5-doxil esteárico incorporado en microsomas de hígado de rata.

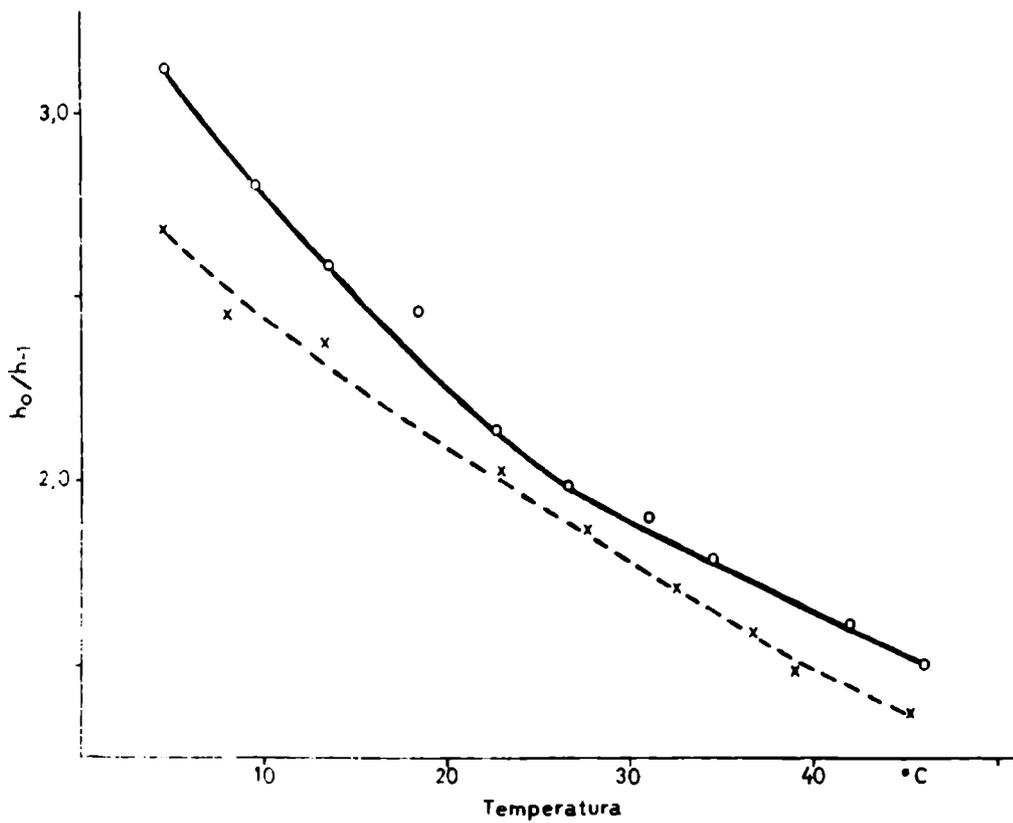


FIGURA 11: Influencia de la temperatura sobre el parámetro h_0/h_{-1} obtenido del espectro de ESR del ácido 16-doxil esteárico incorporado como marcador en microsomas de hígado de ratón (o—o), y en liposomas preparados con los lípidos extraídos de los microsomas (x---x).

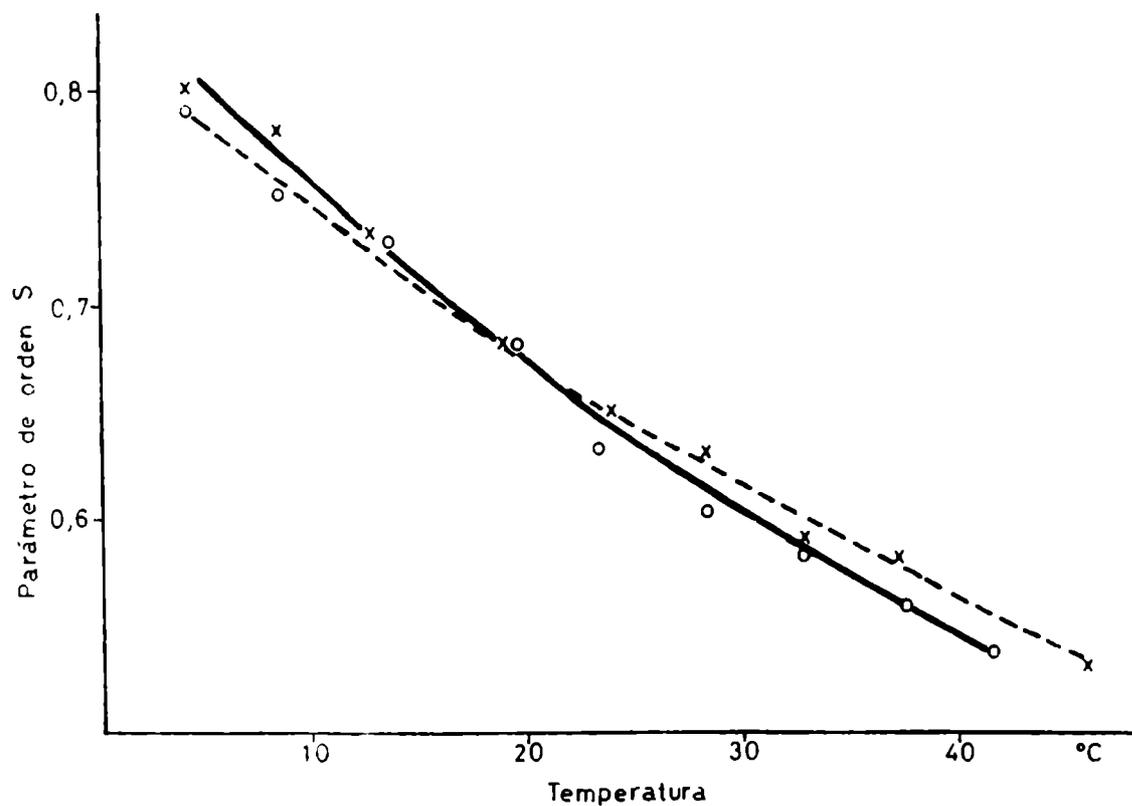


FIGURA 12: Influencia de la temperatura sobre el parámetro de orden S obtenido del espectro de ESR del ácido 5-doxil esteárico incorporado como marcador en microsomas de hígado de rata (o—o), y en liposomas preparados con los lípidos extraídos de microsomas (x---x).

pidos microsomales mostraron curvas muy similares y la relación $h_0/h-1$ no fue muy diferente entre ellos a alguna temperatura.

Los valores del parámetro de orden S, obtenidos de los espectros de 5-doxil esteárico en microsomas y en los liposomas fueron determinados a diferentes temperaturas entre 4° y 42°C. Estos valores fueron graficados versus la temperatura en la figura 12. Puede verse que S decrece continuamente al aumentar la temperatura para ambos sistemas. Esta disminución se produce sin quebraduras que podrían indicar una transición de fase en la región polar de la membrana, a la cual es sensible este marcador.

La figura 12 muestra una concavidad hacia arriba en la curva, que es mas notable en los microsomas. Esto puede ser originado por la presencia de dos zonas lipídicas diferentes de la membrana que presentan distinta dependencia de la fluidez con la temperatura.

d) Difusión lateral del ácido 5-doxil esteárico en la membrana.

El coeficiente de difusión lateral para éste ácido fue determinado para los mismos microsomas. El espectro de ESR fue determinado a tres diferentes relaciones de marcador a lípido microsomal. Las relaciones molares de marcador a lípido se calcularon determinando el peso molecular promedio de los lípidos microsomales, por medio de la composición lipídica de los microsomas determinada por cromatografía en capa delgada y de la composición de ácidos grasos determinada por cromatografía gas-líquido.

Los valores de ΔH_{ex} y W_{ex} calculados son resumidos en la tabla III. El coeficiente de difusión lateral calculado fue de $0,5 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{seg.}$ a 37°C. Este valor es menor que el encontrado para la difusión de fosfolípidos en retículo sarcoplásmico ($7,5 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{seg.}$ a 40°C) (175) y en microsomas de conejo ($10^{-7} \text{ cm}^2/\text{seg.}$ a 30°C) (117).

Este resultado aunque aproximado, demuestra una rápida difusión lateral de las moléculas lipídicas en la membrana -

TABLA III

FRECUENCIA DE INTERCAMBIO DE ENERGIA (Wex) ENTRE MOLECULAS DE ACIDO 5-DOXIL-ESTEARICO INCORPORADAS EN MICROSOMAS DE HIGADO DE RATA A 37°C

RELACION MOLAR DE MARCADOR A LIPIDO (c)	$\frac{c}{1+c}$	ANCHO DE LINEA TOTAL (ΔH)	ΔH	FRECUENCIA DE INTERCAMBIO (Wex)
		(Gauss)	(Gauss)	(MHz)
0,27	0,213	6,8	1,8	2,5
0,54	0,351	7,1	2,1	2,9
0,81	0,448	7,2	2,2	3,1

Con estos datos se calculó un coeficiente de difusión lateral para el ácido 5-doxil esteárico en la membrana microsomal (Ddiff) de aproximadamente $0,5 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{seg.}$

///

microsomal. Esta difusión puede llevar en primera instancia a una distribución al azar de las moléculas. Esto también muestra que la membrana funciona como un sistema bidimensional desde el punto de vista cinético.

III.1.3.- Determinaciones espectrofluorométricas y ópticas.

a) Fluorescencia de N-fenil-1-naftilamina y light scattering.

En la figura 13 se observa la influencia de la temperatura sobre la intensidad de fluorescencia emitida por la N-fenil-1-naftilamina, cuando se la incorporó como marcador fluorescente en la membrana microsomal completa y en liposomas preparados con los lípidos extraídos de microsomas.

Si la membrana en la que se encuentra incorporado este marcador sufre una transición de fase, ocurre un brusco cambio en la intensidad de fluorescencia debido a que es excluido hacia la fase acuosa cuando la fase lipídica cambia de un estado fluido a un estado ordenado.

Las curvas obtenidas tanto para microsomas completos como para los liposomas de los lípidos ^{microsomales} fueron completamente lineales en el rango de temperatura estudiado. Esto indica que ninguna transición o separación de fase, capaz de excluir a este marcador desde la fase lipídica hacia la fase acuosa, ocurre en este rango de temperatura.

En la figura 14 se muestran las curvas de intensidad de light scattering en función de la temperatura para los microsomas completos y para una dispersión de los lípidos extraídos de los microsomas. La intensidad de luz dispersada es mayor cuando la bicapa se encuentra en el estado ordenado que cuando se encuentra en el estado fluido. Así, si la membrana sufre una transición de fase ocurre un cambio brusco en la intensidad de luz dispersada.

Como tanto en los microsomas completos como en las dispersiones de los lípidos microsomales libres de proteína - las curvas de light scattering fueron lineales, esto indica la

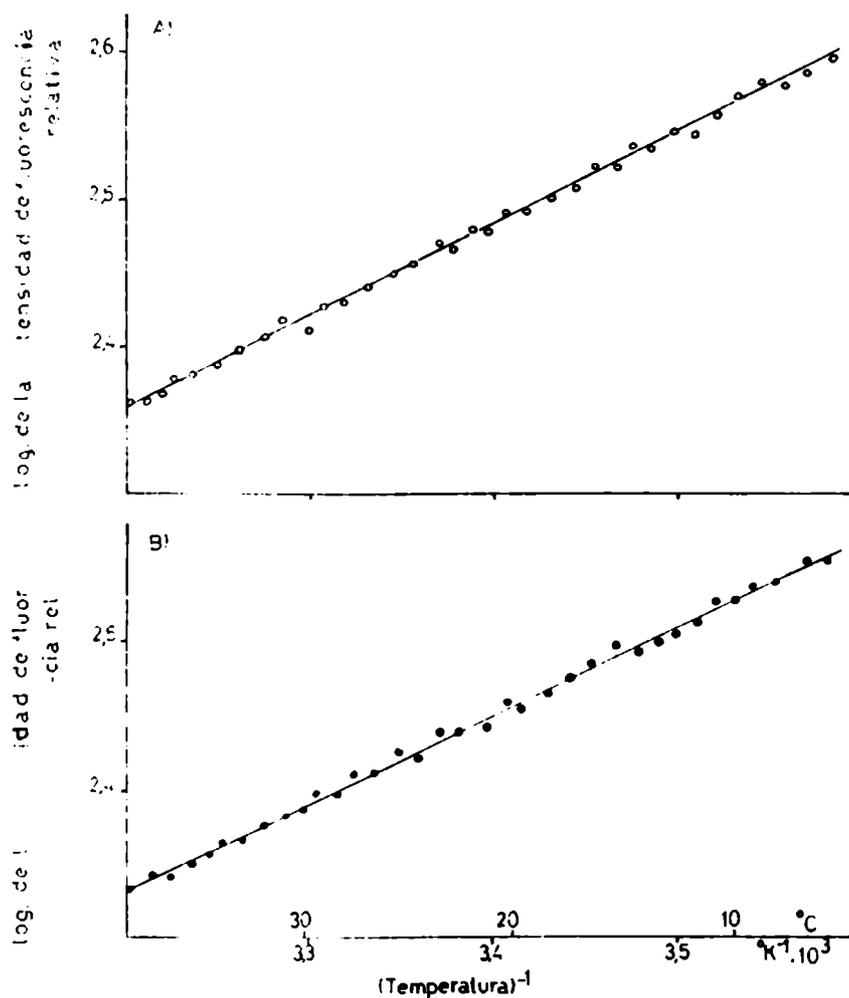


FIGURA 13: Efecto de la temperatura sobre la intensidad de fluorescencia emitida por la N-fenil-1-naftilamina incorporada como marcador en microsomas de hígado de rata (curva A o—o), y en liposomas preparados con los lípidos extraídos de los microsomas (curva B ●—●)

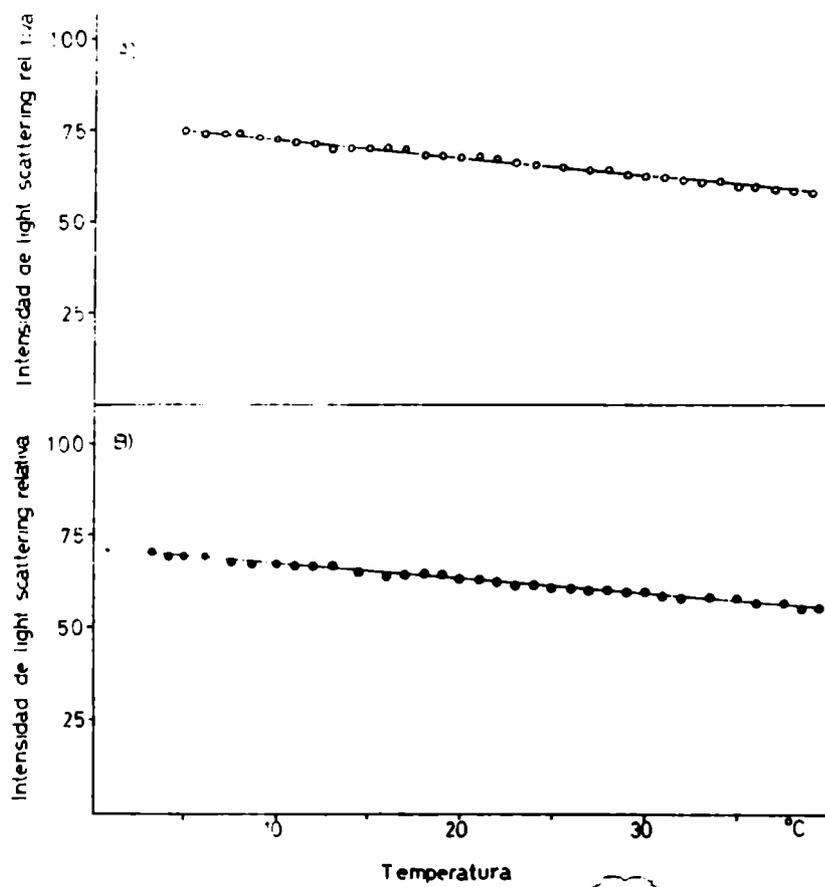


FIGURA 14: Efecto de la temperatura sobre la intensidad de light scattering de una dispersión de microsomas de hígado de rata (curva A o—o), y de liposomas preparados con los lípidos microsomales (curva B ●—●).

ausencia de un cambio de fase de los lípidos en este rango de temperatura que pueda ser detectado por este método.

b) Polarización de fluorescencia.

La incorporación del 1,6-difenil-1,3,5,-hexatrieno - en microsomas puede ser seguida en el tiempo por el incremento en la intensidad de fluorescencia. En la figura 15 se puede - ver que cuando a una suspensión no fluorescente de DPH(10^{-6} M) en sacarosa 0,25 M-EDTA 1,0 mM pH 7,0 se le agregaron microsomas (100 ug de proteína/ml), la intensidad de fluorescencia aumentó continuamente con el tiempo hasta alcanzar un valor máximo constante a los 40 minutos (a 25°C), lo cual indica que se completó la incorporación del fluoróforo en la fase lipídica - de la membrana.

En la figura 16 se pueden observar los espectros de excitación y de emisión para el DPH incorporado en microsomas - de hígado de rata. Estos espectros son muy similares a los que se obtienen en hexano y en liposomas artificiales (428). La - gran separación entre las bandas de absorción y de emisión disminuye la probabilidad de depolarización por transferencia de energía entre moléculas de DPH vecinas, y facilita la eliminación de la contribución del scattering de la luz de excitación a la señal de fluorescencia detectada. En la misma figura se - muestra que la polarización de fluorescencia (medida como $I_{//} / I_{\perp}$) se mantiene constante cuando se excita a lo largo de la última banda de absorción.

Como se vio en la sección II.8.6., el scattering producido por soluciones turbias puede dar lugar a dos tipos de errores en las mediciones de polarización. Uno es producido por el scattering de la luz de excitación que se corrige fácilmente como se indicó. El otro tipo de error es debido a una depolarización adicional producida por el scattering de la luz emitida por fluorescencia. Para evaluar este error, una suspensión de microsomas (1,6 mg de proteína/ml) marcada con DPH (8 μ M), fue sucesivamente diluída, y relación $I_{//} / I_{\perp}$ (corregida por el sca-

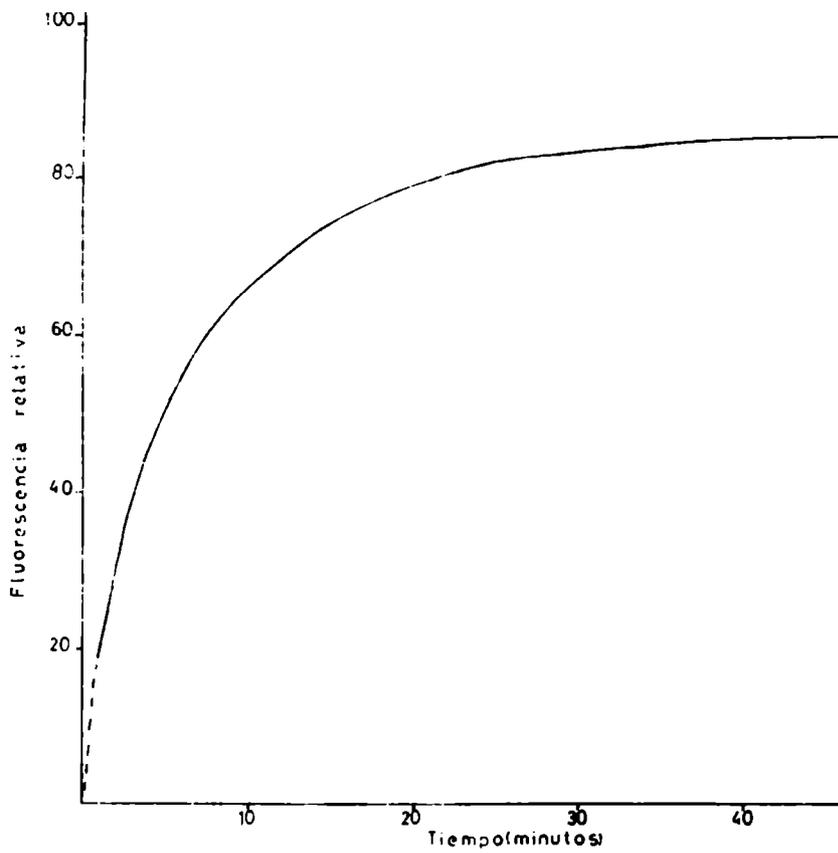


FIGURA 15: Incremento en la fluorescencia emitida por el DPH al incorporarse en la zona hidrofóbica de la membrana de microsomas hepáticos de rata.

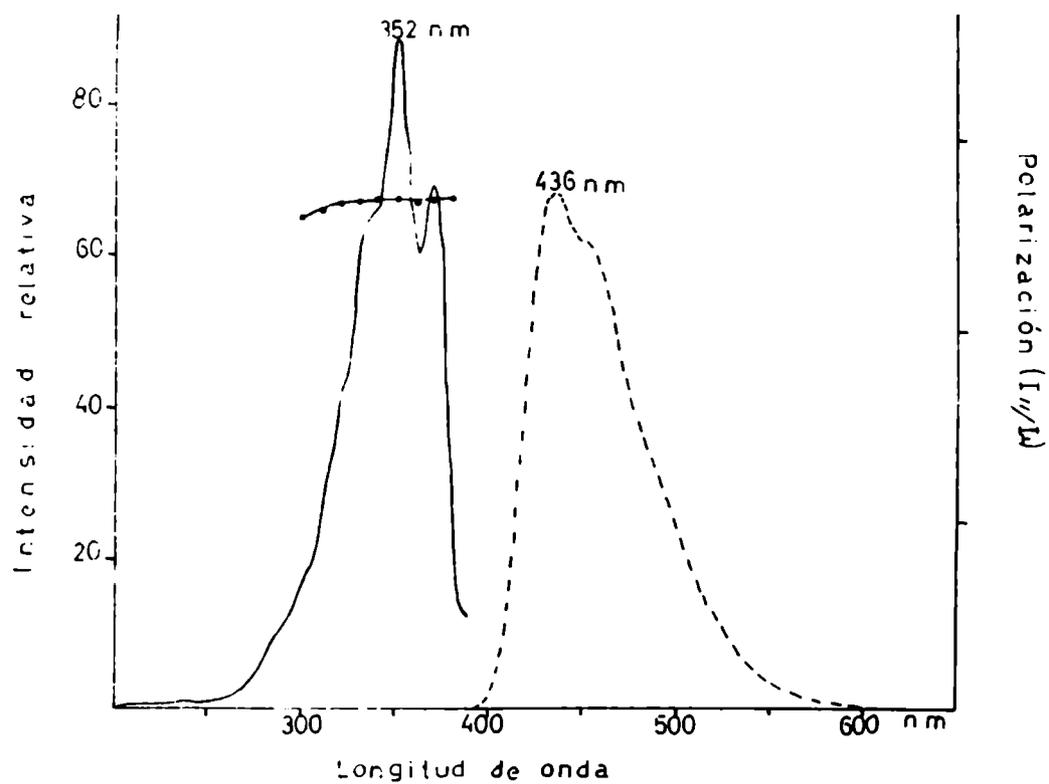


FIGURA 16: Espectros de excitación, de emisión y de polarización del DPH incorporado en microsomas de hígado de rata.

(—) espectro de excitación.

(-----) espectro de fluorescencia

(●—●) espectro de polarización de emisión (I_{\parallel}/I_{\perp}).

///

tering de la luz de excitación y por G) fue evaluada en cada una de las diluciones. Como puede verse en el tabla IV, a medida que la suspensión fue diluída la polarización ($I_{//}/I_{\perp}$) aumentó hasta alcanzar un valor constante por debajo de 100 ug de proteína microsomal/ml, indicando que la depolarización debida al scattering es despreciable a esas concentraciones de la suspensión microsomal.

Por otro lado, en la tabla V se puede ver que cuando una suspensión de microsomas (50 ug de proteína/ml) fue marcada con distintas cantidades de DPH, la polarización de fluorescencia ($I_{//}/I_{\perp}$) se mantuvo constante aún para una concentración de DPH de 1 mM, lo cual corresponde a una relación molar de lípido a DPH de 25:1 aproximadamente. Esto indica que aún a estas concentraciones altas de marcador no ocurre depolarización por transferencia de energía entre moléculas de DPH y que la microviscosidad aparente de la membrana microsomal no se ve afectada por la incorporación del DPH en estas concentraciones. Por estas razones, para evitar estos errores se eligieron las condiciones dadas en la sección II.8.6., para las determinaciones de $\tilde{\eta}$ y de S_{DPH} .

La microviscosidad aparente de la membrana, calculada del grado de polarización de la fluorescencia emitida por el DPH incorporado como marcador en la fase lipídica, fue calculada a distintas temperaturas entre 5° y 40°C. El logaritmo de la microviscosidad aparente graficado en función de la inversa de la temperatura absoluta se muestra en la figura 17. Puede observarse que esto da una recta sin algún cambio de pendiente que indique alguna transición de fase o alteración de la estructura de la fase lipídica capaz de afectar a la velocidad de rotación del fluoróforo.

La microviscosidad obtenida a 36°C fue de 1,20 Poise y a 23° de 1,90 Poise. La microviscosidad aparente en membranas biológicas varía entre 1 y 10 Poise a temperatura ambiente (48). Así, la membrana de microsomas de hígado de rata presen-

TABLA IV

DEPOLARIZACION DEBIDA AL SCATTERING DE LA
FLUORESCENCIA EMITIDA

CONCENTRACION DE DPE	CONCENTRACION DE MICROSOMAS	$I_{//}/I_{\perp}$ *
(μ M)	<u>mg de protefna</u> ml	
8,00	1,60	1,215
4,00	0,80	1,275
2,00	0,40	1,330
1,00	0,20	1,365
0,50	0,10	1,373
0,25	0,05	1,370
0,125	0,025	1,375

* Determinado a 27°C.

TABLA V

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE DPH SOBRE LA POLARIZACION DE FLUORESCENCIA EN MICROSOMAS DE HIGADO DE RATA*

CONCENTRACION DE DPH (μ M)	$I_{//} / I_{\perp}$
1,00	1,350
0,50	1,347
0,25	1,351
0,125	1,348

* 50 μ g de proteína microsomal/ml en sacarosa 0,25 M; EDTA 1,0 mM; pH 7,0 a 27°C.

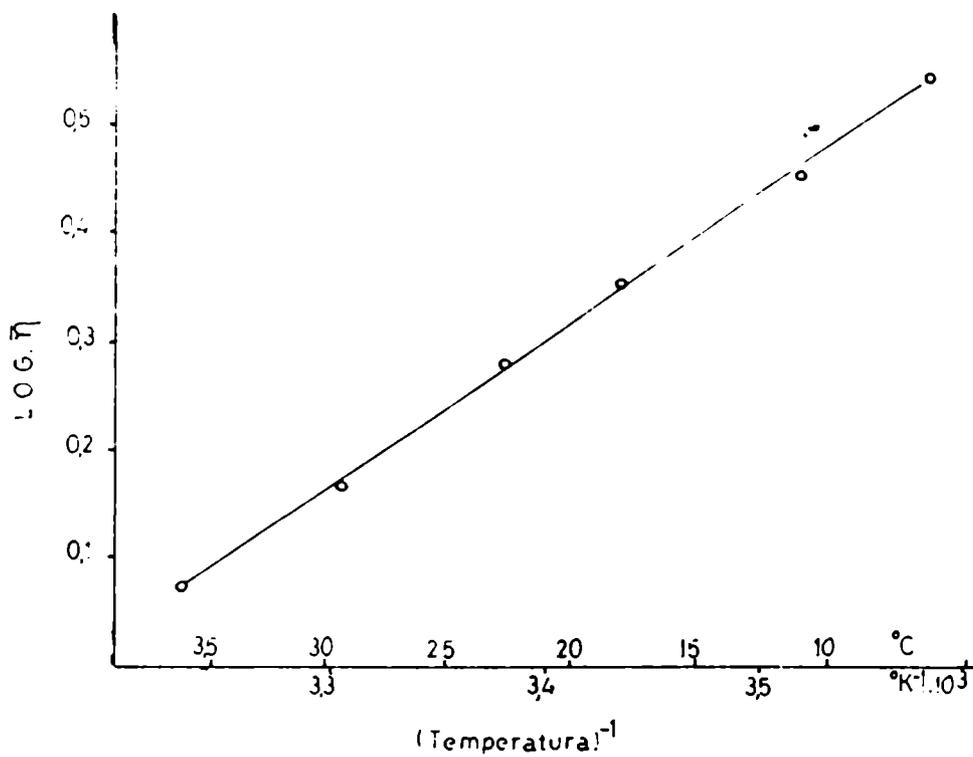


FIGURA 17: Influencia de la temperatura sobre la microviscosidad aparente ($\bar{\eta}$) de microsomas de hígado de rata, calculada del grado de depolarización de fluorescencia del DPH incorporado en la membrana como marcador.

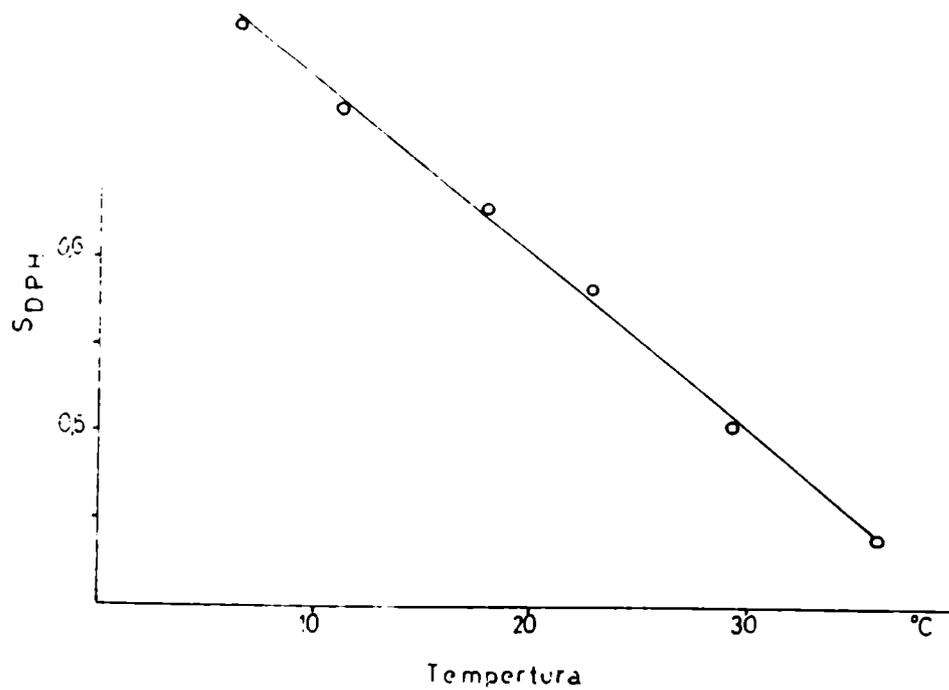


FIGURA 18: Influencia de la temperatura sobre el parámetro de orden (S_{DPH}) de microsomas de hígado de rata, calculado del grado de depolarización de la fluorescencia emitida por el DPH incorporado en la membrana como marcador.

///

ta un valor de microviscosidad aparente que cae en el extremo inferior del dicho rango. Esto indica un alto grado de fluidez para esta membrana.

En la figura 18 se muestra la dependencia de la temperatura del parámetro de orden S_{DPH} . S_{DPH} disminuye progresivamente con la temperatura sin que se produzcan cambios bruscos de pendiente, indicando así la ausencia de una transición de fase. S_{DPH} dio un valor de 0,44 a 36°C. Esto indica un bajo grado de ordenamiento que permite una relativamente alta libertad de rotación del fluoróforo en el interior hidrofóbico de la membrana. La gran mayoría de las membranas biológicas presentan parámetros de orden S_{DPH} superiores a este (442).

III.1.4.- Efecto de la temperatura sobre la actividad de enzimas microsomales.

a) Sistema de la glucosa-6-fosfatasa.

La figura 19 muestra la curva de Arrhenius de la actividad de la G-6-P fosfohidrolasa en microsomas de hígado de rata. Esta muestra una línea recta sin discontinuidades o quebraduras entre 10 y 40°C. Ha sido reportado sin embargo, que esta actividad enzimática muestra curvas de Arrhenius no lineales en microsomas de hígado de cobayo (331) y en microsomas de *Tetrahymena pyriformis* (235), las cuales fueron atribuidas a alteraciones estructurales termotrópicas en la fase lipídica de la membrana. Así, estos resultados pueden ser considerados como indicativos de la ausencia de una alteración en la estructura de los lípidos que circundan a esta enzima en el rango de temperatura estudiado.

Como vimos en la parte de Introducción, la reacción de la G-6-Pasa consta de dos etapas: a) el transporte de la G-6-P desde el exterior hacia el interior de la vesícula microsomal y b) la hidrólisis de la G-6-P por una hidrolasa unida a la superficie interna de la membrana microsomal. La etapa limitante de todo el proceso en vesículas intactas es la etapa del

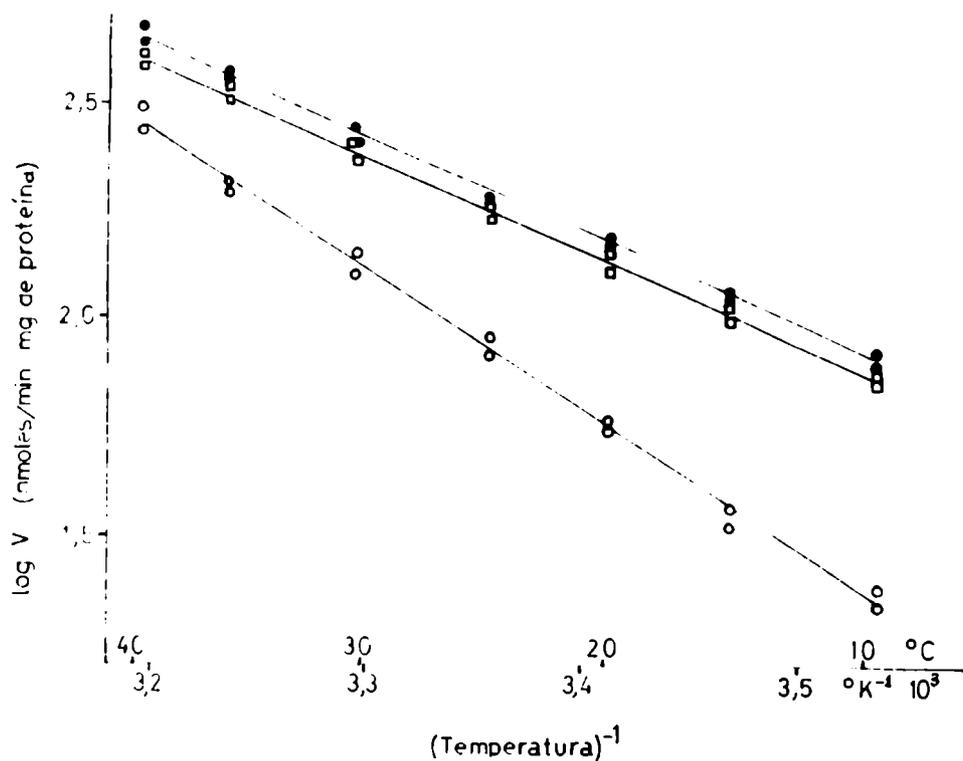


FIGURA 19: Curva de Arrhenius de la actividad glucosa-6-fosfatasa en microsomas de hígado de rata: a) sin ningún tratamiento previo (o—o), b) pretratados con desoxicolato de sodio 0,1 % (p/v) (□—□), y c) pretratados con Triton X-100 0,1 % (v/v) (●—●). Los intervalos del 95 % para las energías de activación aparentes son las siguientes: Microsomas sin tratar = $14,8 \pm 0,8$ Kcal/mol; Microsomas pretratados con desoxicolato = $10,2 \pm 0,5$ Kcal/mol; y Microsomas pretratados con Triton X-100 = $10,1 \pm 0,6$ Kcal/mol. Hubo una diferencia altamente significativa ($p < 0,001$) entre las Ea de los microsomas sin tratar y los tratados con los detergentes.

///

transporte. Así, la curva de la figura 19, en microsomas no tratados, nos muestra la dependencia de la temperatura del proceso de transporte de la G-6-P a través de la bicapa lipídica.

Cuando los microsomas son tratados previamente con detergentes, desaparece la barrera de permeabilidad a la G-6-P, y esta tiene libre acceso a la hidrolasa en el interior de las vesículas. En estas condiciones puede medirse entonces la actividad del componente hidrolítico. En la figura 19 se muestran también las curvas de Arrhenius de la actividad G-6-Pasa en microsomas de hígado de rata previamente tratados con desoxicolato de sodio 0,1 % o con Triton X-100 0,1 %. De su observación y comparación con la de los microsomas no tratados pueden extraerse dos conclusiones: a) La energía de activación (E_a) aparente de la reacción es menor en los microsomas tratados con detergentes (10,2 Kcal/mol) que en los microsomas sin tratar (14,8 Kcal/mol). Estas fueron significativamente diferentes en el nivel del 0,1 al ser analizadas estadísticamente. Esto indica que la temperatura tiene una mayor influencia sobre el transporte de la G-6-P a través de la membrana que sobre la actividad hidrolítica propiamente dicha; y b) La curva de Arrhenius de la actividad hidrolítica también es completamente lineal en el rango de temperatura estudiado, como lo muestran las curvas obtenidas en microsomas en los que se eliminó la barrera de permeabilidad mediante el tratamiento con detergentes.

En el cuadro VI, se resumen las actividades obtenidas a 15 y a 30°C en los microsomas tratados con detergente y en los no tratados. El incremento en actividad al eliminar la barrera de permeabilidad indica que la etapa determinante de la velocidad de la reacción en los microsomas no tratados es la actividad traslocadora de la G-6-P a través de la bicapa lipídica.

Los microsomas pretratados con Tritón X-100 mostraron una actividad levemente superior que los tratados con desoxicolato de sodio. Esto puede ser debido a un leve efecto inhibito-

TABLA VI

LATENCIA DE LA ACTIVIDAD G-6-Pasa EN MICROSOMAS DE HIGADO DE RATA OBSERVADA
POR EL TRATAMIENTO CON DETERGENTES

TRATAMIENTO	ACTIVIDAD G-6-Pasa (nmoles/min.mg de proteína)	% DE LATENCIA
	36°C	15°C
	36°C	36°C
	15°C	15°C
MICROSOMAS NO TRATADOS	136,9	25,9
MICROSOMAS TRATADOS CON TRITON X-100 0,1%	266,0	76,9
		48,5
		66,3
MICROSOMAS TRATADOS CON DESOXICOLATO DE Na 0,1%	241,4	72,5
		43,3
		64,3

*. El % de latencia es la proporción de actividad que es expresada únicamente luego del tratamiento con detergentes.

///

rio de este último detergente sobre la actividad hidrolítica, que ya ha sido descrito por el grupo de Arion (393). Sin embargo en algunas experiencias posteriores se continuó utilizando desoxicolato de sodio ya que a estas concentraciones la inhibición es muy leve.

b) Sistema desaturante de ácidos grasos.

La figura 20 muestra la curva de Arrhenius de la $\Delta 9$ desaturación del ácido palmítico a palmitoleico y la de la $\Delta 6$ desaturación del ácido linoleico a 18:3 $\omega 6$ en microsomas de hígado de rata. Las curvas de Arrhenius para ambas reacciones - muestran un cambio lineal del logaritmo de la actividad sin - ninguna quebradura o discontinuidad en el rango de temperatura estudiado. La E_a aparente es bastante similar para ambas reacciones, del orden de 15 Kcal/mol.

Las reacciones de desaturación medidas son el resultado de una serie de reacciones individuales que comienzan con la síntesis de los tioésteres acil-CoA, continúa con el transporte de electrones desde el NADH hasta el oxígeno molecular a través de una serie de proteínas: la citocromo b_5 reductasa, el citocromo b_5 , y la desaturasa. Conjuntamente con la reducción del Fe^{+++} no hemínico de la desaturasa y su reoxidación - por el oxígeno molecular se produce la desaturación del acil-CoA. La etapa mas lenta de toda esta secuencia de reacciones - es la desaturación del acil-CoA (357, 252).

Así, los resultados obtenidos reflejan el efecto de la temperatura sobre esta etapa determinante, y por lo tanto - la linealidad de las curvas de Arrhenius indica la ausencia de una transición de fase en los lípidos que circundan a las desaturasas en el rango de temperatura medido.

Ha sido demostrado que al menos la $\Delta 9$ desaturasa es capaz de responder a la transición de fase de los lípidos. Cuando esta enzima purificada fue incorporada en liposomas de DMPC, conjuntamente con citocromo b_5 y citocromo b_5 reductasa, mos-

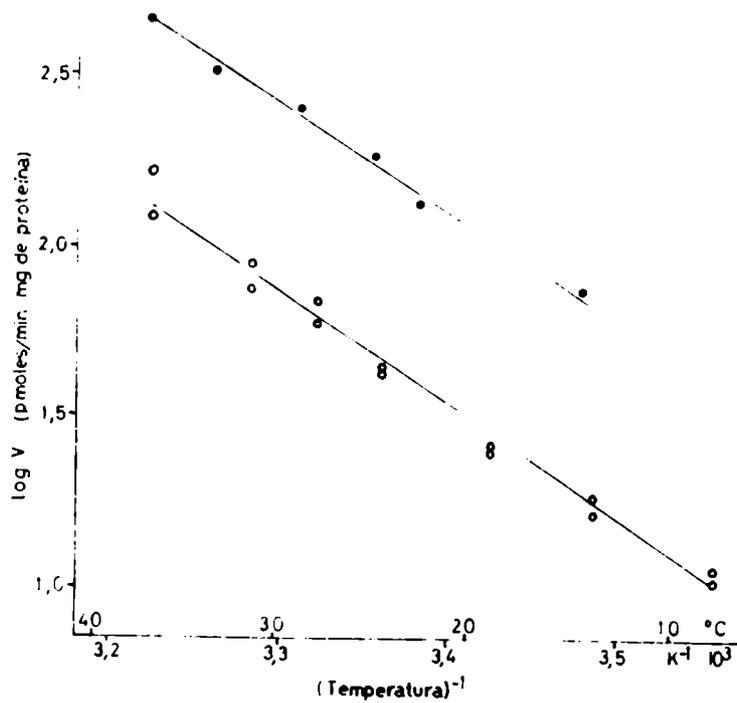


FIGURA 20: Curvas de Arrhenius de las actividades desaturantes de ácidos grasos en microsomas de hígado de rata. a) $\Delta 9$ desaturación de ácido palmítico (●—●), y b) $\Delta 6$ desaturación del ácido linoleico (o—o). Los intervalos de confianza del 95 % para las E_a fueron: $\Delta 6$ desaturasa $15,2 \pm 1,3$ Kcal/mol; y $\Delta 9$ desaturasa $14,8 \pm 1,2$ Kcal/mol.

///

tró una quebradura en su curva de Arrhenius con un cambio de pendiente alrededor de 24°C, que es la temperatura de transición de fase de la DMPC.

Cuando las actividades NADH-ferricianuro reductasa y NADH-citocromo c reductasa se investigaron en microsomas de hígado de rata, sus curvas de Arrhenius fueron también completamente lineales entre 10 y 40°C como se puede ver en la figura 21.

La primera reacción consiste en la reducción del ferricianuro por el NADH, y es catalizada por la NADH-citocromo b_5 reductasa, que es una flavoproteína anfipática unida a la membrana microsomal (363, 364). La segunda reacción mide la transferencia de electrones desde el NADH hasta el aceptor exógeno citocromo c, a través de la flavoproteína citocromo b_5 reductasa y del citocromo b_5 , siendo la etapa determinante de esta reacción la reducción del citocromo b_5 por la flavoproteína (251).

Es importante señalar que la E_a aparente para la NADH-ferricianuro reductasa (9,2 Kcal/mol) es algo menor que la E_a aparente para la NADH-citocromo c reductasa (11,7 Kcal/mol). Así, la temperatura tiene una influencia algo mayor sobre la reducción del citocromo b_5 por la citocromo b_5 reductasa, que sobre la reducción de la flavoproteína por el NADH. Esto puede verse mejor en la figura 22 en la cual se expresa la actividad NADH-citocromo c reductasa como un porcentaje de la actividad NADH-ferricianuro reductasa en función de la temperatura. Puede verse en esta figura, que la actividad relativa de NADH-citocromo c reductasa a NADH-ferricianuro reductasa aumenta linealmente al aumentar la temperatura. A una temperatura determinada, la actividad NADH-ferricianuro reductasa puede ser considerada como la velocidad máxima de la actividad NADH-citocromo c reductasa que se alcanzaría cuando la relación de citocromo b_5 a citocromo b_5 reductasa es suficientemente alta (363, 251). Así, la figura 22 muestra un incremento en

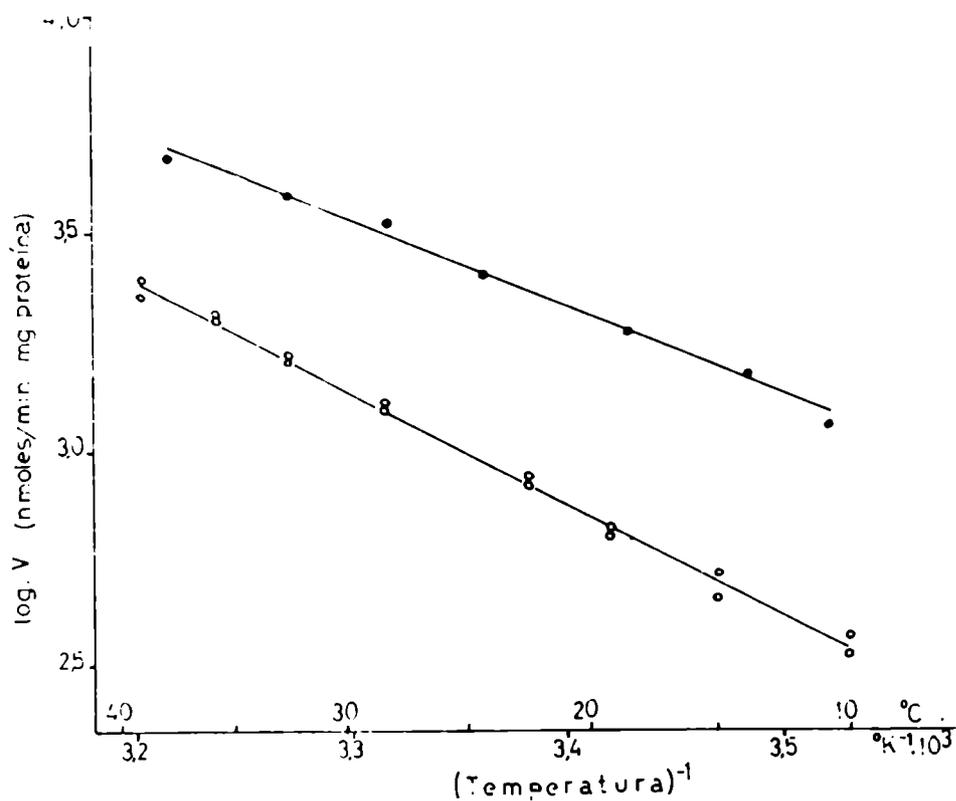


FIGURA 21: Curvas de Arrhenius de las actividades del sistema de transporte de electrones del citocromo b5 de microsomas de hígado de rata. a) NADH-ferricianuro reductasa (●—●), y b) NADH-citocromo c reductasa (○—○). Los intervalos de confianza del 95 % para las E_a fueron: NADH-ferricianuro reductasa = $9,2 \pm 0,9$ Kcal/mol; y NADH-citocromo c reductasa = $11,7 \pm 0,5$ Kcal/mol.

