



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
IZTACALA**

**DISTRIBUCION DE ACIDOS GRASOS EN  
FOSFOINOSITIDOS DE MEMBRANA PLASMATICA DE  
LEVADURA ( *Saccharomyces carlsbergensis* )**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**B I O L O G O**

P R E S E N T A:

**LEONARDO PEREA MARTINEZ**



LOS REYES IZTACALA, MEX.

1994



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**A mis padres, por darme el regalo de la vida**

**A mis hermanos, por brindarme su amistad**

**A mi esposa y a mis hijos, con mucho cariño**

**A mis amigos y compañeros**

**Al Dr. J. Víctor Calderón Salinas, por su apoyo y consejos**

**A la Q.F.B. Elvira Rios Leal, del área de cromatografía del departamento de Biotecnología del CINVESTAV, por su colaboración en la realización de este trabajo.**

**Este trabajo se realizó en el laboratorio 17 del departamento de Bioquímica del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), con la dirección del Dr. José Víctor Calderón Salinas, y fue apoyado parcialmente por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).**

**" Lo que está quieto se sostiene fácilmente; lo que no ha sucedido se puede resolver; lo frágil se rompe en seguida; lo pequeño se puede dispersar. Prevenir antes de que suceda y ordenar antes de la confusión. El árbol gigante nació de un germen diminuto; la torre de nueve pisos dio comienzo por un ladrillo; un viaje de mil kilómetros se inicia con un paso. No es raro que un hombre fracase cuando está a punto de conseguir el éxito. Cuidando del final tanto como del inicio ninguna obra se perdería "**

*Lao Tse*

## INDICE

### Página

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Antecedentes.....	9
Objetivos.....	13
Estrategias.....	14
Materiales y reactivos.....	15
Metodologías.....	16
Resultados y análisis.....	22
Discusión.....	48
Conclusiones.....	53
Lista de símbolos y abreviaturas.....	54
Bibliografía.....	55

## RESUMEN

Una de las propiedades que caracterizan a las membranas biológicas es la asimetría funcional y estructural entre sus caras externa e interna, inicialmente descrita para las proteínas y posteriormente en los lípidos. Estos últimos, por sus características, presentan ciertos problemas metodológicos que complican el estudio de su distribución transmembranal.

En los estudios realizados sobre asimetrías de lípidos existen algunas contradicciones entre diferentes autores utilizando el mismo modelo experimental, principalmente en determinaciones indirectas.

La mayoría de las determinaciones, realizadas en células animales, indican que existe una asimetría estructural entre los fosfolípidos y algunos esfingolípidos (esfingomiolina) de la cara externa e interna de la membrana plasmática.

En el presente trabajo se propone una metodología para analizar la asimetría de los ácidos grasos de fosfatidilinositol de la membrana plasmática de *Saccharomyces carlsbergensis*, utilizando una fosfolipasa tipo C, específica para este fosfoglicérido, y cromatografía de gases.

De nuestros resultados se puede concluir que además de haber una asimetría de ácidos grasos, debida a la asimetría de los fosfolípidos que integran, también existen diferencias en la composición de ácidos grasos del fosfatidilinositol de la cara externa e interna de la membrana plasmática de levaduras.

## INTRODUCCION

La membrana plasmática es una barrera semipermeable que separa a la célula de su medio, sin embargo, permite la entrada y salida de sustancias por medio de sistemas específicos de transporte, regulando la composición iónica y molecular del medio intracelular. Por otra parte, también controla el flujo de información entre células, por medio de receptores específicos.

La membrana plasmática está constituida por lípidos, proteínas y carbohidratos, los cuales pueden estar asociados como glicoproteínas, glicolípidos o proteolípidos. Los tres principales lípidos membranales son los fosfolípidos, los glicolípidos y el colesterol; de estos, sólo los fosfolípidos y los glicolípidos contienen ácidos grasos.

Los fosfolípidos de las membranas se hallan ordenados en bicapas formando una matriz. En esta bicapa, las moléculas lipídicas individuales pueden moverse lateralmente, dotando a la bicapa de fluidez y flexibilidad, además de una resistencia eléctrica elevada y de relativa impermeabilidad respecto a las moléculas muy polares (37).

Estructuralmente, los fosfolípidos pueden ser derivados del glicerol (fosfoglicéridos) o de la esfingosina (esfingolípidos); un fosfoglicérido está formado por una molécula de glicerol en la cual están unidas dos cadenas de ácidos grasos y un alcohol

fosforilado. Los alcoholes que habitualmente contienen los fosfoglicéridos son: etanolamina, colina, glicerol e inositol, los cuales forman a los fosfolípidos correspondientes; en la figura 1 se muestra un esquema de los diferentes



alcoholes y de la colina estructurada como fosfoglicérido.

De acuerdo a las propiedades fisicoquímicas de sus grupos funcionales, los fosfolípidos son moléculas anfipáticas, esto es, moléculas que contienen regiones hidrofóbicas (cadenas alifáticas) y regiones hidrofílicas (cabezas polares). Esta propiedad de anfipatía les permite organizarse en forma de bicapas, permitiendo que se tengan dos caras polares que verían ambos ambientes acuosos de la membrana y una región apolar intermedia, formando de esta manera, la estructura básica trilaminar de una membrana, tal y como se esquematiza en la figura 2, donde puede observarse la localización de las dos caras de la membrana.

Los esfingolípidos contienen tres componentes básicos característicos: un esqueleto de esfingosina o de uno de sus derivados, una molécula de ácido graso y una cabeza polar, la cual, en algunos esfingolípidos, es muy grande y compleja.

Además de los componentes anteriores, los triglicéridos son otro tipo de compuestos que contienen ácidos grasos, 3 ácidos grasos esterificados a glicerol; sin embargo, su concentración en la membrana plasmática es reducida. También existe una pequeña proporción de ácidos grasos libres en las membranas biológicas, la membrana plasmática no es la excepción y contiene solamente el 0.4 % de ácidos grasos libres (26). De manera que la mayor proporción de ácidos grasos en la membrana plasmática se encuentran esterificados en los fosfolípidos.

Los análisis de la composición global de los ácidos grasos en los fosfolípidos, han mostrado que la longitud de cadena puede variar entre 14 y 24 átomos de carbono, siendo