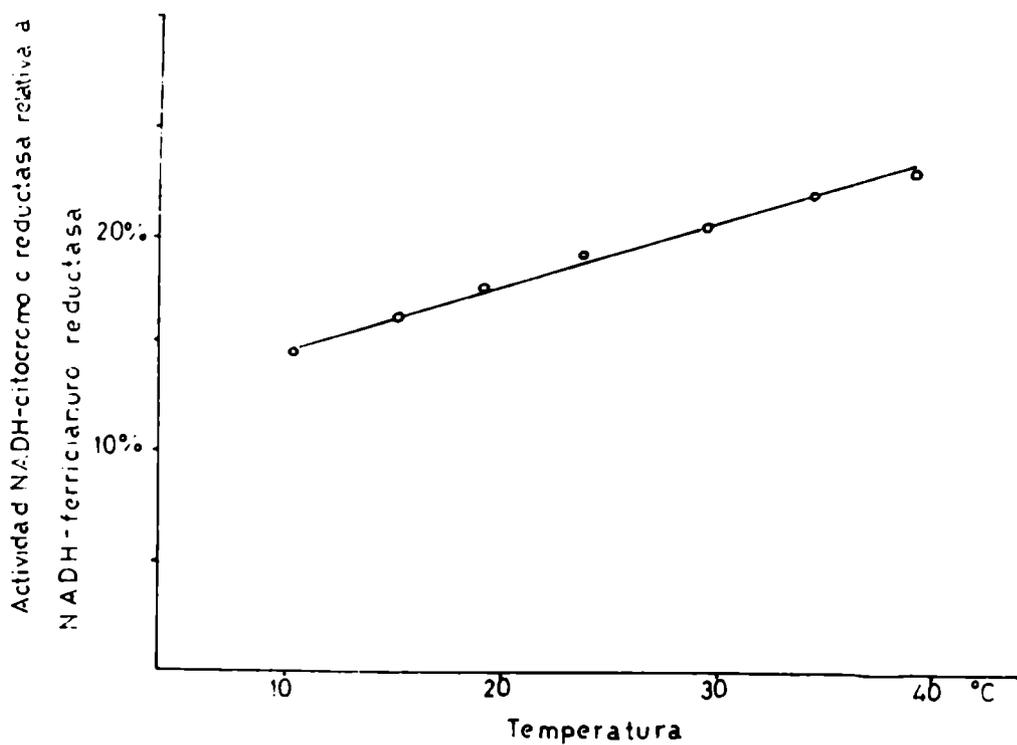


FIGURA 22: Influencia de la temperatura sobre la actividad NADH-citocromo c reductasa relativa a la NADH-ferricianuro reductasa. La actividad relativa se calculó de:

$$\% \text{ de actividad relativa} = \left(\frac{\text{actividad NADH-citocromo c reductasa}}{2 \times \text{actividad NADH-ferricianuro reductasa}} \right) \times 100.$$

El factor 2 que multiplica a la actividad NADH-ferricianuro reductasa se debe a que esta se expresa como nmoles de NADH oxidados en la unidad de tiempo, mientras que la NADH-citocromo c reductasa es expresada como nmoles de citocromo c reducidos por minuto, y la estequiometría de la reacción requiere 2 moles de citocromo c por mol de NADH.

///

v/V_{max} con la temperatura para una determinada relación de citocromo b_5 a flavoproteína. En estos microsomas, la cantidad de citocromo b_5 fue estimada en 0,44nmoles/mg de proteína, y la cantidad de citocromo b_5 reductasa fue de 0,041 nmoles/mg de proteína. Esto da una relación de 11 moléculas de citocromo b_5 por cada molécula de citocromo b_5 reductasa aproximadamente.

El grupo de Strittmatter (251) incorporó en vesículas artificiales de DMPC distintas proporciones de citocromo b_5 y de citocromo b_5 reductasa purificadas, y observaron que cuando la relación de citocromo b_5 a citocromo b_5 reductasa fue baja, la reacción NADH-citocromo c reductasa mostró un brusco descenso en su actividad al disminuir la temperatura por debajo de 24°C, que es la temperatura de transición de fase de la DMPC. La curva de Arrhenius de la NADH-ferricianuro reductasa, por el contrario fue completamente lineal. Además cuando se representó la actividad NADH-citocromo c reductasa como porcentaje de su actividad máxima, la NADH-ferricianuro reductasa, esta mostró un brusco incremento al subir la temperatura por encima de 24°C. Sin embargo, cuando la relación de citocromo b_5 a flavoproteína fue alta, ninguna de las dos reacciones fue afectada por la transición de fase y la representación de la actividad NADH-citocromo c reductasa como porcentaje de la actividad NADH-ferricianuro reductasa fue lineal.

Estos resultados fueron atribuidos a que a bajas relaciones de citocromo b_5 a citocromo b_5 reductasa, el factor determinante de la velocidad de la reacción NADH-citocromo c reductasa es la difusión lateral de las proteínas citocromo b_5 y citocromo b_5 reductasa en el plano de la bicapa lipídica. La velocidad de difusión lateral limitaría el número de encuentros entre las proteínas y la consecuente transferencia de electrones entre ellas.

El brusco descenso en la actividad de la NADH-citocromo c reductasa por debajo de 24°C fue atribuido a una disminución de la velocidad de difusión lateral de las proteínas -

///

cuando la fase lipídica se encuentra en el estado cristalino. A altas relaciones de citocromo b_5 a citocromo b_5 reductasa, la difusión lateral ya no es limitante de la velocidad, sino que lo es la actividad de la flavoproteína, y esta parece ser independiente del estado físico de los lípidos de la membrana.

En nuestros experimentos, la linealidad de la curva de Arrhenius de la NADH-citocromo c reductasa podría indicar la ausencia de una transición de fase en los lípidos de la membrana microsomal, o bien una relación de citocromo b_5 a citocromo b_5 reductasa lo suficientemente alta como para hacer que la difusión lateral no sea determinante de la velocidad. Sin embargo, esta última posibilidad puede ser descartada ya que en todo el rango de temperatura estudiado, la actividad NADH-ferricianuro reductasa fue bastante superior a la actividad NADH-citocromo c reductasa. Además, la relación de citocromo b_5 a citocromo b_5 reductasa calculada está por debajo de 45, que es el valor por encima del cual la transición de fase de la dimiristoil fosfatidilcolina dejó de afectar a la curva de Arrhenius de la NADH-citocromo c reductasa (251). Por lo tanto puede concluirse que en la membrana microsomal de hígado de rata, no ocurre ninguna transición de fase que pueda afectar a la difusión lateral del citocromo b_5 y a su reducción por la citocromo b_5 reductasa.

El incremento en el porcentaje de su velocidad máxima con la temperatura para la reacción NADH-citocromo c reductasa (figura 22), puede indicar un aumento en la velocidad de difusión lateral del citocromo b_5 debido a un aumento en la fluidez de la fase lipídica con la temperatura.

III.1.5.- Discusión.

a) Estructura de la membrana microsomal.

Los espectros de ESR de derivados doxil esteárico incorporados en la membrana microsomal indican que el grupo doxilo es capaz de sufrir un rápido movimiento anisotrópico. Sin

///

embargo, estas experiencias también mostraron que el movimiento de las cadenas hidrocarbonadas es mucho mayor y más isotrópico en el interior hidrofóbico de la membrana que en la zona más polar de la misma.

Este gradiente de movilidad o de fluidez al ir de la zona más polar a la región hidrofóbica central de la bicapa lipídica ha sido mostrado también en otros tipos de membranas biológicas (178, 179) y en membranas artificiales (74, 75, 71, 72) por métodos de resonancia electrónica paramagnética (74, 75, 178, 179, 73), por resonancia magnética nuclear (71, 72) y por polarización de fluorescencia (76).

La determinación del parámetro de orden S del espectro de ESR del ácido 5-doxil esteárico, y también el determinado del grado de depolarización de la fluorescencia del DPH, indican que a temperaturas fisiológicas, la membrana microsomal de hígado de rata presenta un grado de fluidez muy alto, ya que este parámetro cae entre los valores más bajos determinados para otras membranas biológicas.

La microviscosidad aparente determinada de la depolarización de fluorescencia del DPH, indica también que este marcador presenta una gran libertad de movimiento rotacional cuando se encuentra incorporado en la membrana microsomal.

Las proteínas de membrana pueden afectar de diversas maneras a la estructura y fluidez de la fase lipídica en la que se encuentran (ver capítulo I). Sin embargo, las proteínas integrales de la membrana microsomal parecen tener muy poca influencia sobre la movilidad de los ácidos doxil esteárico, utilizados en estas experiencias como marcadores de ESR. Esto sugiere que el medio ambiente en el que se ubican estos marcadores es esencialmente lipídico y estaría de acuerdo con lo sugerido por Marcelja (138) en que las proteínas solo afectarían a la estructura la movilidad de unas pocas moléculas de lípidos en su entorno inmediato. Así, estos efectos no serían percibidos por estos marcadores si estos son excluidos de ese

"annulus" lipídico que circunda a las proteínas o si la proporción de los lípidos afectados por las interacciones lípido-proteína es baja en relación al total de los lípidos de la membrana.

Como se vio en el capítulo I, transiciones de fase de un estado desordenado a un estado ordenado de los lípidos han sido detectadas en una gran variedad de membranas biológicas por diferentes métodos físicos. En el caso de la membrana del retículo endoplásmico se detectaron por polarización de fluorescencia en microsomas de corteza adrenal (325). También en membranas de retículo endoplásmico de *Tetrahymena pyriformis* se encontraron alteraciones en la estructura y movilidad de la fase lipídica por medio de ESR y por la intensidad de fluorescencia de 8-anilino 1-naftaleno sulfonato, pero no se detectó ninguna transición de fase por encima de 0°C por medio de calorimetría diferencial (235).

En microsomas de hígado de rata, se ha reportado que no presentan transición de fase por calorimetría diferencial atribuible a los lípidos entre 0 y 50°C (232), pero se ha reportado que estos microsomas en presencia de etilenglicol 50% presentan una transición por debajo de 0°C (326). Por microscopía de congelación grabado también se observó un agrupamiento de partículas a bajas temperaturas en microsomas de hígado de rata (327).

También se han reportado en microsomas de hígado de rata (218) y de cobayo (331), alteraciones termotrópicas en los lípidos detectadas por ESR y por marcadores fluorescentes a alrededor de 20°C. Estas alteraciones parecieron ocurrir en el interior hidrofóbico de la membrana ya que fueron detectadas por N-fenil-1-naftilamina que se ubica bien en el interior de la bicapa lipídica y no por 8-anilino-1-naftaleno sulfonato que se ubica en la región de la bicapa cercana a los grupos polares (218). Con marcadores de ESR, estas alteraciones fueron

detectadas por 12 o 13-doxil esteárico (265, 333, 334, 454), pero no con 5-doxil esteárico (117). El brusco cambio en la fluidez observado en ciertas zonas de la membrana fue atribuido en algunos casos a una transición de fase cristalino-líquido cristalino (335). Sin embargo, la ausencia de una transición detectable por calorimetría parece sugerir lo contrario (232, 326, 336). Se ha propuesto que estas alteraciones, en lugar de una verdadera transición de fase cristalino-líquido cristalino, se tratarían de la formación de agrupamientos de lípidos "rígidos" pero aún en el estado líquido-cristalino, separados lateralmente de los lípidos fluidos y formando dominios discretos (218).

En nuestros experimentos, sus resultados muestran que ninguna transición de fase cristalino-líquido cristalino ocurre en la membrana microsomal de hígado de rata, ni tampoco alguna alteración brusca en la estructura o fluidez de la fase lipídica que pueda afectar a la movilidad del grupo doxilo cuando está ubicado en las posiciones 5 o 16 de la cadena del ácido esteárico, ni a la partición de la N-fenil-1-naftilamina entre la fase acuosa y la membrana, ni a la velocidad de rotación del DPH en el rango de temperatura que va de 10 a 40°C.

Estos datos indican que los microsomas de hígado de rata se encuentran en el estado líquido cristalino por lo menos por encima de 10°C. Este alto grado de fluidez no solo permite una alta movilidad rotacional de los marcadores fluorescentes y de ESR, sino que también permite una alta velocidad de difusión lateral del ácido 5-doxil esteárico en la membrana del orden de 10^{-8} cm²/seg.

Este estado de alta fluidez puede ser debido al alto contenido de ácidos grasos polietilénicos como araquidónico y linoleico que presenta esta membrana.

b) Actividad y curvas de Arrhenius de enzimas microsomales.

Se ha reportado que la actividad G-6-Pasa presenta una curva de Arrhenius no lineal en microsomas de hígado de co

///

bayo (331), con un cambio de pendiente a aproximadamente 19°C - que fue atribuida a una transición de fase de los lípidos detectada por resonancia electrónica paramagnética. Una dependencia de la fluidez de la membrana de la curva de Arrhenius de la glucosa-6-fosfatasa fue también observada en membranas de retículo endoplásmico de *Tetrahymena pyriformis* (235). Mas aún, las curvas de Arrhenius de la G-6-Pasa han sido utilizadas para detectar transiciones de fase (455).

En nuestras experiencias, no se detectó ninguna quebradura, ni en la curva de Arrhenius de la actividad de transporte de la G-6-P a través de la membrana en microsomas tratados con detergentes. De esto puede deducirse que ninguna alteración brusca en la estructura de los lípidos que pueda afectar a estas actividades ocurre en la membrana microsomal de hígado de rata entre 10 y 40°C.

De las enzimas del sistema desaturante de ácidos grasos, al menos la Δ^9 desaturasa y la NADH-citocromo c reductasa han mostrado responder a la transición de fase de la bicapa lipídica cuando las proteínas purificadas fueron incorporadas en vesículas de DMPC (251, 252). Así, la ausencia de quebraduras en las curvas de Arrhenius de estas actividades en la membrana de microsomas de hígado de rata indica que en el rango de temperatura estudiado no ocurre ninguna alteración en la estructura de la fase lipídica que afecte al comportamiento de estas actividades enzimáticas. Ninguna alteración en los lípidos por la temperatura que pueda afectar a la Δ^6 desaturación del ácido linoleico a 18:3 ω^6 ocurrió tampoco en este rango de temperatura. También se ha mostrado en nuestro laboratorio que las reacciones de Δ^6 desaturación de α -linolénico a octadecatetranoico y la elongación del ácido palmítico a ácido esteárico, dieron curvas de Arrhenius completamente lineales entre 10 y 40°C (456).

Así, estos resultados sugieren que los lípidos que circundan a la G-6-Pasa, NADH-citocromo c reductasa y desaturasas, también están en un estado fluido y no muy diferente al resto de los lípidos de la membrana.

Es importante remarcar que este no sería el caso para el otro sistema de transporte de electrones microsomal, el del citocromo P₄₅₀. Ha sido demostrado que el citocromo P₄₅₀ presenta un anulus de lípidos en un estado mas rígido que el resto de los lípidos de la membrana (117, 321), y que este "anulus" sufre una transición de fase a aproximadamente 36°C y presentaría un alto porcentaje de fosfatidiletanolamina (27) en la forma de micellas invertidas. Además, las curvas de Arrhenius de varias reacciones de monooxigenación de drogas que dependen del citocromo P₄₅₀ como la N-demetilación de etil-morfina, benzfetamina aminopirina y p-nitroanisol muestran quebraduras a aproximadamente 24°C (329). Resultados similares han sido obtenidos para la dealkilación de 7-etoxicumarina (266).

Utilizando marcadores de ESR como sustratos, se pudo observar que tales quebraduras en las curvas de Arrhenius de estas reacciones solo ocurren si el sustrato es liposoluble, pero no cuando es hidrosoluble (117). Si el sustrato es liposoluble, la única manera de acceder a la enzima sería a través de la difusión lateral atravesando el "anulus" lipídico y esta difusión se vería muy reducida por debajo de la temperatura en que los lípidos del "anulus" cambian de estado.

En consecuencia, los lípidos de la membrana del retículo endoplásmico están aparentemente distribuidos de una manera heterogénea, y mientras que la gran parte de los lípidos forman una bicapa fluida, algunas zonas lipídicas pueden presentar otra estructura.

III.2.- EFFECTO DE LA CARENCIA DE ACIDOS GRASOS ESENCIALES SOBRE LA ESTRUCTURA DE LA MEMBRANA MICROSOMAL Y SOBRE LA ACTIVIDAD DE ALGUNAS ENZIMAS MICROSOMALES.

III.2.1.- Efecto de la deficiencia en ácidos grasos esenciales sobre la composición lipídica de la membrana microsomal.

La carencia de ácidos grasos esenciales en la dieta - produjo importantes cambios en la composición de ácidos grasos de los lípidos de la membrana del retículo endoplásmico de hígado de rata. En la tabla VII se muestra un experimento típico en el cual las ratas fueron alimentadas con una dieta libre de grasas durante un período de un mes y la composición de ácidos grasos de sus microsomas se compara con la de ratas de la misma edad alimentadas con una dieta standard.

Los cambios mas importantes que se observan son: una disminución en la proporción de ácido araquidónico y linoleico un incremento en la proporción del ácido oleico y de palmitoleico, y la aparición del ácido eicosa-5,8,11-trienoico, el - cual está ausente o prácticamente ausente cuando los animales son alimentados con una dieta standard. Sin embargo, no hubo - un gran cambio en el grado de insaturación, como lo indica el índice de doble enlaces.

Fue de interés estudiar el efecto de la deficiencia en ácidos grasos esenciales en períodos de tiempo mas cortos. Con este objeto, inmediatamente después del destete, las ratas fueron separadas en dos grupos de 15 animales. Uno de estos - grupos fue alimentado con una dieta control y el otro fue alimentado con una dieta carente en ácidos grasos esenciales. A - los 4, 11 y 23 días luego del destete, cinco animales de cada grupo fueron sacrificados y se determinó en ellos la composición de lípidos y de ácidos grasos de los microsomas de hígado.

Durante esta experiencia no se detectó ninguna diferencia significativa en la distribución de las distintas cla-

TABLA VII

EFFECTO DE LA ALIMENTACION CON UNA DIETA LIBRE DE GRASA SOBRE LA COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS DE LOS LIPIDOS DEL RETICULO ENDOPLASMICO DE HIGADO DE RATA

ACIDO GRASO	PORCENTAJE EN PESO	
	DIETA STANDARD	DIETA LIBRE DE GRASA
16:0	25,5	27,1
16:1	0,3	3,8
18:0	27,3	20,8
18:1	5,1	26,8
18:2	13,4	2,9
20:3		5,6
20:4	23,2	10,5
22:6	5,2	2,5
INDICE DE DO- BLES LIGADURAS	2,65	2,07

Las determinaciones fueron hechas en un pool de los microsomas de hígado de tres ratas de cada grupo.
Un mes de alimentación con la dieta carente.
Solo los ácidos principales fueron considerados.

ses de lípidos entre los dos grupos de animales, a ninguno de los tres períodos de tiempo en que se estudió. La composición de lípidos de estos microsomas fue esencialmente similar a la mostrada en la tabla II. Tampoco se modificó por la deficiencia de ácidos grasos esenciales la relación de lípido a proteína de los microsomas.

La composición de ácidos grasos de los lípidos microsomales, por el contrario, fue modificada muy rápidamente por la carencia de ácidos grasos esenciales en la dieta. Esto se puede observar en la tabla VIII. Al cabo de solo cuatro días de carencia, ya pudo detectarse un pequeño decrecimiento en la proporción del ácido linoleico y una gran disminución en el contenido de ácido araquidónico. La cantidad de ácido linoleico siguió decreciendo hasta el undécimo día de carencia y a partir de allí su proporción se estabilizó. El contenido de ácido araquidónico no siguió decreciendo luego del cuarto día de carencia. Se puede observar también que ocurrió un incremento en la cantidad de ácido palmítico hasta el undécimo día de carencia y a partir de allí volvió a disminuir.

Esta pérdida de ácidos grasos polietilénicos derivados de los ácidos grasos esenciales fue inmediatamente compensada por un incremento en la cantidad de ácidos grasos insaturados de la familia no esencial. Un incremento gradual en la proporción de los ácidos palmitoleico y oleico fue observada a medida que aumentó el tiempo de carencia. Una significativa proporción del ácido eicosa-5,8,11-trienoico, sin embargo, únicamente fue detectada a partir del undécimo día de carencia de ácidos grasos esenciales en la dieta.

Las relaciones de eicosa-5,8,11-trienoico a araquidónico y de oleico a esteárico son consideradas a menudo como un índice del grado de deficiencia en ácidos grasos esenciales. El índice $20:3/20:4$ tiene un valor de 0 para los animales alimentados con dieta completa y aumentó en función del tiempo de carencia hasta alcanzar un valor de 0,11 a los 11 -

TABLA VIII

EFFECTOS TEMPRANOS DE LA DEFICIENCIA EN ACIDOS GRASOS ESPECIALES SOBRE LA COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS DE LOS LIPIDOS MICROSONALES DE HIGADO DE RATA

ACIDO GRASO	PERIODO DE DEFICIENCIA EN ACIDOS GRASOS ESPECIALES					
	4 DIAS		11 DIAS		23 DIAS	
	CONTROL	DEFICIENTE	CONTROL	DEFICIENTE	CONTROL	DEFICIENTE
16:0	25,6 \pm 3,2*	39,9 \pm 3,3	29,8 \pm 2,0	47,9 \pm 1,5	21,4 \pm 0,5	27,3 \pm 1,1
16:1	0,6 \pm 0,3	1,1 \pm 0,6	0,2 \pm 0,2	2,8 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1	5,6 \pm 0,9
18:0	26,1 \pm 1,7	19,2 \pm 1,8	25,3 \pm 1,4	15,9 \pm 0,5	27,7 \pm 3,4	20,6 \pm 1,2
18:1	5,6 \pm 0,8	9,7 \pm 0,8	5,5 \pm 0,5	12,8 \pm 4,1	6,0 \pm 0,4	17,4 \pm 0,7
18:2	12,8 \pm 1,3	10,1 \pm 1,2	11,2 \pm 1,1	4,1 \pm 0,3	12,5 \pm 0,3	5,1 \pm 0,5
20:3 ω 9	-----	-----	-----	1,1 \pm 0,3	-----	4,9 \pm 0,8
20:4	24,2 \pm 1,2	12,0 \pm 1,5	24,0 \pm 1,8	9,9 \pm 0,6	29,2 \pm 2,4	12,5 \pm 1,6
22:6	5,0 \pm 1,1	7,5 \pm 1,6	3,9 \pm 0,5	4,6 \pm 0,4	2,3 \pm 0,3	5,4 \pm 0,6
20:3/20:4				0,11		0,39
18:1/18:0	0,21	0,51	0,22	0,82	0,22	0,84
INDICE DE DO- BLES LIGADURAS#	2,63	1,81	2,37	1,19	2,97	2,53

* La composición de ácidos grasos es la media de 5 animales \pm el error standard. Solo se consideraron los ácidos principales.

El índice de dobles ligaduras se calculó como se indicó en la sección II.4.2.

///

días de carencia y de 0,39 a los 23 días de carencia. El índice 18:1/18:0 tiene un valor de 0,22 en los animales alimentados con dieta completa, y aumentó ya a 0,51 a los cuatro días de carencia y a 0,82 a los 11 días, valor que se mantuvo constante a los 23 días de carencia.

La proporción relativa de ácidos insaturados a ácidos saturados es generalmente considerada como uno de los factores más importantes que determinan la fluidez de una bicapa lipídica. Por esta razón, se calculó de la composición de ácidos grasos, el "índice de dobles ligaduras", como se indicó en la sección II.3.2. Este índice ha sido utilizado como una estimación relativa de la fluidez de la membrana (282, 457). La fluidez de la membrana también puede depender de la proporción de las diferentes clases de lípidos, como la relación de colesterol a fosfolípidos o de fosfatidiletanolamina a fosfatidilcolina. Sin embargo, si la composición lipídica se mantiene constante, como ocurre en este caso, este índice podría dar una buena indicación de la fluidez de la fase lipídica de la membrana. Debe tenerse en cuenta, sin embargo, que otros factores no contemplados en el índice de dobles ligaduras, como por ejemplo la longitud de las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos, pueden también ser importantes en la determinación del grado de fluidez de la membrana.

El índice de dobles ligaduras disminuyó significativamente ya a los cuatro días de carencia de 2,63 a 1,81 ($\Delta = -0,82$). En el undécimo día de carencia, el incremento en la cantidad de ácidos monoenoicos no fue todavía capaz de compensar la pérdida de ácidos poliinsaturados de la familia del ácido linoleico, ya que el índice de dobles ligaduras disminuyó aún más, de 2,37 a 1,19 ($\Delta = -1,18$). Este índice, sin embargo, fue normalizado en gran medida en el vigésimotercer día de carencia ($\Delta = -0,44$), debido al aumento en la proporción de ácidos monoenoicos y a la síntesis e incorporación del ácido eicosa-5,8,11-trienoico.

Así, esta experiencia muestra que la alimentación con dietas carentes en ácidos grasos esenciales, provoca tempranos cambios en la composición y en el grado de insaturación de los ácidos grasos de los lípidos de los microsomas de hígado de rata. Estos cambios son, sin embargo, en gran medida compensados mas tarde por un aumento en la proporción de ácidos insaturados de la familia ω_9 , como palmítico, oleico y eicosa-5,8,11-trienoico, los cuales pueden ser sintetizados "de novo" a partir de acetil CoA. Estos ácidos reemplazan como constituyentes de los lípidos de la membrana, a los ácidos de la familia ω_6 , como linoleico y araquidónico, los cuales no pueden ser sintetizados "de novo", y ellos o sus precursores están ausentes en la dieta.

III.2.2.- Efecto de la deficiencia en ácidos grasos esenciales sobre la estructura de la membrana microsomal.

La estructura de la membrana microsomal fue investigada comparativamente en animales alimentados con dieta completa y con dieta carente en ácidos grasos esenciales. Para ello se utilizaron distintos métodos físicos como ESR y fluorescencia, utilizando distintos marcadores con el fin de explorar distintas zonas de la membrana. Estas mediciones se realizaron en los microsomas completos y con dispersiones de los lípidos extraídos de la membrana microsomal. La relación entre la intensidad de los dos picos de mayor campo, h_0/h_{-1} , se calculó a distintas temperaturas del espectro de ESR del ácido 16-doxil esteárico incorporado en los microsomas. En la figura 23 se puede ver que la relación h_0/h_{-1} es en todos los casos una función continua de la temperatura, sin discontinuidades ni cambios abruptos de pendiente, aún en los microsomas de los animales deficientes en ácidos grasos esenciales. Esto puede interpretarse como una indicación de la ausencia de una transición de fase o un brusco cambio en la movilidad de las cadenas hidrocarbonadas, en el interior hidrofóbico de la membrana.

Nuevamente, las curvas obtenidas en los microsomas -

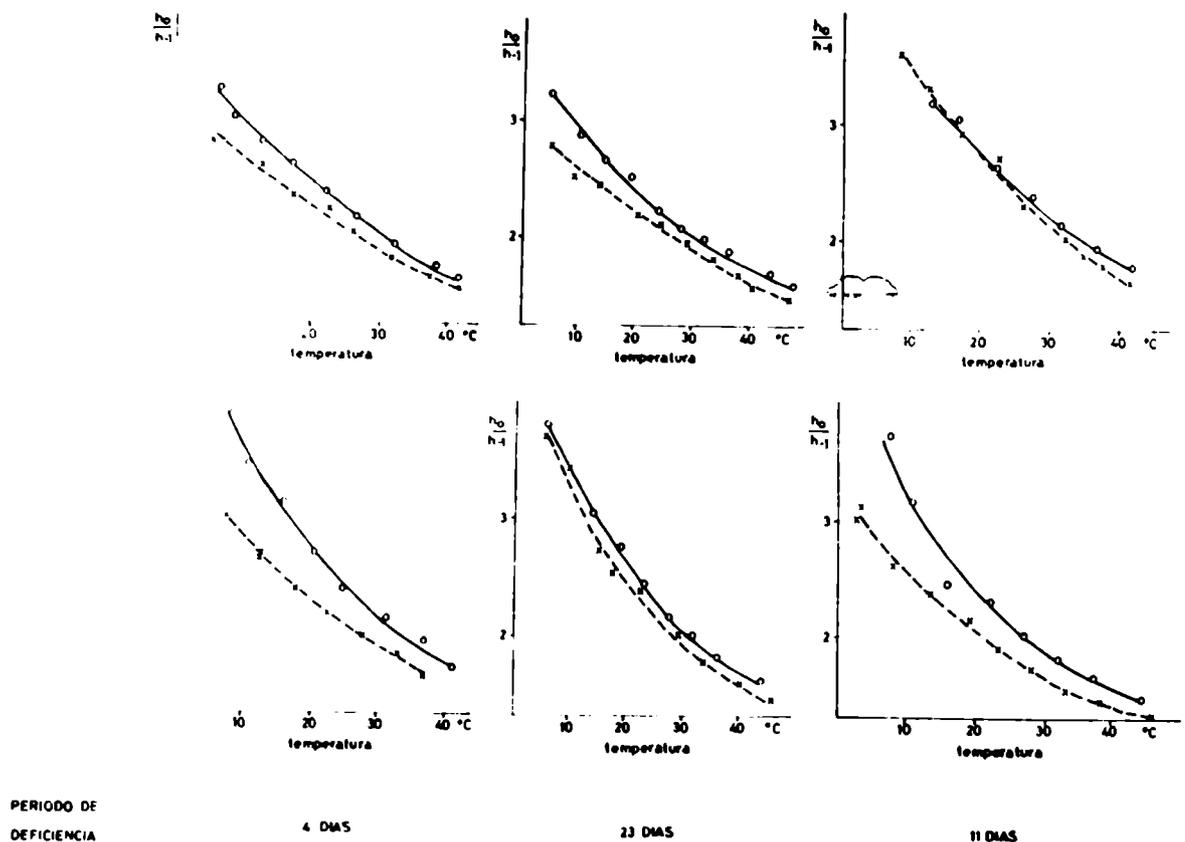


FIGURA 23: Efecto de la deficiencia en ácidos grasos esenciales sobre la dependencia de la temperatura del parámetro h_0/h_{-1} del espectro de ESR del ácido 16-doxil esteárico incorporado en microsomas hepáticos de rata (o—o), y en liposomas preparados con los lípidos extraídos de los microsomas (x---x).

completos y en las dispersiones de los lípidos microsomales li bres de proteína son muy similares, indicando que las proteí- nas no tienen una gran influencia sobre la movilidad del grupo doxilo en la zona central de la bicapa lipídica.

La deficiencia en ácidos grasos esenciales, no tuvo ningún efecto significativo sobre el parámetro $h_0/h-1$. Así, los cambios en la composición de ácidos grasos, que produjeron una disminución en el grado de insaturación como lo indicó el índice de doble enlaces, no se vieron reflejados en un cambio significativo en la movilidad del grupo doxilo en el interior hidrofóbico de la membrana.

En la figura 24 se muestra la dependencia de la temperatura del parámetro de orden S, calculado del espectro de -ESR del ácido 5-doxil esteárico, que explora la región de la - membrana cercana a los grupos polares. La linealidad de estas curvas indica que tampoco en la región mas polar de la membra- na ocurre alguna alteración brusca de movilidad o transición - de fase de los lípidos, ni en los microsomas o en los lípidos microsomales de los animales normales o deficientes en ácidos grasos esenciales.

Los valores del parámetro de orden S calculados a - 37°C son mostrados en la tabla IX, tanto para los microsomas completos como para las dispersiones de los lípidos microsoma- les. La similitud de estos valores indica que dentro de la sen sibilidad del método, la deficiencia en ácidos grasos esencia- les no altera el grado de ordenamiento de las cadenas hidrocar- bonadas en la región cercana a los grupos polares. Así, tampo- co la estructura de esta región sería mayormente afectada por los cambios en la composición de ácidos grasos y la disminu- ción en el grado de insaturación que ocurre por la carencia de ácidos grasos esenciales.

El coeficiente de difusión lateral del ácido 5-doxil esteárico fue determinado en microsomas de hígado de ratas ali- mentadas con dieta carente en ácidos grasos esenciales durante

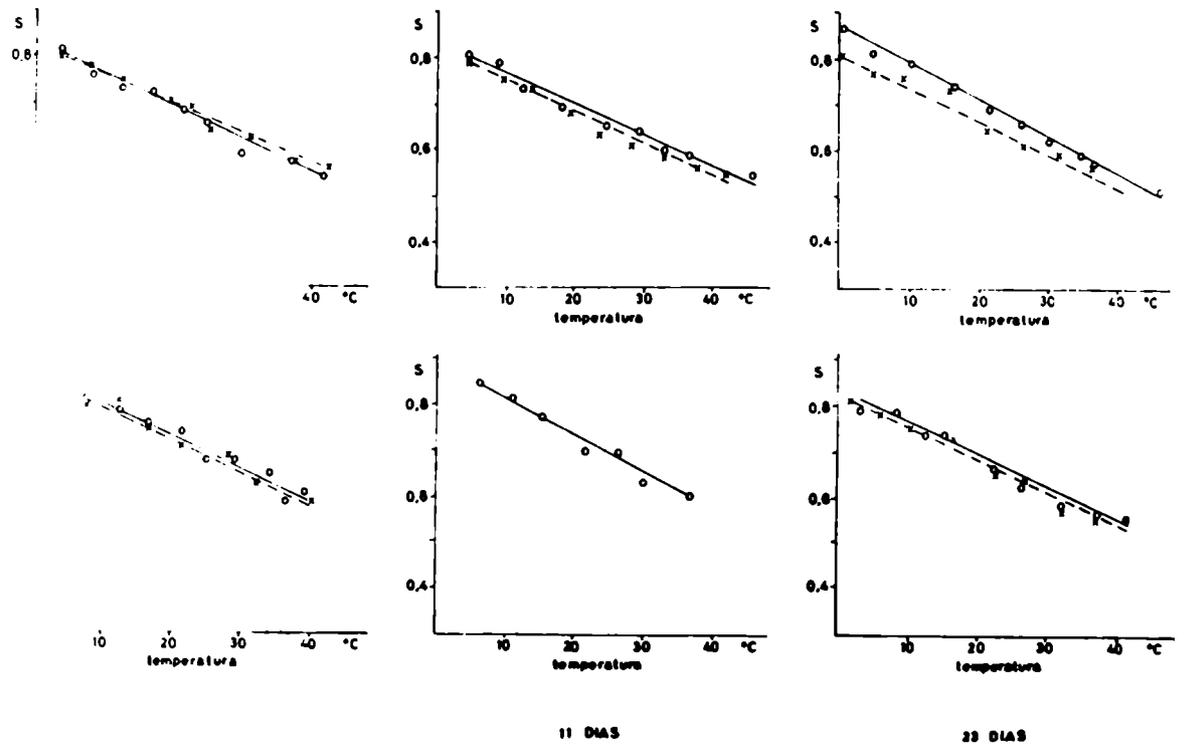


FIGURA 24: Efecto de la deficiencia en ácidos grasos esenciales sobre la dependencia de la temperatura del parámetro de orden S obtenido del espectro de ESR del ácido 5-doxil esteárico incorporado en microsomas de hígado de rata (o—o), y en liposomas preparados con los lípidos microsomales (x---x).

TABLA IX

EFLICTO DE LA DEFICIENCIA EN ACIDOS GRASOS ESSENCIALES SOBRE PARAMETROS ESTRUCTURALES Y DE FLUIDEZ DE MICROSOMAS HEPATICOS DE RATA OBTENIDOS DEL ESPECTRO DE ESR DEL ACIDO 5-DOXIL ESTEARICO

		PERIODO DE DEFICIENCIA					
		4 DIAS		11 DIAS		23 DIAS	
PARAMETRO DE ORDEN S		CONTROL	DEFICIENTE	CONTROL	DEFICIENTE	CONTROL	DEFICIENTE
MICROSOMAS		0,57	0,58	0,58	0,59	0,57	0,57
LIPOSOMAS*		0,57	0,59	0,56	0,56	0,56	0,56
COEFICIENTE DE DIFUSION LATERAL Ddiff (cm ² /seg)						1,5.10 ⁻⁸	1,8.10 ⁻⁸

* Liposomas preparados con los lípidos extraídos de los microsomas

///

23 días y en los respectivos controles a 37°C. Los valores obtenidos se muestran en la tabla IX, e indican un alto grado de fluidez que permite una rápida velocidad de movimiento lateral de este marcador en el plano de la membrana. Sin embargo, tampoco hubo diferencias significativas en el coeficiente de difusión lateral para microsomas de hígado de ratas suficientes deficientes en ácidos grasos esenciales. Esto indica que la velocidad de movimiento lateral de los lípidos en el plano de la membrana dentro de la sensibilidad del método, tampoco es afectada por los cambios en composición y en el grado de insaturación de los ácidos grasos de los lípidos de la membrana microsomal provocados por la deficiencia en ácidos grasos esenciales.

En la figura 25 se muestran las dependencias de la temperatura de la intensidad de light scattering de los microsomas completos y de las dispersiones de los lípidos microsomales de hígado de ratas alimentadas con dieta completa y con dieta carente en ácidos grasos esenciales. En la figura 26 se muestran para los mismos microsomas y liposomas, la dependencia de la temperatura de la fluorescencia emitida por la N-fenil-1-naftilamina, incorporada en estas membranas como marcador. Solo muestran en estos casos los resultados que se obtuvieron al cabo de 11 días de alimentación con la dieta correspondiente, los cuales fueron similares a los obtenidos a los 4 y 23 días. Ambos métodos confirman los resultados obtenidos por las técnicas de resonancia electrónica paramagnética. Ninguna transición de fase ocurre en el rango de temperatura estudiado, capaz de cambiar bruscamente el grado de dispersión de luz o la partición de la N-fenil-1-naftilamina entre la fase lipídica y la fase acuosa, ni en los microsomas ni en los lípidos microsomales de hígado de ratas suficientes o deficientes en ácidos grasos esenciales.

La microviscosidad aparente de la membrana microsomal fue calculada del grado de polarización de fluorescencia -

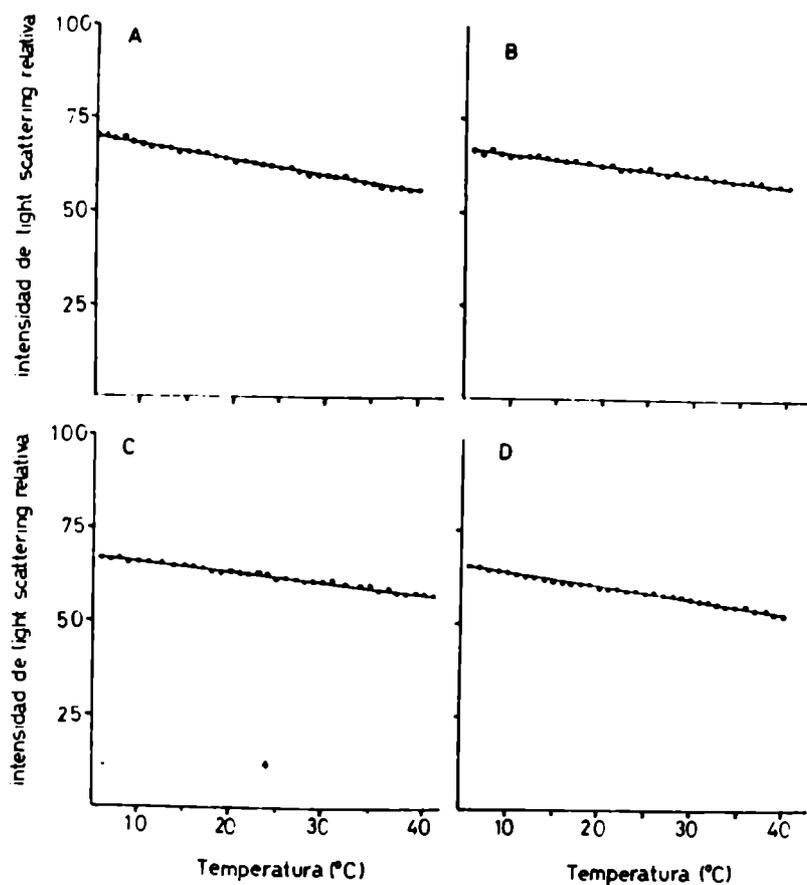


FIGURA 25: Efecto de la temperatura sobre la intensidad de light scattering de microsomas (AyB) y liposomas de los lípidos microsomaes (CyD) de hígado de ratas suficientes (AyC) y deficientes en ácidos grasos esenciales(ByD). (11 días de carencia).

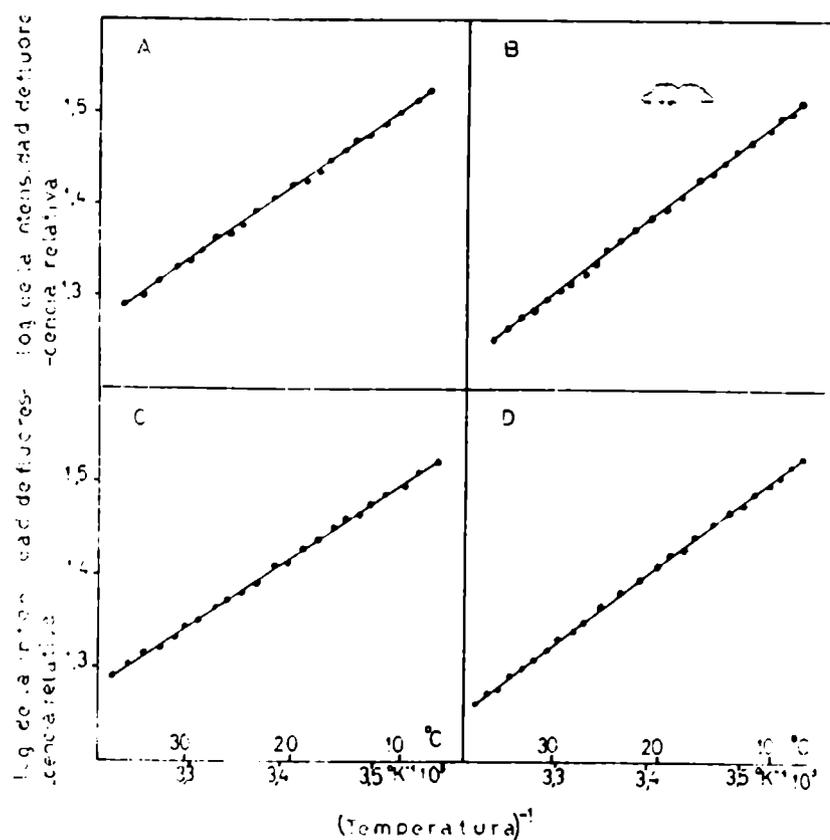


FIGURA 26: Dependencia de la temperatura de la intensidad de fluorescencia de la N-fenil-1-naftilamina incorporada en microsomas (AyB) y en liposomas de los lípidos microsomales (CyD) de hígado de ratas suficientes (AyC) y deficientes (ByD) en ácidos grasos esenciales. (11 días de carencia).

///

del DPH, incorporado en la membrana como marcador, a distintas temperaturas para un lote de ratas alimentadas con una dieta control y un lote de ratas alimentadas con una dieta carente en ácidos grasos esenciales durante 15 días.

En la figura 27 se grafica el logaritmo de la microviscosidad aparente en función de la inversa de la temperatura absoluta. Estas curvas fueron completamente lineales entre 6 y 40°C, tanto para los microsomas de animales controles como para los de los animales deficientes en ácidos grasos esenciales, indicando la ausencia de transición de fase.

La microviscosidad aparente de los microsomas de animales deficientes en ácidos grasos esenciales es mayor que la de los microsomas de animales controles a bajas temperaturas, pero la diferencia se va haciendo cada vez menor a medida que aumenta la temperatura. A temperaturas fisiológicas, la microviscosidad aparente es prácticamente idéntica en ambos tipos de microsomas. La microviscosidad obtenida a 6°C y a 36°C para ambos tipos de microsomas se indica en la tabla X.

En la figura 28 se grafica el parámetro de orden S_{DPH} en función de la temperatura para ambos tipos de microsomas. Estas curvas muestran la ausencia de una transición de fase en el rango de temperatura estudiado. A bajas temperaturas, el parámetro de orden S_{DPH} fue mayor para los microsomas de hígado de los animales deficientes en ácidos grasos esenciales que para los microsomas de hígado de los animales alimentados con dieta completa. Sin embargo, a medida que aumenta la temperatura, las diferencias se van haciendo cada vez menores, a temperaturas fisiológicas ambas membranas presentan parámetros de orden prácticamente idénticos. Los parámetros de orden S calculados a 6°C y a 36°C se indican en la tabla X al igual que el tratamiento estadístico de estos resultados. A 6°C, tanto el parámetro de orden S_{DPH} como la microviscosidad aparente fueron significativamente mayores en los microsomas de animales deficientes, que en los microsomas de animales suficientes

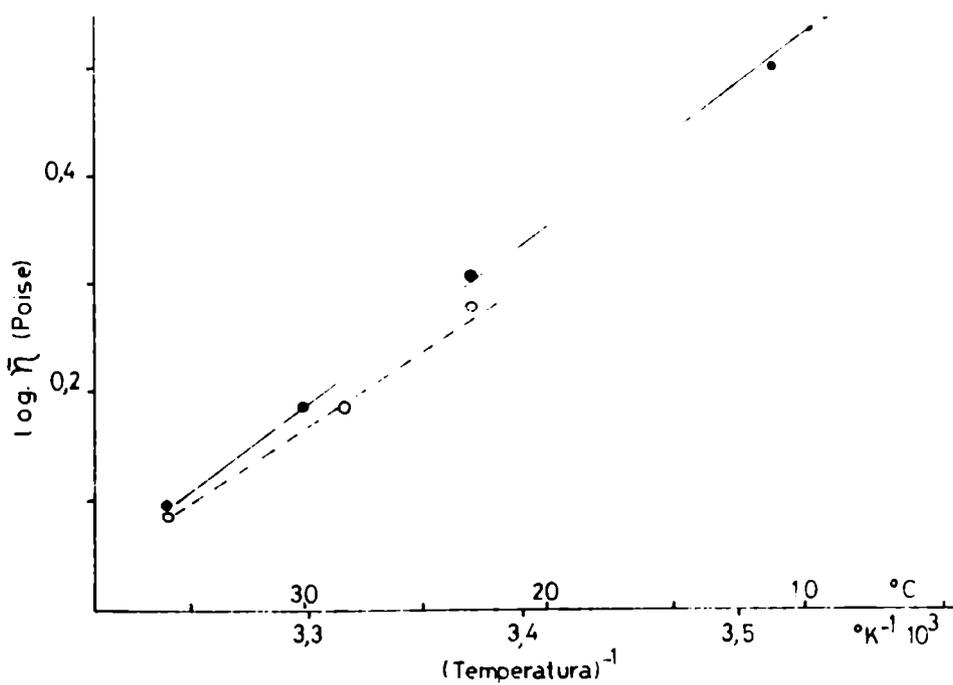


FIGURA 27: Efecto de la deficiencia en ácidos grasos esenciales sobre la dependencia de la temperatura de la microviscosidad aparente ($\tilde{\eta}$) de microsomas, calculada de la depolarización de fluorescencia del DPH. (o---o) microsomas de ratas suficientes en ácidos grasos esenciales; (●—●) microsomas de hígado de ratas sometidas a 30 días de carencia en ácidos grasos esenciales.

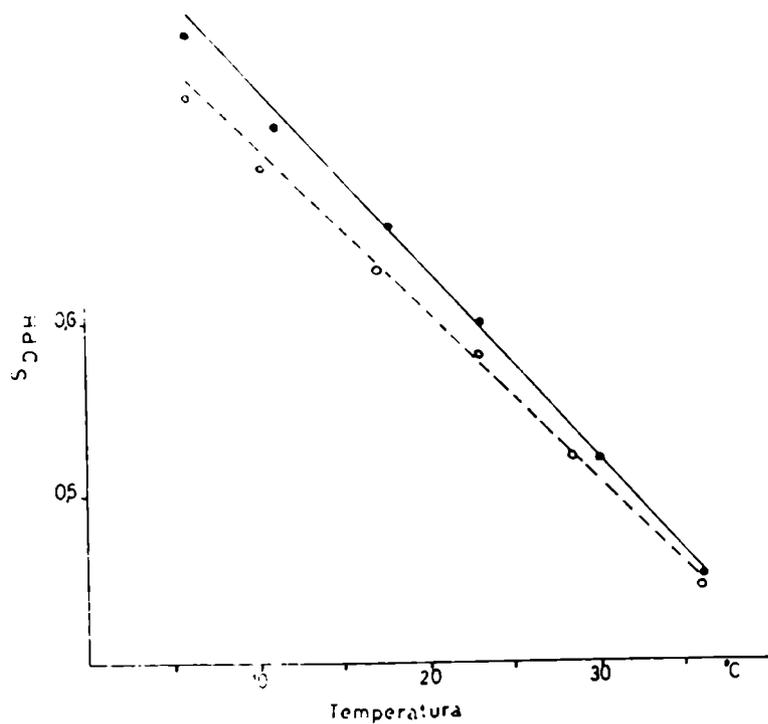


FIGURA 28: Efecto de la temperatura sobre el parámetro de orden (SDPH) de la membrana microsomal de hígado de ratas suficientes (o---o) y deficientes (●—●) en ácidos grasos esenciales. 30 días de carencia.

TABLA X

EFFECTO DE LA DEFICIENCIA EN ACIDOS GRASOS ESENCIALES SOBRE LA MICROVISCOSIDAD APARENTE ($\bar{\eta}$) Y EL PARAMETRO DE ORDEN (S_{DPH}) DETERMINADOS DEL GRADO DE POLARIZACION DE FLUORESCENCIA DEL 1,6-DIFENIL-1,3,5-HEXATRIENO

	36°C		6°C	
	$\bar{\eta}$ (Poise)	S_{DPH}	$\bar{\eta}$ (Poise)	S_{DPH}
MICROSOMAS	1,18	0,436	3,43	0,730
CONTROLES	$\pm 0,04$	$\pm 0,011$	$\pm 0,07$	$\pm 0,005$
MICROSOMAS	1,24	0,451	4,12	0,769
DEFICIENTES	$\pm 0,04$	$\pm 0,012$	$\pm 0,13$	$\pm 0,006$
p		n.s.*	0,001	0,001

* No significativo

Los valores indicados son las medias de las determinaciones en seis ratas por grupo \pm el error standard. El grupo deficiente en ácidos grasos esenciales fue sometido durante 15 días a una dieta libre de grasa luego del destete, mientras que el grupo control fue alimentado con una dieta completa durante el mismo período. El índice de dobles ligaduras en estos microsomas fue en promedio de 2,70 en los microsomas controles y de 1,80 en los microsomas deficientes en ácidos grasos esenciales.

///

en ácidos grasos esenciales. Sin embargo, a 36°C, tanto la microviscosidad como el parámetro de orden S_{DPH} , no mostraron diferencias significativas entre ambos tipos de microsomas.

Así, estos resultados indican que los cambios en la composición de ácidos grasos por la deficiencia en ácidos grasos esenciales, indujeron una mayor restricción a la libertad de movimiento rotacional del 1,6-difenil hexatrieno incorporado a la fase lipídica de la membrana, a bajas temperaturas. Sin embargo, la movilidad rotacional de este fluoróforo no se vio afectada a temperaturas fisiológicas, en los microsomas de hígado de rata.

III.2.3.- Efecto de la deficiencia en ácidos grasos esenciales sobre la actividad de las ácido graso desaturasas y la transferencia de electrones.

La deficiencia en ácidos grasos esenciales produjo cambios significativos en la actividad de las enzimas desaturantes de ácidos grasos. En la figura 29a) se muestra la variación de actividad de la $\Delta 9$ desaturasa con el tiempo de alimentación con una dieta carente en ácidos grasos y con una dieta completa. En la figura 29 b) se muestra la variación de actividad expresada como porcentaje de variación relativa entre los animales deficientes y suficientes en ácidos grasos esenciales. La actividad de esta enzima se incrementó rápidamente con la carencia. Ya en el cuarto día de carencia, su actividad fue significativamente mayor que en los controles. El aumento de actividad fue mayor aún en el undécimo día, alcanzando casi tres veces el valor de actividad en los animales suficientes, y se mantuvo en el vigésimo tercer día de carencia. Este incremento en la actividad de la $\Delta 9$ desaturasa, podría explicar el incremento observado en la proporción de ácidos monoenoicos, provocada por la carencia en ácidos grasos en la dieta.

La actividad de la $\Delta 6$ desaturasa fue modificada mas lentamente y menos intensamente que la $\Delta 9$ desaturasa por la -

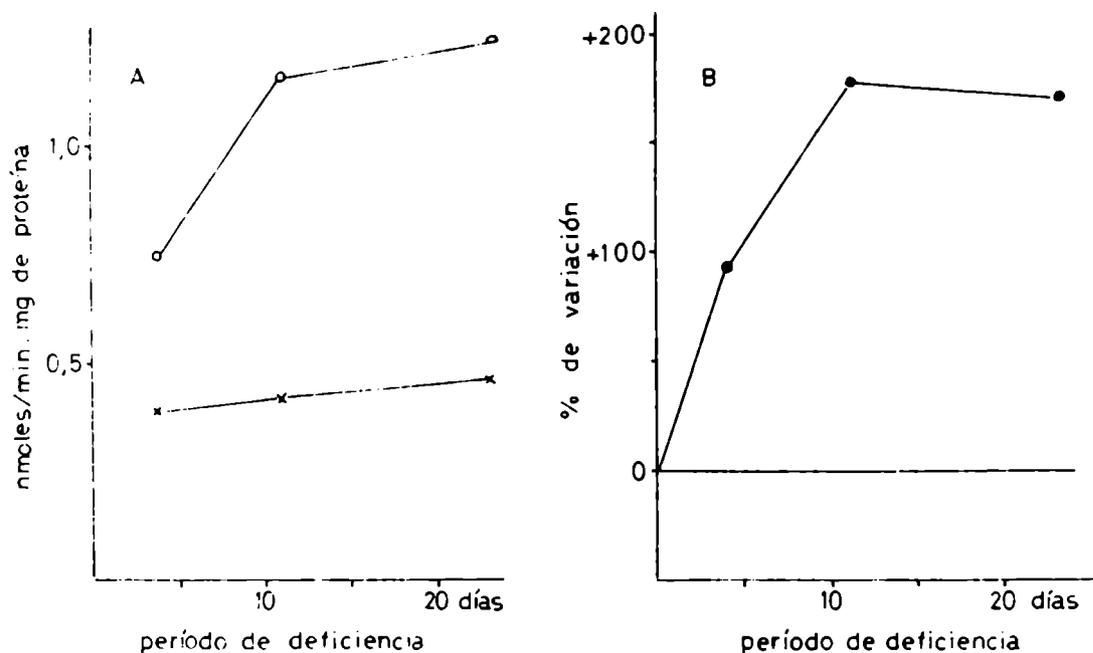


FIGURA 29: Efecto del tiempo de alimentación con una dieta carente en ácidos grasos esenciales sobre la $\Delta 9$ desaturación de ácido palmítico. (x—x) microsomas de hígado de ratas controles. (o—o) microsomas de hígado de ratas alimentadas con una dieta carente en ácidos grasos esenciales. A) actividad absoluta. B) actividad de los microsomas de animales deficientes relativa a la de los animales controles.

///

deficiencia en ácidos grasos esenciales. En la figura 30 a) se puede observar que mientras en los animales alimentados con una dieta completa, la actividad pasó por un mínimo a los 11 días, y luego volvió a incrementarse, en los animales alimentados con una dieta deficiente en ácidos grasos esenciales, la actividad aumentó continuamente con el tiempo de carencia. En la figura 30 b) se muestra el porcentaje de variación relativa de la actividad en los microsomas deficientes con respecto a la actividad de los microsomas de los animales controles. La actividad se vio incrementada significativamente recién a los 11 días de carencia, cuando fue un 75% más alta que en el control, y a los 23 días de carencia aún permaneció un 25% más alta que en el control.

También se determinaron las actividades de las proteínas transportadoras de electrones, NADH-ferricianuro reductasa y NADH-citocromo c reductasa. En la figura 31 a) se puede ver que la actividad NADH-ferricianuro reductasa se modificó con la edad de los animales pasando por un máximo a los 11 días y luego disminuyendo a los 23 días. Estos cambios fueron independientes de la dieta, ya que con ambos tipos de dietas, completa y deficiente en ácidos grasos esenciales, las modificaciones fueron similares. Cuando se expresa el porcentaje de variación de actividad por la dieta en función del tiempo, figura 31 b), se puede ver que la carencia en ácidos grasos esenciales no tuvo efecto sobre esta actividad.

Por otro lado, la actividad NADH-citocromo c reductasa mostró cambiar diferentemente con la edad, dependiendo de la dieta con que fueron alimentados los animales. En la figura 32 a) se puede observar que la actividad NADH-citocromo c reductasa aumentó más rápidamente con la edad en los animales alimentados con dieta completa, alcanzando la máxima actividad a los 11 días. En los animales deficientes en ácidos grasos esenciales, la actividad NADH-citocromo c reductasa, aumentó mucho más lentamente, aunque a los 23 días alcanzó el valor de -

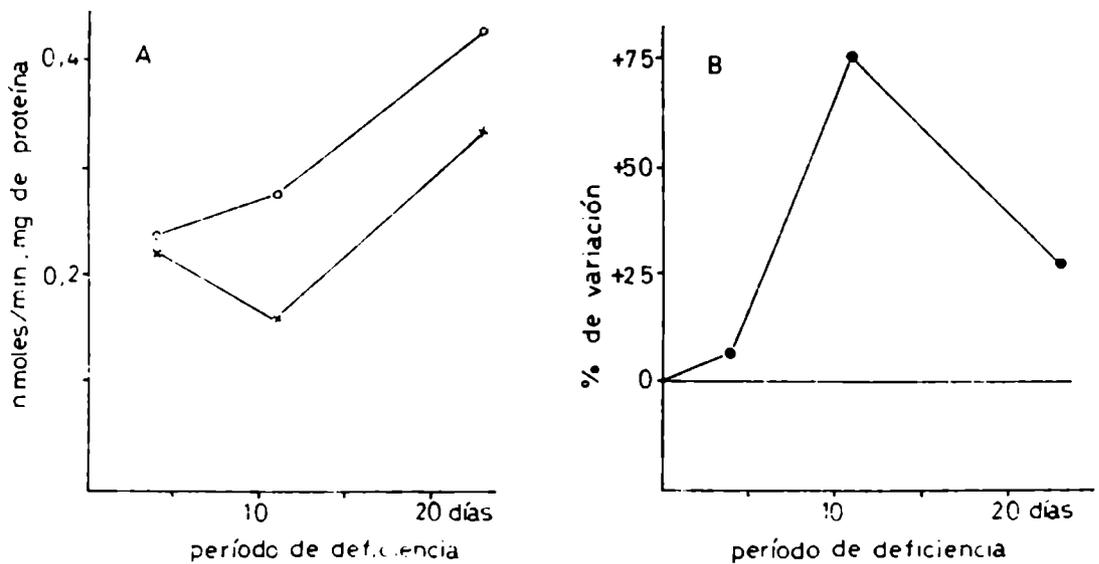


FIGURA 30: Efecto del tiempo de alimentación con una dieta carente en ácidos grasos esenciales sobre la $\Delta 6$ desaturación de ácido linoleico. Microsomas de hígado de ratas controles (x—x). Microsomas de hígado de ratas deficientes en ácidos grasos esenciales (o—o). A) actividad absoluta. B) actividad de los animales deficientes relativa a la de los controles.

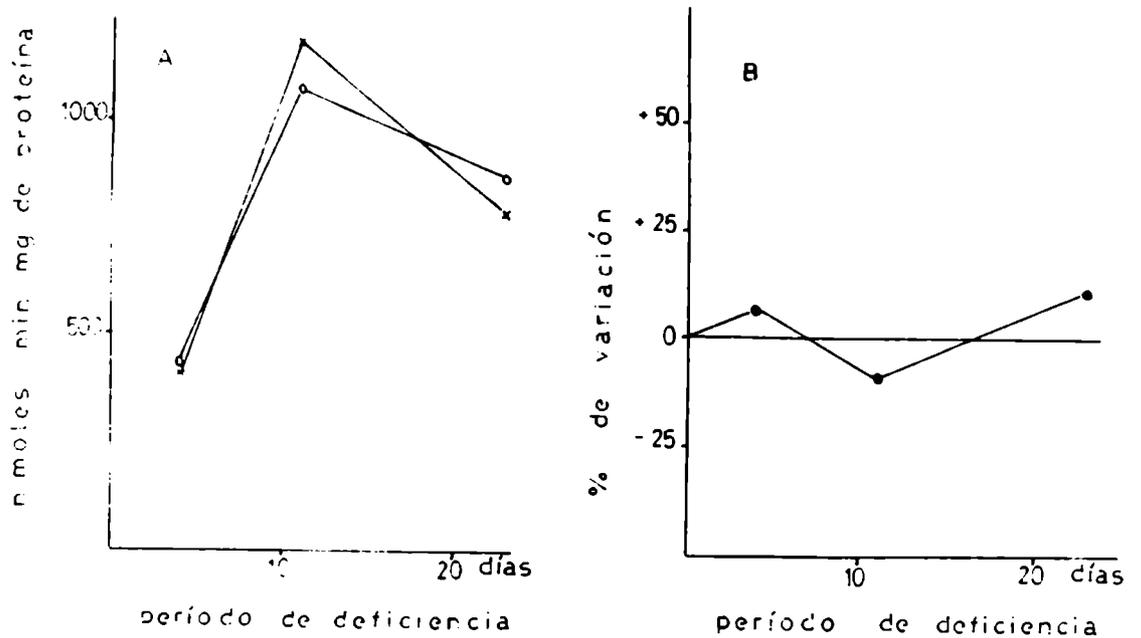


FIGURA 31: Efecto de la deficiencia en ácidos grasos esenciales sobre la actividad NADH-ferricianuro reductasa. Microsomas de hígado de ratas controles (x—x). Microsomas de hígado de ratas deficientes en ácidos grasos esenciales (o—o). A) actividad absoluta. B) actividad de los microsomas de animales deficientes relativa a la de los microsomas de los animales controles.

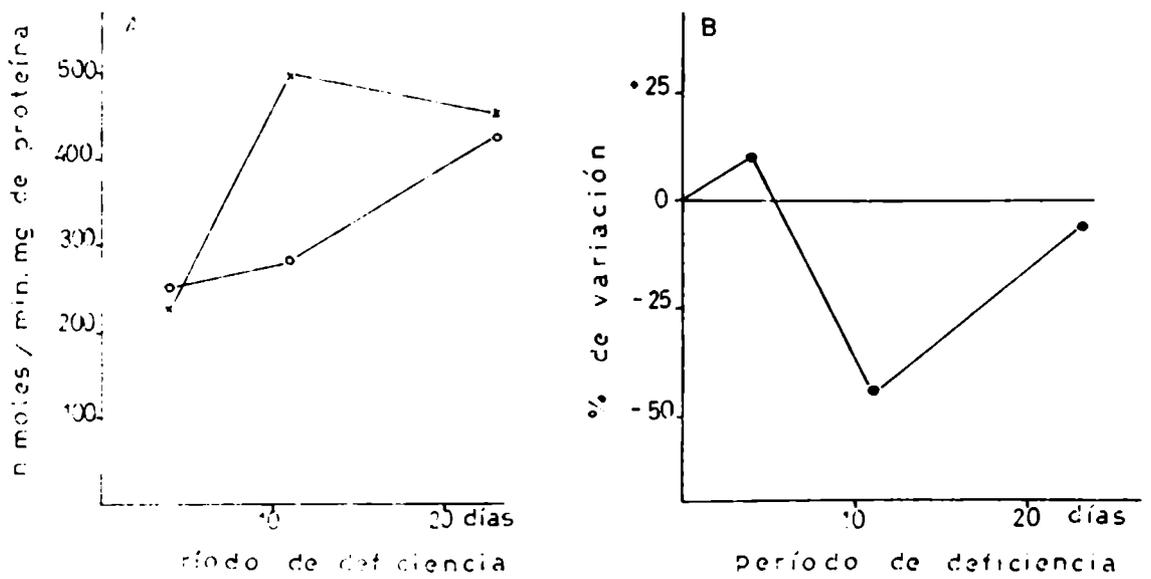


FIGURA 32: Efecto de la deficiencia en ácidos grasos esenciales sobre la actividad NADH-citocromo c reductasa. (x—x) microsomas de animales controles. (o—o) microsomas de hígado de ratas deficientes en ácidos grasos esenciales. A) actividad absoluta. B) actividad relativa de los animales deficientes con respecto a los animales controles.

los animales alimentados con la dieta completa. En la figura 32 b) donde se representa el porcentaje de variación de la actividad en los animales deficientes en ácidos grasos esenciales con respecto a los animales con dieta completa, se puede observar que la carencia produjo una disminución en la actividad NADH-citocromo c reductasa a aproximadamente la mitad del valor de actividad de los animales con dieta completa a los 11 días de carencia, alcanzando nuevamente a los 23 días el valor de actividad normal. Debe notarse que la disminución en actividad de la NADH-citocromo c reductasa en los animales deficientes con respecto a los animales suficientes en ácidos grasos esenciales ocurrió a los 11 días de carencia, precisamente cuando el grado de insaturación de los ácidos grasos de los lípidos microsomales alcanzó el valor mínimo.

La actividad NADH-ferricianuro reductasa, y por lo tanto la cantidad de citocromo b_5 reductasa es igual en los microsomas de los animales deficientes y suficientes en ácidos grasos esenciales. Por lo tanto, una posibilidad es que la disminución en actividad de la NADH-citocromo c reductasa por la deficiencia en ácidos grasos esenciales sea debida a una disminución en la velocidad de difusión lateral de las proteínas citocromo b_5 y citocromo b_5 reductasa, debido a una disminución en la fluidez de la membrana al disminuir el grado de insaturación de los ácidos grasos de sus lípidos constituyentes. Sin embargo, una disminución en la concentración de citocromo b_5 en la membrana no puede ser descartada.

Los cambios en actividad de NADH-ferricianuro reductasa y NADH-citocromo c reductasa con la deficiencia en ácidos grasos esenciales, no se correlacionan con los cambios en actividad de las desaturasas. En consecuencia, el transporte de electrones no puede ser determinante de las respuestas de las desaturasas. Además, la velocidad de transferencia de electrones se mantiene siempre muy por encima de la velocidad de desaturación, por lo que la etapa de desaturación es siempre deter

minante de la velocidad de la reacción total.

III.2.4.- Efecto de la deficiencia en ácidos grasos esenciales sobre las curvas de Arrhenius de enzimas microsoma- les.

a) Sistema de la glucosa-6-fosfatasa.

Las curvas de Arrhenius de la actividad G-6-Pasa se muestran en la figura 33, para microsomas de hígado de ratas alimentadas con una dieta standard y para microsomas de ratas alimentadas durante 30 días con una dieta libre de grasas.

Ambas curvas son completamente lineales entre 10 y 40°C. Así, los cambios en la composición de ácidos grasos provocados por la deficiencia en ácidos grasos esenciales, no fueron suficientes para provocar una transición de fase o cambio en la estructura de la fase lipídica, capaz de afectar a los lípidos circundantes de la proteína encargada del transporte de la G-6-P a través de la membrana, en el rango de temperatura estudiado.

La deficiencia en ácidos grasos esenciales tampoco tuvo ningún efecto sobre la Ea aparente para la reacción de la G-6-Pasa.

La actividad de la enzima, sin embargo, fue modificada significativamente por la carencia en ácidos grasos esenciales, como se puede ver en la tabla XI. La alimentación con una dieta libre de grasa provocó un incremento en la actividad de la G-6-Pasa, de aproximadamente cuatro veces con respecto a la alimentación standard.

b) Sistema desaturante de ácidos grasos y transporte de electrones.

El efecto de la deficiencia en ácidos grasos esenciales sobre las curvas de Arrhenius de la Δ^6 desaturasa se muestra en la figura 34. Solo se muestran los resultados obtenidos al cabo de 11 días de alimentación con la dieta correspondiente, los cuales no difieren de los resultados que se obtuvieron

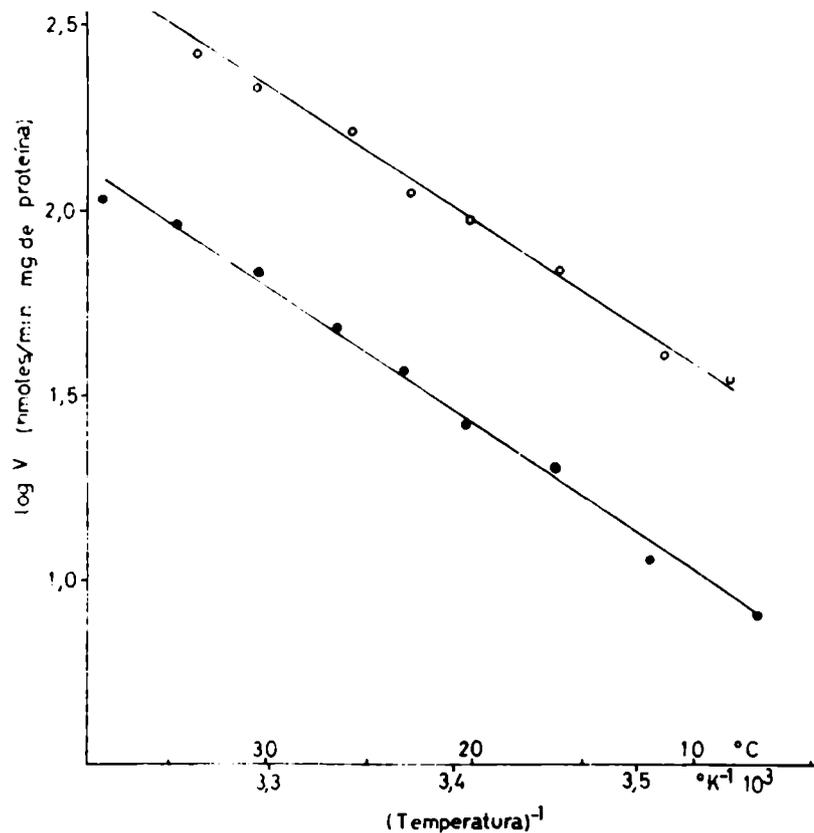


FIGURA 33: Efecto de la deficiencia en ácidos grasos esenciales sobre la curva de Arrhenius de la actividad glucosa-6-fosfatasa. (●—●) microsomas de hígado de animales controles. (○—○) microsomas de hígado de ratas sometidas a 30 días de alimentación con una dieta libre de grasa. Los intervalos de confianza del 95 % para las Ea fueron: microsomas controles = $15,1 \pm 1,1$ Kcal/mol; microsomas deficientes = $14,9 \pm 0,9$ Kcal/mol.

TABLA XI

EFFECTO DE LA DEFICIENCIA EN ACIDOS GRASOS ESENCIALES SOBRE LA
ACTIVIDAD GLUCOSA-6-FOSFATASA DE MICROSOMAS DE HIGADO DE RATA

	ACTIVIDAD ESPECIFICA (μ moles/min.mg de proteina)	
	15°C	37°C
MICROSOMAS	21,3	122,5
CONTROLES	\pm 4,6	\pm 14,5
MICROSOMAS	62,1	403,0
DEFICIENTES	\pm 3,0	\pm 26,0
P	0,01	0,01

Los valores indicados son los promedios de dos experimentos independientes en los que se utilizaron los pools de los microsomas hepáticos de tres ratas por grupo. Conjuntamente se indica el error standard. Las ratas deficientes fueron sometidas durante un mes a una dieta libre de grasa. El grupo control fue integrado con ratas de la misma edad alimentadas con una dieta standard.

al cabo de 4 y de 23 días.

Las curvas fueron lineales entre 10 y 40°C, lo cual indica que la fluidez de los lípidos en la proximidad de estas enzimas no cambia lo suficiente por la deficiencia en ácidos grasos esenciales como para provocar la aparición de una fase cristalina en el rango de temperatura estudiado. Tampoco se observó ningún efecto significativo de la deficiencia en ácidos grasos esenciales sobre la energía de activación aparente de estas reacciones.

Las curvas de Arrhenius para las reacciones NADH-ferricianuro reductasa y NADH-citocromo c reductasa, en microsomas de animales alimentados durante 4 días con una dieta carente en ácidos grasos esenciales, se muestran en la figura 35 en donde se las compara con las curvas obtenidas para microsomas de animales de la misma edad alimentados con una dieta control. También para estas actividades, las curvas de Arrhenius fueron completamente lineales en el rango de temperatura estudiado, y la deficiencia en ácidos grasos esenciales no tuvo efecto sobre las energías de activación aparentes. Iguales resultados se obtuvieron a los 11 y 23 días de carencia.

III.2.5.- Discusión.

La deficiencia en ácidos grasos esenciales provoca importantes alteraciones en la composición de ácidos grasos de los lípidos microsomales. Estas modificaciones no solo son el producto de los cambios en la composición de ácidos grasos de la dieta, sino que también se deben en parte a los cambios en la actividad biosintética de los ácidos grasos insaturados.

El incremento en actividad de la Δ^9 desaturasa que se observa casi inmediatamente sería responsable del incremento en la proporción de ácidos monoenoicos en los lípidos microsomales, que ocurre cuando los animales se someten a una dieta carente en ácidos grasos esenciales.

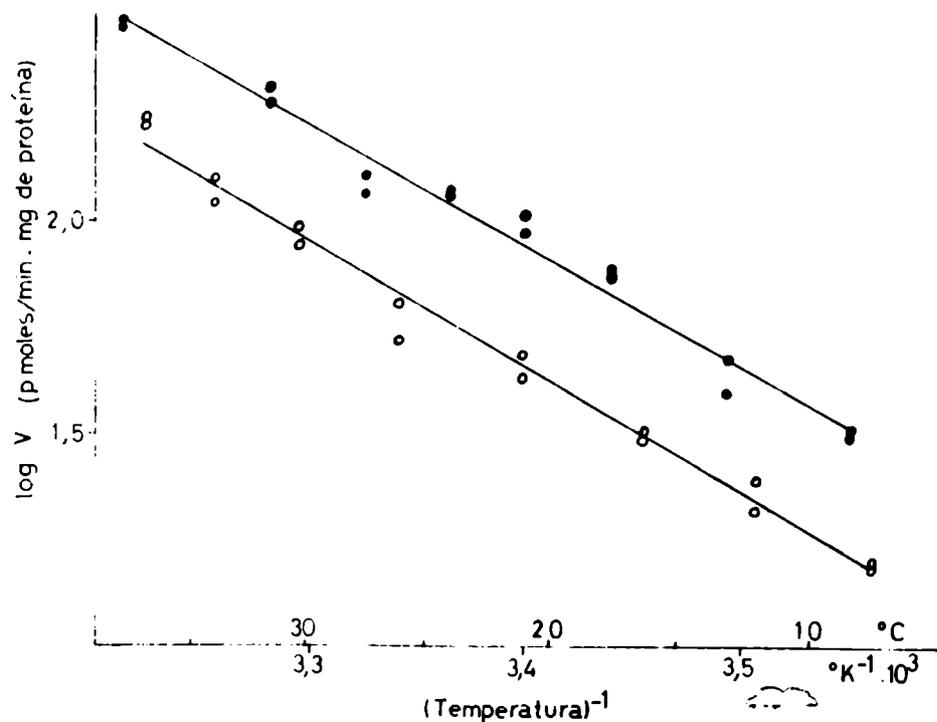


FIGURA 34: Efecto de la deficiencia en ácidos grasos esenciales sobre la curva de Arrhenius de la $\Delta 6$ desaturación del ácido linoleico. (o—o) microsomas de hígado de ratas controles; (●—●) microsomas de hígado de ratas sometidas a 11 días de alimentación con una dieta carante de ácidos grasos esenciales. Los intervalos de confianza del 95 % para las E_a fueron: animales controles = $13,5 \pm 1,0$ Kcal/mol; animales deficientes = $13,0 \pm 1,2$ Kcal/mol.

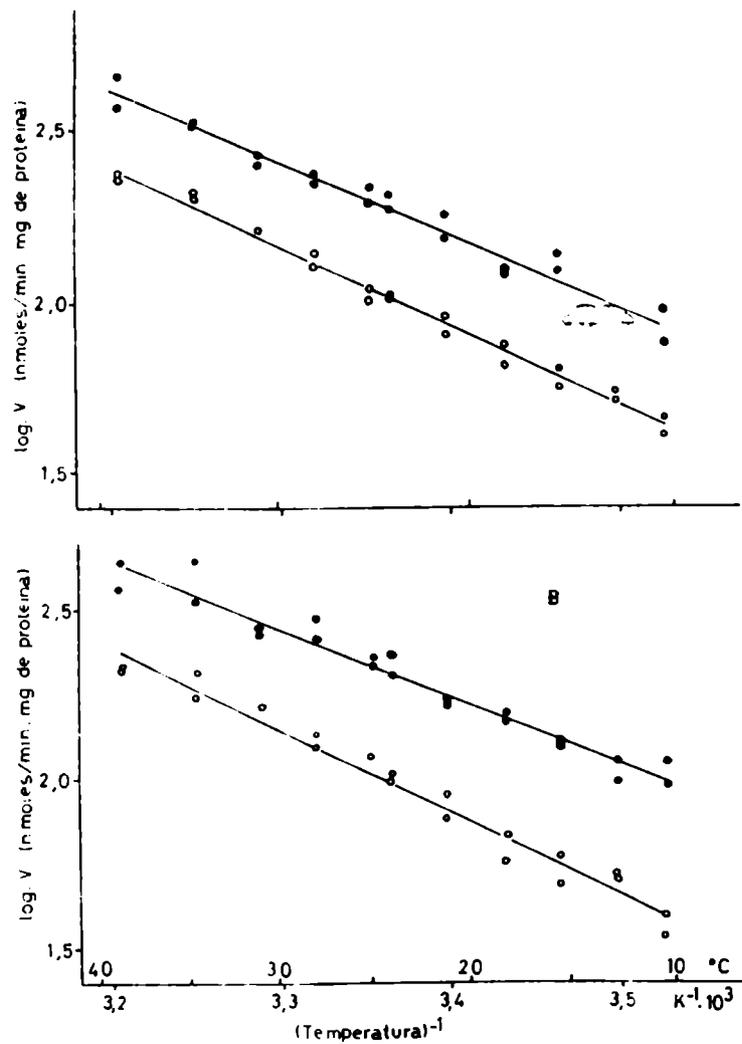


FIGURA 35: Efecto de la deficiencia en ácidos grasos esenciales sobre las curvas de Arrhenius del sistema de transporte de electrones del citocromo b5. (●—●) NADH-ferricianuro reductasa; (○—○) NADH-citocromo c reductasa. A) animales controles. B) animales sometidos a 4 días de alimentación con una dieta carente de ácidos grasos esenciales. Los límites de los intervalos de confianza del 95 % para las E_a son:

Animales controles: NADH-ferricianuro reductasa = $9,9 \pm 0,9$ Kcal/mol; NADH-citocromo c reductasa = $10,8 \pm 0,6$ Kcal/mol.

Animales deficientes: NADH-ferricianuro reductasa = $9,2 \pm 0,9$ Kcal/mol; NADH-citocromo c reductasa = $11,2 \pm 1,0$ Kcal/mol.

El contenido de los lípidos de la membrana del retículo endoplásmico en ácidos grasos esenciales o derivados de estos, como linoleico y araquidónico, disminuye rápidamente al eliminarse el suministro por medio de la dieta de los precursores. Se ha demostrado en nuestro laboratorio (458), que la actividad de la $\Delta 5$ desaturasa, que interviene en la síntesis del ácido araquidónico, al contrario de lo que ocurre con las $\Delta 6$ y $\Delta 9$ desaturasas, disminuye rápidamente con la carencia de ácidos grasos esenciales en la dieta a aproximadamente un 40% de su actividad original a los cuatro días de carencia y luego la actividad incrementa paulatinamente hasta alcanzar aproximadamente el valor de los animales alimentados con dieta completa a los 23 días de carencia. Esta rápida disminución de la actividad de la $\Delta 5$ desaturasa, también podría contribuir a la rápida caída en el contenido de ácido araquidónico de los lípidos microsomales.

Sin embargo, la disminución del contenido de los ácidos linoleico y araquidónico de los lípidos del retículo endoplásmico es inmediatamente compensada por un aumento en el contenido de ácidos monoinsaturados y del ácido eicosa-5,8,11-trienoico. Normalmente, la $\Delta 6$ desaturación del ácido oleico ocurre a bajas velocidades debido a un efecto competitivo del ácido linoleico (342). Así, una disminución en la cantidad de ácido linoleico por la carencia producirá un aumento en la $\Delta 6$ desaturación del ácido oleico y la posterior elongación y $\Delta 5$ desaturación conducirán a un incremento en la cantidad de eicosa-5,8,11-trienoico. La disminución en la cantidad de ácido linoleico, y también el incremento observado en la actividad $\Delta 6$ desaturasa serían responsables del aumento en el contenido de ácido eicosa-5,8,11-trienoico por la deficiencia en ácidos grasos esenciales. El incremento en la actividad de la $\Delta 9$ desaturasa, por otra parte sería responsable del aumento en el contenido de ácidos monoenoicos. De esta manera, la rata contrarresta bastante bien la carencia de ácidos grasos esenciales en la dieta, reemplazando a los ácidos grasos poliinsaturados deriva

dos de las familias esenciales por ácidos poliinsaturados de la serie no esencial. De esta manera, la fluidez de la membrana es mantenida dentro de límites bastante estrechos.

Si bien se pudo observar una neta disminución en el grado de insaturación de los ácidos grasos de los lípidos microsomas por la carencia en ácidos grasos esenciales, como se mostró por el índice de dobles ligaduras, especialmente a los 11 días de carencia, este índice fue casi completamente normalizado luego de 23 días de carencia.

Además, esta disminución en el grado de insaturación de los lípidos de la membrana, no fue suficiente para provocar una significativa disminución de la fluidez de la membrana, como fue demostrado por medio de las determinaciones de resonancia electrónica paramagnética y de polarización de fluorescencia.

Si bien a bajas temperaturas, la microviscosidad y el parámetro de orden S obtenido del grado de depolarización de fluorescencia del DPH fue algo mayor en los microsomas deficientes en ácidos grasos esenciales que en los controles, a temperaturas fisiológicas fueron esencialmente idénticos.

Así, la fase lipídica de los microsomas de hígado de ratas deficientes en ácidos grasos esenciales permanece aún en un estado de alta fluidez semejante al de los microsomas suficientes en ácidos grasos esenciales, permitiendo una alta velocidad de difusión lateral del ácido 5-doxil esteárico, una alta velocidad de rotación del 1,6-difenil hexatrieno, y una gran movilidad del grupo doxilo ya sea cuando se encuentra en el interior hidrofóbico o en la zona cercana a los grupos polares de la membrana. El comportamiento de la rata sería diferente al del cobayo, ya que en este animal, se ha demostrado en nuestro laboratorio (280) que la carencia en ácidos grasos esenciales provoca un significativo aumento en la microviscosidad aparente de los microsomas de hígado, en todo el rango de temperatura entre 10 y 40°C.

Ha sido reportado que los microsomas de hígado de ratas alimentadas con una dieta carente en ácidos grasos esenciales muestran por calorimetría diferencial transiciones de fase atribuibles a los lípidos a aproximadamente 8 y 14°C (232). Además, estos autores reportaron que la curva de Arrhenius de la actividad NADH-citocromo c reductasa mostró un cambio de pendiente en la zona de 5°C. Nuestros experimentos muestran que ni aún a los 11 días de carencia, en donde la disminución en el grado de insaturación de los ácidos grasos fue mas pronunciada, ocurre alguna transición de fase o alteración termotrópica de la estructura de la fase lipídica en el rango de 10 a 40°C, capaz de producir un cambio brusco en la movilidad del grupo doxilo ubicado en el interior hidrofóbico de la membrana (16-doxil esteárico), o en la zona mas cercana a la superficie hidrofóbica (5-doxil esteárico), o en la velocidad de rotación del DPH, o en la partición de la N-fenil-1-naftilamina entre la fase acuosa y la fase lipídica.

Ha sido propuesto que la actividad de algunas enzimas desaturantes de ácidos grasos en animales inferiores podría ser modificada por cambios en la fluidez de su entorno lipídico (383, 384). Nuestros experimentos, sin embargo, mostraron que ocurrieron cambios importantes en la actividad de las enzimas desaturantes sin que hayan ocurrido cambios significativos en la fluidez de la fase lipídica. Las actividades de las distintas desaturasas y del transporte de electrones asociado, son modificadas de diferente manera por la deficiencia en ácidos grasos esenciales, y si bien permiten explicar en parte los cambios que ocurren en la composición de ácidos grasos, no se correlacionan simplemente con los cambios en el índice de dobles ligaduras y menos aún con los parámetros de fluidez obtenidos por los diferentes métodos físicos. Así, es difícil considerar que en estos experimentos, la causa directa que modifica la actividad de estas enzimas sea la modificación de la fluidez de la membrana. Por lo tanto esta activación se debería a otras causas como por ejemplo a un incremento en el

///

número de moléculas de estas enzimas en la membrana, u otras.

La modificación de la actividad enzimática por la deficiencia en ácidos grasos esenciales no solamente se restringió a las enzimas relacionadas con la biosíntesis de ácidos - grasos poliinsaturados, sino que también ocurre en otros sistemas enzimáticos no relacionados directamente con el metabolismo lipídico, como por ejemplo en el sistema de la G-6-Pasa, ya que nuestras experiencias muestran que la deficiencia en ácidos grasos esenciales incrementó el nivel de actividad de esta enzima



III.3.- EFFECTO DE LA TRANSICION DE FASE ORDEN-DESORDEN SOBRE LAS CURVAS DE ARRHENIUS DE ENZIMAS MICROSOMALES.

III.3.1.- Comparación entre distintos métodos para detectar la transición de fase en bicapas lipídicas.

Con el fin de contar con un método simple y adecuado para detectar las transiciones de fase en las membranas modificadas, se probaron tres métodos diferentes en membranas artificiales de DMPC. La DMPC presenta una transición orden-desorden a alrededor de 24°C.

En la figura 36 se muestra la dependencia de la temperatura de la intensidad de fluorescencia emitida por la N-fenil-1-naftilamina incorporada como marcador en los liposomas de DMPC. En este caso, las curvas fueron registradas incrementando la temperatura desde 5 a 40°C, o a la inversa bajando la temperatura desde 40 a 5°C. En la curva descendente, se puede observar que ocurre una brusca disminución en la intensidad de fluorescencia al disminuir la temperatura y producirse el cambio de fase del estado líquido-cristalino al estado cristalino. Como se explicó en el capítulo II, esto se debe a que la N-fenil-1-naftilamina es excluida progresivamente de la fase lipídica hacia la fase acuosa a medida que los lípidos van sufriendo la transición del estado desordenado al estado ordenado. Lo contrario ocurre cuando en la curva ascendente se pasa del estado ordenado al estado desordenado.

En la figura 36 puede verse que la curva registrada aumentando la temperatura (transición del estado ordenado al estado fluido), no se superpone con la curva registrada con temperatura decreciente (transición del estado desordenado al estado cristalino), sino que esta última se encuentra desplazada hacia temperaturas menores. Este fenómeno de histéresis es característico de estas transiciones (41) y ha sido detectado también en membranas biológicas (88). Por esta razón, todas las curvas para la detección de transiciones de fase en las membranas modificadas siempre se registraron en el sentido de temperatura creciente, aunque esto no se indique.

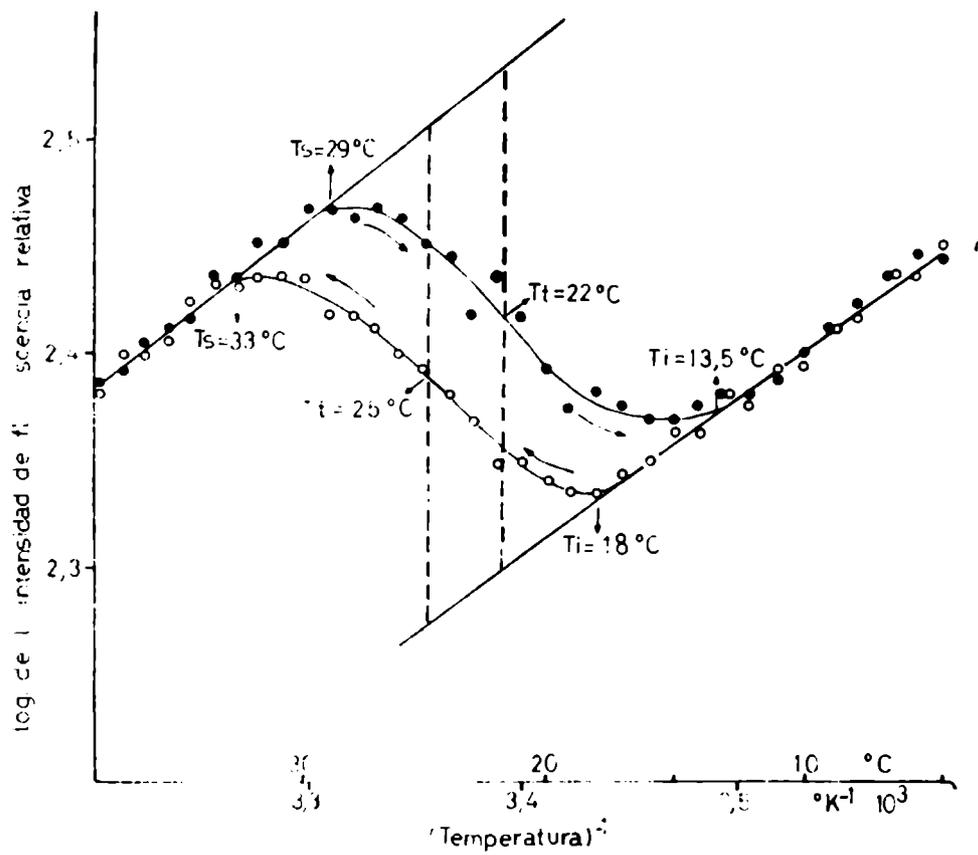


FIGURA 36: Transición de fase en liposomas de DMPC detectada por la intensidad de fluorescencia de la N-fenil-1-naftilamina. (●—●) temperatura descendente; (o—o) temperatura ascendente.

La transición puede ser definida indicando el límite superior (T_s) y el límite inferior (T_i) de la misma. El rango o ancho de la transición (ΔT) es la diferencia entre T_s y T_i . A temperaturas superiores al límite superior T_s , las cadenas hidrocarbonadas se encuentran en el estado líquido-cristalino, desordenado. A temperaturas inferiores al límite inferior T_i , los lípidos se encuentran en el estado ordenado, cristalino. A temperaturas dentro del rango de la transición, o sea entre T_i y T_s , coexisten ambas fases. Al ir aumentando la temperatura dentro del rango de la transición, la proporción de lípidos en el estado desordenado va aumentando progresivamente a expensas de la fase cristalina.

La temperatura de transición de fase (T_t) es definida como la temperatura en la cual el 50% de los lípidos se encuentra en el estado ordenado y el otro 50% se halla en la fase fluída. Si la transición es simétrica, T_t coincidirá con el punto medio entre T_i y T_s , sin embargo no siempre la transición es perfectamente simétrica, por lo que T_t se calcula como se indica en las figuras 36, 37 o 38. Se prolongan las rectas correspondientes a ambos estados puros (por debajo de T_i y por encima de T_s , y la temperatura del punto equidistante entre ambas rectas corresponde a T_t .

Las transiciones de fase de sistemas lipídicos, aún en dispersiones de una única especie de fosfolípidos como en este caso, se caracterizan por presentar un rango ΔT relativamente ancho. Además el ancho de la transición puede variar según el método de preparación de las dispersiones lipídicas, y es mayor cuanto menor sea el radio de curvatura de la bicapa lipídica, el cual a su vez depende del tamaño de las vesículas. El ancho de la transición también es mayor para vesículas monolamelares que para liposomas multilamelares (459). Los liposomas de DMPC utilizados para estas determinaciones, no fueron centrifugados a 160.000 xg luego de la sonicación por lo que pueden contener algo de liposomas multilamelares.

En la figura 37 se muestra la curva de intensidad de light scattering en función de la temperatura para los liposomas de DMPC. Solo se indica la curva registrada incrementando la temperatura. Si bien los límites T_i y T_s no coinciden exactamente con los determinados por la fluorescencia de la N-fenil-1-naftilamina, y ΔT es algo menor en este caso, la concordancia entre la temperatura de transición determinada por ambos métodos es buena.

En la figura 38 se muestra la detección de la transición de fase de los liposomas de DMPC por medio de la determinación de la polarización de la fluorescencia emitida por el DPH incorporado como marcador en estos liposomas. Puede verse en esta figura, que la transición puede detectarse ya sea registrando directamente la anisotropía de fluorescencia (r) en función de la temperatura, o calculando de esta el parámetro de orden (S_{DPH}) o la microviscosidad aparente ($\bar{\eta}$). La temperatura de transición (T_t), detectada por la polarización de la fluorescencia del DPH fue similar a la determinada por light scattering y la fluorescencia de N-fenil-1-naftilamina, aunque Δt fue algo menor en este caso.

Estas determinaciones muestran una buena concordancia entre estos tres métodos. Debido a la simplicidad de la determinación y al hecho de que no necesita de la incorporación de ninguna sustancia extraña como marcador, el método de light scattering fue el más utilizado para detectar las transiciones de fase en las membranas modificadas.

III.3.2.- Modificación de la composición lipídica de la membrana microsomal "in vitro".

Una manera de investigar la influencia de la estructura de la membrana sobre la actividad enzimática es estudiar su respuesta a las transiciones de fase orden-desorden. Sin embargo como se demostró en las secciones anteriores, las membranas del retículo endoplásmico de hígado de rata debe sufrir su transición de fase por lo menos por debajo de 10°C , ya que por

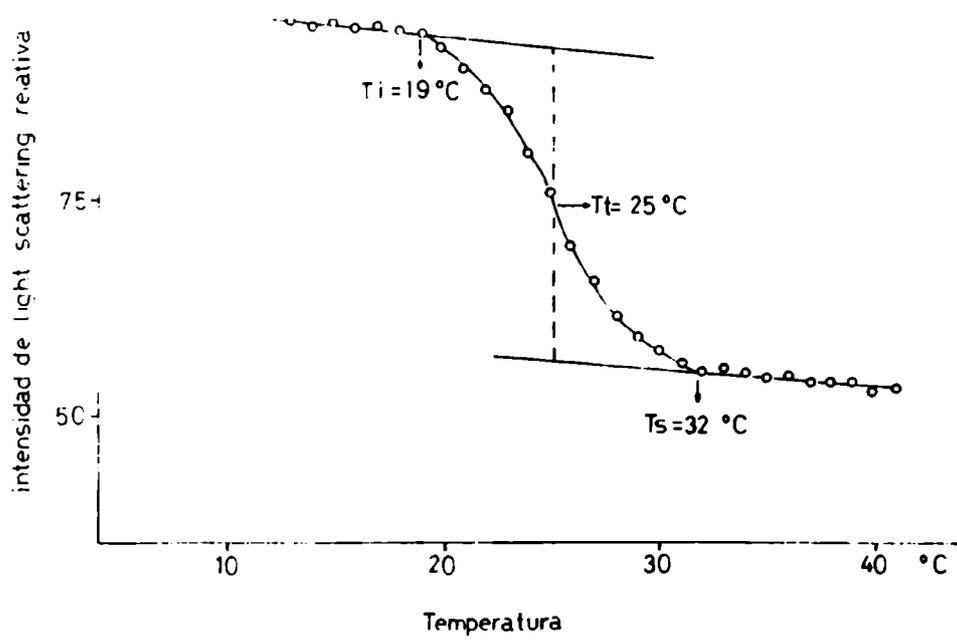


FIGURA 37: Detección de la transición de fase de liposomas de DMPC por medio del registro de la intensidad de light scattering en función de la temperatura.

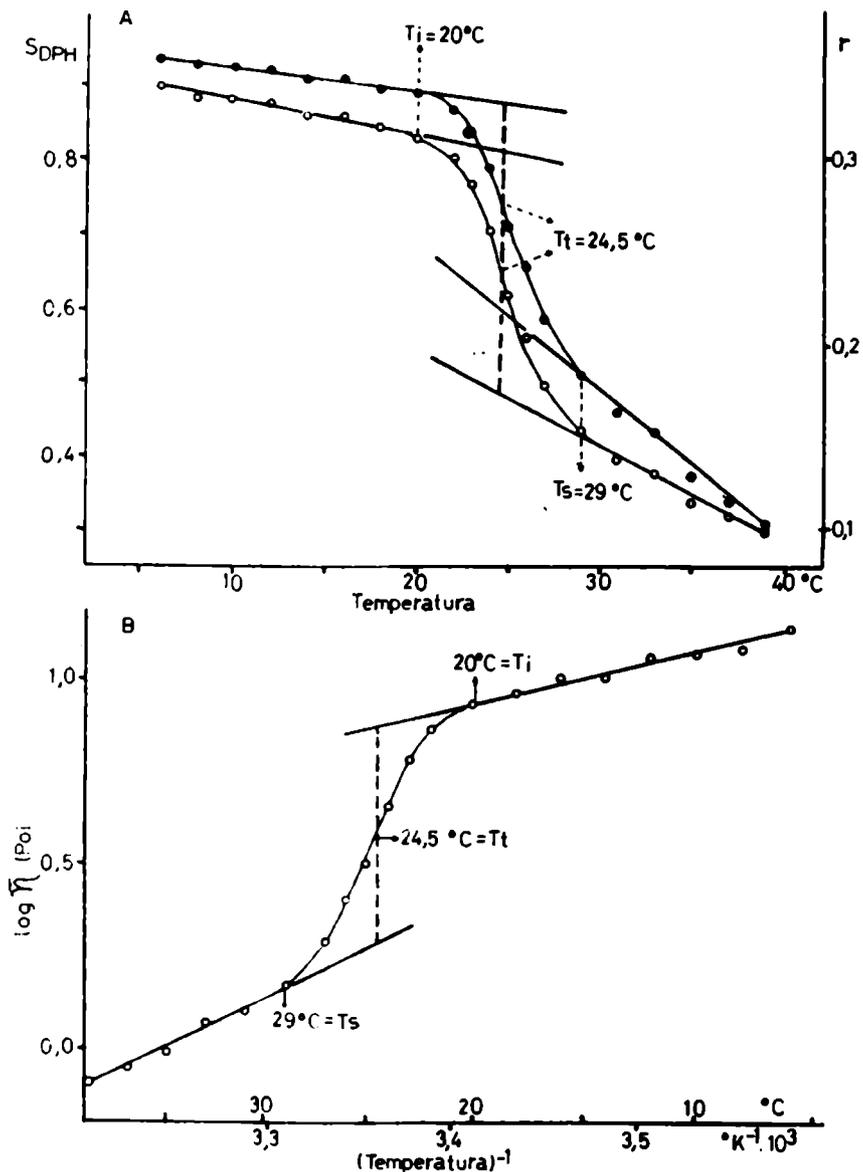


FIGURA 38: Detección de la transición de fase de lipomas de DMPC por medio de la depolarización de fluorescencia del DPH. A) (o—o) anisotropía de fluorescencia (r); (●—●) parámetro de orden ($SDPH$). B) (o—o) microviscosidad aparente ($\bar{\eta}$).

///

encima de esta temperatura presenta un estado de alta fluidez característica del estado líquido-cristalino. Para poder estudiar la influencia de la transición de fase sobre la actividad de las enzimas microsomales, la temperatura de transición de fase de la membrana fue incrementada por medio de la incorporación "in vitro" de lecitina exógena.

La lecitina elegida para estos estudios fue la DMPC, ya que esta presenta una T_t de aproximadamente 24°C , la cual queda aproximadamente en el medio del rango de temperatura en que se puede determinar las actividades enzimáticas. En algunos experimentos, sin embargo, también se utilizó DPPC. La incorporación de estos fosfolípidos se realizó por medio de tres métodos diferentes como fusión, substitución y solubilización-reconstitución, los cuales se han descrito en el capítulo II.

a) Fusión de liposomas de DMPC con microsomas de hígado de rata.

Cuando los microsomas de hígado de rata fueron fusionados con liposomas de DMPC, la cantidad de DMPC incorporada - indicada por el porcentaje de ácido mirístico aumentó en proporción a la cantidad de DMPC incubada (Tabla XII). En los microsomas originales, el contenido de 14:0 es de alrededor del 1%. El porcentaje de ácido mirístico de los microsomas incubados con 8 y 13 mg de DMPC por mg de lípido endógeno alcanzó un 69 y un 87% respectivamente. Como el contenido de 14:0 en los microsomas originales es muy bajo, su porcentaje en los microsomas tratados se debe casi exclusivamente a la DMPC incorporada, y esto se tomó como un índice de la cantidad de DMPC incorporada. La relación lípido/proteína aumenta notoriamente al fusionar los microsomas con liposomas de DMPC, de la misma manera que la relación fosfolípido/proteína. El control al cual se refiere la tabla fue tratado de la misma manera que los microsomas fusionados con la excepción de que no se les agregó liposomas. En este caso, si bien la composición de ácidos grasos no se modificó, la relación lípido/proteína o fosfolípido/pro

TABLA XII

INCORPORACION DE DMPC EN MICROSOMAS DE HIGADO DE RATA POR EL METODO DE FUSION

TRATAMIENTO	DMPC INCUBADA	CONTENIDO DE 14:0	RELACION		RECUPERACION DE PROTEINAS	TEMPERATURA DE TRANSICION DE FASE	
			LIPIDO PROTEINA	FOSFOLIPIDO PROTEINA		FLUORESCENCIA**	LIGHT SCATTERING
	(mg/mg)*	(%)	(mg/mg)	(μ mol/mg)	(%)	(°C)	(°C)
NINGUNO	0,0	1,5	0,38	0,36	100	10	10
FUSION CON DMPC	8,0	68,6	1,85	1,62	66	18,5	19,5
FUSION CON DMPC	13,0	87,3	3,50	3,21	40	23,0	23,5
CONTROL***	0,0	2,2	0,59	0,50	72	10	10

* Expresado como mg de DMPC incubados por mg de lípido microsomal endógeno.

** Usando N-fenil-1-naftilamina como marcador fluorescente.

*** Tratados de la misma manera que los microsomas fusionados pero sin el agregado de liposomas de DMPC.

teína también aumentó, aunque menos intensamente que en los microso^mas fusionados. Esto posiblemente se debe a la pérdida de proteínas periféricas débilmente unidas a la superficie de la membrana microsomal, durante los lavados a que se sometieron.

Usando el criterio de (414), el aumento en la relación lípido/proteína o fosfolípido/proteína indicaría que los cambios producidos en la composición lipídica de los microso^mas fueron producidos por una incorporación de DMPC en los microso^mas, mas bien que por un intercambio de fosfolípidos entre los liposomas y los microsomas. No es posible distinguir - si la DMPC se incorpora realmente en la bicapa lipídica de la membrana microsomal, o simplemente los liposomas de DMPC permanecen adsorbidos a la superficie de los microsomas aún después de los lavados. Sin embargo, como veremos mas adelante, el hecho de que la actividad de algunas enzimas "sientan" la transición de fase de estas membranas modificadas indicaría que la - DMPC queda al menos parcialmente en el medio en el que se hallan estas enzimas. Además el gran porcentaje de DMPC hallado en las membranas modificadas, en casos queda el 90% de DMPC y solo un 10% de lípidos endógenos, difícilmente pueda deberse - únicamente a una simple adsorción. 

La cantidad de proteínas microsomales recuperadas - por este método varió entre el 40 y el 70%. Debe tenerse en - cuenta que en el control se perdió un 30% de las proteínas, y estas deben ser principalmente proteínas periféricas. Así, solo una pequeña proporción de proteínas integrales se perderían por este tratamiento.

La temperatura de transición de fase (Tt) obtenidas por light scattering o por la fluorescencia de la N-fenil-1-naftilamina es menor de 10°C tanto en los microsomas originales como en los controles. A medida que aumenta la proporción de DMPC incorporada, la Tt se acerca a 24°C que es la Tt de la DMPC pura. La Tt fue de alrededor de 19°C en las membranas con un 69% de 14:0 y de aproximadamente 23°C en las membranas

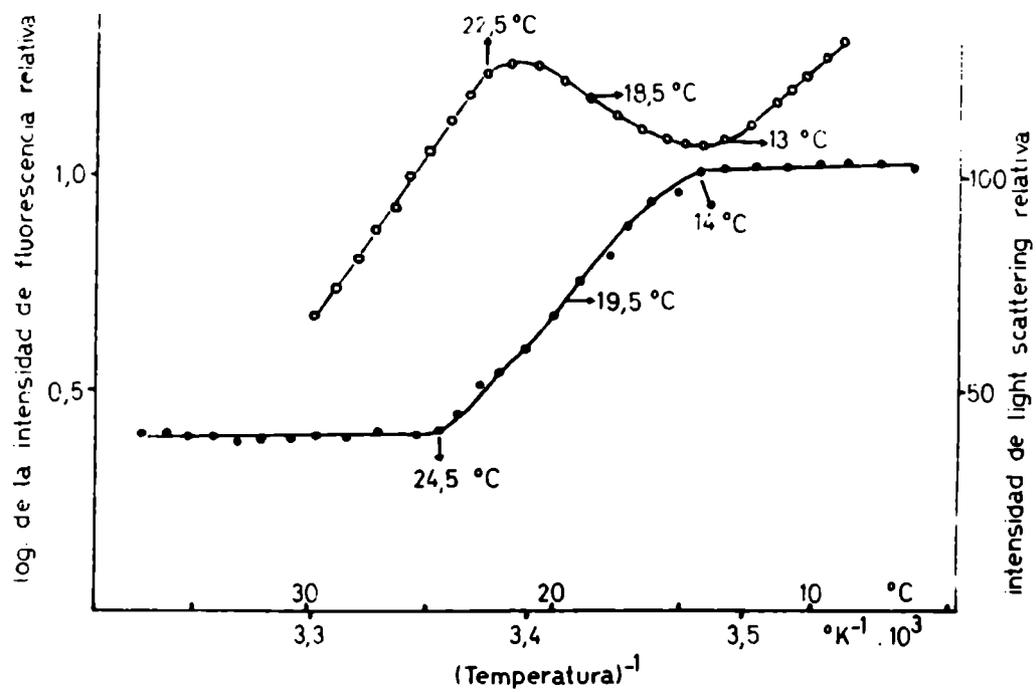


FIGURA 39: Transición de fase en microsomas fusionados con liposomas de DMPC (69 % de 14:0)

(●—●) light scattering; (o—o) fluorescencia de la N-fenil-1-naftilamina.

con un 87% de 14:0.

La transición de fase detectada por light scattering y por la fluorescencia de la N-fenil-1-naftilamina para las membranas con un 69% de 14:0 se muestra en la figura 39. Si bien los métodos de light scattering y de fluorescencia dieron valores algo diferentes para T_i y T_s , los valores de T_t obtenidos por ambos métodos fueron bastante similares dentro del error experimental.

b) Substitución de los lípidos microsomaes por DMPC.

En la tabla A111 se muestran los resultados obtenidos por el método de sustitución utilizando diferentes cantidades de desoxicolato de sodio y de DMPC. Cuando se incubaron solo 7 mg de DMPC por mg de lípido microsomal endógeno, y 0,25 mg de desoxicolato/mg de lípido total, la proporción de 14:0 alcanzó un 80%. En este caso la relación lípido/proteína o fosfolípido/proteína fue incrementada pero de una manera mucho menos pronunciada que en los experimentos de fusión. Esto indica que al menos parte de los lípidos endógenos son substituídos por DMPC. La cantidad de detergente utilizado o mas bien la relación de detergente a lípido parece influir sobre la relación lípido/proteína encontrada en las membranas modificadas. Cuando se utilizaron 0,1 mg de desoxicolato por mg de lípido total, aproximadamente el mismo porcentaje de 14:0 se alcanzó, pero con una relación lípido/proteína mayor, indicando que ocurre mas incorporación y menos substitución. Cuando se utilizaron 0,5 mg de desoxicolato por mg de lípido total, la relación de lípido/proteína encontrada fue menor, pero sin embargo, la cantidad de proteína recuperada en este caso fue muy pobre. En todos los otros experimentos realizados se usaron 0,25 mg de desoxicolato/mg de lípido total (DMPC + lípido microsomal).

Con 0,25 mg de desoxicolato/mg de lípido, el % de 14:0 aumentó en proporción a la cantidad de DMPC incubada, y fue del 80% con 7 mg de DMPC/mg de lípido endógeno, y del 64%

TABLE XIII

INCORPORACION DE DMPC EN MICROSOMAS DE HIGADO DE RATA POR EL METODO DE SUBSTITUCION

TRATAMIENTO	DMPC INCUBADA	RELACION		CONTENIDO DE 14:0	RELACION		RECUPERACION DE PROTEINAS	TEMPERATURA DE TRANSICION DE FASE		
		DESOXICOLATO LIPIDO	LIPIDO PROTEINA		FOSFOLIPIDO PROTEINA	FLUORESCENCIA DE N-FENIL-1- NAFTILAMINA		LIGHT SCATTERING		
									(mg/mg)*	(mg/mg)**
NINGUNO	0,0	0,0	0,7	0,47	0,40	100	10	10		
SUBSTITUCION CON DMPC	7,0	0,10	75,4	2,01	1,92	61	d.d.#	n.d.		
SUBSTITUCION CON DMPC	7,0	0,25	79,9	1,14	1,04	56	20,0	21,0		
SUBSTITUCION CON DMPC	7,0	0,50	81,2	0,90	0,87	11	n.d.	n.d.		
SUBSTITUCION CON DMPC	5,5	0,25	64,2	1,10	1,01	52	18,0	18,5		
CONTROL##	0,0	0,25	1,4	0,85	0,74	48	10	10		

* Expresado como mg de DMPC incubados/mg de lípido microsomal endógeno.

** Expresado como mg de desoxicolato/mg de lípido total (DMPC + lípido endógeno).

No determinada.

Tratados de la misma manera pero sin el agregado de DMPC.

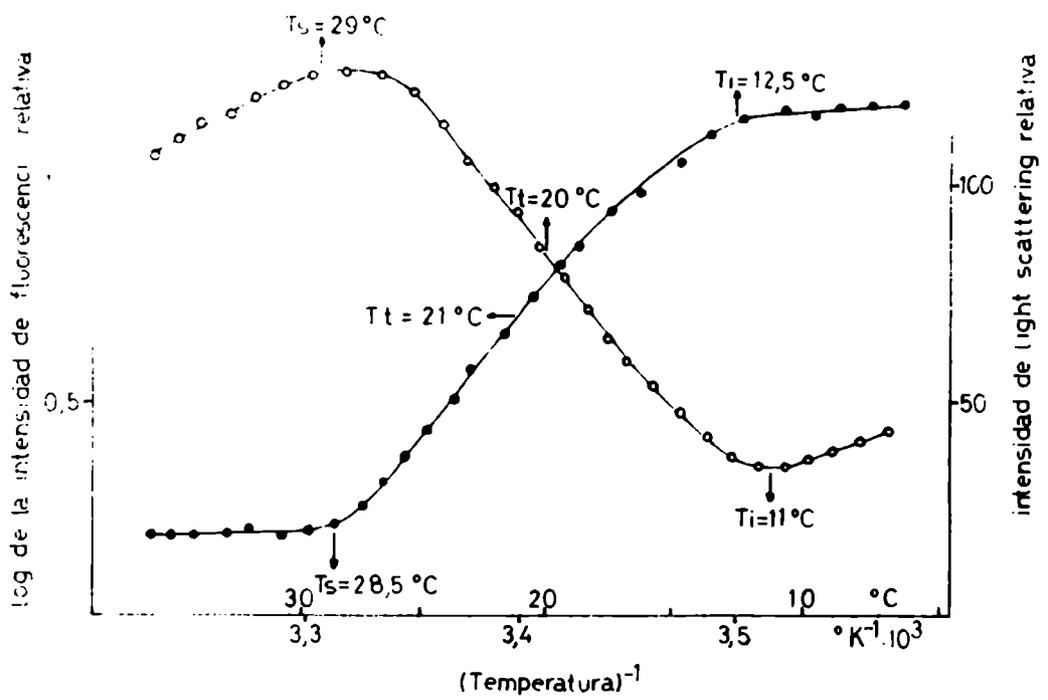


FIGURA 40: Transición de fase en microsomas cuyos lípidos fueron substituídos por DMPC (80 % de 14:0).

(●—●) light scattering; (o---o) fluorescencia de la N-fenil-1-naftilamina.

///

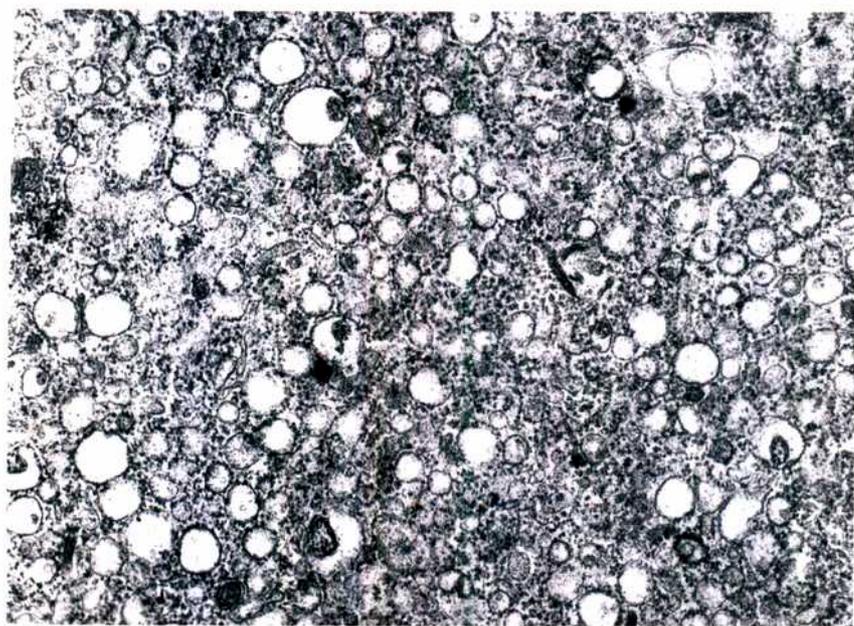
con 5,5 mg de DMPC/mg de lípido endógeno. El porcentaje de ácido mirístico en las membranas modificadas de esta manera, al igual que las obtenidas por el método de fusión, fue menor que la proporción que se obtendría si se alcanzara un completo equilibrio entre los lípidos endógenos y la DMPC.

La T_t fue acercándose a 24°C a medida que la proporción de DMPC incorporada fue mayor, y fue de aproximadamente 20°C en las membranas con 80% de 14:0 y de 18°C en las membranas con 64% de 14:0. En la figura 40 se muestran las curvas de light scattering y de fluorescencia de la N-fenil-1-naftilamina para las membranas con un 80% de DMPC obtenidas por sustitución. El rango de la transición de fase en este caso fue más ancho que en el caso de las membranas obtenidas por fusión. Nuevamente la concordancia entre ambos métodos para detectar la transición de fase fue aceptable.

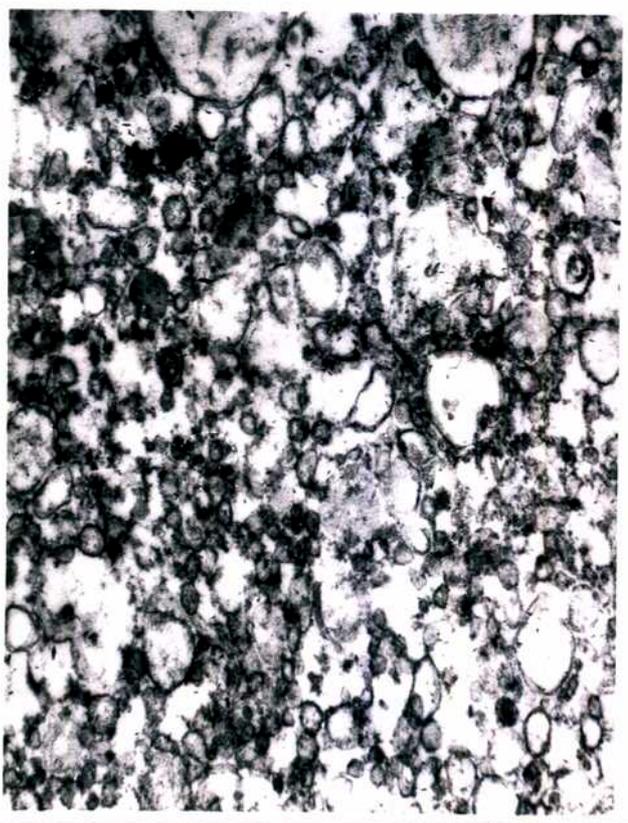
c) Integridad de las vesículas microsomales modificadas por fusión y sustitución.

Los microsomas modificados por los métodos de fusión y sustitución fueron observados por microscopía electrónica. En la figura 41 se muestran las micrografías obtenidas en microsomas sin tratar, en microsomas fusionados con DMPC, y en microsomas cuyos lípidos fueron substituídos por DMPC. Estas muestran que los microsomas tratados por ambos métodos perdieron los ribosomas que se ven unidos a la superficie de los microsomas sin tratar. Los microsomas modificados presentan un aspecto de membranas, aunque la estructura de vesículas selladas parece estar alterada. En el caso de los microsomas tratados por sustitución, la integridad de las vesículas parece estar muy afectada. En cambio el tratamiento por fusión pareció ser menos drástico, y la integridad de las vesículas parece conservarse algo más que las tratadas por sustitución.

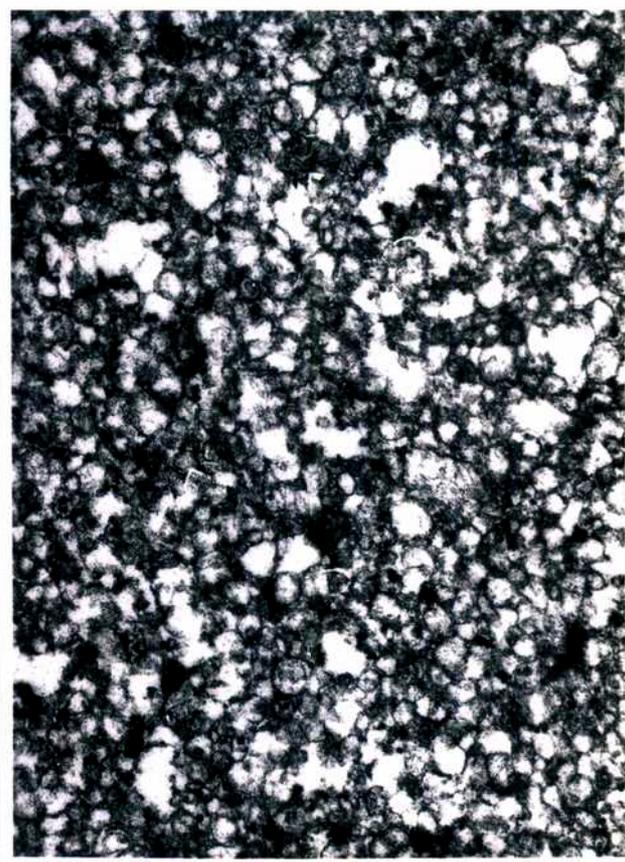
Otra manera de estudiar la integridad de las vesículas microsomales fue medir la actividad manosa-6-fosfatasa antes y después del tratamiento de las membranas con desoxicola-



A



B



C

FIGURA 41: Aspecto de los microsomas tratados por fusión y sustitución. A) Microsomas originales. B) Microsomas fusionados con liposomas de DMPC. C) Microsomas tratados por sustitución con DMPC. Aumento: X 20.000

///

to de sodio. M-6-P no es un sustrato para la glucosa-6-fosfata sa en microsomas intactos, y solo puede ser hidrolizada si la barrera de permeabilidad de las vesículas es eliminada para permitir el acceso de este sustrato alternativo al sitio activo de la enzima en el espacio luminal de las vesículas microsomas (406). Así, el grado de latencia de esta actividad enzimática es la proporción de enzima que se encuentra en vesículas selladas, y puede ser considerado como un índice de la integridad de la barrera de permeabilidad de las vesículas microsomas. La latencia de la actividad M-6-Pasa se corresponde muy bien con la permeabilidad de la membrana al EDTA como mostraron Arion y col. (399).

Los resultados de estas mediciones en los microsomas modificados se muestran en la tabla XIV, donde se puede observar que en las membranas modificadas por fusión, la barrera de permeabilidad se encuentra parcialmente alterada. Esta permeabilización de los microsomas a la M-6-P es producida por el procedimiento de incubación y no por la adición de DMPC, ya que la disminución en el grado de latencia ocurre también en la misma extensión en los microsomas controles, los cuales recibieron el mismo tratamiento de incubación, pero sin el agregado de los liposomas de DMPC. El porcentaje de vesículas permeables a la M-6-P en las muestras tratadas por fusión supera el 50%, en contraste con solo un 12% en los microsomas sin tratar. El grado de latencia de la actividad M-6-Pasa también parece ser independiente del tiempo de incubación.

En las membranas tratadas por el procedimiento de substitución, el grado de latencia es prácticamente nulo, lo que indica que la barrera de permeabilidad es completamente eliminada tanto en los microsomas substituídos con DMPC como en los controles tratados de la misma manera pero sin el agregado de DMPC.

TABLA XIV

INTEGRIDAD DE LA BARRERA DE PERMEABILIDAD DE LOS MICROSOMAS TRATADOS POR FUSION Y SUBSTITUCION

TRATAMIENTO	ACTIVIDAD MANOSA-6-FOSFATASA**		LATENCIA (%)
	SIN DESOXICOLATO	PERMEABILIZADOS CON DESOXICOLATO 0,1%	
NINGUNO	16,7	143,8	88,7
FUSIONADOS CON DMPC DURANTE 30 MINUTOS	100,0	166,0	39,3
FUSIONADOS CON DMPC DURANTE 60 MINUTOS	109,6	187,8	41,6
CONTROL DE FUSION*	87,8	143,4	38,8
SUBSTITUIDOS CON DMPC	176,0	118,3	1,9
SUBSTITUIDOS SIN DMPC (CONTROL)	143,5	147,8	2,9

* 30 minutos de incubación.

** Determinada con una concentración de M-6-P de 25 mM.

d) Solubilización de microsomas y reconstitución con fosfolípidos exógenos.

Membranas muy ricas en lecitina exógena fueron obtenidas también por el método de solubilización y reconstitución. En la tabla XV se muestra que la relación lípido/proteína o fosfolípido/proteína obtenida dependió de la longitud de las cadenas hidrocarbonadas de la fosfatidilcolina utilizada en la reconstitución. Al reconstituír con DMPC se obtuvo una relación de lípido/proteína mucho menor que al reconstituír con DPPC o con una mezcla de DMPC-DPPC 1:1 (P/P). Es posible que esta diferencia sea debida a la menor capacidad de la DMPC comparada con la DPPC para formar vesículas bilaminares, ya que cuanto menor es la longitud de las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos, tienen menor tendencia a formar vesículas de bicapa y mayor tendencia a formar micellas (51). Así, es posible que gran parte de la DMPC quede en el sobrenadante de 100.000 g en forma de micellas.

La proporción de 14:0 o de 16:0 exógeno que se obtiene por éste método es cercana al valor calculado asumiendo un completo equilibrio entre los lípidos exógenos y endógenos, al contrario de lo que ocurrió con los métodos de fusión y sustitución. La proporción de proteínas recuperadas por este método es bastante inferior a la recuperada por los métodos de fusión y sustitución.

La temperatura de transición de fase se determinó en estas membranas por light scattering y por la fluorescencia de la N-fenil-1-naftilamina. Ambos métodos dieron resultados similares. Las membranas reconstituídas con lípidos endógenos no muestran transición de fase en el rango de temperatura medido. Cuando se reconstituyó con DMPC o con DPPC, la transición de fase ocurrió a temperaturas cercanas a la T_t de la DMPC o la DPPC puras (24 y 41°C, respectivamente). Al reconstituír con una mezcla de DMPC-DPPC 1:1 (p/p), la transición ocurrió a una temperatura intermedia, a aproximadamente 31°C.

TABLA XV

SOLUBILIZACION DE MICROSOMAS Y RECONSTITUCION CON LIPIDOS EXOGENOS

TRATAMIENTO	CONTENIDO DE LECITINA		CONTENIDO DE EXOGENA		RELACION		RELACION		RECUPERACION DE PROTEINAS	TEMPERATURA DE TRANSICION DE FASE	
	14:0		16:0		LIPIDO	PROTEINA	FOSFOLIPIDO	PROTEINA		FLUORES-	LIGHT
	TOTAL EXOGENO	(%)**	TOTAL EXOGENO	(%)**							
INCUBADA	(%)	(%)**	(%)	(%)**	(mg/mg)	(μmol/mg)	(%)	(°C)	(°C)		
NINGUNO	0,0	0,8	17,8		0,41	0,35	100	10	10		
DMPC	5,5	79,4	79,3		1,15	1,09	8	22,5	21,0		
	5,5	40,4	40,3	44,0	7,10	6,60	12	31,5	30,5		
DPPC	5,5		85,4	81,4	7,86	7,03	13	37,5	37,5		
CONTROL#	0,0	0,4	17,4		0,92	0,75	21	10	10		

* Expresado como mg de lípido exógeno/mg de lípido microsomal endógeno.

** Calculado como se indicó en la sección II.10.

Usando N-fenil-1-naftilamina como marcador.

Solubilizado y reconstituido con los lípidos endógenos.

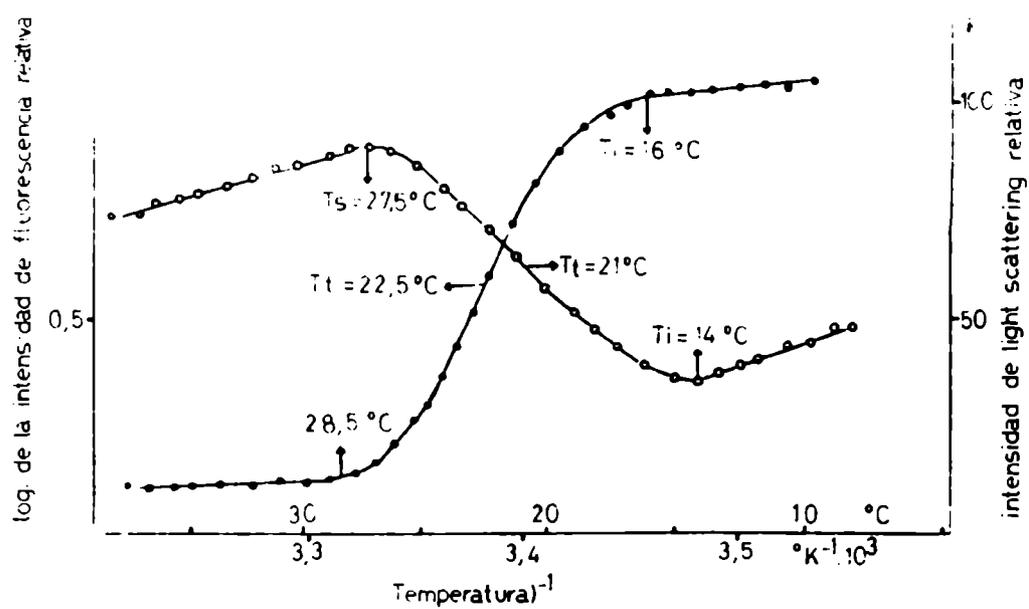


FIGURA 42: Transición de fase en membranas obtenidas por solubilización de los microsomas y reconstitución con DMPC (79 % de 14:0).

(●—●) light scattering; (○—○) fluorescencia de la N-fenil-1-naftilamina.

La figura 42 muestra las curvas de light scattering y de fluorescencia de N-fenil-1-naftilamina para las membranas solubilizadas y reconstituídas con DMPC (79% de 14:0), las cuales indican una transición de fase centrada a aproximadamente 22°C.

e) Recuperación de actividades enzimáticas en las membranas modificadas.

En la tabla XVI se muestra la recuperación de actividades de las $\Delta 6$ y $\Delta 9$ desaturasas, G-6-Pasa, NADH-ferricianuro reductasa y NADH-citocromo c reductasa. Como se vio en la sección anterior, el método por el que se obtiene la menor recuperación de proteínas fue el de solubilización-reconstitución, pero por los otros dos métodos la recuperación fue mayor del 40%.

La recuperación de las actividades de las $\Delta 6$ y $\Delta 9$ desaturasas fue muy baja en todos los casos. Las actividades que se muestran en la tabla son las recuperadas con las óptimas condiciones que se probaron. En este caso se reemplazó al buffer tris-acetato por buffer fosfato 41 mM y N-acetil cisteína 1,4 mM. También se agregó 0,2 mg de proteína citosólica (sobrenadante de 100.000 xg) al medio de incubación cuando se midió la actividad para evitar pérdidas de actividad por la eliminación durante los lavados de factores solubles involucrados en la desaturación (460). Si se utilizó buffer tris-acetato en lugar de fosfato durante el procedimiento de fusión o de sustitución, o si se omitió el agregado de citosol al medio de incubación, la actividad recuperada fue siempre menor. Esta pérdida de actividad no fue debida a la DMPC, ya que también ocurrió en los respectivos controles.

La actividad de la NADH-ferricianuro reductasa recuperada en los microsomas modificados por fusión o sustitución fue similar a la recuperación de las proteínas totales, por lo que la actividad específica permaneció prácticamente sin modificarse por estos tratamientos. La actividad de la NADH-citocromo c reductasa, sin embargo se recuperó en mayor proporción

TABLA XVI

RECUPERACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS EN LAS MEMBRANAS MODIFICADAS

TRATAMIENTO	Δ6 DESATURACION* (37°C)		Δ9 DESATURACION* (37°C)		GLUCOSA-6-FOSFA-TASA (37°C)		NADH-FERRICIANURO REDUCTASA (25°C)		NADH-CITOCROMO C REDUCTASA (25°C)	
	A.R**	A.E***	A.R**	A.E***	A.R**	A.E***	A.R**	A.E***	A.R**	A.E***
NINGUNO	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
FUSION	DMPC	9	14	26	95	144	66	100	96	145
	DMPC	10	25	35	112	280	61	152	90	225
SUBSTITUCION#	CONTROL##	25	35	28	107	149	70	97	94	131
	DMPC	3	5	14	84	150	49	88	103	184
SOLUBILIZACION	CONTROL##	4	8	13	145	302	45	94	93	194
	DMPC						9	105	7	87
RECONSTITUCION	DMPC-DPPC						49	417	20###	165###
	1:1(p/p)						55	421	19###	144###
CONTROL##	---	---	---	---	---	---	41	195	57	275

* Tratamientos realizados con buffer fosfato, y agregando citosol al medio de reaccion.

** % de actividad total recuperada

*** Actividad especifica relativa a los microsomas no tratados.

Usando 0,25 mg de desoxicolato/mg de lípido total
Tratados de la misma manera pero sin agregar lecitina exogena

En estos casos las actividades indicadas son a 41°C, con la membrana en el estado fluido.

///

que las proteínas totales, y la actividad específica aumentó, cuando los microsomas fueron modificados por fusión o substitución. Algo similar ocurrió con la G-6-Pasa, aunque puede verse en la tabla que en algunos casos se recuperó una actividad total superior a la actividad original. Esto no es sorprendente ya que es conocido que la actividad G-6-Pasa aumenta cuando se destruye la barrera de permeabilidad de las vesículas microsomas (ver capítulo I). Como vimos, el tratamiento de substitución produjo una completa destrucción de la barrera de permeabilidad y el tratamiento de fusión la destruyó en un 50-60%. Así, esta sería posiblemente la causa del incremento en la actividad de la G-6-Pasa.

De los tres métodos, el procedimiento de solubilización-reconstitución fue el que dio no solo la menor recuperación de proteínas totales, sino que también dio la menor recuperación de las actividades NADH-ferricianuro reductasa y NADH-citocromo c reductasa. La actividad específica de la NADH-citocromo c reductasa, si bien es menor que en los microsomas originales cuando se reconstituyó con DMPC, aumentó cuando se reconstituyó con DPPC o con una mezcla de DMPC-DPPC 1:1 (p/p) o con los lípidos endógenos de los microsomas. La actividad específica de la NADH-ferricianuro reductasa fue similar a la de los microsomas originales al reconstituír con DMPC, pero aumentó si la reconstitución se hizo con los lípidos endógenos, con DPPC o con una mezcla de DMPC-DPPC 1:1 (p/p).

En microsomas cuya composición lipídica fue modificada por los métodos descriptos, se determinaron las curvas de Arrhenius para las actividades G-6-Pasa, NADH-ferricianuro reductasa y NADH-citocromo c reductasa. Las curvas de Arrhenius para las actividades Δ^6 y Δ^9 desaturasas no pudieron ser construídas debido a la baja actividad recuperada.

III.3.3.- Efecto de la transición de fase orden-desorden de las membranas modificadas sobre las curvas de Arrhe-

nius de la glucosa-6-fosfatasa.

Las curvas de Arrhenius de la actividad G-6-Pasa en microsomas fusionados con liposomas de DMPC se muestra en la figura 43. En la misma figura se muestra la curva de Arrhenius obtenida en microsomas tratados por el método de fusión pero sin el agregado de los liposomas de DMPC. En el experimento mostrado, la proporción de 14:0 fue del 87%, y la T_t determinada por light scattering y por la fluorescencia de la N-fenil-1-naftilamina fue de aproximadamente 23°C. En la curva de Arrhenius de la G-6-Pasa se puede observar un pequeño cambio aparentemente de pendiente a alrededor de 30°C. Este cambio de pendiente, sin embargo, no fue significativo y no siempre pudo ser detectado, ya que en una segunda experiencia, la curva fue cercanamente lineal y de única pendiente entre 10 y 40°C.

Así, la transición de fase de estas membranas no produce aparentemente alguna quebradura abrupta o discontinuidad en la curva de Arrhenius de la G-6-Pasa, por lo menos en estas condiciones experimentales.

Las E_a aparentes para los microsomas fusionados con liposomas de DMPC ($14,1 \pm 0,7$ Kcal/mol) y del control de fusión ($13,0 \pm 0,8$ Kcal/mol), no difieren significativamente entre sí, ni de la E_a aparente de los microsomas originales ($13,8 \pm 0,8$ Kcal/mol) cuya curva de Arrhenius se muestra en la figura 44. Así, aunque en los microsomas tratados por fusión se encontró que la barrera de permeabilidad esta destruída en un 50-60%, esto no fue suficiente para hacer que disminuya significativamente la E_a aparente, como ocurre cuando la barrera de permeabilidad es totalmente destruída (ver sección III.1.4a) En este caso, la actividad medida sería un promedio de la actividad de transporte y de la actividad del componente hidrolítico.

Las curvas de Arrhenius para la actividad G-6-Pasa en microsomas tratados por el método de substitución se muestran en la figura 44. Similarmente a los microsomas fusionados con DMPC, ellos no muestran quebraduras en el rango de tempera

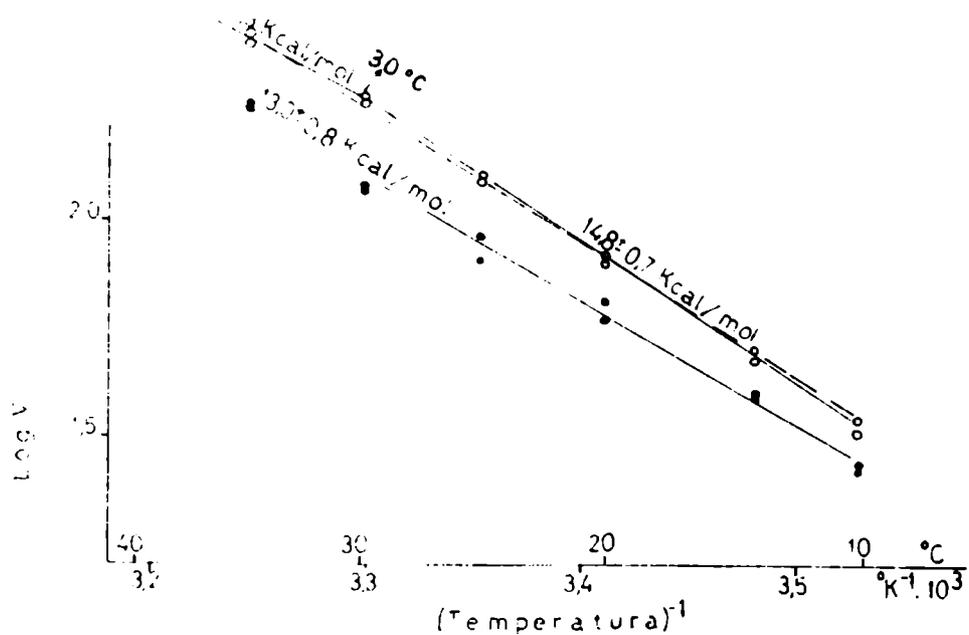


FIGURA 43: Curva de Arrhenius de la actividad glucosa-6-fosfata-
sa en microsomas fusionados con liposomas de DMPC.

(●—●) Microsomas controles.

(○) Microsomas fusionados con liposomas de DMPC (69 % de 14:0)

(—) Curva trazada seperadamente por encima y por debajo
de 30 °C.

(----) Curva trazada en todo el rango de temperatura medido.

Se indican en la figura los intervalos de confianza del 95 % de
la E_a para los microsomas controles y por encima y por debajo de
30 °C para los microsomas fusionados. Para la curva trazada so-
bre todo el rango de temperatura, fue $14,1 \pm 0,7$ Kcal/mol.

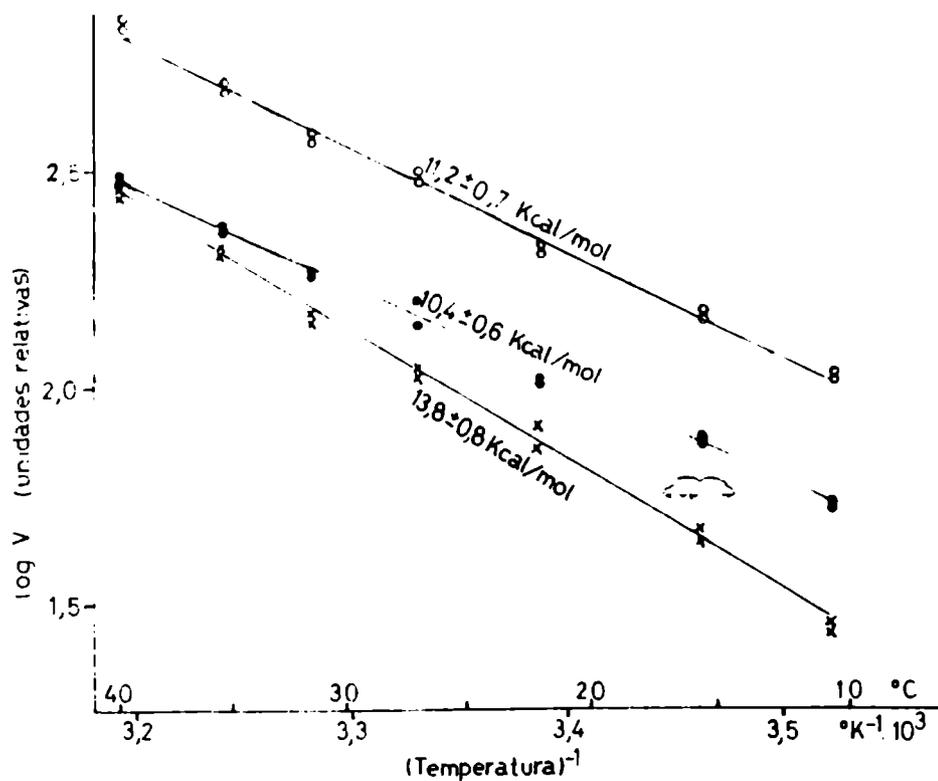


FIGURA 44: Curva de Arrhenius de la actividad glucosa-6-fosfatasa en microsomas cuyos lípidos fueron substituídos por DMPC. (x—x) Microsomas originales. (o—o) Microsomas controles. (●—●) Microsomas substituídos con DMPC (80 % de 14:0) Las E_a se indican junto a los límites del intervalo de confianza del 95 %.

tura estudiado. Sin embargo, los microsomas substituídos con DMPC o los microsomas controles que han sido tratados de la misma manera, pero sin DMPC, muestran una disminuci3n en la Ea aparente con respecto a la de los microsomas originales que fue significativa en el nivel del 1%. Esta disminuci3n en la Ea aparente no puede ser atribuída a la substituci3n de los lípidos end3genos por DMPC, sino que se debió al tratamiento de substituci3n que emplea desoxicolato de sodio. La Ea aparente obtenida en estos casos fue similar a la que se obtiene cuando se destruye la barrera de permeabilidad de las vesículas microsomales (ver secci3n III.1.4 a). Así, en este caso la actividad medida sería la actividad del componente hidrolítico ubicado en el interior de las vesículas microsomales al cual en este caso el sustrato tendría libre acceso, lo cual también fue confirmado por la pérdida total de la latencia a la actividad M-6-Pasa.

La actividad del componente hidrolítico del sistema de la G-6-Pasa, por lo tanto, presenta una curva de Arrhenius lineal a pesar de que la membrana sufre una transici3n de fase, y presenta la misma Ea aparente cuando la membrana se encuentra en el estado líquido-cristalino que cuando se encuentra en el estado cristalino. Así, la actividad de este componente de la superficie luminal podría no ser dependiente del estado físico de los lípidos de la membrana.

III.3.4.- Efecto de la transici3n orden-desorden de los lípidos de membranas modificadas sobre la actividad NADH-ferricianuro reductasa.

En la figura 45 se muestran las curvas de Arrhenius de la actividad NADH-ferricianuro reductasa en los microsomas fusionados con liposomas de DMPC, en las membranas cuyos lípidos han sido substituídos por DMPC, y en microsomas solubilizados y reconstituídos con DMPC. Se puede observar que la incorporaci3n de DMPC por cualquiera de estos tres métodos no alteró ni la forma ni la pendiente de la curva de Arrhenius de esta ac

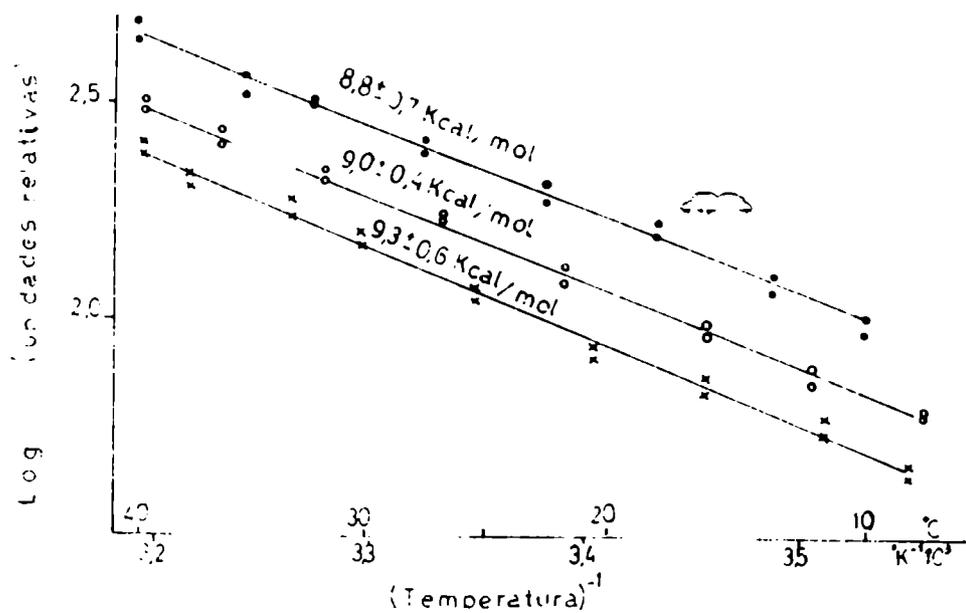


FIGURA 45: Curvas de Arrhenius de la actividad NADH-ferricianuro reductasa en microsomas modificados.

(●—●) Microsomas fusionados con liposomas de DMPC (69 % de 14:0); (○—○) Microsomas solubilizados y reconstituídos con DMPC (77 % de 14:0); (x—x) Microsomas substituídos con DMPC (80 % de 14:0).

tividad enzimática, a pesar de que estas membranas presentaron una transición de fase en el rango de temperatura medido. Las E_a aparentes obtenidas en estos casos no difirieron de la obtenida para los microsomas sin tratar ni de la obtenida para los controles, cuyas curvas de Arrhenius no se muestran.

Así, la transición de fase de los lípidos de la membrana no tendría efecto sobre la actividad de esta enzima, ya que la reacción se produce con la misma eficiencia cuando los lípidos de la membrana se hallan en el estado líquido-cristalino que cuando estos se encuentran en el estado ordenado.

III.3.5.- Transición de fase en membranas modificadas por la incorporación de lecitinas exógenas y su efecto sobre las curvas de Arrhenius de la actividad NADH-citocromo c reductasa.

La curva de Arrhenius de la NADH-citocromo c reductasa en microsomas fusionados con liposomas de DMPC y en los controles tratados similarmente sin el agregado de la DMPC, se muestra en la figura 46 a). Al contrario de lo que ocurrió con la actividad NADH-ferricianuro reductasa, la curva de Arrhenius de la NADH-citocromo c reductasa mostró una quebradura a aproximadamente $22,5^{\circ}\text{C}$, mientras que las membranas controles dieron curvas completamente lineales y con la misma energía de activación aparente que los microsomas originales. La E_a aparente en las membranas fusionadas con liposomas de DMPC es menor que la de los microsomas originales y los controles por encima de $22,5^{\circ}\text{C}$, y es mayor que en ellos por debajo de $22,5^{\circ}\text{C}$.

La transición de fase de estas membranas fue detectada por light scattering y se muestra en la Figura 46 b). La T_t obtenida fue de $23,5^{\circ}\text{C}$, la cual coincide bastante bien con la temperatura a la que ocurrió la quebradura en la curva de Arrhenius de la NADH-citocromo c reductasa.

En la figura 47 a), se muestra la curva de Arrhenius para la NADH-citocromo c reductasa en microsomas cuyos lípidos

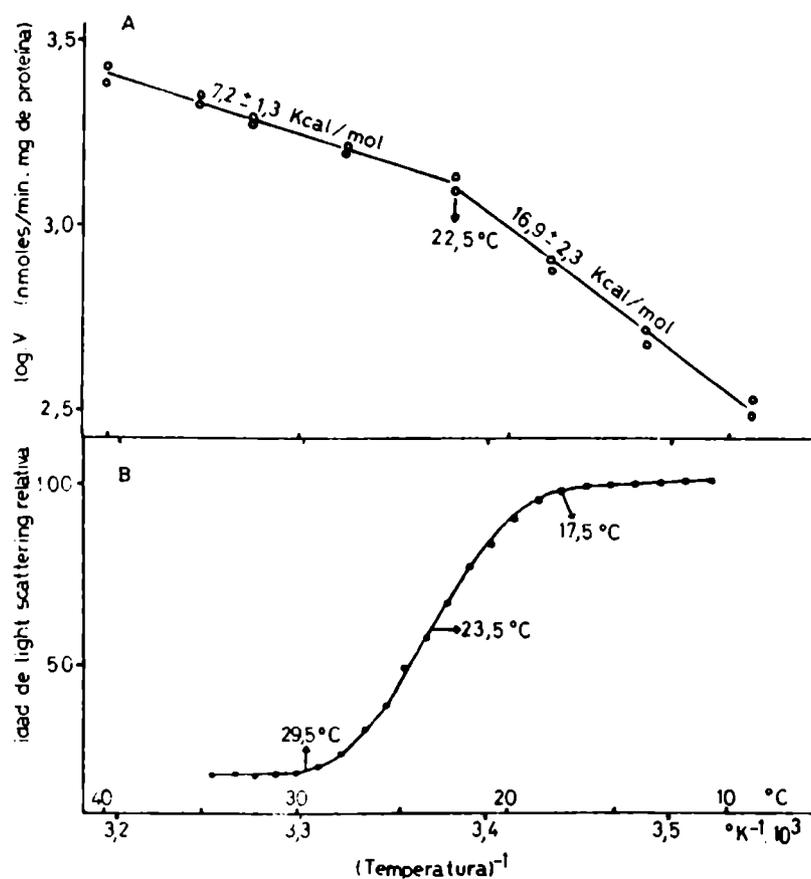


FIGURA 46: Efecto de la transición de fase sobre la actividad NADH-citocromo c reductasa en microsomas fusionados con liposomas de DMPC (87 % de 14:0).
 A) Curva de Arrhenius (o—o); B) Curva de light scattering (●—●). Las E_a se indican junto a los límites del intervalo de confianza del 95 %.

///

fueron substituídos con DMPC. En ella se puede observar una -
quebradura a alrededor de 22°C con un gran incremento en la Ea
aparente por debajo de esa temperatura. Los microsomas contro-
les, dieron una curva de Arrhenius lineal y de similar pendien-
te que los microsomas originales. En la figura 47 b), se mues-
tra la curva de light scattering para las membranas obtenidas
de esta manera, y se puede ver que dieron una Tt de aproximada-
mente 20,5°C, la cual nuevamente coincide muy bien con la tem-
peratura a la que ocurrió la quebradura en la curva de Arrhe-
nius de la NADH-citocromo c reductasa.

Cuando los microsomas fueron solubilizados y recons-
tituídos con DMPC, nuevamente se observó que la curva de Arrhe-
nius de la actividad NADH-citocromo c reductasa mostró una que-
bradura alrededor de 23,5°C cercanamente coincidente con la Tt
de esas membranas determinada por light scattering, como se -
puede ver en la figura 48 a)y b).

Así, las curvas de Arrhenius de la NADH-citocromo c
reductasa en membranas modificadas por la incorporación de una
gran proporción de DMPC por cualquiera de estos tres métodos,
mostraron quebraduras a aproximadamente la misma temperatura,
la cual fue cercanamente coincidente con la temperatura a la -
que ocurrió la transición orden-desorden de los lípidos de la
membrana. La Ea aparente observada por encima de la temperatu-
ra de la quebradura fue algo menor que en los microsomas origi-
nales, e independiente del método utilizado para la incorpora-
ción de DMPC. Sin embargo, por debajo de la temperatura de la
quebradura, las Ea aparentes mostraron diferencias significati-
vas entre los tres métodos utilizados para obtener los microso-
mas modificados. Las Ea aparentes por debajo de la quebradura
fueron: $16,9 \pm 2,3$ Kcal/mol para los microsomas fusionados con
liposomas de DMPC; de $23,7 \pm 3,7$ Kcal/mol para los microsomas -
cuyos lípidos fueron substituídos por DMPC; y de $50,0 \pm 2,7$ Kcal/
mol para los microsomas solubilizados y reconstituídos con
DMPC.

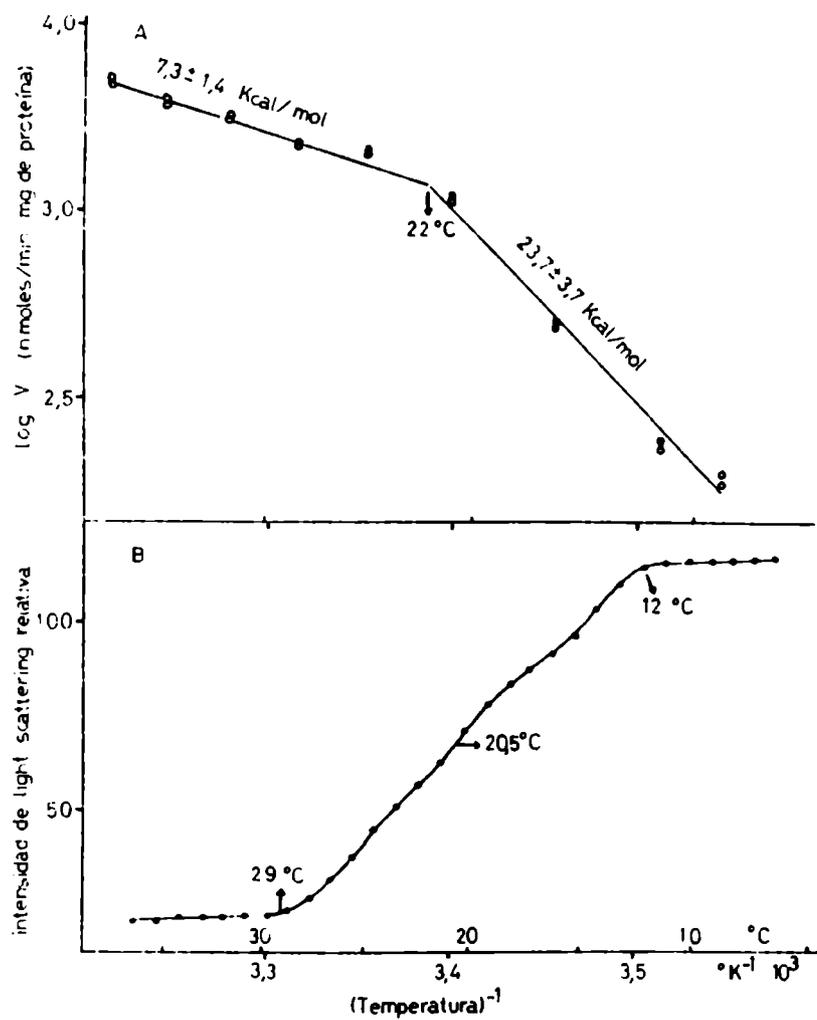


FIGURA 47: Efecto de la transición de fase de membranas obtenidas por substitución por DMPC (83 % de 14:0), sobre la actividad NADH-citocromo c reductasa.

A) Curva de Arrhenius. B) Curva de light scattering.

Las E_a se indican junto a los límites del intervalo de confianza del 95 %.

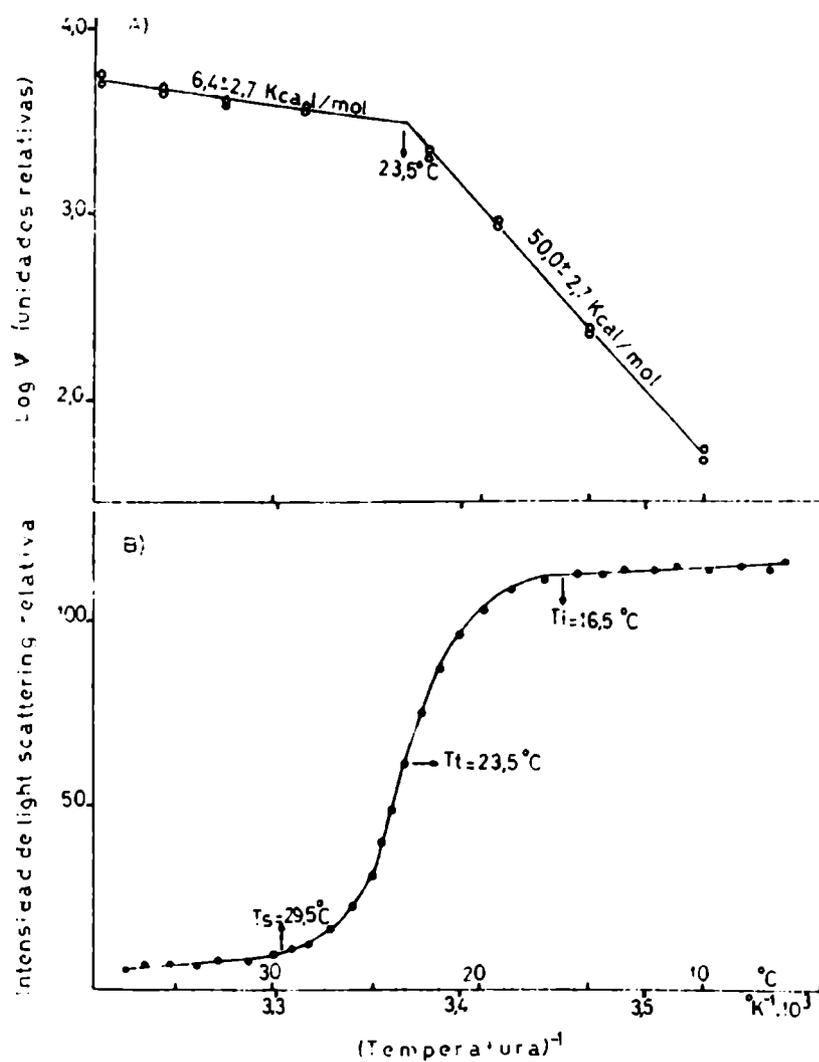


FIGURA 48: Efecto de la transición de fase de membranas obtenidas por solubilización y reconstitución con DMPC (84 % de 14:0), sobre la actividad NADH-citocromo c reductasa.

A) Curva de Arrhenius. B) Curva de light scattering.

Las energías de activación aparentes se indican junto a los límites del intervalo de confianza del 95 %.

De acuerdo con estos resultados, la transición orden-desorden de la fase lipídica de la membrana produciría una -quebradura abrupta en la curva de Arrhenius de la actividad -NADH-citocromo c reductasa, con un cambio en la E_a aparente a la temperatura media de la transición de fase, sin que cambie la velocidad de la reacción a esa temperatura. Este tipo de -curvas solo puede ser explicado por un cambio en la mecanismo de la reacción o en la etapa determinante de la misma producido por la transición de fase de los lípidos (252), o si el estado activado requiere de la unión de moléculas de lípidos (253).

En base a experiencias realizadas por el grupo de -Strittmatter (362-364), ellos propusieron que la velocidad de la reacción NADH-citocromo c reductasa sería limitada por la -difusión lateral de las proteínas citocromo b₅ reductasa y citocromo b₅ en el plano de la membrana. Además, la velocidad de difusión lateral de las proteínas es influenciada por la fluidez, o su inversa la microviscosidad de la membrana. Por lo -tanto, si así fuera, las dependencias de la temperatura para -la microviscosidad aparente de la fase lipídica y para la velo-cidad de esta reacción deberían ser similares.

La dependencia de la temperatura del logaritmo de la microviscosidad aparente a través de una transición de fase de un sistema lipídico sigue aproximadamente al cambio en la intensidad de light scattering como se mostró en la sección III. 3.1. Tanto la microviscosidad aparente como la intensidad de -light scattering aumentan bruscamente al disminuir la temperatura dentro del rango de la transición de fase, pero tanto por encima de T_s , como por debajo de T_i , las pendientes de estas -curvas son mucho menores y no muy diferentes entre sí. Por esta razón, si la velocidad de la reacción NADH-citocromo c reductasa fuera dependiente de la microviscosidad de la fase lipídica, su curva de Arrhenius debería ser trifásica, y con una pendiente similar por encima y por debajo del rango de la tran-sición de fase de los lípidos. Así, las curvas de Arrhenius pa

ra esta reacción obtenidas en las membranas modificadas no se correlacionan con los cambios en la fluidez de la fase lipídica que ocurren a través de la transición orden-desorden, y es por lo tanto difícil interpretar estos resultados como que la reacción fuera limitada por la velocidad de difusión lateral de las proteínas en el plano de la membrana a lo largo de toda la transición de fase.

Sin embargo, ha sido propuesto que muchas curvas de Arrhenius de actividades de membrana que aparentemente son observadas como bifásicas, podrían ser en realidad trifásicas, pero uno de los cambios de pendiente podría pasar desapercibido debido a que podría ocurrir fuera del rango de temperatura experimentalmente medible (148).

Para testear la posibilidad de que en estas membranas así modificadas ocurra una segunda quebradura a bajas temperaturas, como no fue posible medir la actividad a temperaturas muy inferiores a 10°C con suficiente exactitud, se intentó la incorporación en la membrana microsomal de un fosfolípido que sufra la transición de fase a una temperatura mayor. La DPPC se eligió ya que presenta una T_t a 41°C y así, permite realizar las determinaciones de actividad a temperaturas muy por debajo del rango de transición de fase.

En la figura 49 a), se muestran las curvas de Arrhenius de la NADH-citocromo c reductasa en membranas solubilizadas y reconstituídas con DPPC y con una mezcla de DMPC-DPPC 1:1 (p/p). Aquí puede verse claramente que las curvas son trifásicas y presentan dos quebraduras o cambios de pendiente. Estos cambios de pendiente ocurrieron a 39,5°C y 30,5°C para las membranas reconstituídas con DPPC, y a 30°C y 14°C para las membranas reconstituídas con una mezcla de DMPC-DPPC 1:1 (p/p). La pendiente de las curvas es mayor en el rango de temperatura entre las dos quebraduras y es menor por encima y por debajo de este rango. No fue posible el cálculo con suficiente exactitud de las E_a aparentes por encima de 39,5°C para las membra-

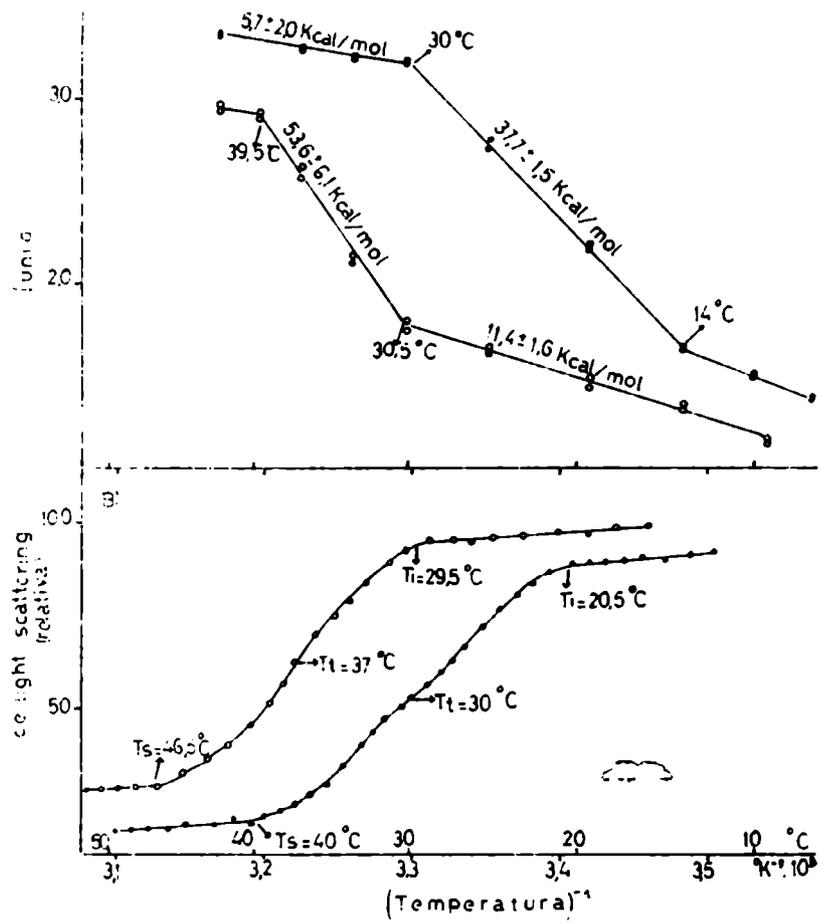


FIGURA 49: Efecto de la transición de fase sobre la actividad NADH-citocromo c reductasa en membranas solubilizadas y reconstituídas con DPPC (81 % de 16:0 exógeno) (○—○); o con una mezcla de DMPC-DPPC 1:1 (p/p) (40 % de 14:0, 44 % de 16:0 exógeno) (●—●). A) Curvas de Arrhenius; B) light scattering. Las E_a se indican junto a los límites del intervalo de confianza del 95 %.

nas reconstituídas con DPPC, y por debajo de 14°C para las membranas reconstituídas con DMPC-DPPC 1:1 (p/p). Sin embargo, la E_a aparente por encima de 30°C para las membranas reconstituídas con la mezcla DMPC-DPPC 1:1 (p/p) no es muy diferente de la E_a aparente obtenida por debajo de $29,5^{\circ}\text{C}$ para las membranas reconstituídas con DPPC.

Estos resultados hacen suponer que las curvas de Arrhenius de esta actividad obtenidas para los microsomas modificados por la incorporación de DMPC (figuras 46, 47 y 48) serían en realidad curvas trifásicas y un segundo cambio de pendiente debe ocurrir por debajo de la temperatura mínima que se midió en esas experiencias.

En la figura 49 b), se muestran las curvas de light scattering en función de la temperatura para las membranas reconstituídas con DPPC o con DMPC-DPPC 1:1 (p/p). Las membranas reconstituídas con DPPC presentaron una transición de fase cuya T_s fue de $46,5^{\circ}\text{C}$ y su T_i fue de $29,5^{\circ}\text{C}$. La T_t fue de aproximadamente 37°C , esto es algo menor que la T_t de la DPPC pura que es de 41°C . Las membranas reconstituídas con DMPC-DPPC 1:1 (p/p) presentaron una transición de fase en un rango de temperatura intermedio entre las reconstituídas con DMPC y las reconstituídas con DPPC, con una T_t de 30°C , una T_i de $20,5^{\circ}\text{C}$ y una T_s de 40°C .

Ya que las curvas de Arrhenius de la NADH-citocromo c reductasa son trifásicas, ambas quebraduras pueden ser asignadas al comienzo y al final de la transición de fase. Es decir que el rango de temperatura intermedio entre las dos quebraduras, que presenta una pendiente pronunciada sería el rango de la transición de fase "sentido" por la reacción. Por encima de la quebradura superior, los lípidos se hallan totalmente en la fase desordenada y por debajo de la quebradura inferior se hallan totalmente en la fase ordenada. En el rango de temperatura entre las dos quebraduras coexisten ambas fases.

En la tabla XVII se resumen los límites de las transiciones de fase en las membranas modificadas, determinados por light scattering, y los límites de las transiciones de fase "sentidas" por la NADH-citocromo c reductasa. Unicamente en las membranas reconstituídas con DPPC, los límites de la transición de fase detectados por light scattering son mas o menos aproximados a los límites "sentidos" por la reacción NADH-citocromo c reductasa. Sin embargo, en las membranas reconstituídas con DMPC-DPPC 1:1 (p/p) o con DMPC, las quebraduras observadas en las curvas de Arrhenius de la NADH-citocromo c reductasa se hallan desplazadas hacia menores temperaturas con respecto a los valores de T_s y T_i determinados por light scattering. Por lo tanto, podemos decir que si bien la reacción NADH-citocromo c reductasa responde a la transición de fase de los lípidos, esta respuesta se encuentra desplazada hacia valores de temperatura menores. Esta reacción "siente" la transición de fase a menores temperaturas. Cuando se disminuye la temperatura y parte de los lípidos comienzan a transformarse al estado ordenado, la reacción de la NADH-citocromo c reductasa aún continúa siendo tan efectiva como si todos los lípidos estuvieran en el estado líquido-cristalino, y solo cuando una gran proporción de lípidos ya estan en el estado cristalino, la reacción recién responde a la transición de fase haciéndose menos efectiva.

Fue de interés estudiar el efecto de la incorporación de cantidades crecientes de lípido exógeno sobre las curvas de Arrhenius de la actividad NADH-citocromo c reductasa. Estos estudios se realizaron por los métodos de fusión y de solubilización-reconstitución.

En la figura 50 a) y b) se muestran respectivamente las curvas de Arrhenius de la actividad NADH-citocromo c reductasa y las curvas de intensidad de light scattering en función de la temperatura para microsomas fusionados con diferentes cantidades de liposomas de DMPC. Se puede observar que la curva de intensidad de light scattering ya fue levemente modifica

TABLA XVII

ENTRE LAS TEMPERATURAS DE LAS QUEBRADURAS DE LAS CURVAS DE ARRHENIUS DE LA ACTIVIDAD NADH-CITOCROMO C REDUCTASA Y DE LA TRANSICION ORDEN-DESORDEN DE LA MEMBRANA

MEMBRANA	TRANSICION DE FASE*		CURVA DE ARRHENIUS DE LA ACTIVIDAD NADH-CITOCROMO C REDUCTASA	
	T _i	T _s	QUEBRADURA INFERIOR	QUEBRADURA SUPERIOR
	(°C)	(°C)	(°C)	(°C)
FUSIONADA CON DMPC	17,5	29,5	10	22,5
SUBSTITUIDA CON DMPC	12,0	29,0	10	22,0
SOLUBILIZADA Y RECONS- TITUIDA CON DMPC	16,5	29,5	10	23,5
SOLUBILIZADA Y RECONS- TITUIDA CON DPPC	29,5	46,5	30,5	39,5
SOLUBILIZADA Y RECONS- TITUIDA CON DMPC-DPPC#	20,5	40,0	14,0	30,0

* Detectada por light scattering.

DMPC-DPPC en una relación 1:1 (p/p).

da, indicando la ocurrencia de separaciones de fase en los lípidos de las membranas modificadas, cuando el % de 14:0 solo alcanzó un 30%. A medida que aumentó la proporción de DMPC, la transición observada fue cada vez mas intensa, lo que indica que la proporción de lípidos que son involucrados en la transición orden-desorden es cada vez mayor. La temperatura a la que ocurrió la transición, sin embargo, solo se modificó levemente al ir aumentando la cantidad de DMPC incorporada.

Las curvas de Arrhenius de la NADH-citocromo c reductasa, no fueron afectadas por la fusión con liposomas de DMPC hasta que el porcentaje de 14:0 fue del 67%. La fusión con cantidades mayores de liposomas de DMPC, produjo curvas de Arrhenius con una quebradura a temperaturas no muy diferentes entre sí, de manera casi independiente de la cantidad de DMPC incorporada.

En la figura 51 a) se muestran los resultados de la incorporación de cantidades crecientes de DMPC por el método de solubilización-reconstitución. Al contrario de lo que ocurrió con el método de fusión, la curva de Arrhenius de la NADH-citocromo c reductasa ya mostró una quebradura a aproximadamente 15°C cuando la proporción de 14:0 alcanzó solo un 43%. Además, la temperatura a la que ocurrió la quebradura aumentó gradualmente al aumentar la proporción de DMPC incorporada, llegando a 23°C cuando el porcentaje de 14:0 fue del 79%. Las curvas de light scattering para estas membranas se muestran en la figura 51 b). Solo pudo detectarse la transición de fase completa cuando la proporción de 14:0 fue del 79%. Cuando la proporción de 14:0 fue del 61% o menor, solo se detecta el límite superior de la transición (T_s). Este límite T_s , sin embargo, aumentó gradualmente de 18°C para las membranas con un 43% de 14:0, hasta 31°C para aquellas membranas que contenían un 79% de 14:0.

También puede observarse en las figuras 50 a) y 51 a), que las pendientes de las curvas de Arrhenius observadas -

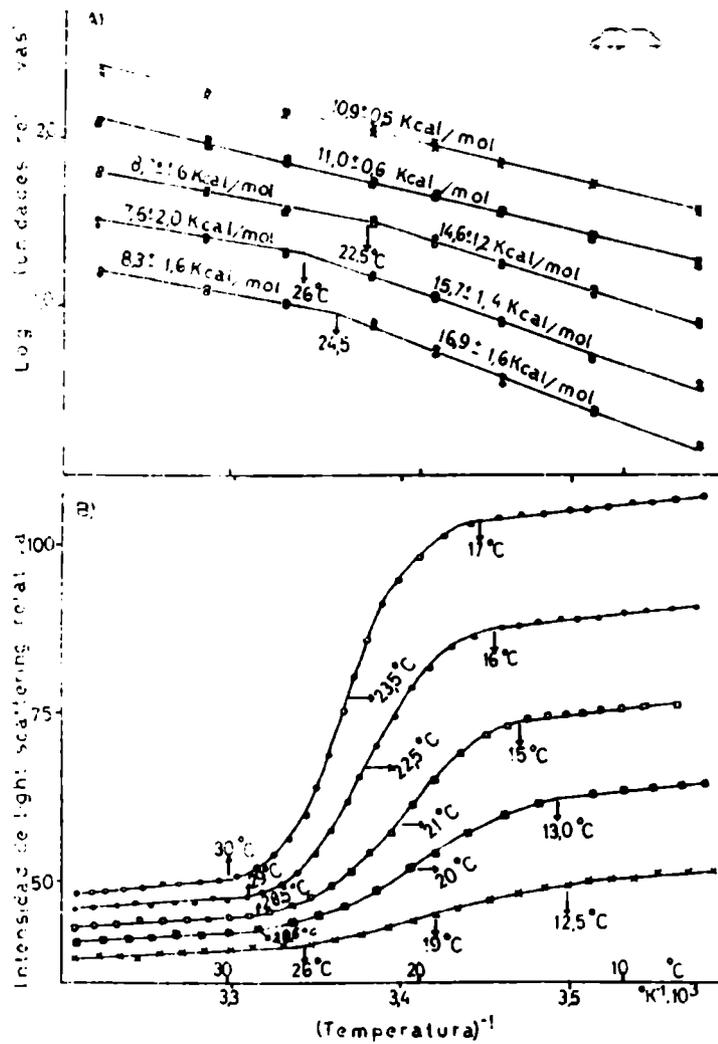


FIGURA 50: Efecto de la incorporación de cantidades crecientes de DMPC por fusión sobre la transición orden-desorden de la membrana y sobre las curvas de Arrhenius de la actividad NADH-citocromo c reductasa.

A) Curvas de Arrhenius. B) Curvas de light scattering.

(x—x) 30 % de 14:0; (■—■) 55 % de 14:0; (□—□) 67 % de 14:0; (●—●) 82 % de 14:0; y (o—o) 87 % de 14:0).

Se indican los intervalos de confianza del 95 % para las Ea.

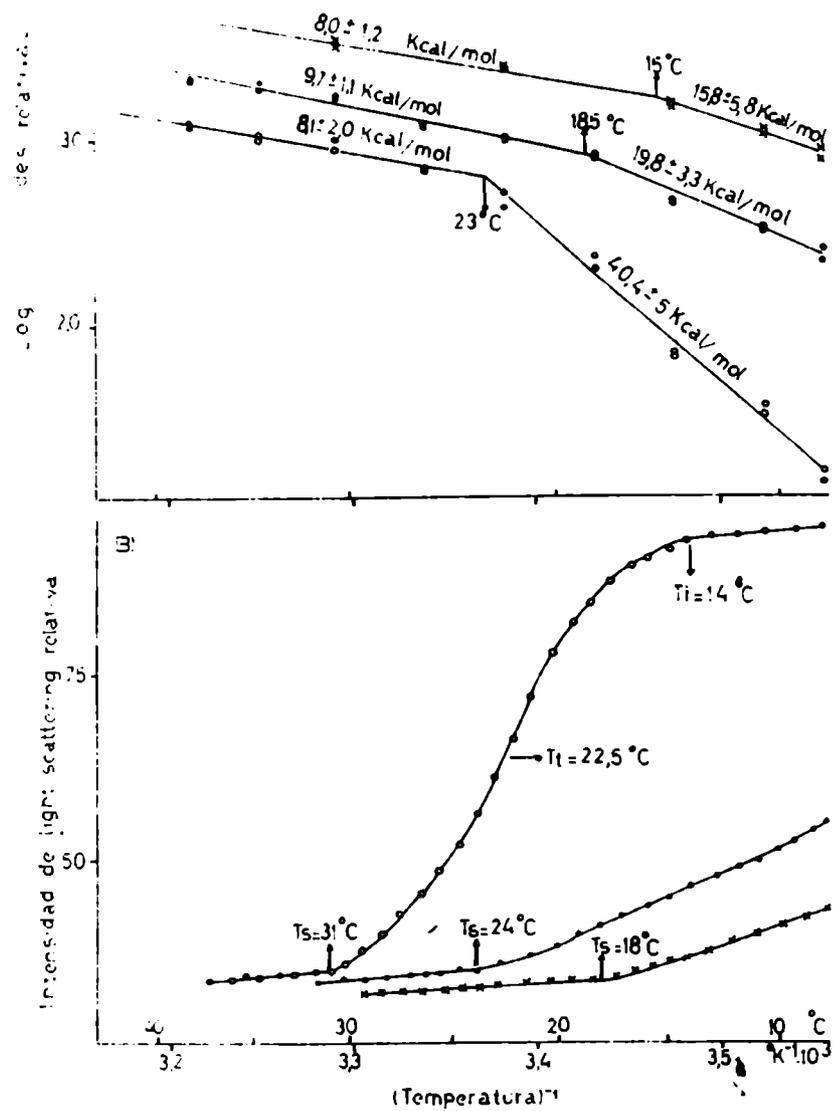


FIGURA 51: Efecto de la incorporación de cantidades crecientes de DMPC por solubilización-reconstitución, sobre la transición de fase de la membrana y sobre las curvas de Arrhenius de la actividad NADH-citocromo c reductasa.

A) Curvas de Arrhenius. B) Curvas de light scattering.

(x—x) 43 % de 14:0; (●—●) 61 % de 14:0; (o—o) 79 % de 14:0

Las E_a se indican con los límites de su intervalo de confianza del 95

por debajo de las quebraduras en las membranas obtenidas por solubilización-reconstitución, fueron cada vez mayores a medida que se incrementó la cantidad de DMPC incorporada. En las membranas obtenidas por fusión, las pendientes de las curvas de Arrhenius por debajo de las quebraduras fueron significativamente menores que en el caso de las membranas obtenidas por solubilización-reconstitución, y el incremento de esta pendiente con la cantidad de DMPC incorporada fue menos notable. Las E_a aparentes observadas por encima de la quebradura fueron aparentemente independientes del método utilizado y de la cantidad de DMPC incorporada.

Estos resultados podrían indicar que el método de solubilización-reconstitución produce una distribución mas homogénea de la DMPC incorporada entre los lípidos endógenos. Cuando se incorporan por el método de fusión cantidades no muy grandes de DMPC, esta no se mezclaría homogéneamente con los lípidos endógenos, quedando así areas formadas casi exclusivamente por DMPC, y zonas casi libres de DMPC. Las transiciones de fase detectadas por light scattering se producirían únicamente en las zonas ricas en DMPC, lo cual explicaría el hecho de que la temperatura a la que ocurre la transición de fase no se modifique mayormente al aumentar la proporción de DMPC incorporada. El pequeño incremento observado en T_t al aumentar la proporción de DMPC podría deberse a que la separación en zonas de DMPC pura y en zonas libres de DMPC no sería absoluta. La proporción de las areas ricas en DMPC, que sufren la transición, sería cada vez mayor a medida que se incrementa la cantidad de DMPC incorporada, lo que haría que la transición detectada por light scattering sea cada vez mas intensa como se observa en la figura 50 b).

Cuando los microsomas fueron solubilizados con detergentes, mezclados con DMPC, y posteriormente se eliminó el detergente para reconstituír las membranas, la DMPC se distribuyó aparentemente de una manera mas homogénea entre los lípidos

microsomales, haciendo que aún cuando se incorporan cantidades relativamente pequeñas de DMPC, la transición de fase sea sufrida por casi todos los lípidos de la membrana a una temperatura que depende de la proporción de DMPC incorporada.

La diferencia entre ambos métodos es bien notoria - cuando el porcentaje de 14:0 fue de alrededor del 50-60%. En la figura 50 b), se puede ver que las membranas obtenidas por fusión que contenían un 55% de 14:0 mostraron una transición de fase bien definida en la cual pudieron detectarse ambos límites T_s y T_i . En la figura 51 b) se observa por el contrario que membranas obtenidas por solubilización-reconstitución que contenían un 61% de 14:0, mostraron una transición mucho más ancha en la que solo pudo detectarse el límite superior T_s .

En las membranas obtenidas por fusión con cantidades relativamente bajas de DMPC, las proteínas citocromo b5 y citocromo b5 reductasa se particionarían preferiblemente en las áreas libres de DMPC, y así, la reacción NADH-citocromo c reductasa no "sentiría" la transición de fase que ocurriría en las áreas formadas casi exclusivamente por DMPC. La actividad medida sería la suma de la actividad en las zonas libres de DMPC y en las zonas ricas en DMPC. Al ir aumentando la proporción de las zonas ricas en DMPC, la proporción de las proteínas responsables de la reacción en esas zonas se incrementaría progresivamente, y así sería cada vez mayor la proporción de actividad que "siente" la transición de fase. Esto también explicaría la mayor pendiente observada por debajo de la temperatura de la quebradura en el caso de las membranas obtenidas por fusión - con respecto a las obtenidas por solubilización-reconstitución, ya que en el primer caso, la contribución de la actividad en las zonas libres de DMPC, que presentaría una curva de Arrhenius lineal, haría que la pendiente por debajo de la quebradura sea menos pronunciada.

Por el contrario, en las membranas obtenidas por solubilización-reconstitución, todos los lípidos (DMPC y lípidos

endógenos) se hallarían distribuidos mas homogeneamente en la membrana, y así la transición de fase es detectada por la reacción NADH-citocromo c reductasa aún cuando la proporción de - DMPC en la membrana es relativamente baja.

En las figuras 52 y 53 se muestran las curvas de - light scattering y las curvas de Arrhenius para las membranas solubilizadas y reconstituídas con cantidades crecientes de - DPPC y de una mezcla de DMPC-DPPC 1:1 (p/p), respectivamente. Similarmente a cuando se usó DMPC, se observa un gradual desplazamiento de las quebraduras en las curvas de Arrhenius y de la temperatura de transición de fase hacia mayores temperaturas a medida que aumenta la proporción de lecitina exógena incorporada. Según el criterio anterior, estos lípidos también - se distribuirían de una manera mas o menos homogénea entre los lípidos endógenos de la membrana.

El grupo de Strittmatter (251), mostró que la reacción NADH-citocromo c reductasa es limitada por la difusión lateral del citocromo b5 y la citocromo b5 reductasa, solo cuando estas proteínas se encuentran suficientemente diluídas en - la matriz lipídica. Cuando la concentración de estas proteínas en la fase lipídica es muy elevada, y están separadas por una distancia muy pequeña, la velocidad de la reacción se hace independiente de la difusión lateral, y por lo tanto de la transición de fase de los lípidos de la membrana. En estas experiencias, al incorporar cantidades crecientes de lípidos exógenos, se produce un aumento en la dilución de las proteínas en la fase lipídica, como se puede observar en las tablas XVIII y XIX, de la relación lípido-proteína.

Para descartar la posibilidad de que la aparición de las quebraduras en las curvas de Arrhenius de la NADH-citocromo c reductasa sea consecuencia de esa dilución, se incorporaron cantidades crecientes de lípidos microsomales por solubilización y reconstitución. En la figura 54 se puede observar que esto no tuvo ningún efecto sobre las curvas de Arrhenius de la

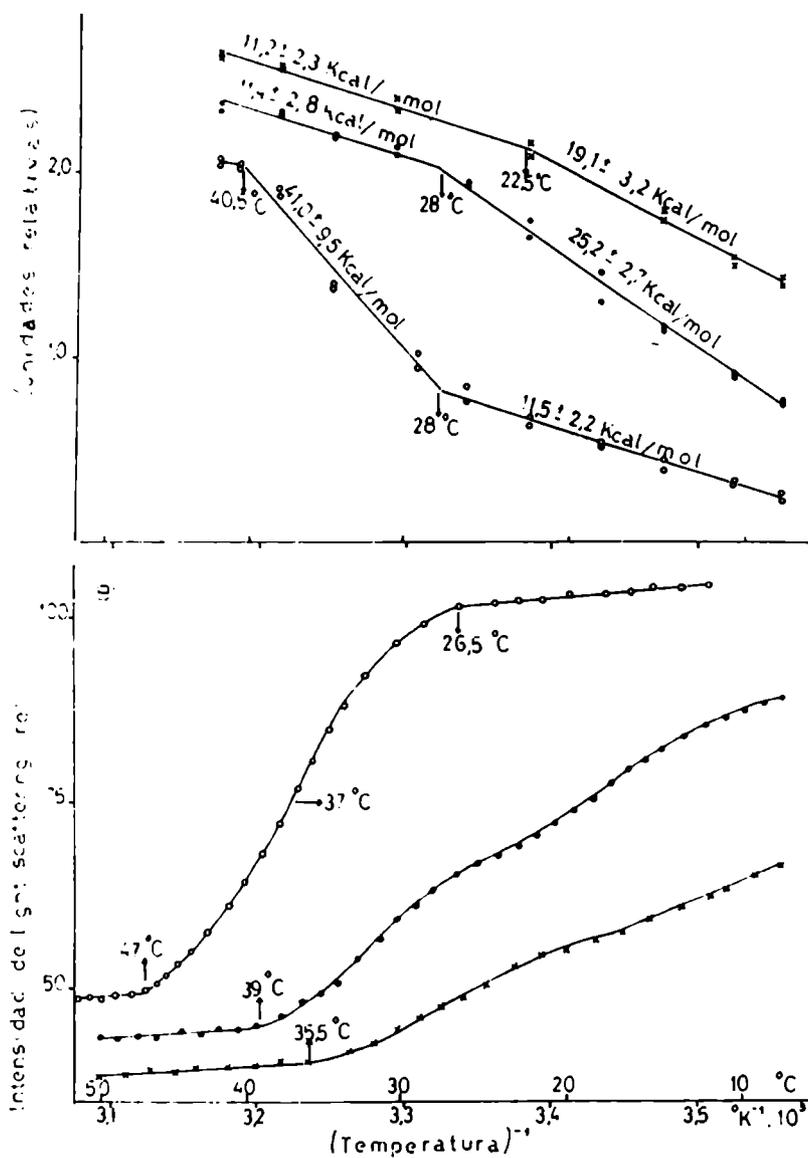


FIGURA 52: Efecto de la incorporación de cantidades crecientes de DPPC por solubilización-reconstitución sobre la transición de fase de la membrana y sobre las curvas de Arrhenius de la actividad NADH-citocromo c reductasa.

A) Curvas de Arrhenius. B) Curvas de light scattering.

(x—x) 46 % de 16:0 exógeno; (●—●) 70 % de 16:0 exógeno;

(o—o) 81 % de 16:0 exógeno.

Las Ea se indican con sus límites del intervalo de confianza del 95 %.

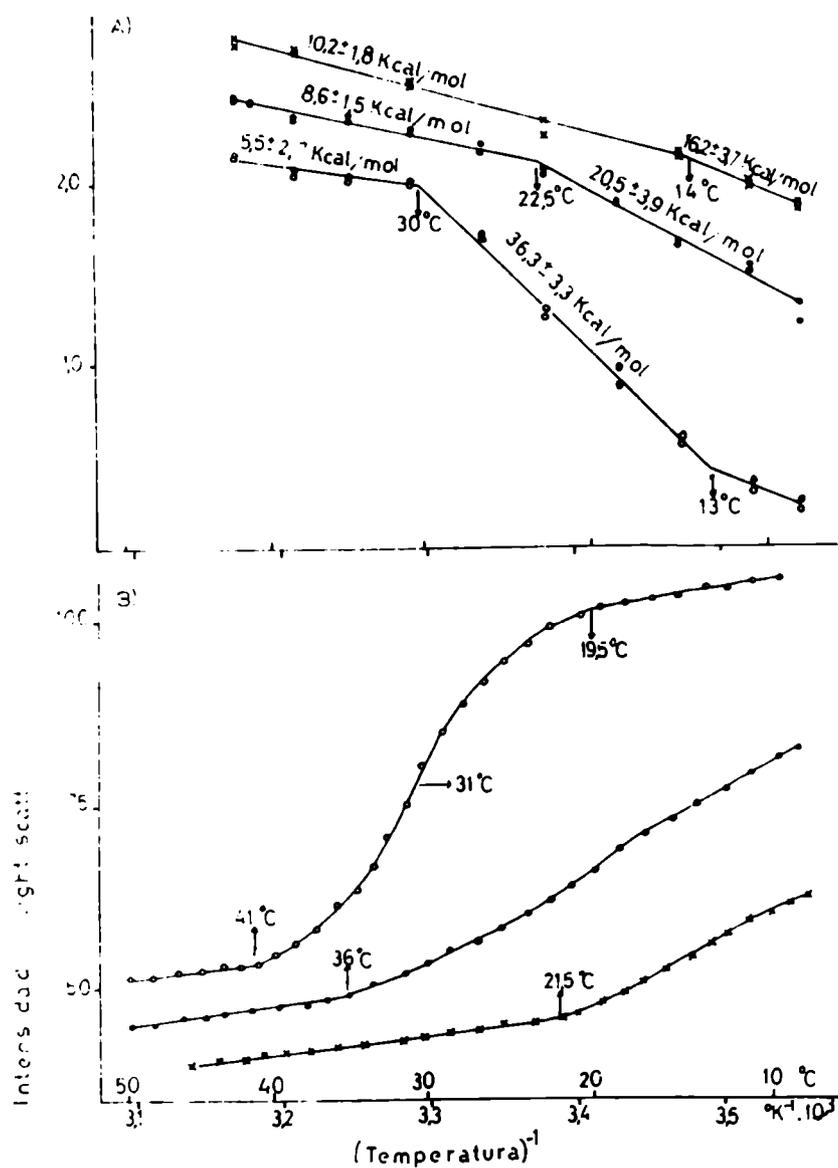


FIGURA 53: Efecto de la incorporación por solubilización-reconstitución de cantidades crecientes de una mezcla de DMPC-DPPC 1:1 (p/p) sobre la transición de fase de la membrana y sobre las curvas de Arrhenius de la actividad NADH-citocromo c reductasa.

A) Curvas de Arrhenius. B) Curvas de light scattering.

(x—x) 23 % de 14:0 y 15 % de 16:0 exógeno; (●—●) 33 % de 14:0 y 29 % de 16:0 exógeno; (o—o) 40 % de 14:0 y 43 % de 16:0 exógeno. Las Ea se indican junto con los límites del intervalo de confianza del 95 %.

TABLA XVIII

MODIFICACION DE LA RELACION DE LIPIDO A PROTEINA EN LAS MEMBRANAS FUSIONADAS CON DIFERENTES CANTIDADES DE LIPOSOMAS DE DMPC

TRATAMIENTO	LIPIDO EXOGENO INCUBADO	CONTENIDO DE 14:0 EXOGENO (%)	RELACION:		RELACION		RECUPERACION DE PROTEINAS (%)
			FOSFOLIPIDO PROTEINA ($\mu\text{mol}/\text{mg}$)	(%)	LIPIDO PROTEINA (mg/mg)	(%)	
NINGUNO			0,34		0,31	100,0	
FUSION CON DMPC	2,70	29,6	0,78		0,75	61,5	
FUSION CON DMPC	4,05	55,3	0,86		0,79	61,2	
FUSION CON DMPC	5,40	67,5	1,00		0,94	65,2	
FUSION CON DMPC	16,20	82,6	1,83		1,68	69,0	
FUSION CON DMPC	32,30	87,2	2,53		2,36	69,3	
CONTROL#			0,46		0,40	70,1	

* Expresado como mg de DMPC por mg de lípido microsomal endógeno.

Tratado como-para fusión pero sin agregar liposomas de DMPC.

TABLA XIX

MODIFICACION DE LA RELACION DE LIPIDO A PROTEINA EN LAS MEMBRANAS SOLUBILIZADAS Y RECONSTITUIDAS CON DIFERENTES CANTIDADES DE LIPIDOS EXOGENOS

TRATAMIENTO	LIPIDO EXOGENO INCUBADO	CONTENIDO DE 14:0 EXOGENO (%)	CONTENIDO DE 16:0 EXOGENO (%)	FOSFOLIPIDO PROTEINA ($\mu\text{mol/mg}$)	LIPIDO PROTEINA (mg/mg)	RECUPERACION DE PROTEINAS (%)
NINGUNO	----	----	----	0,37	0,36	100,0
LIPIDOS ENDOGENOS						
LIPIDOS MII-CROSOMALES	1,95			0,75	0,71	29,7
LIPIDOS MII-CROSOMALES	7,78			0,90	0,79	21,5
DMPC	1,95	43,3		0,83	0,77	18,1
DMPC	3,89	61,2		0,95	0,91	16,4
DMPC	7,78	79,3		1,04	0,96	11,3
DMPC-DPPC 1:1 (p/p)	1,95	23,4	15,0	0,95	0,86	22,6
DMPC-DPPC 1:1 (p/p)	3,89	33,5	29,1	1,09	0,93	16,7
DMPC-DPPC 1:1 (p/p)	7,78	40,3	43,7	7,03	6,52	17,0
DPPC	1,95		46,0	1,02	0,89	28,0
DPPC	3,89	----	70,2	4,16	4,02	22,6
DPPC	7,78	----	81,5	7,71	6,91	18,7

SOLUBILIZADOS Y RECONSTITUIDOS CON:

* Expresado como mg de lípido exógeno por mg de lípido endógeno.

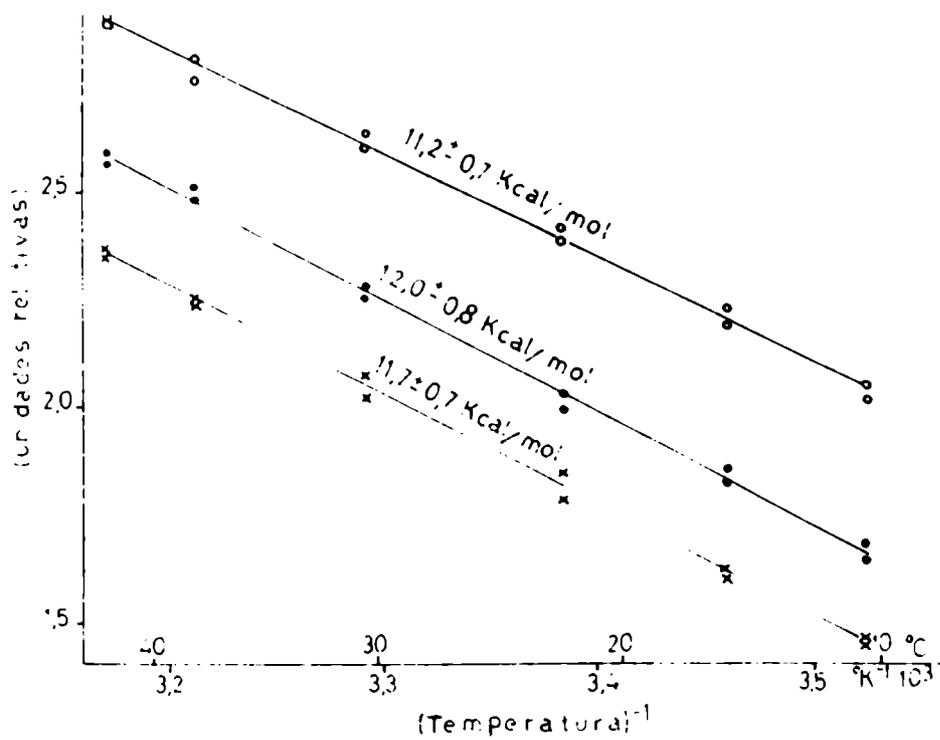


FIGURA 54: Efecto de la incorporación de cantidades crecientes de lípidos microsomales por solubilización-reconstitución sobre las curvas de Arrhenius de la actividad NADH-citocromo c reductasa.

(o—o) relación fosfolípido a proteína = $0.75 \mu\text{mol/mg}$.

(●—●) relación fosfolípido a proteína = $0.90 \mu\text{mol/mg}$.

(x—x) relación fosfolípido a proteína = $1.97 \mu\text{mol/mg}$.

Se indican los límites del intervalo de confianza del 95 % para las Ea.

///

NADH-citocromo c reductasa ni sobre las curvas de light scattering.

Debido a la importancia de las concentraciones de citocromo b₅ y de citocromo b₅ reductasa en la fase lipídica, estas proteínas fueron determinadas como se describió en el capítulo II en las membranas modificadas. No solo la concentración absoluta de estas proteínas en la matriz lipídica es importante para la reacción NADH-citocromo c reductasa, sino que también lo es la relación citocromo b₅/citocromo b₅ reductasa. La velocidad máxima alcanzable para la reacción NADH-citocromo c reductasa depende de la concentración de la flavoproteína (actividad NADH-ferricianuro reductasa), y la relación v/V_{max} es cada vez mayor y se va acercando a 1 a medida que aumenta la relación citocromo b₅/citocromo b₅ reductasa. Cuando esta relación es suficientemente grande, v/V_{max} se hace igual a 1 y la velocidad de la reacción es limitada por la actividad de la flavoproteína (NADH-ferricianuro reductasa), y se independiza de la difusión lateral de las proteínas en la membrana. Se ha demostrado por la incorporación de distintas cantidades de las proteínas purificadas en vesículas artificiales de dimiristoil fosfatidil colina (251), que la reacción NADH-citocromo c reductasa se hace independiente de la difusión lateral de las proteínas en el plano de la membrana cuando la relación citocromo b₅/citocromo b₅ reductasa alcanza un valor de alrededor de 45. Como la actividad de la NADH-ferricianuro reductasa no responde a la transición de fase de los lípidos de la membrana, a relaciones citocromo b₅/flavoproteína suficientemente altas, la reacción NADH-citocromo c reductasa se independiza del estado físico de la matriz lipídica.

Por esta razón, las relaciones citocromo b₅/citocromo b₅ reductasa fueron determinadas en las membranas modificadas. En la tabla XX se muestran los contenidos de citocromo b₅ y de citocromo b₅ reductasa para las membranas fusionadas con cantidades crecientes de DMPC. La recuperación de citocromo b₅

TABLA XX

CONCENTRACION DE CITOCROMO b5 Y CITOCROMO b5 REDUCTASA EN LA MATRIZ LIPIDICA DE MEMBRANAS MODIFICADAS POR FUSION CON DISTINTAS CANTIDADES DE LIPOSOMAS DE DMPC

TRATAMIENTO	LIPIDO EXOGENO INCUSADO	CIT. b5 RECUPERADO (%)	CIT. b5 REDUCTASA RECUPERADA (%)	CIT. b5 PROTEINA (nmol/mg)	REDUCTASA PROTEINA (nmol/mg)	CIT. b5 FOSFOLIPIDO (nmol/ μ mol)	REDUCTASA FOSFOLIPIDO (nmol/ μ mol)	CIT. b5 REDUCTASA (mol/mol)
NINGUNO		100,0	100,0	0,335	0,050	1,396	0,208	6,7
FUSION CON DMPC	2,70	93,8	43,3	0,511	0,035	0,655	0,045	14,5
FUSION CON DMPC	4,05	92,7	45,3	0,507	0,037	0,590	0,043	13,7
FUSION CON DMPC	5,40	90,4	46,1	0,464	0,035	0,464	0,035	12,9
FUSION CON DMPC	16,20	63,6	36,4	0,309	0,026	0,169	0,014	11,9
FUSION CON DMPC	32,30	57,7	39,7	0,279	0,029	0,110	0,011	9,5
CONTROL#	-----	97,2	53,1	0,464	0,038	1,010	0,082	12,3

* Expresado como mg de DMPC por mg de lípido microsomal endógeno.

Tratado de la misma manera pero sin agregar liposomas de DMPC.

es bastante alta, especialmente cuando se incorporan bajas cantidades de DMPC, y disminuye a medida que aumenta la proporción de DMPC incorporada. La recuperación de citocromo b5 reductasa es menor que la de citocromo b5, y es relativamente independiente de la cantidad de DMPC incorporada. Esto hace que la relación citocromo b5/flavoproteína aumente a aproximadamente el doble del valor de los microsomas originales cuando se incorporan bajas cantidades de DMPC, y luego disminuya progresivamente al aumentar la proporción de DMPC incorporada. Las concentraciones de citocromo b5 y de flavoproteína, expresadas como nmoles/ μ mol de fosfolípido disminuyen progresivamente al aumentar la proporción de DMPC incorporada.

En la tabla XXI se muestran los contenidos de citocromo b5 y de citocromo b5 reductasa en las membranas obtenidas por solubilización y reconstitución con diferentes cantidades de DMPC, DPPC o de una mezcla de ambas lecitinas exógenas. La cantidad de citocromo b5 recuperado luego de este tratamiento disminuye sensiblemente al aumentar la proporción de lípido exógeno. La recuperación de citocromo b5 reductasa fue muy variable y no pareció seguir una variación uniforme al incrementar la proporción de lípido exógeno. Al contrario de lo que ocurrió por el método de fusión, la relación citocromo/flavoproteína no varió significativamente con respecto a los microsomas originales cuando se reconstituyó con bajas cantidades de lípido exógeno y disminuyó notablemente al reconstituír con grandes cantidades de lípido exógeno. Las concentraciones de citocromo b5 y de flavoproteína expresadas como nmoles/ μ mol de fosfolípido, al igual que en el método de fusión, disminuyen notoriamente al aumentar la cantidad de lípido exógeno incorporado.

En todas las membranas obtenidas por cualquiera de los dos métodos, las concentraciones de citocromo b5 y de citocromo b5 reductasa son marcadamente inferiores a las requeridas para producir un sistema estrechamente empaquetado y hacer

TABLA XXI

CONCENTRACION DE CITOCROMO b5 EN LA MATRIZ LIPIDICA DE MEMBRANAS MODIFICADAS POR SOLUBILIZACION Y RECONSTITUICION CON DIFERENTES CANTIDADES DE LIPIDOS EXOGENOS

TRATAMIENTO	LIPIDO EXOGENO INCUBADO	CIT. b5 RECUPERADO (%)	CIT. b5 REDUCTASA RECUPERADA (%)	CIT. b5 PROTEINA	REDUCTASA PROTEINA	CIT. b5 FOSFOLIPIDO	REDUCTASA FOSFOLIPIDO	CIT. b5 REDUCTASA	CIT. b5 REDUCTASA
NINGUNO	----	100,0	100,0	0,38	0,058	1,04	0,157	0,157	6,6
LIPIDOS ENDOGENOS		70,1	57,9	0,91	0,113	1,21	0,151	0,151	8,0
LIPIDOS MI-CROSOMALES	1,95	14,1	17,8	0,25	0,048	0,28	0,053	0,053	5,3
LIPIDOS MI-CROSOMALES	7,78	7,1	19,2	0,14	0,057	0,07	0,029	0,029	2,4
DMPC	1,95	43,5	37,8	0,92	0,121	1,11	0,146	0,146	7,6
DMPC	3,89	30,6	33,0	0,72	0,117	0,76	0,123	0,123	6,1
DMPC	7,78	6,4	9,2	0,22	0,047	0,21	0,045	0,045	4,6
DMPC-DPPC 1:1(P/P)	1,95	55,2	44,9	0,94	0,115	0,99	0,121	0,121	8,2
DMPC-DPPC 1:1(P/P)	3,89	28,8	23,3	0,66	0,081	0,61	0,074	0,074	8,2
DMPC-DPPC 1:1(P/P)	7,78	18,8	70,9	0,42	0,241	0,06	0,034	0,034	1,8
DPPC	1,95	55,3	57,9	0,76	0,120	0,74	0,118	0,118	6,3
DPPC	3,89	36,2	92,5	0,62	0,238	0,15	0,057	0,057	2,6
DPPC	7,78	17,4	78,8	0,36	0,244	0,05	0,032	0,032	1,5

SOLUBILIZADOS Y RECONSTITUIDOS CON:

* Expresado como mg de lipido exogeno por mg de lipido endogeno

que la distancia entre las proteínas sea muy pequeña como para que la velocidad de la reacción sea independiente del desplazamiento lateral de los componentes en el plano de la membrana - (251).

En las membranas obtenidas por fusión con liposomas de DMPC, la relación citocromo b₅/flavoproteína fue mayor que en las membranas obtenidas por solubilización-reconstitución, y fue disminuyendo al aumentar la proporción de DMPC incorporada. La alta relación citocromo/flavoproteína en las membranas obtenidas por fusión con bajas cantidades de DMPC, podría contribuir en algo a que la reacción NADH-citocromo c reductasa no "sienta" la transición de fase. Sin embargo, esta no puede ser la causa fundamental, ya que en todos los casos la relación citocromo b₅/flavoproteína fue bastante inferior a 45. Además, la actividad NADH-ferricianuro reductasa fue siempre muy superior a la actividad NADH-citocromo c reductasa, por lo que nunca la actividad NADH-citocromo c reductasa pudo haber sido limitada por la actividad de la flavoproteína. Por otro lado, en las membranas que poseen un 67% de 14:0, la NADH-citocromo c reductasa respondió a la transición de fase y la relación citocromo/flavoproteína fue de 12,9. Mientras que en las membranas con un 55% de 14:0, la relación de citocromo/flavoproteína fue solo levemente mayor (13,7), y la NADH-citocromo c reductasa ya no respondió a la transición de fase de los lípidos.

Es difícil que este pequeño incremento en la relación citocromo/flavoproteína sea el único responsable de la desaparición de la respuesta a la transición de fase por parte de esta reacción. Así, la explicación mas simple para este comportamiento sería la distribución no homogénea de la DMPC incorporada por fusión, como lo muestran las curvas de light scattering; y la partición preferencial de las proteínas citocromo b₅ y citocromo b₅ reductasa en las áreas prácticamente libres de DMPC, como se discutió anteriormente.

III.3.6.- Discusión.

a) Incorporación de lecitinas exógenas en la membrana microsomal.

Como ya vimos anteriormente, la composición de ácidos grasos de los lípidos de los microsomas de ~~hígado~~ hígado de rata es rica en ácidos grasos polietilénicos. Esto hace que la membrana sea muy fluída a temperatura fisiológica y no sufra la transición al estado ordenado aún bajando la temperatura hasta 10°C. A pesar de esta alta fluidez, algunos sistemas enzimáticos de los microsomas de hígado de rata como el de la NADPH-citocromo P450 oxigenasa se encuentran aparentemente rodeados de un "anulus" lipídico de menos fluidez. Este sistema enzimático presenta quebraduras en sus curvas de Arrhenius a aproximadamente -36°C (321) que se atribuyeron a una transición de fase de los lípidos que forman dicho "anulus". Así, en este sistema, los cambios en composición y en la fluidez del "anulus" lipídico podrían ser mas importantes que los cambios de las propiedades del resto de los lípidos de la membrana. Sin embargo ha sido demostrado que los cambios en las propiedades de los lípidos que no forman el "anulus" pueden ejercer una influencia importante en el estado físico de los lípidos del "anulus" y sobre las proteínas (138).

Los sistemas enzimáticos estudiados aquí, parecen diferir del sistema del citocromo P450, ya que no presentan quebraduras en sus curvas de Arrhenius entre 10 y 40°C, y así no parecen estar rodeados de un "anulus" de lípidos rígidos.

Para investigar la influencia de las transiciones orden-desorden de los lípidos de la membrana sobre la actividad de estos sistemas enzimáticos, la composición lipídica de la membrana microsomal fue modificada mediante la incorporación de lecitina exógena.

Por medio de los tres métodos utilizados se lograron membranas con altos contenidos de lecitina exógena, que presentaron transición de fase en el rango de temperatura medible.

Sin embargo, hubo diferencias importantes entre los distintos métodos, en el grado de ruptura de las vesículas microsomales y en la distribución de los lípidos incorporados entre los lípidos endógenos de la membrana. Los métodos que utilizan detergentes alteran completamente la integridad de las vesículas microsomales, haciéndolas completamente permeables a la M-6-P. El método de fusión también incrementó la permeabilidad a la M-6-P aunque en menor proporción, y así pareció conservar algo más la integridad de las vesículas microsomales. Si bien la integridad de la barrera de permeabilidad de las vesículas no tiene importancia en procesos laterales como el transporte de electrones, es de importancia fundamental en el caso de un sistema de transporte vertical como el de la G-6-P.

Por otro lado, por el método de fusión, al menos cuando se incorporaron pequeñas cantidades de lípido exógeno, parece no obtenerse una distribución homogénea entre los lípidos endógenos, del lípido exógeno incorporado. En cambio, por el método de solubilización-reconstitución, el lípido exógeno incorporado pareció distribuirse entre los lípidos endógenos, de una manera más homogénea.

b) Efecto de la transición orden-desorden de los lípidos de la membrana sobre la actividad del sistema de la glucosa-6-fosfatasa.

Como vimos antes, en microsomas de hígado de rata el sistema de la G-6-Pasa no muestra quebraduras en sus curvas de Arrhenius entre 10 y 40°C. Sin embargo ha sido reportado (331) que la curva de Arrhenius de la glucosa-6-fosfatasa de microsomas de hígado de cobayo presenta una quebradura a 19°C, que probablemente se debe a una alteración termotrópica de la estructura de la fase lipídica detectada por medio de marcadores de ESR. La influencia de la fluidez de la fase lipídica sobre las curvas de Arrhenius de la G-6-Pasa también ha sido reportado en membranas del retículo endoplásmico de *Tetrahymena pyriformis* (235). Mas aún, las quebraduras en las curvas de Arrhenius de la actividad G-6-Pasa han sido utilizadas para detectar transi-

ciones de fase (455). Es importante señalar además, que el transporte de otros carbohidratos como por ejemplo β -galactósidos y β -glucósidos a través de membranas de *E. coli* modificadas por la administración de distintos ácidos grasos en la dieta, muestran curvas de Arrhenius con quebraduras que se corresponden con transiciones de fase de los lípidos de la membrana (230, 461).

Cuando la membrana microsomal fue modificada por substitución con DMPC, se encontró una disminución en la E_a aparente y un incremento en la actividad, pero esto fue independiente de la incorporación del fosfolípido, y fue debido al tratamiento mismo, el cual utilizó desoxicolato de sodio. Se ha mostrado que esta enzima es activada por detergentes y otros agentes que alteran la integridad y la permeabilidad de la membrana (403, 393, 398). La etapa limitante de esta reacción es la etapa del transporte de la G-6-P del lado citoplasmático al lumen de las vesículas microsomales. Así, una desintegración de la barrera de permeabilidad permitiría el libre acceso del sustrato al sitio hidrolítico y la velocidad de la reacción incrementaría marcadamente. La microscopía electrónica y la ausencia de latencia de la actividad M-6-Pasa confirman la ruptura de la integridad de la barrera de permeabilidad de las vesículas microsomales. Además, se ha mostrado que el desoxicolato de sodio en una concentración de 0,05% ya es suficiente para eliminar la barrera de permeabilidad (318).

Por lo tanto, en este caso estaríamos midiendo directamente la actividad hidrolítica y no la etapa de transporte a través de la membrana. Esto explicaría el decrecimiento en la E_a aparente de la reacción G-6-Pasa observado en los microsomas tratados por el método de substitución. Consecuentemente, la actividad del componente hidrolítico no dependería del estado físico de la membrana ya que las curvas de Arrhenius fueron lineales con una E_a aparente que se mantuvo constante a través del rango de temperatura en el que ocurrió la transición orden

-desorden de la fase lipídica. Así, esta actividad presenta la misma efectividad cuando los lípidos se encuentran en el estado cristalino que cuando se hallan en el estado fluído. La reacción se produciría sobre la superficie de la membrana, utilizando sustratos solubles en agua, y no requiere de la existencia de una bicapa fluída para su pleno funcionamiento.

En los microsomas fusionados con liposomas de DMPC o en sus controles, no ocurrió un cambio significativo en la E_a aparente de la reacción, pero sin embargo, la microscopía electrónica y las medidas de latencia de la actividad M-6-Pasa indicaron que ocurrió una sustancial ruptura de la integridad de las vesículas microsomales. En este caso se tendría una mezcla de vesículas con la barrera de permeabilidad intacta, y de vesículas cuya barrera de permeabilidad ha sido alterada y permiten el libre acceso del sustrato a la enzima hidrolítica. La actividad medida sería la suma de la actividad de transporte en las vesículas cuya barrera de permeabilidad permanece intacta, y de la actividad hidrolítica de aquellas vesículas completamente permeables. La leve quebradura observada en algunos experimentos a alrededor de 30°C podría deberse a un efecto de la transición de fase de los lípidos sobre la actividad de transporte. Sin embargo sería necesario confirmar esto por medio de algún método que deje intacta la integridad de la barrera de permeabilidad de las vesículas microsomales.

c) Efecto de la transición de fase de los lípidos de la membrana sobre el sistema de transporte de electrones dependiente del citocromo b₅.

Nuestros experimentos mostraron que la actividad de la flavoproteína citocromo b₅ reductasa medida por la velocidad de reducción del ferricianuro, no fue afectada por la transición de fase de los lípidos de las membranas modificadas; ya que las curvas de Arrhenius fueron lineales y con la misma energía de activación aparente tanto por encima como por debajo de la temperatura en que se produjo el cambio de fase. Así, la

reacción fue tan efectiva con la fase lipídica de la membrana en el estado desordenado, como cuando los lípidos se hallaron en el estado cristalino. Esto confirma los resultados de Strittmatter y Rogers (251) de que esta actividad fue independiente de la transición de fase cuando la proteína purificada fue incorporada en liposomas de DMPC.

La flavoproteína citocromo b₅ reductasa expone su sitio catalítico hacia la fase acuosa, y ambos sustratos, NADH y ferricianuro, son solubles en agua; por lo que ningún movimiento traslacional de la enzima ni de los sustratos en la membrana son necesarios para la reacción. Así, la bicapa lipídica solamente tendría la función de unir a la enzima, y los cambios estructurales en la fase lipídica no alterarían al sitio catalítico de la reductasa.

Por el contrario, la reacción NADH-citocromo c reductasa respondió a la transición de fase de las membranas modificadas con quebraduras en sus curvas de Arrhenius. Una disminución en la efectividad de la reacción fue observada por debajo de la temperatura en la que ocurrió el cambio de fase de los lípidos de la membrana. Ya que la etapa determinante de la velocidad de esta reacción es la transferencia de electrones entre dos proteínas anfipáticas, la citocromo b₅ reductasa y el citocromo b₅, ambas flotando en la bicapa lipídica, la velocidad de la reacción dependerá de la frecuencia de choques entre ambas proteínas y así, de su concentración y movilidad traslacional de acuerdo con el modelo propuesto por el grupo de Strittmatter (251). Ha sido bien demostrado que la velocidad de difusión lateral de las proteínas en bicapas lipídicas disminuye al aumentar la viscosidad de la fase lipídica (176). Así, la transición de fase a un estado cristalino de los lípidos de la membrana provocaría un decrecimiento en la velocidad de difusión lateral, y esto reduciría la frecuencia de choques entre la flavoproteína y el citocromo y por lo tanto la velocidad de la reacción NADH-citocromo c reductasa.

En las membranas que fueron modificadas por la incorporación de DMPC o por la incorporación en bajas cantidades de DPPC o de una mezcla de DMPC-DPPC se observaron curvas de Arrhenius bifásicas con un cambio en la energía de activación aparente a aproximadamente la temperatura en la que ocurrió el cambio de estado de los lípidos de la membrana. Este tipo de curvas en las que se produce un cambio en la energía de activación sin que cambie la velocidad de la reacción en ese punto, podría ser explicada por un cambio en el mecanismo de la reacción o en la etapa determinante de la misma como consecuencia del cambio de estado de los lípidos (252); o también podría explicarse por la teoría de Wynn-Williams (253) donde el estado activado requiere de la unión de una o más moléculas de lípido (ver capítulo I). Esto es difícil de conciliar con el modelo de Strittmatter de que la reacción es limitada por la difusión lateral de las proteínas en la membrana, ya que si así fuera, la influencia de la temperatura sobre la fluidez de la membrana y sobre la velocidad de la reacción deberían ser similares.

Sin embargo, cuando la reacción NADH-citocromo c reductasa se midió en membranas con altos contenidos de DPPC o de DMPC-DPPC 1:1 (p/p), respondió a la transición de fase de los lípidos con una curva de Arrhenius trifásica. Estas curvas trifásicas presentan una pendiente pronunciada en el rango de la transición de fase, y una pendiente menor por encima y por debajo de la transición de fase. Así, estas curvas se correlacionan mejor con los cambios en la fluidez de la fase lipídica que ocurren a través de la transición orden-desorden, y esto podría ser bien explicado por el efecto del cambio de fase sobre la velocidad de difusión lateral de la flavoproteína y del citocromo en la membrana. En base a esto, la explicación más simple para las curvas bifásicas observadas en membranas con DMPC o con bajas proporciones de DPPC o de DMPC-DPPC, es que serían en realidad curvas trifásicas, y que la quebradura inferior debe ocurrir a una temperatura demasiado baja para poder ser detectada.

Si bien la NADH-citocromo c reductasa responde a la transición de fase orden-desorden de los lípidos, pudo ser observado que esta reacción "siente" la transición a menores temperaturas que las detectadas por light scattering o por la fluorescencia de la N-fenil-1-naftilamina. Estas diferencias entre la temperatura de la transición de los lípidos de la membrana y la temperatura a la que ocurren las quebraduras en las curvas de Arrhenius de enzimas de membrana han sido explicadas por la existencia de un "anulus" lipídico rodeando a la enzima, que sufriría la transición de fase a una temperatura diferente del resto de los lípidos de la membrana (257, 144). Si esto es lo que ocurre en el sistema de la NADH-citocromo c reductasa, el "anulus" lipídico debería tener características mas fluidas que el resto de la membrana y sufrir la transición de fase a menor temperatura. Si bien se ha mostrado que el citocromo b5 provoca una disminución en la movilidad de las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos circundantes (116, 462), lo cual tendría el efecto inverso al observado en nuestras experiencias, estas mediciones han sido realizadas por encima de la Tt de la bicapa lipídica, y se ha mostrado que las proteínas pueden tener un efecto condensante por encima de Tt, pero tendrían un efecto fluidificante cuando la bicapa lipídica se encuentra en el estado ordenado (138). El efecto de las proteínas sobre la Tt de las bicapas lipídicas no es fácilmente predecible y dependería de las particulares interacciones lípido-proteína. Además, en la reacción NADH-citocromo c reductasa interviene la flavoproteína citocromo b5 reductasa, además del citocromo b5, y no hay datos sobre el efecto de esta proteína sobre los lípidos que la circundan.

Cuando se fusionaron microsomas con cantidades crecientes de liposomas de DMPC, observamos que la reacción NADH-citocromo c reductasa solo respondió a la transición de fase de los lípidos cuando la DMPC se incorporó en proporciones superiores al 67%. Pero cuando la DMPC se incorporó por solubili

de la reconstitución aún en bajas proporciones, la reacción "sentiría" la transición de la fase lipídica. Esto podría ser explicado por la presencia de un "anulus" de lípidos que interactúan con las proteínas responsables de la reacción, de una manera más fuerte que el resto de los lípidos de la membrana. Cuando se incorpora DMPC por fusión en bajas proporciones, el lípido exógeno no accedería a dicho "anulus", y la reacción no sentiría la transición de fase del resto de los lípidos. Solo cuando la DMPC se incorpora por fusión en una proporción suficientemente alta, la composición del "anulus" sería modificada y consecuentemente se modificaría el comportamiento de la reacción. Cuando los microsomas son solubilizados con detergente, el "anulus" lipídico sería destruido, y al reconstituírse las membranas, aún con bajas proporciones de lípido exógeno, este accedería al medio circundante de las proteínas, y la reacción "sentiría" los cambios en las propiedades de la fase lipídica producidos al variar la temperatura.

Sin embargo, se ha propuesto que el estado de los lípidos del "anulus" tendría que ser afectado por los cambios de estado del resto de los lípidos de la membrana (138). Se ha demostrado por ejemplo que la $\text{Ca}^{++} \text{Mg}^{++}$ ATPasa de retículo sarcoplásmico, cuando es insertada en bicapas de DPPC, responde a la transición de los lípidos del "anulus", y también a la transición del resto de los lípidos de la bicapa (250).

Además, se ha demostrado que las proteínas solo serían capaces de afectar las propiedades de unas pocas capas de lípidos circundantes (138). Así, si en las membranas obtenidas por fusión con bajas proporciones de lípido exógeno, se admite la presencia de un "anulus" que represente solo una pequeña proporción de los lípidos totales de la membrana; la composición y propiedades de los lípidos que están fuera del "anulus", no debería diferir mucho de la composición y propiedades de los lípidos de las membranas obtenidas por solubilización y

reconstitución. Sin embargo, las curvas de light scattering fueron muy diferentes en las membranas con bajas proporciones de lípido exógeno obtenidas por uno u otro método, indicando que el supuesto "anulus" representa una proporción de lípidos bastante grande. Así, esto puede ser interpretado como una distribución no homogénea del lípido exógeno incorporado por fusión, y una preferencial partición de las proteínas responsables de la reacción en las zonas prácticamente libres de DMPC, como fue explicado en la sección III.3.6.2. Esas zonas prácticamente libres de DMPC estarían formadas casi exclusivamente por lípidos microsomales endógenos, y serían el supuesto "anulus" que representa una proporción importante de los lípidos totales.

Por otro lado, aunque ha sido propuesto que la flavoproteína el citocromo b5 forman un complejo organizado en la membrana del retículo endoplásmico (361), se ha postulado y presentado evidencias (363) de una distribución al azar de ambas proteínas en la bicapa de la membrana microsomal. Así, si la distribución de ambas proteínas es al azar, las proteínas deberían sufrir difusión lateral, con o sin su "anulus" lipídico, a través del resto de los lípidos de la membrana, para que se produzcan los choques y la transferencia de electrones. Por lo tanto, la reacción debería depender del estado físico de los lípidos fuera del "anulus", y debería reflejar su transición de fase mas bien que la transición de los lípidos del "anulus".

Una interesante teoría ha sido desarrollada para explicar el comportamiento del sistema de transporte de β -glicósidos en membranas de *Escherichia coli* (148) (ver capítulo I). La transición de fase del estado cristalino al estado líquido-cristalino ocurre por la formación de dominios o áreas de lípidos fluídos dentro de la matriz lipídica cristalina. Estos dominios fluídos van creciendo de tamaño al aumentar la temperatura a expensas de los dominios ordenados, hasta que por en-

cima del límite superior de la transición (T_s), la totalidad de los lípidos estaría en el estado desordenado. Las curvas de Arrhenius trifásicas del tipo de las observadas para la NADH-citocromo c reductasa podrían ser explicadas en base a una menor actividad de la enzima cuando se encuentra en los dominios ordenados que cuando esta en los dominios fluídos. Además, las quebraduras en las curvas de Arrhenius podrían ocurrir a mayor o menor temperatura que los límites de la transición de fase de los lípidos, si la enzima se particiona preferiblemente en los dominios ordenados o en los desordenados respectivamente.

Para procesos como el de la NADH-citocromo c reductasa, cuya etapa determinante depende de la interacción de dos proteínas controlada por difusión, si estas proteínas se particionan preferiblemente en los dominios fluídos, se produciría una acumulación de ellas en estos dominios, con una consecuente disminución de la distancia promedio entre ellas. Este aumento en la concentración efectiva de estas proteínas incrementaría la velocidad de interacciones y contrarrestaría el decrecimiento en velocidad debido a la disminución de la temperatura. Al mismo tiempo, esto podría explicar que se observe por encima de la quebradura superior, una menor E_a aparente que en las membranas que no sufren transición de fase.

De esta manera los resultados aquí obtenidos pueden ser explicados teniendo en cuenta que la velocidad de la reacción sería limitada por la difusión lateral de las proteínas en el plano de la membrana y una preferencial partición del citocromo b5 o de la citocromo b5 reductasa, o ambas en los dominios lipídicos fluídos con respecto a los dominios ordenados.

III.4.- EFFECTO DE ALCOHOLES ALIFATICOS DE BAJO PESO MOLECULAR SOBRE LA FLUIDEZ DE LA MEMBRANA MICROSOMAL Y ACTIVIDAD DE ENZIMAS ASOCIADAS A DICHA MEMBRANA.

Los alcoholes alifáticos, cuando son incorporados en membranas artificiales de fosfolípidos, son capaces de afectar ciertas de sus características como ser la Tt, y ciertos parámetros de movilidad determinados por ESR y NMR, como por ejemplo S, ho/h-1, etc. (67, 68). En general, los alcoholes alifáticos saturados de cadena larga, y alcoholes trans-insaturados incrementan el grado de ordenamiento de las cadenas hidrocarbonadas de la bicapa lipídica (67). Por el contrario, los alcoholes de cadena corta (menos de 8 átomos de carbono), y los de cadena cis-insaturada han mostrado incrementar la fluidez y la movilidad de las cadenas hidrocarbonadas (67, 68). Los alcoholes alifáticos se ubicarían en la membrana con su cadena alifática paralela a las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos, alineando su grupo -OH con los grupos polares en la superficie hidrofílica de la bicapa. Las cadenas alifáticas cortas de los alcoholes de bajo peso molecular, dejarían espacios vacíos en el interior hidrofóbico de la misma, lo cual incrementaría la movilidad de las cadenas de los fosfolípidos (68).

En estas experiencias se estudió el efecto de dos alcoholes alifáticos de cadena corta: el n-butanol, y el alcohol isoamílico ($\text{HO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$); sobre la fluidez de la membrana microsomal (determinada del grado de depolarización de la fluorescencia del DPH); y sobre la actividad del sistema de saturante de ácidos grasos con su cadena transportadora de electrones, y del sistema de la G-6-Pasa.

III.4.1.- Efecto del n-butanol y del isoamilol sobre el grado de depolarización de la fluorescencia emitida por el DPH incorporado en la membrana microsomal.

Cuando a una suspensión de microsomas marcados previamente con DPH como se indicó en el capítulo II (50 μg de proteína/ml; y 0,25 μM de DPH), se le agregó alcohol isoamili-

co (40 mM), la polarización de fluorescencia se siguió en función del tiempo, a 20°C, se pudo observar que esta disminuyó rápidamente durante los primeros dos minutos, y a partir de los dos minutos se mantuvo constante, como se puede observar en la figura 55, en la cual los valores de polarización fueron convertidos en microviscosidad aparente.

Por otro lado, el experimento mostrado en el cuadro XXII, mostró que cuando a los microsomas se les agregó 60 mM de alcohol isoamílico, y se dejaron durante 5 minutos a temperatura ambiente, la microviscosidad aparente fue disminuída de 2,19 a 0,77 Poise. Sin embargo, cuando los microsomas tratados de esta manera fueron recentrifugados a 100.000 xg durante una hora con el objeto de eliminar el alcohol no incorporado, y se resuspendieron en un medio libre de alcohol, la polarización de fluorescencia volvió a alcanzar el valor de los microsomas no tratados.

Estos resultados indicarían que el alcohol isoamílico se incorpora espontáneamente en la membrana microsomal incrementando su fluidez. La incorporación se produciría por un proceso de partición entre la fase acuosa y la fase lipídica, ya que si se elimina el alcohol del medio acuoso, este vuelve a salir de la membrana. El equilibrio de la partición entre la bicapa lipídica y la fase acuosa se alcanzaría rápidamente, a alrededor de los dos minutos. Sin embargo, para poder confirmar esto fueron necesarios otros tipos de controles.

El DPH, como la gran mayoría de los fluoróforos aromáticos, no presenta prácticamente fluorescencia cuando se halla en un medio de alta polaridad como el agua. Así, cuando se lo agrega a una suspensión lipídica como en este caso a los microsomas, la fluorescencia que se detecta proviene prácticamente toda del DPH que se halla en la fase lipídica, siendo completamente despreciable la que proviene del DPH no incorporado a la membrana. Esta propiedad es la que hace adecuados a estos marcadores para estas determinaciones. Sin embargo, en el cua-

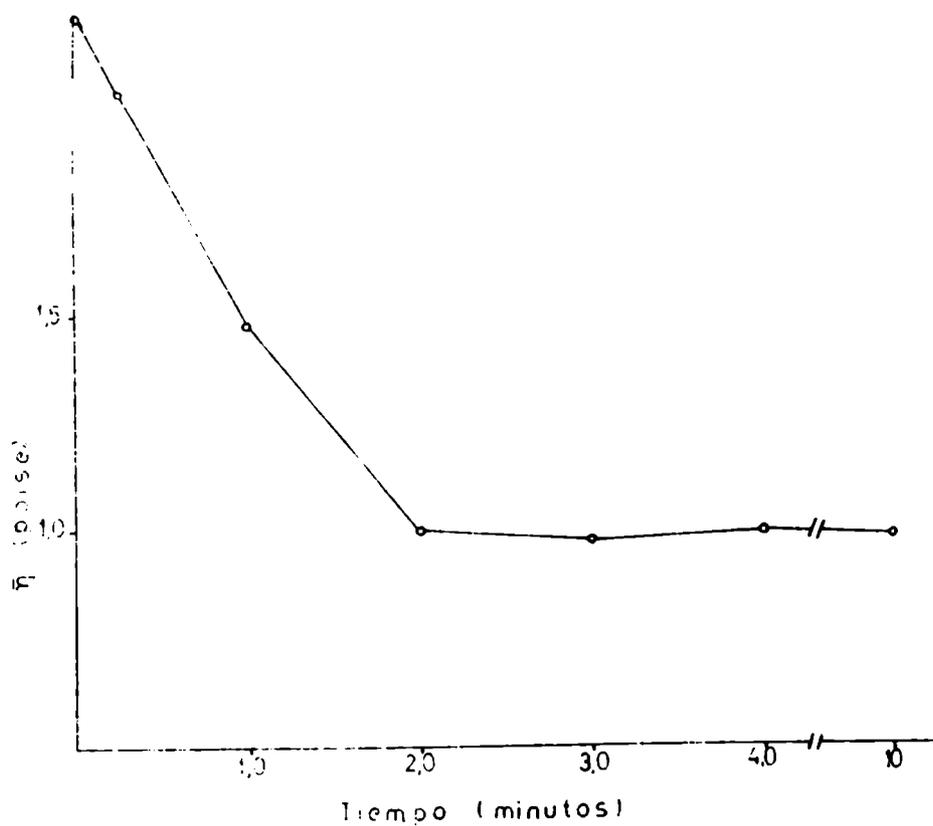


FIGURA 55: Variación en la microviscosidad aparente de microsomas marcados con DPH con el tiempo de incubación con alcohol isoamílico.

Microsomas (50 μg de proteína/ml), marcados con DPH (0,25 μM), mas alcohol isoamílico (40 mM).

TABLA XXII

INCORPORACION DE ALCOHOL ISOAMILICO EN MICROSOMAS DE HIGADO
DE RATA

MUESTRA	$\bar{\eta}$ 20°C (Poise)
	2,19
Microsomas*	
+ alcohol isoamílico 60 mM	0,77
Microsomas*	
+ alcohol isoamílico 60 mM	2,16
lavados#	

* Suspensión de 50 μ g de proteína microsomal / ml, en sacarosa 0,25 M - EDTA 1,0 mM pH 7,0; marcados con 14 C como se describió en la sección II.8.6.

Recentrifugados a 100.000 g durante 60 minutos y re-suspendidos en sacarosa 0,25 M - EDTA 1 mM pH 7,0

dro XXIII se puede ver que cuando a una suspensión acuosa de DPH se le agregó alcohol isoamílico, la fluorescencia aumentó a aproximadamente un 15% de la que se obtiene cuando a la misma concentración de DPH se le agregó microsomas. Como esta fluorescencia es casi completamente depolarizada, ya que el medio acuoso es de baja viscosidad y completamente isotrópico, podría suceder que la depolarización observada por el agregado del alcohol no sea debida a una disminución de la microviscosidad de la membrana, sino a un incremento en la fluorescencia del DPH que permanece en la fase acuosa sin incorporarse en los microsomas. En el sistema completo DPH-alcohol-microsomas, la fluorescencia de la fase acuosa debe ser en realidad muy inferior al 15% ya que la gran parte del DPH se incorpora en la fase lipídica. Sin embargo, como se desconoce si el alcohol puede influir sobre la partición del DPH entre la fase acuosa y la fase lipídica, fue necesario medir la fluorescencia del medio acuoso y ver si esta era significativa, y si se debían corregir los valores de polarización para los cálculos de microviscosidad.

Para esto, las suspensiones de microsomas marcadas con DPH y tratadas con el alcohol, se dividieron en dos fracciones. En una fracción se determinó directamente $I_{//}$ e I_{\perp} (corrigiendo por light scattering). La otra fracción fue centrifugada a 100.000 xg durante una hora y en el sobrenadante se midieron $I_{//}$ e I_{\perp} (también corregidos por light scattering). Para hacer la corrección por la fluorescencia del medio acuoso, a las $I_{//}$ e I_{\perp} de las suspensiones totales, se les descontaron las $I_{//}$ e I_{\perp} de los respectivos sobrenadantes, para obtener de esta manera las $I_{//}$ e I_{\perp} debidas únicamente al DPH incorporado en la fase lipídica.

La fluorescencia encontrada en el sobrenadante fue como máximo el 2% de la de la suspensión total. En la tabla XXIV se muestran para distintas concentraciones de isoamilol, los valores de microviscosidad aparente obtenidos directamente

TABLA XXIII

INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA RELATIVA DEL DPH EN DISTINTOS MEDIOS

MUESTRA	FLUORESCENCIA RELATIVA
DPH en sacarosa 0,25 M - EDTA 1 mM pH 7,0	0,25
DPH en sacarosa 0,25 M - EDTA 1 mM pH 7,0 + alcohol isoamílico 60 mM	12,5
DPH en sacarosa 0,25 M - EDTA 1 mM pH 7,0 + alcohol isoamílico 60 mM + microsomas*	87,0

* 50 μ g de proteína microsomal/ml, incubados una hora a temperatura ambiente, en oscuridad y agitando.

TABLA XXIV

CONTRIBUCION DE LA FLUORESCENCIA DEL DPH NO INCORPORADO
EN LOS MICROSOMAS EN LAS DETERMINACIONES DE $\bar{\eta}$

CONCENTRACION DE ALCOHOL ISOAMILICO	$\bar{\eta}$ (no corregida)	$\bar{\eta}$ (corregida)*
(mM)	(Poise)	(Poise)
0	2,19	2,18
37	1,05	1,09
90	0,72	0,70

* Corregida por la contribución del sobrenadante de
100.000 g como se indica en el texto.

fluorescencia de la suspensión total, y los valores obtenidos corrigiendo por la contribución de la fluorescencia del madante. No hay prácticamente diferencias entre los valores de microviscosidad aparente obtenidos de una u otra forma. Así, la mayor parte del DPH se halla incorporada en la fase lipídica de los microsomas, y la fluorescencia del DPH que pueda quedar en la fase acuosa es despreciable dentro del error experimental. Esto indicaría que la disminución en la polarización de fluorescencia observada por el agregado del isoamilol se debe a una disminución en la microviscosidad de la membrana que permite una mayor libertad de rotación del DPH.

En la figura 56 se muestra el efecto de concentraciones crecientes de alcohol isoamílico y n-butanol sobre la microviscosidad de la membrana microsomal. La microviscosidad aparente disminuye rápidamente a bajas concentraciones de alcohol, y luego el efecto parece saturado por encima de 70 mM para el alcohol isoamílico. El efecto del n-butanol es similar pero es mucho menor que el del alcohol isoamílico, y el plateau es alcanzado a concentraciones mayores. La mayor efectividad del isoamilol con respecto al n-butanol para disminuir la microviscosidad aparente de la membrana microsomal, seguramente se debe a su menor solubilidad en agua y una solubilización mayor en la fase lipídica. El hecho de que las cadenas ramificadas produzcan un mayor desorden de la fase lipídica que las cadenas lineales, también podría contribuir en algo a la mayor efectividad del alcohol isoamílico.

III.4.2.- Efecto del n-butanol y el isoamilol sobre la actividad del sistema desaturante de ácidos grasos y la cadena de transporte de electrones asociada.

En la figura 57 se muestra el efecto del alcohol isoamílico y del n-butanol sobre las actividades del sistema de transporte de electrones microsomal. La actividad NADH-ferri-cianuro reductasa no es modificada mayormente al aumentar la -

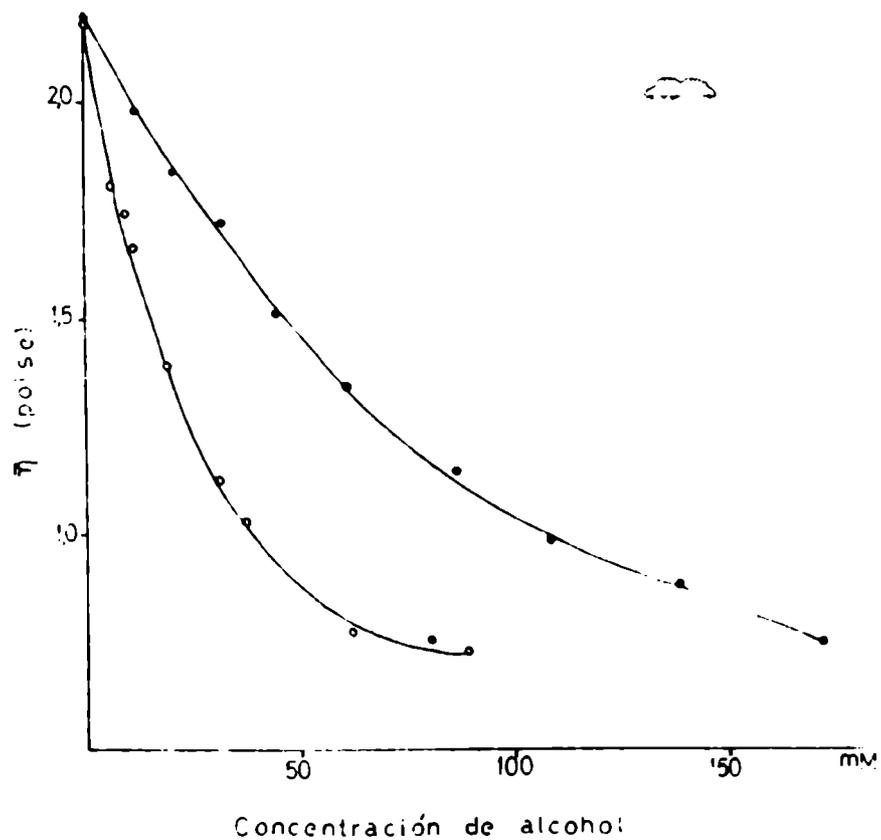


FIGURA 56: Efecto de distintas concentraciones de alcoholes alifáticos de bajo peso molecular sobre la microviscosidad aparente de microsomas de hígado de rata a 20 °C.
 (o—o) alcohol isoamílico; (●—●) n-butanol.

concentración de ninguno de los dos alcoholes estudiados. Por el contrario, la actividad de la NADH-citocromo c reductasa aumentó al aumentar la concentración de ambos alcoholes. Similarmente a lo que ocurrió con la fluidez de la membrana, la actividad incrementó rápidamente a bajas concentraciones de alcohol y pareció saturar a mayores concentraciones. Para el n-butanol, se observó que la actividad incrementó mas suavemente que para el isoamilol, y a altas concentraciones de este alcohol se observó una nueva caída en actividad. En general, hay una correlación bastante buena entre los cambios en la microviscosidad aparente y la actividad de la NADH-citocromo c reductasa, aunque el efecto de los alcoholes sobre esta actividad pareció saturar a concentraciones algo mayores que el efecto sobre la microviscosidad aparente. El efecto inhibitorio a altas concentraciones de n-butanol no sería debido a un efecto del alcohol sobre la fluidez de la membrana, sino que podría deberse a algún efecto sobre la proteína misma. Así, estos resultados indicarían que la actividad NADH-ferricianuro reductasa es independiente de los cambios en la fluidez de la membrana mientras que la actividad NADH-citocromo c reductasa se ve favorecida por la fluidificación de la membrana producida por estos alcoholes.

En la figura 58 puede observarse el efecto del alcohol isoamílico sobre la actividad de la $\Delta 9$ desaturasa. La actividad fue medida a dos concentraciones de ácido palmítico: 66 y 13 μM . Esta actividad no fue modificada por el alcohol isoamílico cuando se midió a concentraciones saturantes (66 μM) del sustrato, pero disminuyó al incrementar la concentración del alcohol, de una manera similar a la disminución en microviscosidad aparente. La inhibición de esta actividad podría ser debida a un efecto del alcohol sobre la enzima, y no una respuesta a los cambios de fluidez. Sin embargo, el hecho de que el efecto inhibitorio parezca saturar a altas concentraciones de alcohol, de manera semejante a los cambios de fluidez,

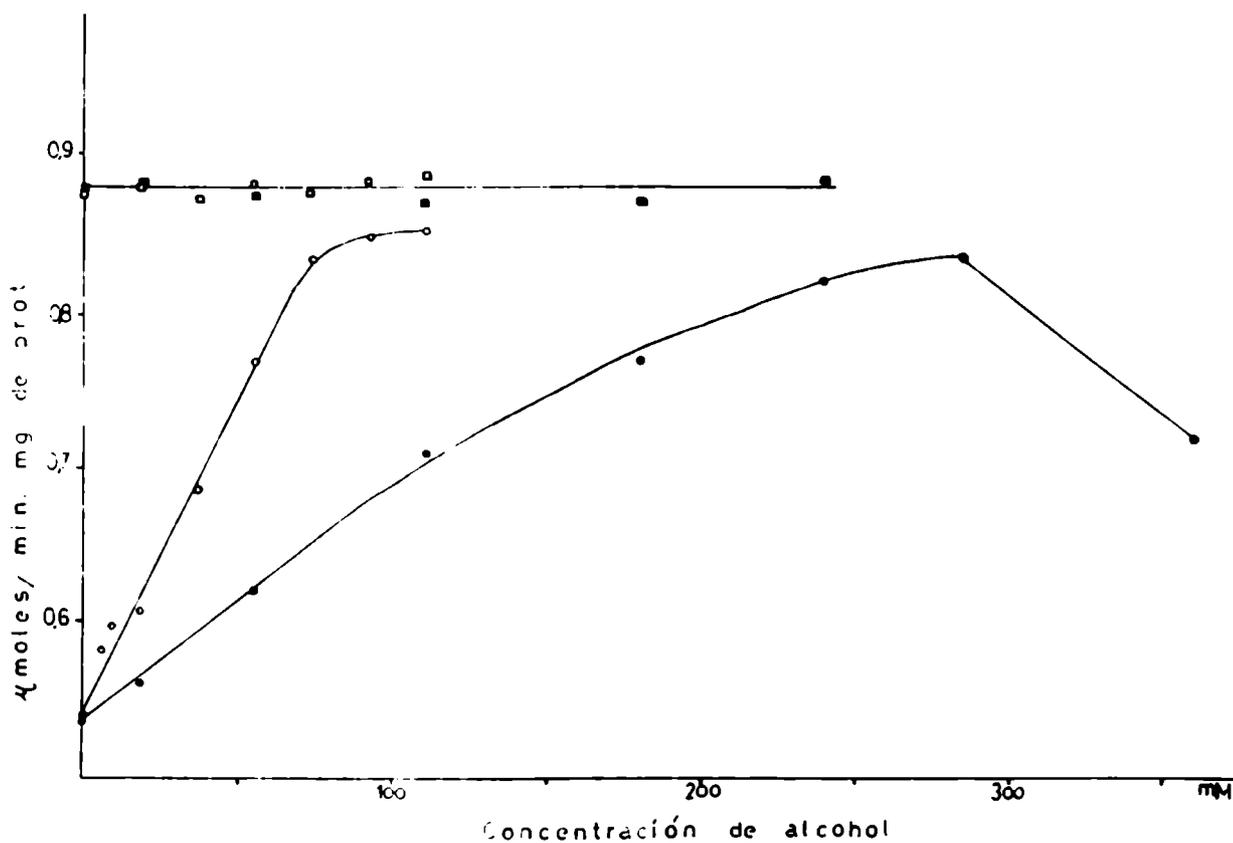


FIGURA 57: Efecto de alcoholes alifáticos de cadena corta sobre el sistema de transporte de electrones del citocromo b5.

(□—□) NADH-ferric nitrate reductase — alcohol isoamílico

(■—■) NADH-ferricyanuro reductasa — n-butanol

(○—○) NADH-citocromo c reductasa — alcohol isoamílico

(●—●) NADH-citocromo c reductasa — n-butanol

Cada punto es el promedio de dos determinaciones, las cuales se realizaron a 25 °C.

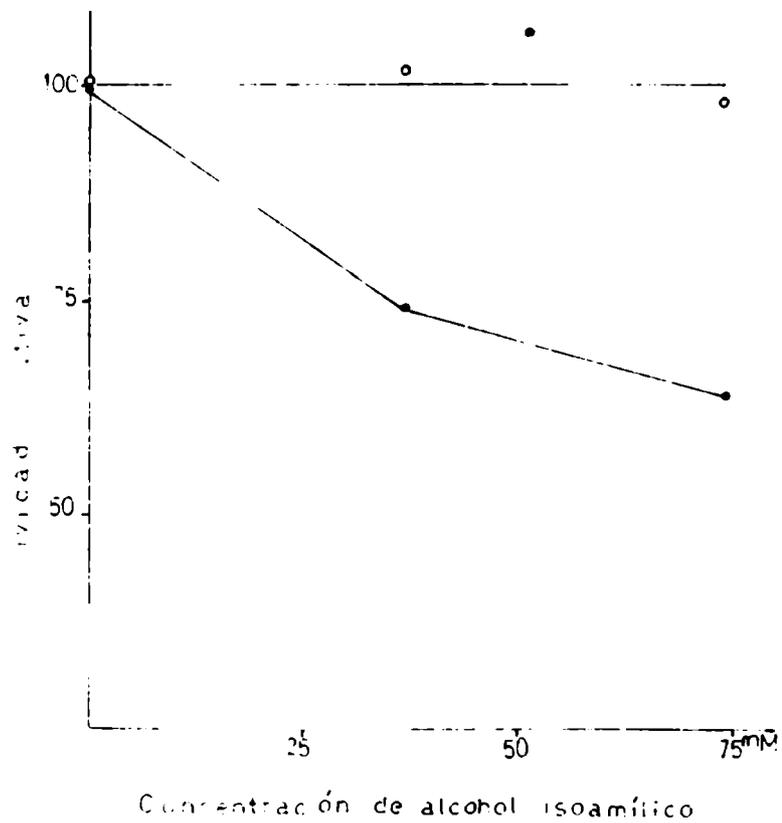


FIGURA 58: Efecto del alcohol isoamílico sobre la actividad $\Delta 9$ desaturasa.

(o—o) 66 μM de ácido palmítico; (●—●) 13 μM de ácido palmítico. Cada punto es el promedio de dos determinaciones realizadas a 37 °C.

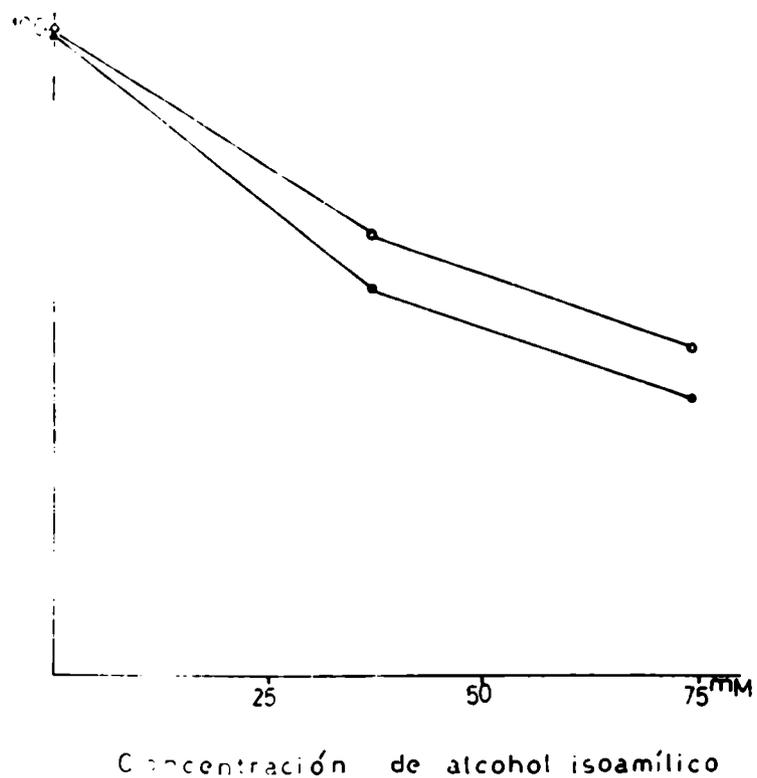


FIGURA 59: Efecto del alcohol isoamílico sobre la actividad $\Delta 6$ desaturasa de microsomas de hígado de rata.

(o—o) 66 μM de ácido linoleico; (●—●) 13 μM de ácido linoleico. Cada punto es el promedio de dos determinaciones realizadas a 37 °C.

y el hecho de que la actividad no sea inhibida a altas concentraciones de sustrato parecen sugerir lo contrario.

El efecto del alcohol isoamílico sobre la actividad Δ^6 desaturasa se muestra en la figura 59. A bajas concentraciones de sustrato, el efecto del isoamilol sobre esta actividad fue similar al efecto de este alcohol sobre la Δ^9 desaturasa. Sin embargo, a una concentración de ácido linoleico de $66 \mu\text{M}$, también pudo observarse una disminución en actividad, aunque algo mas leve que a $13 \mu\text{M}$, por efecto del alcohol.

III.4.3.- Efecto del alcohol isoamílico sobre la actividad del sistema de la glucosa-6-fosfatasa.

El efecto del isoamilol fue también investigado sobre el sistema de la glucosa-6-fosfatasa, en microsomas no tratados, y en microsomas tratados con Triton X-100 0,1% para romper la barrera de permeabilidad. En la figura 60 puede verse que la actividad del componente hidrolítico de este sistema (microsomas tratados) no es modificada por el agregado del alcohol. Sin embargo, la actividad en microsomas no tratados aumentó a bajas concentraciones de isoamilol, paralelamente a la disminución en microviscosidad, y luego fue inhibida a altas concentraciones de alcohol. Para que la actividad medida en los microsomas no tratados sea realmente la actividad del transporte de la G-6-P a través de la membrana, es necesario que el alcohol no afecte a la permeabilidad de la membrana. El hecho de que a altas concentraciones de alcohol sea inhibida la actividad en los microsomas no tratados, y no en los microsomas permeabilizados con Triton X-100, ya indica que la permeabilidad no sería mayormente afectada por el alcohol. Como una prueba mas, se midió la latencia de la actividad de hidrólisis de la M-6-P. En la tabla XXV se muestran las actividades de la M-6-Pasa antes y después del tratamiento con Triton- X-100, y el porcentaje de latencia; para diferentes concentraciones de alcohol isoamílico. La latencia de la M-6-Pasa se mantuvo cons-

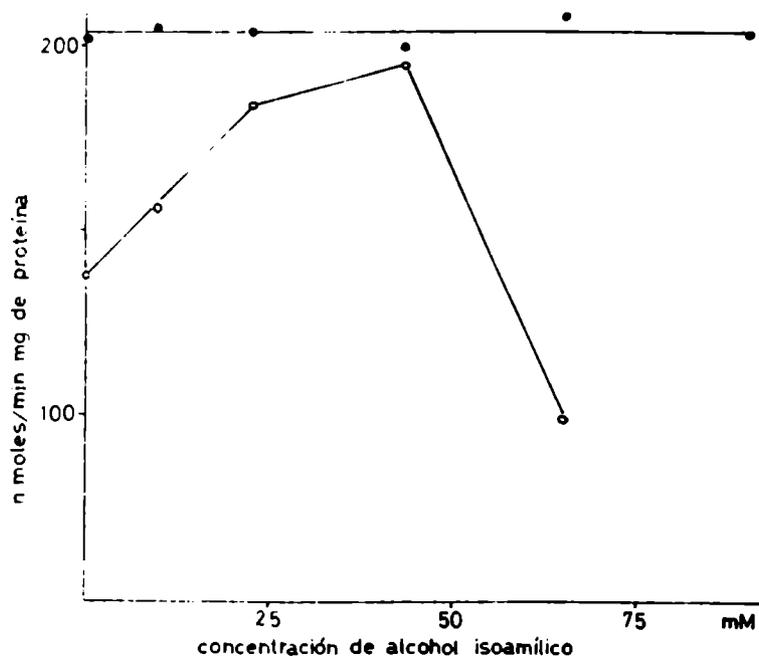


FIGURA 60: Efecto del alcohol isoamílico sobre la actividad del sistema de la glucosa-6-fosfatasa de microsomas de hígado de rata. (o—o) microsomas no tratados; (●—●) microsomas permeabilizados con Triton X-100 0,1 %. Cada punto es el promedio de dos determinaciones realizadas a 37 °C.

TABLA XXV

EFFECTO DEL ALCOHOL ISOAMILICO SOBRE LA PERMEABILIDAD DE LAS VESICULAS MICROSOMALES A LA M-6-P

CONCENTRACION DE ALCOHOL ISOAMILICO	ACTIVIDAD M-6-P FOSFOHIDROLASA*		LATENCIA (%)
	MICROSOMAS NO TRATADOS	MICROSOMAS TRATADOS CON TRITON X-100 0,1 %	
0	1,68	15,3	89
9	1,83	14,1	87
23	1,46	16,2	91
44	1,56	15,6	90
65	1,91	14,7	87
90	1,82	15,2	88

* Determinada con una concentración de M-6-P de 1,0 mM.

///

tante al mismo valor de los microsomas sin alcohol, aún para las mas altas concentraciones de isoamilol, indicando que la barrera de permeabilidad de las vesículas microsomales no es alterada por el alcohol.

Así, estos resultados indican que la actividad del componente hidrolítico no es afectada por los cambios en la fluidez de la membrana producidos por el isoamilol. Por otro lado, la actividad del transporte de la G-6-P aumenta al aumentar la fluidez de la membrana por lo menos a bajas concentraciones de alcohol. A altas concentraciones de alcohol, el efecto inhibitorio puede ser debido a un efecto del alcohol mismo sobre la proteína transportadora y no una respuesta a los cambios de fluidez de la membrana, similarmente a lo que ocurrió con la actividad NADH-citocromo c reductasa a altas concentraciones de n-butanol.

III.4.4.- Discusión.

Estas experiencias mostraron que los alcoholes alifáticos isoamilol y n-butanol, cuando se agregan a una suspensión de microsomas, se particionan entre la fase acuosa y la fase lipídica, y producen un aumento en la fluidez de la membrana, como pudo ser detectado por la polarización de la fluorescencia emitida por el DPH incorporado en la membrana como marcador. El efecto de estos alcoholes concuerda con el efecto producido por alcoholes de cadena corta sobre sistemas lipídicos artificiales (68). El isoamilol fue mas efectivo que el n-butanol para fluidificar la membrana, lo cual posiblemente se deba a que se particiona mas favorablemente que el n-butanol en la fase lipídica.

El efecto de estos alcoholes sobre la cadena transportadora de electrones dependiente del citocromo b₅, confirman los resultados de las experiencias de la sección III.3 en las que se observó que la NADH-ferricianuro reductasa fue insensible a los cambios de fase de la membrana, y que la NADH-

///

citocromo c reductasa fue sensiblemente inhibida por el cambio de la fase lipídica de un estado fluido a un estado ordenado. Así, esto indicaría que la reacción NADH-citocromo c reductasa no solo responde a los grandes cambios de estructura que ocurren a lo largo de una transición de fase orden-desorden, sino que su actividad también se ve modulada por cambios de fluidez que no involucren un cambio de estado, lo cual concuerda con la teoría de Strittmatter de que esta reacción sería limitada por la difusión lateral de las proteínas en la membrana (251).

Por otro lado, el efecto de la fluidez de la membrana sobre las actividades desaturantes de ácidos grasos, según estas experiencias, pareció ser el inverso que sobre la NADH-citocromo c reductasa, con un aumento en la fluidez disminuyendo la actividad. Sobre la Δ^9 desaturasa, el efecto parece ser mas bien sobre la afinidad de la enzima por el sustrato, ya que la inhibición solo se encontró a concentraciones de sustrato bajas. En cambio sobre la Δ^6 desaturasa, el efecto inhibitorio fue observado a baja y alta concentración de sustrato, aunque fue menos intenso en el último caso. Si bien estas reacciones deben requerir de la difusión lateral del sustrato en la membrana para unirse a la enzima, la respuesta de esta enzima a la fluidificación de la fase lipídica por los alcoholes es contraria a lo que se esperaría si la difusión lateral del sustrato fuera limitante de la velocidad. Sin embargo, la difusión del sustrato no es la etapa limitante, sino que parece ser la salida de los hidrógenos para formar el doble enlace (252).

El efecto observado sobre las desaturasas estaría de acuerdo con lo postulado por el grupo de Thompson (383, 384) de que las desaturasas de *Tetrahymena pyriformis* serían sensibles a la fluidez de su entorno lipídico y que la actividad se vería favorecida por una disminución en la fluidez. Esto podría ser importante para la autoregulación del grado de insaturación de las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos y por lo

tanto de la fluidez de la membrana. Sin embargo, el mecanismo íntimo de estas respuestas de la actividad desaturante es aún inexplicable con estos datos experimentales. Este tipo de respuesta de las desaturasas a los cambios en la fluidez de la membrana, sin embargo, no podría ser la única responsable del incremento de la actividad desaturante producida por la carencia de ácidos grasos esenciales "in vivo" ya que en ese caso no se encontraron cambios significativos en la fluidez de la membrana (por lo menos a temperaturas fisiológicas), y para ambas enzimas ($\Delta 6$ y $\Delta 9$ desaturasas) se encontró un incremento en la actividad medida con altas concentraciones de sustrato.

La fluidificación de la membrana microsomal producida por estos alcoholes, mostró ser un método adecuado para estudiar la influencia de la fluidez de la membrana sobre la actividad del sistema de la G-6-Pasa, ya que al contrario de los métodos de fusión y substitución utilizados en las experiencias descritas en la sección III.3, mantuvo intacta la barrera de permeabilidad de la membrana microsomal. Estos resultados indicaron que el transporte de la G-6-P a través de la membrana se ve favorecido por un incremento en la fluidez de la misma. Otros sistemas transportadores de carbohidratos, como por ejemplo el transporte de β -galactósidos y de β -glucósidos en membranas de E.coli, han mostrado que la actividad aumenta al aumentar la fluidez de la membrana (148). La actividad hidrolítica, en cambio no fue afectada por los cambios en microviscosidad producidos por el alcohol, y esto concuerda con el hecho de que esta actividad fue insensible a la transición de fase en membranas modificadas por la incorporación de DMPC (sección III.3).

Así, estos resultados indicaron que las reacciones que utilizan sustratos solubles, como la actividad NADH-ferri-cianuro reductasa y la hidrólisis de la G-6-P en microsomas permeabilizados, no mostraron dependencia de la fluidez y el estado físico de los lípidos de la membrana. Por otro lado,

reacciones que requieren de la difusión lateral o del transporte vertical a través de la membrana, como lo son la NADH-citocromo c reductasa y la actividad G-6-Pasa en microsomas, intactos, mostraron que su actividad se vio favorecida por un aumento en la fluidez de la fase lipídica.

III.5.- CONCLUSIONES GENERALES.

- 1) La membrana microsomal de hígado de rata se encuentra a temperaturas fisiológicas en un estado de alta fluidez, ya que los parámetros de orden determinados por ESR y por polarización de fluorescencia, y la microviscosidad aparente caen entre los valores mas bajos hallados en otras membranas biológicas. Este estado de alta fluidez permite una alta velocidad de difusión lateral del ácido 5-doxil esteárico incorporado en la membrana.
- 2) Al igual que la gran mayoría de las membranas biológicas y bicapas lipídicas artificiales, la membrana del retículo endoplásmico de hígado de rata presenta un gradiente de movilidad en las cadenas hidrocarbonadas que aumenta al ir de la zona polar al interior hidrofóbico de la membrana.
- 3) Dentro de la sensibilidad de los métodos utilizados, la membrana de microsomas de hígado de rata no presenta ningún cambio de fase líquido-cristalino a cristalino entre 10 y 40°C, capaz de producir cambios bruscos visibles en la movilidad u ordenamiento de las cadenas hidrocarbonadas, tanto en el interior hidrofóbico como en la región mas cercana a los grupos polares; o en la velocidad de rotación del DPH incorporado en la membrana; o en la partición de la N-fenil-1-naftilamina entre la fase acuosa y la fase lipídica de la membrana.
- 4) Al contrario de otras proteínas microsomales como el citocromo P₄₅₀, los lípidos que circundan a las $\Delta 6$ y $\Delta 9$ desaturasas, al citocromo b₅ y al componente traslocador de G-6-P del sistema de la G-6-P fosfohidrolasa no parecen sufrir ninguna alteración en su estructura al variar la temperatura entre 10 y 40°C que pueda alterar su actividad.

- 5) Los cambios en composición de ácidos grasos de los lípidos constituyentes de la membrana microsomal de hígado de rata, producidos por la deficiencia en ácidos grasos esenciales - se reflejan en una disminución en el grado de insaturación en períodos cortos (alrededor de 11 días), pero el grado de insaturación normal es recuperado en tiempos mas largos.

- 6) La disminución en el grado de insaturación de los lípidos - microsomales producido por la deficiencia en ácidos grasos esenciales en tiempos cortos no es suficiente para producir un cambio detectable en la movilidad y el grado de orden de las cadenas hidrocarbonadas, y en la velocidad de difusión del ácido 5-doxil esteárico en el plano de la membrana. La microviscosidad aparente de la fase lipídica de la membrana microsomal tampoco es afectada a temperaturas fisiológicas por la deficiencia en ácidos grasos esenciales. La rata, por lo tanto, logra mantener mediante el incremento en la - síntesis de ácidos grasos poliinsaturados de la serie no esencial, la fluidez y el ordenamiento de la membrana dentro de límites estrechos a pesar de la deficiencia en ácidos - grasos esenciales.

- 7) Los cambios en composición de ácidos grasos de los lípidos de la membrana microsomal de hígado de rata debida a la deficiencia en ácidos grasos esenciales no fueron suficientes tampoco como para provocar la aparición de alguna alteración estructural o transición de fase en los lípidos de la membrana entre 10 y 40°C, capaz de influir significativamente sobre el grado de orden y la movilidad de las cadenas hidrocarbonadas, sobre la partición de la N-fenil-1-naftilamina entre la fase acuosa y la fase lipídica, y sobre la velocidad de difusión rotacional del DPH incorporado en la membrana. Los lípidos que circundan a las proteínas $\Delta 6$ desaturasa, citocromo b5 y componente traslocador de G-6-P del -

sistema G-6-P fosfohidrolasa, tampoco son afectados por la deficiencia en ácidos grasos esenciales de manera de sufrir alguna alteración estructural que influya sobre la actividad de estas enzimas.

- 8) La actividad del componente hidrolítico del sistema de la G-6-P fosfohidrolasa (microsomos permeabilizados) no es afectada por la transición de fase orden-desorden de la membrana en microsomos modificados por la incorporación de lecitina exógena. Esta actividad tampoco es influenciada por cambios en la fluidez de la membrana que no involucran transiciones de fase, producidos por la incorporación de alcoholes de bajo peso molecular en la membrana. Así, la estructura y fluidez de la fase lipídica de la membrana tendría muy poca influencia sobre esta actividad, y esto puede deberse a que utiliza un sustrato hidrosoluble, y posiblemente el sitio catalítico de esta enzima esté expuesto hacia la fase acuosa.
- 9) La actividad del componente traslocador de G-6-P a través de la membrana microsomal, por el contrario es sensiblemente favorecida por un aumento en la fluidez de la membrana producido por la incorporación en la fase lipídica de alcoholes de bajo peso molecular, lo que muestra que la estructura y fluidez de la membrana son capaces de influir en este proceso de transporte vertical.
- 10) La actividad de la flavoproteína citocromo b5 reductasa (medida como NADH-ferricianuro reductasa) no es afectada por la modificación de la fluidez de la membrana por medio de la incorporación en ella de alcoholes de bajo peso molecular, o por la transición de fase orden-desorden en membranas en las que se modificó la composición lipídica por la incorporación de lecitina exógena. Esta enzima, al igual -

que el componente hidrolítico del sistema G-6-P fosfohidrolasa, utiliza sustratos solubles en agua (en el caso de esta reacción), y tiene su sitio catalítico expuesto hacia la fase acuosa, el cual no se vería afectado por los cambios en las propiedades de la fase lipídica.

- 11) La velocidad de transferencia de electrones entre la flavoproteína citocromo b5 reductasa y el citocromo b5 (NADH-citocromo c reductasa), por el contrario, es afectada sensiblemente por las propiedades de la fase lipídica. El cambio de un estado fluído a un estado ordenado de los lípidos de la membrana cuya composición lipídica fue modificada por la incorporación de lecitinas exógenas inhibe sensiblemente a esta actividad. Cambios en la fluidez de la membrana sin que involucren un cambio de fase, como los producidos por la incorporación de alcoholes de cadena corta, también modifican la velocidad de transferencia de electrones entre estas proteínas. Esto podría ser explicado por el hecho de que la fluidez y estructura de la membrana afectarían a la difusión lateral de estas proteínas en el plano de la membrana.

- 12) La actividad NADH-citocromo c reductasa responde a la transición de fase orden-desorden de membranas modificadas por la incorporación de lecitinas exógenas, con una curva de Arrhenius trifásica, a pesar de que en algunos casos pueden observarse como bifásicas debido a que uno de los cambios de pendiente ocurre fuera del rango de temperatura normalmente medido.

- 13) Las proteínas citocromo b5 reductasa y citocromo b5 parecen particionarse preferiblemente en los dominios fluídos cuando ocurre una transición o separación de fase, como se deduce de la respuesta de la actividad NADH-citocromo c re

ductasa a los cambios de fase en membranas modificadas por la incorporación de lecitinas exógenas.

- 14) La velocidad de desaturación de los ácidos palmítico y linoleico ($\Delta 6$ y $\Delta 9$ desaturasas respectivamente) es aparentemente afectada por los cambios en la fluidez de la membrana producidos por la incorporación de alcoholes de bajo peso molecular. Un aumento en la fluidez de la membrana produciría una disminución en la efectividad de estas reacciones. En la $\Delta 9$ desaturasa, el efecto fue observado solo a bajas concentraciones de ácido palmítico, indicando que podría ser afectada la afinidad de la enzima por el sustrato. En la $\Delta 6$ desaturación del ácido linoleico, en cambio, la modificación de la fluidez de la membrana afectó a la actividad tanto a altas como a bajas concentraciones de sustrato. Esta respuesta de las desaturasas a la fluidez de la fase lipídica podría tener importancia como un mecanismo de autorregulación del grado de insaturación y de la fluidez de la membrana. Este comportamiento de las desaturasas sin embargo, no puede ser responsable del incremento en la actividad de estas enzimas producido por la deficiencia en ácidos grasos esenciales, en donde seguramente debe ocurrir un incremento en la cantidad de enzima.

Rodolfo A. Brenner



BIBLIOGRAFIA

- 1) Wallach D.H.F. and Gordon A. (1968) Fed.Proc. 27,1263
- 2) Vanderkooi G. and Capaldi R.A. (1972) Ann.N.Y.Acad.Sci. 195,135
- 3) Nozaki Y. and Tanford C. (1971) J.Biol.Chem. 246,2211
- 4) Maroux S. and Louvard D. (1976) Biochim.Biophys.Acta 419,189
- 5) Haugen D.A.,Armes L.G.,Yasunobu K.T. and Coon M.J. (1977) Biochem.Biophys.Res.Comm. 77,967
- 6) Tanford C. and Reynolds J.A. (1976) Biochim.Biophys.Acta 457,133
- 7) Spatz L. and Strittmatter P. (1971) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 68,1042
- 8) Spatz L. and Strittmatter P. (1971) J.Biol.Chem. 248,793
- 9) Tomita M. and Marchesi V.T. (1975) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 72,2964
- 10) Nelson N. (1976) Biochim.Biophys.Acta 456,314
- 11) Luisis A.J., Tonino S. and Paigen K. (1976) J.Biol.Chem. 251,7753
- 12) Sandermann H. and Strominger J.L. (1971) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 68,2441
- 13) Zorn M. and Futterman S. (1971) J.Biol.Chem. 246,881
- 14) Keefer L.M. and Bradshaw R.A. (1977) Fed.Proc. 36,1799
- 15) Braun V. (1975) Biochim.Biophys.Acta 415,335
- 16) Folch-Pi J. and Sakura J.D. (1976) Biochim.Biophys.Acta 427,410
- 17) Mac Lennan D.H. (1975) Can.J.Biochem. 53,251
- 18) Yamamoto S. and Lampen J.O. (1976) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 73,1457
- 19) Berliner L.J. ed. (1976) Spin Labeling - Theory and applications Academic Press, New York
- 20) Huang C. (1969) Biochemistry 8,344
- 21) Ferguson J.L. and Brown G.H. (1968) J.Am.Oil Chem.Soc. 45,120

- 22) Sandermann H., Falk H. and Schumacher G. (1977) Anal.Biochem. 82, 583
- 23) Tanford C. (1973) The hydrophobic effect; Formation of micelles and biological membranes. J.Wiley and Sons, New York
- 24) Schumacher G. and Sandermann H. (1976) Biochim.Biophys.Acta 448, 642
- 25) Reiss-Husson F. (1967) J.Mol.Biol. 25,363
- 26) Cullis P.R. and De Kruijff B. (1978) Biochim.Biophys.Acta 507, 207
- 27) Stier A., Finch S.A.E. and Bösterling B. (1978) FEBS Lett. 91, 109
- 28) Stier A., Kühnle W., Bösterling B. and Finch S.A.E. (1978) in "The induction of drug metabolism" (Estabrook R.W. and Lindenlauf E. eds.) pp 225 F.K.Schattaver Verlag, Stuttgart - New York
- 29) De Kruijff B., Verkleij A.J. and Van Etcheld C.J.A. (1979) Biochim.Biophys.Acta 555,200
- 30) Usher J.R., Espand R.M. and Papahadjopoulos D. (1978) Chem.Phys. Lipids 22,245
- 31) Cullis P.R. and De Kruijff B. (1979) Biochim.Biophys.Acta 559, 399
- 32) Small D.M. (1970) Fed.Proc. 29,1320
- 33) Sandermann H. (1973) FEBS Lett. 29,256
- 34) Kagawa Y. (1972) Biochim.Biophys.Acta 265,297
- 35) Oldfield E. and Chapman D. (1972) FEBS Lett. 23,285
- 36) Schreier-Muccillo S., Butler K.W. and Smith I.C.P. (1973) Arch. Biochem.Biophys. 159,297
- 37) Demel R.A. and De Kruijff B. (1976) Biochim.Biophys.Acta 457, 107
- 38) Haberland M.E. and Reynolds J.A. (1973) Fed.Proc. 32,639
- 39) Lecuyer H. and Dervichian D.G. (1969) J.Mol.Biol. 45, 39
- 40) Janiack M.J., Loomis C.R., Shipley G.G. and Small D.M. (1974) J.Mol.Biol. 86,325

- 41) Lee A.G. (1977) *Biochim.Biophys.Acta* 472,237
- 42) Jacobson K. and Papahadjopoulos D. (1975) *Biochemistry* 14,152
- 43) Estep T.N., Mountcastle D.B., Barenholz Y., Biltonen R.L. and Thompson T.E. (1979) *Biochemistry* 18,2112
- 44) Hui S.W. (1977) *Biochim.Biophys.Acta* 472, 345
- 45) Schoenborn E.P. (1976) *Biochim.Biophys.Acta* 457,41
- 46) Seelig J. (1978) *Biochim.Biophys.Acta* 515,105
- 47) Schreirer S., Polnazzek C.F. and Smith I.C.P. (1978) *Biochim. Biophys.Acta* 515,375
- 48) Shinitzky M. and Barenholz Y. (1978) *Biochim.Biophys.Acta* 515, 367
- 49) Hare F. and Lussan C. (1978) *FEBS Lett.* 94,231
- 50) Phillips M.C., Williams R.M and Chapman D. (1969) *Chem.Phys. Lipids* 3,234
- 51) Sandermann H. (1978) *Biochim.Biophys.Acta* 515,209
- 52) Levine Y.K., Bailey A.I. and Wilkins M.H.F. (1968) *Nature* 220, 577
- 53) Razin S. (1978) *Biochim.Biophys.Acta* 513,401
- 54) Freire E. and Biltonen R. (1978) *Biochim.Biophys.Acta* 514,54
- 55) Trauble H. (1971) *Naturwissenschaften* 58,277
- 56) Lee A.G., Birdsall N.J.M., Metcalfe J.C., Toon P.A. and Warren G.B. (1974) *Biochemistry* 13, 3699
- 57) Michaelson D.M., Horwitz A.F. and Kleim M.P. (1974) *Biochemistry* 13,2605
- 58) Cullis P.R. and De Kruijff B. (1978) *Biochim.Biophys.Acta* 513,31
- 59) Yeagle P.L., Hutton W.C. and Martin R.B. (1978) *Biochemistry* 17,5745
- 60) Eibl H. and Blume A. (1979) *Biochim.Biophys.Acta* 553,476
- 61) Graddock W.F., Stamatoff J.B., Eisenberg P., Barreman D.W. and Spielberg N. (1979) *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 88,907

- 62) Kurland R.J., Hammoudah M., Nir S. and Papahadjopoulos D. (1979) Biochem.Biophys.Res.Commun. 88, 927
- 63) Cullis P.R. and Verkleij A.J. (1979) Biochim.Biophys.Acta 552,546
- 64) Mountcastle D.B., Biltonen R.L. and Halsey M.J. (1978) Proc.Natl. Acad.Sci.U.S. 75,4906
- 65) Lee A.G. (1978) Biochim.Biophys.Acta 514,95
- 66) Chaykowski F.T., Wan J.K.S. and Singer M.A. (1979) Chem.Phys. Lipids 23,133
- 67) Pringle M. and Miller K.W. (1979) Biochemistry 18,3314
- 68) Richards C.D., Martin V., Gregory S., Keightley C.A., Hesketh T. R., Smith G.A., Warren G.B. and Metcalfe J.C. (1978) Nature 276, 775
- 69) Sackmann E., Trauble H., Galla H.J. and Overath P. (1973) Biochemistry 12, 5360
- 70) Chapman D. and Penkett S.A. (1966) Nature 211,1304
- 71) Chan S.I., Feigenson G.W. and Seiter C.H.A. (1971) Nature 231,110
- 72) Levine Y.K., Birdsall N.J.M., Lee A.G. and Metcalfe J.C. (1972) Biochemistry 11,1416
- 73) Jost P.C., Libertini L.J., Herbert V.C. and Griffith O.H. (1971) J.Mol.Biol. 59,77
- 74) Hubbell W.L. and Mc Connell H.M. (1968) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 61,12
- 75) Hubbell W.L. and Mc Connell H.M. (1971) J.Am.Chem.Soc. 93,314
- 76) Tilley J., Thulborn K., Keith R. and Sawyer W.H. (1979) J.Biol. Chem. 254,2592
- 77) Mc Farland B.G. and Mc Connell H.M. (1971) Proc.Natl.Acad.Sci. U.S. 68,1274
- 78) Waggoner A.S. and Stryer L. (1970) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 67, 579
- 79) Leslauc W., Cain J.E. and Blasie J.K. (1972) Proc.Natl.Acad. Sci.U.S. 69,1499
- 80) Mason J.T. and Huang C. (1978) Ann.N.Y.Acad.Sci. 308,29

- 81) Gaber B.P., Yager P. and Peticolas W.L. (1978) *Biophys.J.* 24,677
- 82) Devaraj P. and Mc Connell H.M. (1972) *J.Am.Chem.Soc.* 94,4475
- 83) Kornberg R.D. and Mc Connell H.M. (1971) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.* 68,2564
- 84) Trauble H. and Sackmann E. (1972) *J.Am.Chem.Soc.* 94,4449
- 85) Rubenstein J.L.R., Smith B.A. and Mc Connell H.M. (1979) *Proc. Natl.Acad.Sci.U.S.* 76,15
- 86) Kuo A. and Wade C.G. (1979) *Biochemistry* 18,2300
- 87) Kornberg R.D. and Mc Connell H.M. (1971) *Biochemistry* 10,1111
- 88) Overath P. and Trauble H. (1973) *Biochemistry* 12,2625
- 89) Mc Connell H.M., Wright K.L. and Mc Farland B.G. (1972) *Biochem. Biophys.Res.Commun.* 47,273
- 90) Wu S.H. and Mc Connell H.M. (1975) *Biochemistry* 14,847
- 91) Mabrey S. and Sturtevant J.M. (1976) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.* 73, 3862
- 92) Van Dijk P.W.M., Kapes A.J., Oonk H.A.J. and De Gier J. (1977) *Biochim.Biophys.Acta* 470,58
- 93) Lee A.G. (1977) *Biochim.Biophys.Acta* 472, 285
- 94) Hong K. and Hubbell W.L. (1972) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.* 69,2617
- 95) Verkleij A.J. and Ververgaert P.H. (1975) *Ann.Rev.Phys.Chem.* 26,101
- 96) Grant C.W.M. and Mc Connell H.M. (1974) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.* 71,4653
- 97) Mc Intosh T.J. (1978) *Biochim.Biophys.Acta* 513,43
- 98) Kowato S., Kinoshita K. and Ikegami A. (1978) *Biochemistry* 17, 5026
- 99) Demel R.A., Van Deenen L.L.M. and Pethica B.A. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* 135,11
- 100) Lapper R.D., Paterson S.J. and Smith I.C.P. (1972) *Can.J.Biochem.* 50,969

- 101) Mailer C., Taylor C.P.S., Schreier-Muccillo S. and Smith I.C.P. (1974) Arch.Biochem.Biophys. 163,671
- 102) Schreier-Muccillo S., Marsh D., Dugas H., Schneider H. and Smith I.C.P. (1973) Chem.Phys.Lipids 10,11
- 103) Levine Y.K. and Wilkins M.H.F. (1971) Nature, New Biol. 230,69
- 104) Rothman J.E. and Engelman D.M. (1972) Nature 237,42
- 105) Jacobs R. and Oldfield E. (1979) Biochemistry 18,3280
- 106) Martin R.R. and Yeagle P.L. (1978) Lipids 13,594
- 107) Cullis P.R., Van Dijck P.W.M., De Kruijff B. and De Gier J. (1978) Biochim.Biophys.Acta 513,21
- 108) Demel R.A., Jansen J.W.C.M., Van Dijck P.W.M. and Van Deenen L. L.M. (1977) Biochim.Biophys.Acta 465,1
- 109) Kaplan J.H. (1973) Biochim.Biophys.Acta 311,1
- 110) Bitler K.W., Hanson A.W., Smith I.C.P. and Schneider H. (1973) Can.J.Biochem. 51,980
- 111) Davis A.F., Hanson H., Leslie R.B. and Phillips M.C. (1973) Biochim. Biophys. Acta 317,214
- 112) Van S.P. and Griffith O.H. (1975) J.Membr.Biol. 20,155
- 113) Jost P.C., Griffith O.H., Capaldi R.A. and Vanderkooi G. (1973) Biochim.Biophys.Acta 311,141
- 114) Jost P.C., Nadakavukaren K.K. and Griffith O.H. (1977) Biochemistry 16,3110
- 115) Knowles P.F. (1979) Biochemistry 18,4480
- 116) Dehlinger P.J., Jost P.C. and Griffith O.H. (1974) Proc.Natl. Acad.Sci.U.S. 71,2280
- 117) Stier A. and Sackmann E. (1973) Biochim.Biophys.Acta 311,400
- 118) Bennett J.P., Mc Gill K.A. and Warren G.B. (1978) Nature 274,823
- 119) Denes A.S. and Stanacev N.Z. (1978) Can.J.Biochem. 56,905
- 120) Falk K.E. and Karlsson B. (1979) FEBS Lett. 98,25
- 121) Kang S.Y., Gutowsky H.S., Hsung J.C., Jacobs R., King T.E., Rice D. and Oldfield E. (1979) Biochemistry 18,3257

- 122) Verma S.P., Wallach D.H.F. and Smith I.C.P. (1974) *Biochim.Biophys.Acta* 345,129
- 123) Hesketh T.R., Smith G.A., Houslay M.D., Mc Gill K.A., Birdsall N.J.M., Metcalfe J.C. and Warren G.B. (1976) *Biochemistry* 15,4145
- 124) Seelig A. and Seelig J. (1978) *Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.* 359,1747
- 125) Marsh D. and Barrantes F.J. (1978) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.* 75, 4329
- 126) Trauble H. and Overath P. (1973) *Biochim.Biophys.Acta* 307,491
- 127) Brown M.F., Miljanich G.P. and Dratz B.A. (1977) *Proc.Natl.Acad. Sci.U.S.* 74,1978
- 128) Simpkins H. and Hokin L.E. (1973) *Arch.Biochem.Biophys.* 158,897
- 129) Bertoli E., Finean J.B. and Griffiths D.E. (1976) *FEBS Lett.* 61, 163
- 130) Nixdorff K., Martin H.H., Rottem S. and Razin S. (1978) *FEBS Lett.* 94,298
- 131) Brady G.W. and Fein D.B. (1979) *Biophys.J.* 26,49
- 132) Brulet P. and Mc Connell H.M. (1976) *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 68,363
- 133) Oldfield E., Gilmore R., Glaser M., Gutowsky H.S., Hshung J.C., Kang S.Y., King T.E., Meadows M. and Rice D. (1978) *Proc.Natl. Acad.Sci.U.S.* 75,4657
- 134) Bach D., Bursuker I. and Goldman R. (1977) *BiochimBiophys.Acta* 469,171
- 135) Gomez-Fernández J.C., Goni F.M., Bach D., Restall C. and Chapman D. (1979) *FEBS Lett.* 98,224
- 136) Rosseneu M., Vercaemst R., Caster H., Lievens M.J., Van Tornout P. and Herbert P. (1979) *Eur.J.Biochem.* 96,357
- 137) Mombers C., Verkleij A.J., De Gier J. and Van Deenen L.L.M. (1979) *Biochim.Biophys.Acta* 551,271
- 138) Marcelja S. (1976) *Biochim.Biophys.Acta* 455,1
- 139) Van Zoelen E.J.J., Zwaal R.F.A., Reuvers F.A.M., Demel R.A. and Van Deenen L.L.M. (1977) *Biochim.Biophys.Acta* 464,482

- 140) Kang S.Y., Gutowsky H.S. and Oldfield E. (1979) *Biochemistry* 18, 3268
- 141) Mac Lennan D.H., Seeman P., Iles G.H. and Yip C.C. (1971) *J.Biol. Chem.* 246,2702
- 142) Robinson N.C. and Capaldi R.A. (1977) *Biochemistry* 16,375
- 143) Heron C., Corina D., and Ragan C.I. (1977) *FEBS Lett.* 79,399
- 144) Beauregard G. and Roufogalis B.D. (1977) *Biochem.Biophys.Res. Commun.* 77,211
- 145) Armitage I.M., Sharpiro D.L., Furthmayer H. and Marchesi V.T. (1977) *Biochemistry* 16,1317
- 146) Widnell C.C. (1974) *Methods Enzymol.* 32,368
- 147) Evans W.H. and Gurd J.W. (1973) *Biochem.J.* 133,189
- 148) Thilo L., Trauble H. and Overath P. (1977) *Biochemistry* 16,1283
- 149) Gorter E. and Grendel F. (1925) *J.Exp. Med.* 41,439
- 150) Danielli J.F. and Davson H. (1935) *J.Cell Comp.Physiol.* 5,495
- 151) Robertson J.D. (1966) *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 137, 421
- 152) Schmitt F.O., Bear R.S. and Palmer K.J. (1941) *J.Cell Comp. Physiol.* 18,31
- 153) Palmer K.T. and Schmitt F.O. (1941) *J.Cell Comp.Physiol.* 17,385
- 154) Finean J.B. and Burge R.E. (1963) *J.Mol.Biol.* 7,672
- 155) Caspar D.L.D. and Kirschner D.A. (1971) *Nature, New Biol.* 231,46
- 156) Blaurock A.E. and Wilkins M.H.F. (1969) *Nature* 223,906
- 157) Corless J.M. (1972) *Nature* 237,229
- 158) Blaurock A.E. and Wilkins M.H.F. (1972) *Nature* 236,313
- 159) Wilkins M.H.F., Blaurock A.E. and Engelman D.M. (1971) *Nature, New Biol.* 230,72
- 160) Harrison S.C., David A., Jumblatt J. and Darnell J.E. (1971) *J.Mol.Biol.* 60,523
- 161) Collander R. and Bärlund H. (1933) *Acta Bot. Fenn.* 11,1

- 162) Lenard J. and Singer S.J. (1966) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 56,1828
- 163) Verkleij A.J. and Ververgaert P.H. (1978) Biochim.Biophys.Acta 515,303
- 164) Branton D. (1967) Exp.Cell Res. 45,703
- 165) Wrigglesworth J.M., Packer L. and Branton D. (1970) Biochim. Biophys. Acta 205,125
- 166) Pinto da Silva P. and Branton D. (1970) J.Cell Biol. 45,598
- 167) Bretscher M.S. (1971) J.Mol.Biol. 59,351
- 168) Segrest J.P., Jackson R.L. and Marchesi V.T. (1972) Biochem. Biophys.Res.Comm. 49,964
- 169) Singer S.J. and Nicolson G.L. (1972) Science 175,720
- 170) Singer S.J. (1974) Annu.Rev.Biochem. 43,805
- 171) Cone R.A. (1972) Nature, New Biol. 236,39
- 172) Frye L.D. and Edidin M. (1970) J.Cell Sci. 7,319
- 173) Blasie J.K., Worthington C.R. and Dervey M.M. (1969) J.Mol.Biol. 39,407
- 174) Hochli M. and Hackenbrock C.R. (1979) Proc.Natl.Acad.Sci. 76, 1256
- 175) Scandella C.J., Devaux P. and Mc Connell H.M. (1972) Proc.Natl. Acad.Sci.U.S. 69,2056
- 176) Smith L.M., Smith B.A. and Mc Connell H.M. (1979) Biochemistry 18,2256
- 177) Nicolson G.L.(1976) Biochim.Biophys.Acta 457,57
- 178) Hubbell W.L. and Mc Connell H.M. (1969) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 63,16
- 179) Hubbell W.L. and Mc Connell H.M. (1969) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 64,20
- 180) Sumper M. and Traible H. (1973) FEBS Lett 30,29
- 181) Taylor R.B., Duffus P.H., Raff M.C. and De Petris S. (1971) Nature, New Biol. 233,225
- 182) Stein J.M.,Edner O.J.and Bargoot F.G.(1968) Science 162, 909

- 183) Lenard J. and Singer S.J. (1968) Science 159,738
- 184) Glaser M., Simpkins H., Singer S.J., Sheetz M. and Chan S.I. (1970) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 65,721
- 185) Edelman G.M. (1976) Science 192,218
- 186) Harrison R. and Lunt G.G. (1980) "Biological Membranes; Their Structure and Function"; Blackie and Son Limited; Glasgow and London.
- 187) Rothman J.E. and Lenard J. (1977) Science 195,743
- 188) Op de Kamp J.A.F. (1979) Annu.Rev.Biochem. 48,47
- 189) Van Meer G., Poorthuis J.H.M., Wirtz K.W.A., Op de Kamp J.A.F. and Van Deenen L.L.M. (1980) Eur.J.Biochem. 103,283
- 190) Shaw J.M., Moore E.J., Patzer M.C., Correa Freire M.C., Wagner R.R. and Thompson T.E. (1979) Biochemistry 18,583
- 191) Zilversmit D.B. and Hughes M.E. (1977) Biochim.Biophys.Acta 469,99
- 192) Van den Besselar A.M.H.P., De Kruijff B., Van den Bosch H. and Van Deenen L.L.M. (1978) Biochim.Biophys.Acta 510,242
- 193) Laugley K.E. and Kennedy E.P. (1979) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.. 76,6245
- 194) Bell R.M., Ballas L.M. and Coleman R.A. (1981) J.Lipid Res. 22, 391
- 195) Coleman R. (1973) Biochim.Biophys Acta 300,1
- 196) Yu L., Yu C-A. and King T.E. (1973) Biochemistry 12,540
- 197) Bruni A., Van Dijk P.W.M. and De Gier J. (1975) Biochim.Biophys. Acta 406,315
- 198) Gazzotti P., Bock H.C. and Fleischer S. (1975) J.Biol.Chem. 250, 5782
- 199) Linden C.D., Wright K.L., Mc Connell H.M. and Fox C.F. (1973) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 70,2271
- 200) Sandermann H. (1976) FEBS Lett. 63,59
- 201) Dean W.L. and Fanford C. (1977) J.Biol.Chem. 252,3551
- 202) O'Brien T.A., Blake I.I.R., and Gennis R.B.(1977) Biochemistry 16, 3105

- 203) Gatt S. and Barenholz Y. (1973) *Annu.Rev.Biochem.* 42,61
- 204) Gazzotti P., Bock H.G. and Fleischer S. (1974) *Biochem.Biophys. Res.Comm.* 58,309
- 205) Lu A.Y.H. (1976) *Fed.Proc.* 35,2460
- 206) Yu C-A., Yu L. and King T.E. (1975) *J.Biol.Chem.* 250,1383
- 207) Jurtshuk P., Sekuzu I. and Green D.E. (1961) *Biochem.Biophys. Res.Comm.* 6,71
- 208) Wilschut J.C., Regts J. and Scherphof G. (1976) *FEBS Lett.* 63,328
- 209) Eytan G.D., Matheson M.J. and Racher E. (1976) *J.Biol.Chem.* 251, 6831
- 210) Ragan C.I. and Hinkle P.C. (1975) *J.Biol.Chem.* 250,8472
- 211) Kimelberg H.K. and Papahadjopoulos D. (1974) *J.Biol.Chem* 249,1071
- 212) Kimelberg H.K. and Papahadjopoulos D. (1972) *Biochim.Biophys. Acta* 282,277
- 213) Dixon M. and Webb E.C. (1964) "Enzymes" pp 145-166. Longmans, London
- 214) Han M.H. (1972) *J.Theoret.Biol.* 35,543
- 215) Levy H.M., Sharon N., Ryan E.M. and Koshland D.E. (1962) *Biochim. Biophys.Acta* 56,118
- 216) Zeylemaker W.P., Jansen H., Veeger C. and Slater E.C. (1971) *Biochim.Biophys.Acta* 242,14
- 217) Kumamoto J., Raison J.K. and Lyons J.M. (1971) *J.Theoret.Biol.* 31,47
- 218) Pechey D.T., Graham A.B. and Wood G.C. (1978) *Biochem.J.* 175,115
- 219) Raison J.K. (1973) *J.Bioenergetics* 4,285
- 220) Mc Murchie E.J. and Raison J.K. (1979) *Biochim.Biophys.Acta* 554, 364
- 221) Wodtke E. (1976) *J.Comp.Physiol.B* 110,145
- 222) Houslay M.D. and Palmer R.W. (1978) *Biochem.J.* 174,909
- 223) Massey V. (1953) *Biochem J.* 53,72

- 224) Massey V., Curti B. and Ganther H. (1966) J.Biol.Chem. 241,2347
- 225) Edelbradek J. (1957) Ann.Rev.Physiol. 19,59
- 226) Silvius J.R., Read B.D. and Mc Elhaney (1978) Science 199,902
- 227) Lyons J.M. and Raison J.K. (1970) Plant Physiol. 45,386
- 228) Lyons J.M. and Asmundson C.M. (1965) J.Am.Oil Chem.Soc. 42,1056
- 229) Doty P. and Yang J.T. (1956) J.Am.Chem.Soc. 78,498
- 230) Exner O. (1964) Nature 201,488
- 231) Lyons J.M. and Raison J.K. (1970) Comp.Biochem.Physiol. 37,405
- 232) Mabrey S., Powis G., Schenkman J.B. and Tritton T.R. (1977) J. Biol.Chem. 252,2929
- 233) Stanley K.K. and Luzio J.P. (1978) Biochim.Biophys.Acta 514,198
- 234) Silvius J.R. and Mc Elhaney R.N. (1980) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 77,1255
- 235) Wunderlich F., Ronai A., Speth V., Seelig J. and Blume A. (1975) Biochemistry 14,3730
- 236) Thilo L. and Overath P. (1976) Biochemistry 15,328
- 237) Houslay M.D., Hesketh T.R., Smith G.A., Warren G.B. and Metcalfe J.C. (1976) Biochim.Biophys.Acta 436,495
- 238) Heron C., Gore M.G. and Ragan C.I. (1979) Biochem.J. 178,415
- 239) Houslay M.D., Warren G.B., Birdsall N.J.M. and Metcalfe J.C. (1975) FEBS Lett. 51,146
- 240) Morriset J.D., Pownall H.J., Plumlee R.T., Smith H.C., Zehner Z. E., Esfoni M. and Wakil S.J. (1975) J.Biol.Chem. 250,6969
- 241) Esko J.D., Gilmore J.R. and Gluser M.(1977) Biochemistry 16,1881
- 242) Sato N., Murata N., Miura Y. and Veta N. (1979) Biochim.Biophys. Acta 572,19
- 243) Njus D., Sulzman F.M. and Hastings J.W. (1974) Nature 248,116
- 244) Danks S.M. and Tribe M.A. (1979) J.Therm.Biol. 4,183
- 245) Raison J.K., Lyons J.M. and Thompson W. (1971) Arch.Biochem. Biophys. 142,83

- 246) Hughey R.P., Coyle P.J. and Curthoys N.P. (1979) *J.Biol.Chem.* 254,1127
- 247) Lenaz G., Curatola G., Mazzanti L., Parenti-Castelli G. Bartoli E. (1978) *Biochem.Pharmacol.* 27,2835
- 248) Parenti-Castelli G., Sechi A.M., Landi L., Cabrini L., Moscarello S. and Lenaz G. (1979) *Biochim.Biophys.Acta* 547,161
- 249) Berezney R., Awasthi Y.C. and Crane F.L. (1970) *J.Bioenergetics* 1, 57
- 250) Hesketh T.R., Smith G.A., Houslay M.D., Mc Gill K.A., Birdsall N.J.M., Metcalfe J.C. and Warren G.B. (1976) *Biochemistry* 15,311
- 251) Strittmatter P. and Rogers M.J. (1975) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.* 72,2658
- 252) Enoch H.G., Catalá A. and Strittmatter P. (1976) *J.Biol.Chem.* 251,5095
- 253) Tudor Wynn-Williams A. (1976) *Biochem.J.* 157,279
- 254) Hinz H.J. and Sturtevant J.M. (1972) *J.Biol.Chem.* 247,6071
- 255) Warren G.B., Houslay M.D., Metcalfe J.C. and Birdsall N.J.M. (1975) *Nature* 255,684
- 256) Hardwicke P.M.D. (1976) *Eur.J.Biochem.* 62,431
- 257) De Kruijff B., Van Dijck P.W.M., Goldbach R.W., Demel R.A. and Van Deenen L.L.M. (1973) *Biochim.Biophys.Acta* 330,269
- 258) Cronan J.E. and Gelmann R.P. (1975) *Bacteriol.Rev.* 39,232
- 259) Dipple I. and Houslay M.D. (1978) *Biochem.J.* 174,179
- 260) Shechter E., Letellier L. and Gulik-Krzywicki T. (1974) *Eur.J. Biochem.* 49,61
- 261) Van Heerikhuizer H., Kwak E., Van Bruggen E.F.J. and Witholt B. (1975) *Biochim.Biophys.Acta* 413,177
- 262) Letellier L., Mouddeu H. and Shechter E. (1977) *Proc.Natl.Acad. Sci.U.S.* 74,452
- 263) Baldassare J.J., Rhinehart K.B. and Silbert D.F. (1976) *Biochemistry* 15,2986
- 264) Denes A.S. and Stanacev N.Z. (1979) *Can.J.Biochem.* 57,238
- 265) Inesi G., Millman M. and Eletr S. (1973) *J.Mol.Biol.* 81,483

- 266) Duppel W. and Ullrich V. (1976) *Biochim.Biophys.Acta* 426,399
- 267) Richardson T., Tappel A.L. and Grager E.H. (1961) *Arch.Biochem. Biophys.* 94,1
- 268) Watson K., Houghton R.L., Bertoli E. and Griffiths D.E. (1975) *Biochem.J.* 146,409
- 269) Janoff A.S., Haug A. and Mc Groarty E.J. (1979) *Biochim.Biophys.Acta* 551,56
- 270) Traüble H. and Bibl H. (1974) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.* 71,214
- 271) Ito T., Onishi S.I., Ishinaga M. and Kito M. (1975) *Biochemistry* 14,3064
- 272) Galla H.J. and Sackmann E. (1975) *Biochim.Biophys.Acta* 401,509
- 273) Papahadjopoulos D., Moscarello M., Eylar E.H. and Isac T. (1975) *Biochim.Biophys.Acta* 401,317
- 274) Sandhoff K. and Pallman B. (1978) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.* 75,122
- 275) Strittmatter W.J., Hirata F. and Axelrod J. (1979) *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 88,147
- 276) Moore B.M., Lentz B.R. and Meissner G. (1978) *Biochemistry* 17, 5248
- 277) Sinensky M., Minneman K.P. and Molinoff P.B. (1979) *J.Biol.Chem.* 254,9135
- 278) Hirato F., Strittmatter W.J. and Axelrod J. (1979) *Proc.Natl. Acad.Sci.U.S.* 76,368
- 279) Siñeriz F., Morero H. and Farías R.N. (1978) *Biochim.Biophys. Acta* 513,78
- 280) Castuma C. and Brenner R.R. (1982) *Biochim.Biophys. Acta* (en prensa)
- 281) Davis R.A., Kern F., Showalter R., Sutherland E., Sinensky M. and Simon F. (1978) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.* 75,4130
- 282) Lippiello P.M., Holloway C.T., Garfield S.A. and Holloway P.W. (1979) *J.Biol.Chem.* 254,2004
- 283) Fisher P.B., Flamm M., Schachter D. and Weinstein I.B. (1979) *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 86,1063
- 284) Lenaz G., Curatola G., Mazzanti L. and Parenti-Castelli G. (1978) *Mol.Cell.Biochem.* 22,3

- 285) Giese G., Fromme I. and Wunderlich F. (1979) Eur.J.Biochem 95, 275
- 286) Di Rienzo J.M. and Inouye M. (1979) Cell 17,155
- 287) Scaroit A.J. and Gallily R. (1979) Immunology 36,199
- 288) Amatruda J.M. and Finch E.D. (1979) J.Biol.Chem. 254,2619
- 289) Nohl H. (1979) Z.Gerontol 12,9
- 290) Shiga T., Maeda N., Suda T., Kon K. and Sekiya M. (1979) Biochim.Biophys.Acta 553,84
- 291) Burleson G.R., Kulpa C.F., Edwards H.E. and Thomas J.K. (1978) Exp.Cell Res. 116,291
- 292) Fraley R.T., Yen G.S.L., Lueking D.R. and Kaplan S. (1979) J. Biol.Chem. 254,1987
- 293) Georgescould D. and Duclohier H. (1978) Biochem.Biophys.Res. Commun. 85,1186
- 294) Nathan I., Fleischer G., Livne A., Dvilausky A. and Parola A.H. (1979) J.Biol.Chem. 254,9822
- 295) Brenner R.R. (1977) Drugs Metabolism Reviews 6,155
- 296) Loud A.V. (1968) J.Cell Biol. 37,27
- 297) Weibel E.R., Stäubli W., Gnägi H.R. and Hess F.A. (1969) J.Cell Biol. 42,68
- 298) Wibo M., Amar-Costesec A., Berthet J. and Beaufay H. (1971) J. Cell Biol. 51,52
- 299) Adelman M.R., Blobel G. and Sabatini D.D. (1974) Methods Enzymol. 31,201
- 300) Glaumann H. and Dallner G. (1968) J.Lipid Res. 9,720
- 301) Davison S.C. and Wills E.D. (1974) Biochem.J. 140,461
- 302) Lee T-C. and Snyder F. (1973) Biochim.Biophys.Acta 291,71
- 303) Hammer C.T. and Wills E.D. (1978) Biochem.J. 174,585
- 304) Nyquist S.E., Matschiner J.T. and Morr   D.J. (1971) Biochim. Biophys.Acta 244,645

- 305) Glaumann H., Bergstrand A. and Ericson J.L.E. (1975) J.Cell Biol. 64,356
- 306) Siekevitz P. (1962) Methods Enzymol. 5,61
- 307) De Pierre J.W. and Dallner G. (1975) Biochim.Biophys.Acta 415, 411
- 308) Welton A.F. and Aust S.D. (1974) Biochem.Biophys.Res.Commun. 56,898
- 309) Beaufay H., Amar-Costesec A., Thinès-Sempoux D., Feytmans E., Robbi M. and Berthet J. (1974) J.Cell Biol. 61,201
- 310) Svensson H., Dallner G. and Ernster L. (1972) Biochim.Biophys. Acta 274,447
- 311) Glaumann H. and Dallner G. (1970) J.Cell Biol. 47,34
- 312) Nilsson O. and Dallner G. (1975) FEBS Lett. 58,190
- 313) Oshino N. and Omura T. (1973) Arch.Biochem.Biophys. 157,395
- 314) Kunyama Y. (1972) J.Biol.Chem. 247,2979
- 315) Nilsson O., Peterson E. and Dallner G. (1973) J.Cell Biol. 56, 762
- 316) Lewis J.A. and Tata J.R. (1973) Biochem.J. 134,69
- 317) Nilsson O. and Dallner G. (1977) Biochim.Biophys.Acta 464,453
- 318) Nilsson O.S. and Dallner G. (1977) J.Cell Biol. 72,568
- 319) Sundler R., Sarcione L., Alberts A.W. and Vagelos P.R. (1977) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 74,3350
- 320) Higgins J. and Davson R.M.C. (1977) Biochim.Biophys.Acta 470,342
- 321) Stier A. (1976) Biochem.Pharmacol. 25,109
- 322) Stier A., Kühnle W. and Rosen R. (1977) in "Microsomes and Drug Oxidation" (Ullrich V. ed.) Pergamon Press, Oxford and New York
- 323) De Kruijff B., Van der Besselaar A.M.P.H., Cullis P.R., Van der Bosch H. and Van Deenen L.L.M. (1978) Biochim.Biophys Acta 514,1
- 324) Wisnieski B.J., Huang Y.O. and Fox F.C. (1974) J.Supram.Struct. 2,593
- 325) Narasimhulu S. (1978) Biochim.Biophys.Acta 544,381

- 326) Blazyk I.F. and Steim I.M. (1972) *Biochim.Biophys.Acta* 266,737
- 327) Duppel W. and Dahl G. (1976) *Biochim.Biophys.Acta* 426,408
- 328) Duppel W. and Ullrich V. (1974) *Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem.* 355,1188
- 329) Yang C.S., Strickhart F.S. and Kicha L.P. (1977) *Biochim.Biophys. Acta* 465,362
- 330) Peterson J.A., Ebel R.E., O'Keefe D.H., Matsubara T. and Estabrook R.W. (1976) *J.Biol.Chem.* 251,4010
- 331) Eleur S., Zakim D. and Vessey D.A. (1973) *J.Mol.Biol.* 78,351
- 332) Raison J.K. and Mc Murchie E.J. (1974) *Biochim.Biophys.Acta* 363,135
- 333) Grisham C.M. and Barnett R.E. (1973) *Biochemistry* 12,2635
- 334) Charnock J.S. and Bashford C.L. (1975) *Mol.Pharmacol.* 11,766
- 335) Zakim D. and Vessey D.A. (1975) *J.Biol.Chem.* 250,342
- 336) Martonosi A. (1974) *FEBS Lett.* 47,327
- 337) Imai Y. (1961) *J.Biochem (Tokyo)* 49,462
- 338) Bloomfield D.K. and Bloch K. (1960) *J.Biol.Chem.* 235,337
- 339) De Tomás M.E., Peluffo R.O. and Mercuri O. (1973) *Biochim.Biophys.Acta* 306,149
- 340) Mercuri O., Peluffo R.O. and De Tomás M.E. (1974) *Biochim.Biophys.Acta* 369,264
- 341) De Tomás M.E., Mercuri O. and Peluffo R.O. (1975) *Lipids* 10,360
- 342) Brenner R.R. (1974) *Mol.Cell.Biochem.* 3,41
- 343) Brenner R.R. (1971) *Lipids* 6,567
- 344) Ninno R.E., De Torrenzo M.P.de, Castuma J.C. and Brenner R.R. (1974) *Biochim.Biophys.Acta* 360,124
- 345) Peluffo R.O., Gomez Dumm I.N.T.de, Alaniz M.J.T.de, and Brenner R.R. (1971) *J.Nutr.* 101,1075
- 346) Alaniz M.J.T.de, and Brenner R.R. (1976) *Mol.Cell.Biochem.* 12,81
- 347) Gomez Dumm I.N.T. de, Alaniz M.J.T.de, and Brenner R.R. (1976) *J.Lipid Res.* 17,616

- 348) Gomez Dumm I.N.T.de, Alaniz M.J.T.de, and Brenner R.R. (1975) J. Lipid Res. 16,264
- 349) Castuma J.C., Catalá A. and Brenner R.R. (1972) J.Lipid Res. 13, 783
- 350) Oshino N., Imai Y. and Sato R. (1966) Biochim.Biophys.Acta 128, 13
- 351) Scherer G. and Weis W. (1978) Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 359,1527
- 352) Holloway P.W. (1971) Biochemistry 10,1556
- 353) Gurr M.I. and Robinson M.P. (1970) Eur.J.Biochem. 15,335
- 354) Oshino N. and Sato R. (1971) J.Biochem.(Tokyo) 69,169
- 355) Oshino N. and Sato R. (1972) Arch.Biochem.Biophys. 149,369
- 356) Hiwatashi I., Ichikawa I. and Yamano T. (1975) Biochim.Biophys. Acta 388,397
- 357) Strittmatter P., Spatz L., Corcoran D., Rogers M.J., Setlow B. and Redline R. (1974) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 71,4565
- 358) Rogers M.J. and Strittmatter P. (1973) J.Biol.Chem. 248,800 .
- 359) Leto T.L. and Holloway P. (1979) J.Biol.Chem. 254,5015
- 360) Rogers M.J. and Strittmatter P. (1975) J.Biol.Chem. 250,5713
- 361) Ito A. (1974) J.Biochem (Tokyo) 75,787
- 362) Strittmatter P., Rogers M.J. and Spatz L. (1972) J.Biol.Chem. 247,895
- 363) Rogers M.J. and Strittmatter P. (1974) J.Biol.Chem. 249,895
- 364) Rogers M.J. and Strittmatter P. (1974) J.Biol.Chem. 249,5565
- 365) Sullivan M.R. and Holloway P.W. (1973) Biochem.Biophys.Res.Commun. 54,808
- 366) Morris L.J., Harris R.V., Kelley W. and James A.T. (1968) Biochem.J. 109,673
- 367) Morris L.J. (1970) Biochem.J. 118,681
- 368) Johnson A.R. and Gurr M.I. (1971) Lipids 6,78

- 369) Brenner R.R. and Peluffo R.O. (1969) *Biochim.Biophys.Acta* 176,471
- 370) Holloway P.W. and Katz J.T. (1972) *Biochemistry* 11,3689
- 371) Leon M., Bonfils C. and Debey P. (1978) *Arch.Biochem.Biophys.* 191,216
- 372) Seelig A. and Seelig J. (1974) *Biochemistry* 13,4839
- 373) Peluffo R.O., Nervi A.M. and Brenner R.R. (1976) *Biochim.Biophys. Acta* 441,25
- 374) Paulsrud J.R., Stewart S.E., Graff G. and Holman R. (1970) *Lipids* 5,611
- 375) Holloway C. and Holloway P.W. (1975) *Arch.Biochem.Biophys.* 167,496
- 376) Fulco A.J. (1974) *Annu.Rev.Biochem.* 43,215
- 377) Sinensky M. (1974) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.* 71,522
- 378) Reiser R., Stevenson B., Kayama M., Choudhury R.B.R. and Wood D. W. (1963) *J.Am.Oil Chem.Soc.* 40,507
- 379) De Torrenco M.P.de, and Brenner R.R. (1976) *Biochim.Biophys.Acta* 424,36
- 380) Harris P. and James A.T. (1969) *Biochim.Biophys.Acta* 187,13
- 381) Nozawa Y. and Kasai R. (1978) *Biochim.Biophys.Acta* 529,54
- 382) Skriver L. and Thompson G.A. (1979) *Biochim.Biophys.Acta* 572,376
- 383) Martin C.E., Hiramitsu K., Kitajima Y., Nozawa Y., Skriver L. and Thompson G.A. (1976) *Biochemistry* 15,5213
- 384) Kasai R., Kitajima Y., Martin C.E, Nozawa Y., Skriver L. and Thompson G.A. (1976) *Biochemistry* 15,5228
- 385) Nordlie R.C. and Arion W.J. (1964) *J.Biol.Chem.* 239,1680
- 386) Arion W.J. and Nordlie R.C. (1964) *J.Biol.Chem.* 239,2752
- 387) Hanson T.L., Lueck J.D., Horne R.N. and Nordlie R.C. (1970) *J. Biol.Chem.* 245,6078
- 388) Lueck J.D. and Nordlie R.C. (1970) *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 39,120

- 389) Nordlie R.C. and Arion W.J. (1965) J.Biol.Chem. 240,2155
- 390) Snoke R.E. and Nordlie R.C. (1967) Biochim.Biophys.Acta 139,190
- 391) Soodsma J.F. and Nordlie R.C. (1969) Biochim.Biophys.Acta 191,
636
- 392) Stetten M.R. and Burnett F.F. (1967)Biochim.Biophys.Acta 139,138
- 393) Arion W.J., Carlson P.W., Wallin B.K. and Lange A.L. (1972) J.
Biol.Chem. 247,2551
- 394) Vianna A.L. and Nordlie R.C. (1969) J.Biol.Chem. 244,4027
- 395) Arion W.J. and Nordlie R.C. (1967) J.Biol.Chem. 242,2207
- 396) Hanson T.L. and Nordlie R.C. (1970) Biochim.Biophys.Acta 198,66
- 397) Nordlie R.C., Arion W.J., Hanson T.L., Gilsford J.R. and Horne
R.N. (1968) J.Biol.Chem. 243,1140
- 398) Arion W.J., Wallin B.K., Carlson P.W. and Lange A.J. (1972) J.
Biol.Chem. 247,2558
- 399) Arion W.J., Ballas L.M., Lange A.J. and Wallin B.K. (1976) J.
Biol.Chem. 251,4901
- 400) Leskes A., Siekevitz P. and Palade G.E. (1971) J.Cell Biol. 49,
264
- 401) Leskes A., Siekevitz P. and Palade G.E. (1971) J.Cell Biol. 49
288
- 402) Wallin B.K. and Arion W.J. (1973) J.Biol.Chem. 248,2380
- 403) Arion W.J., Wallin B.K., Lange A.J. and Ballas L.M. (1975) Mol.
Cell.Biochem. 6,75
- 404) Arion W.J., Lange A.J. and Ballas L.M. (1976) J.Biol.Chem. 251,
6784
- 405) Arion W.J., Lange A.J. and Walls H.E. (1980) J.Biol.Chem. 255,
10387
- 406) Ballas L.M. and Arion W.J. (1977) J.Biol.Chem 252,8512
- 407) Nilsson O.S., Arion W.J., De Pierre J.W., Dallner G. and Ernster
L. (1978) Eur.J.Biochem. 82,627
- 408) Arion W.J., Lange A.J., Walls H.E. and Ballas L.M. (1980) J.
Biol.Chem. 255,10396

- 409) Zakim D. and Edmondson (1982) J.Biol.Chem. 257,1145
- 410) Zakim D. (1970) J.Biol.Chem. 245,4953
- 411) Duttera S.M., Byrne W.L. and Ganoza M.C. (1968) J.Biol.Chem. 243,2216
- 412) Garland R.L., Cori C.F. and Chang H.F.W. (1974) Proc.Natl.Acad. Sci.U.S. 71,3805
- 413) Cater B.R., Trivedi P. and Hallinan T. (1975) Biochem.J. 148,279
- 414) Dyatlovitskaya E.V., Lemenovskaya A.F. and Bergelson L.D. (1979) Eur.J.Biochem. 99,605
- 415) Gornall A.G., Bardwill C.J. and David M.M. (1949) J.Biol.Chem. 177,751
- 416) Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. (1951) J.Biol.Chem. 193,265
- 417) Folch J., Lees M. and Sloane-Stanley G.H. (1957) J.Biol.Chem. 226,497
- 418) Chen P.S., Toribara T. and Huber W. (1956) Anal.Chem. 28,1756
- 419) Nutter L.J. and Privett O.S. (1968) J.Chromatog. 35,519
- 420) Miyake Y., Gaylor J.L. and Mason H.S. (1968) J.Biol.Chem. 243, 5788
- 421) Brenner R.R. and Peluffo R.O. (1966) J.Biol.Chem. 241,5213
- 422) Baginski E.S., Foa P.P. and Zak B. (1974) in "Methods of enzymatic analysis" (Bergmeyer H.V. ed.) Verlag Chemie, Academic Press, Vol. 2 pp 876
- 423) Weber G. (1953) Adv.Prot.Chem. 8,415
- 424) Steimberg I.Z. (1975) in "Biochemical Fluorescence Concepts" (Chen R.A. and Edelhock H. eds.) Vol. I pp 79, Marcel Dekker, New York
- 425) Stryer L. (1968) Science 162,526
- 426) Shinitzky M., Dianoux A.G., Gitler C. and Weber G. (1971) Biochemistry 10,2106
- 427) Bashford C.L., Morgan C.G. and Radda G.K. (1976) Biochim.Biophys. Acta 426,157

- 428) Shinitzky M. and Barenholz Y. (1974) J.Biol.Chem. 249,2652
- 429) Shinitzky M. and Inbar M. (1976) Biochim.Biophys.Acta 433,133
- 430) Shinitzky M. (1974) Israel J. of Chemistry 12,879
- 431) Chen L.A., Dale R.E., Roth S. and Brand L. (1977) J.Biol.Chem. 252,2163
- 432) Kawato S., Kinoshita K. and Ikegami A. (1977) Biochemistry 16, 2319
- 433) Lacowicz J.R., Prendergast F.G. and Hogen D. (1979) Biochemistry 18,508
- 434) Veath W.R. and Stryer L. (1977) J.Mol.Biol. 117,1109
- 435) Kawato S., Kinoshita K. and Ikegami A. (1978) Biochemistry 17, 5026
- 436) Glatz P. (1978) Anal.Biochem. 87,187
- 437) Hildenbrand K. and Nicolau C. (1979) Biochim.Biophys.Acta 553, 365
- 438) Kinoshita K., Kawato S. and Ikegami A. (1977) Biophys.J. 20,289
- 439) Jahnig F. (1979) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 76,6361
- 440) Heyn M. (1979) FEBS Lett. 108,359
- 441) Andrich M.P. and Vanderkooi J.M. (1976) Biochemistry 15,1257
- 442) Van Blitterwijk W.J., Van Hoeven R.P. and Van Der Meer B.W. (1981) Biochim.Biophys.Acta 644, 323
- 443) Ingram D.J.E. (1969) "Biological and Biochemical Applications of electron spin resonance", Adan Hilger LTD, London
- 444) Seelig J. (1970) J.Am.Chem.Soc. 92,3881
- 445) Goldman S.A., Bruno G.V., Polnaszek C.F. and Freed J.H. (1972) J.Phys.Chem. 56,716
- 446) Hwang J.S., Mason R.P., Hwang L.P. and Freed J.H. (1975) J.Phys. Chem. 79,485
- 447) Chapman D., Williams R.M. and Landbrooke B.D. (1967) Chem.Phys. Lipids 1,445

- 448) Warren G.B., Toon P.A., Birdsall N.J.M., Lee A.G. and Metcalfe J.C. (1974) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 71,622
- 449) Barenholz Y., Gibbes D., Litman B.J., Goll J., Thompson T.E. and Carlson F.D. (1977) Biochemistry 16,2806
- 450) Waggoner A.S., Kingzett T.J., Rothschafer S., Griffith O.H. and Keith A.D. (1969) Chem.Phys.Lipids 3,245
- 451) Mc Connell H.M. and Mc Farland B.G. (1970) Quart.Rev.Biophys. 3, 91
- 452) Libertine L.J., Waggoner A.S., Jost F.C. and Griffith O.H. (1969) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 64,13
- 453) Chignell C.F. and Chignell D.A. (1975) Biochem.Biophys.Res.Commun. 62,136
- 454) Eletr S. and Inesi G. (1972) Biochim.Biophys.Acta 290,178
- 455) Thompson G.A. and Nozawa Y. (1977) Biochim.Biophys.Acta 472,55
- 456) Brenner R.R., Garda H., Leikin A.I. and Pezzano H. (1980) Acta Physiol.Latinoam. 30,225
- 457) Farías R.N., Bloj B., Morero R.D., Siñeriz F. and Trucco R.S. (1975) Biochim.Biophys.Acta 415,231
- 458) Brenner R.R., Garda H., Gomez Dumm I.N.T.de, and Pezzano H. (1981) Progr.Lipid Res. 20,315
- 459) Lentz B.R., Barenholz Y. and Thompson T.E. (1976) Biochemistry 15,4521
- 460) Catalá A., Nervi A.M. and Brenner R.R. (1975) J.Biol.Chem. 250, 7481
- 461) Overath P., Erenner M., Gulik-Krzywicki T., Schechter E. and Letellier L. (1975) Biochim.Biophys.Acta 389,358
- 462) Faucon J.F., Dufourcq J., Lussan C. and Bernon R. (1976) Biochim. Biophys.Acta 436,283

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS UTILIZADOS

ATP	5'Adenosina trifosfato
c	relación molar de marcador (ácido 5-doxil esteárico) a lípido
c.m.c.	concentración micelar crítica
CoA	coenzima A
Ddiff.	coeficiente de difusión lateral
DMPC	dimiristoil fosfatidilcolina
DMPE	dimiristoil fosfatidiletanolamina
DMPS	dimiristoil fosfatidilserina
doxil	4,4'-dimetil-N-oxil oxazolidina
DOPC	dioleil fosfatidilcolina
DOPE	dioleil fosfatidiletanolamina
DPH	1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno
DPPC	dipalmitoil fosfatidilcolina
DPPE	dipalmitoil fosfatidiletanolamina
ΔH	ancho de la línea central del espectro de ESR del ácido 5-doxil esteárico
$\Delta H_{dip.}$	ensanchamiento de la línea central del espectro de ESR debido a las interacciones dipolo-dipolo
ΔH_{hex}	ensanchamiento de la línea central del espectro de ESR debido al intercambio de energía por colisiones
ΔH_o	ancho de la línea central del espectro de ESR para el marcador infinitamente diluido en un medio diamagnético
ΔT	ancho de la transición de fase (= $T_s - T_i$)
E_a	energía de activación aparente
EDTA	etilen diamino tetraacetato
ESR	resonancia electrónica paramagnética
F	intensidad de fluorescencia total (= $I_{//} + 2I_{\perp}$)
G-6-P	glucosa-6-fosfato
G-6-Pasa	glucosa-6-fosfato fosfohidrolasa
h _o	intensidad de la línea central del espectro de ESR
h ₋₁	intensidad de la línea de alto campo del espectro de ESR del grupo doxilo
I _{//}	intensidad de fluorescencia detectada con ambos, polarizador y analizador, en posición vertical

I _⊥	intensidad de fluorescencia detectada con el polarizador en posición vertical y el analizador horizontal
M-6-P	manosa-6-fosfato
M-6-Pasa	manosa-6-fosfato fosfohidrolasa
NMR	resonancia magnética nuclear
	microviscosidad aparente
p	grado de polarización de fluorescencia
PC	fosfatidilcolina
PE	fosfatidiletanolamina
PG	fosfatidilglicerol
PI	fosfatidilinositol
PS	fosfatidilserina
r	anisotropía de fluorescencia
r _s	anisotropía de fluorescencia determinada con excitación continua
r _∞	anisotropía de fluorescencia de tiempo de decaimiento infinito
r ^o	anisotropía de fluorescencia límite en un medio totalmente congelado
S	parámetro de orden
S _{DPH}	parámetro de orden determinado de la polarización de la fluorescencia del DPH
T' _{//}	separación hiperfina del espectro de ESR de ácidos doxil esteáricos, medido con la normal a la superficie de la bicapa paralela al campo magnético aplicado. En nuestro caso se midió de la separación entre el primer máximo y el último mínimo
T' _⊥	separación hiperfina del espectro de ESR de ácidos doxil esteáricos, medido con la normal a la superficie de la bicapa perpendicular al campo magnético aplicado. En nuestro caso se estimó de la distancia entre el primer mínimo y el último máximo
TCA	ácido tricloroacético
T _i	temperatura del límite inferior de la transición de fase
Tris	2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propandiol
T _s	temperatura del límite superior de la transición de fase
	temperatura transición de fase

INDICE

CAPITULO I: INTRODUCCION

- I.1. GENERALIDADES
- I.2. CARACTERISTICAS DE LAS PROTEINAS DE MEMBRANAS
- I.3. ESTRUCTURAS LIQUIDO-CRISTALINAS. CARACTERISTICAS DE LOS LIPIDOS DE MEMBRANAS
- I.4. MOVILIDAD Y ORDEN. (TRANSICIONES DE FASE)
- I.5. SEPARACIONES DE FASE
- I.6. EFECTO DE LA INCORPORACION DE COLESTEROL EN BICAPAS LIPIDICAS
- I.7. INTERACCIONES ENTRE LIPIDOS Y PROTEINAS
- I.8. ESTRUCTURA DE LAS MEMBRANAS BIOLOGICAS
- I.9. ENZIMAS DE MEMBRANA. REGULACION DE SU ACTIVIDAD POR LIPIDOS
- I.10. EFECTO DE LA FLUIDEZ DE LA MEMBRANA SOBRE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS INTEGRALES. TRANSICIONES DE FASE Y CURVAS DE ARRHENIUS
- I.11. ESTRUCTURA Y FUNCION DE LA MEMBRANA DEL RETICULO ENDOPLASMICO
- I.12. SISTEMA DESATURANTE DE ACIDOS GRASOS
- I.13. DESATURACION Y COMPOSICION LIPIDICA DE LA MEMBRANA
- I.14. SISTEMA DE LA GLUCOSA-6-FOSFATASA
- I.15. RESUMEN Y OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO

CAPITULO II: MATERIALES Y METODOS

- II.1. PROCEDENCIA DEL MATERIAL UTILIZADO
- II.2. ANIMALES Y DISTAS
- II.3. OBTENCION DE LA FRACCION MICROSOMAL
- II.4. DETERMINACIONES ANALITICAS
 - II.4.1. Determinación de proteínas
 - II.4.2. Analisis de lípidos
 - a) Extracción
 - b) Cuantificación de fosfolípidos
 - c) Composición de lípidos
 - d) Composición de ácidos grasos
 - II.4.3. Determinación de citocromo b5 y citocromo b5 reductasa

- II.5. DETERMINACIONES ENZIMATICAS.
- II. .1.Actividad de las enzimas desaturantes de ácidos grasos
- II.5.2.Actividad del sistema de transporte de electrones
- II.5.3.Actividad del sistema de la glucosa-6-fosfatasa
- II.5.4.Curvas de Arrhenius
- II.5.5.Latencia de la actividad manosa-6-fosfatasa
- II.6. DETECCION DE LA TRANSICION DE FASE ORDEN-DESORDEN POR LIGHT SCATTERING
- II.7. DETECCION DE LA TRANSICION DE FASE POR LA FLUORESCENCIA DE N-FENIL-1-NAFTILAMINA
- II.8. POLARIZACION DE FLUORESCENCIA
- II.8.1.Teoría general
- II.8.2.Polarización de fluorescencia en medios fluidos
- II.8.3.Viscosidad en estructuras líquido-cristalinas. Concepto de microviscosidad
- II.8.4 Cálculo de la microviscosidad del grado de polarización de fluorescencia
- II.8.5.Grado ordenamiento estructural en las membranas. Parámetro de orden S_{DPPH}
- II.8.6.Procedimiento experimental
- II.9. DETERMINACIONES DE RESONANCIA ELECTRONICA PARAMAGNETICA
- II.9.1.Teoría general. Principios básicos
- II.9.2.Efecto de la movilidad y el orden sobre el espectro de ESR
- II.9.3.Radicales nitroxilos
- II.9.4.Parámetro de orden S
- II.9.5.Procedimiento experimental
- II.9.6.Determinación del coeficiente de difusión lateral del ácido 5-doxil esteárico
- II.10. INCORPORACION DE LIPIDOS EXOGENOS EN MICROSOMAS
- II.11. MICROSCOPIA ELECTRONICA
- II.12. MODIFICACION DE LA FLUIDEZ DE LA MEMBRANA POR LA INCORPORACION DE ALCOHOLES DE BAJO PESO MOLECULAR

CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSION

III.1. ESTRUCTURA Y ACTIVIDAD ENZIMATICA DE MICROSOMAS DE HIGADO DE RATA	133
III.1.1. Composición lipídica de la membrana microsomal	133
III.1.2. Determinaciones de resonancia electrónica paramagnética	133
a) Movilidad de las cadenas hidrocarbonadas	133
b) Parámetro de orden S	140
c) Influencia de la temperatura sobre la movilidad y el grado de orden	141
d) Difusión lateral del ácido 5-doxil esteárico en la membrana	146
III.1.3. Determinaciones espectrofluorométricas y ópticas	148
a) Fluorescencia de N-fenil-1-naftilamina y light scattering	148
b) Polarización de fluorescencia	151
III.1.4. Efecto de la temperatura sobre la actividad de enzimas microsomales	159
a) Sistema de la glucosa-6-fosfatasa	159
b) Sistema desaturante de ácidos grasos	163
III.1.5. Discusión	169
a) Estructura de la membrana microsomal	169
b) Actividad y curvas de Arrhenius de enzimas microsomales	172
III.2. EFECTO DE LA CARENCIA DE ACIDOS GRASOS ESENCIALES SOBRE LA ESTRUCTURA DE LA MEMBRANA MICROSOMAL Y SOBRE LA ACTIVIDAD DE ALGUNAS ENZIMAS MICROSOMALES	175
III.2.1. Efecto de la deficiencia en ácidos grasos esenciales sobre la composición lipídica de la membrana microsomal	175
III.2.2. Efecto de la deficiencia en ácidos grasos esenciales sobre la estructura de la membrana microsomal	180
III.2.3. Efecto de la deficiencia en ácidos grasos esenciales sobre la actividad de las ácido graso desaturasas y la transferencia de electrones	192
III.2.4. Efecto de la deficiencia en ácidos grasos esenciales sobre las curvas de Arrhenius de enzimas microsomales	199
a) Sistema de la Glucosa-6-fosfatasa	199

b) Sistema desaturante de ácidos grasos y transporte de electrones	199
III.2.5. Discusión	202
III.3. EFECTO DE LA TRANSICION DE FASE ORDEN-DESORDEN SOBRE LAS CURVAS DE ARRHENIUS DE ENZIMAS MICROSOMALES	209
III.3.1. Comparación entre distintos métodos para detectar la transición de fase en bicapas lipídicas	209
III.3.2. Modificación de la composición lipídica de la membrana microsomal "in vitro"	212
a) Fusión de liposomas de DMPC con microsomas de hígado de rata	215
b) Substitución de los lípidos microsomales por DMPC	219
c) Integridad de las vesículas microsomales modificadas por fusión y substitución	222
d) Solubilización de microsomas y reconstitución con fosfolípidos exógenos	226
e) Recuperación de actividades enzimáticas en las membranas modificadas	229
III.3.3. Efecto de la transición de fase orden-desorden de las membranas modificadas sobre las curvas de Arrhenius de la glucosa-6-fosfatasa	232
III.3.4. Efecto de la transición orden-desorden de los lípidos de membranas modificadas sobre la actividad NADH-ferricianuro reductasa	235
III.3.5. Transición de fase en membranas modificadas por la incorporación de lecitinas exógenas y su efecto sobre las curvas de Arrhenius de la actividad NADH-citocromo c reductasa	237
III.3.6. Discusión	264
a) Incorporación de lecitinas exógenas en la membrana microsomal	264
b) Efecto de la transición orden-desorden de los lípidos de la membrana sobre la actividad del sistema de la glucosa-6-fosfatasa	265
c) Efecto de la transición de fase de los lípidos de la membrana sobre el sistema de transporte de electrones dependiente del citocromo b ₅	267
III.4. EFECTO DE ALCOHOLES ALIFATICOS DE BAJO PESO MOLECULAR SOBRE LA FLUIDEZ DE LA MEMBRANA MICROSOMAL Y ACTIVIDAD DE ENZIMAS ASOCIADAS A ESA MEMBRANA	274

III.4.1. Efecto del n-butanol y del isoamilol sobre el grado de depolarización de la fluorescencia emitida por el DPH incorporado en la membrana microsomal	274
III.4.2. Efecto del n-butanol y el isoamilol sobre la actividad del sistema desaturante de ácidos grasos y la cadena de transporte de electrones asociada	281
III.4.3. Efecto del alcohol isoamílico sobre la actividad del sistema de la glucosa-6-fosfatasa	287
III.4.4. Discusión	290
III.5. CONCLUSIONES GENERALES	294
BIBLIOGRAFIA	299
ABREVIATURAS Y SIMBOLOS UTILIZADOS	322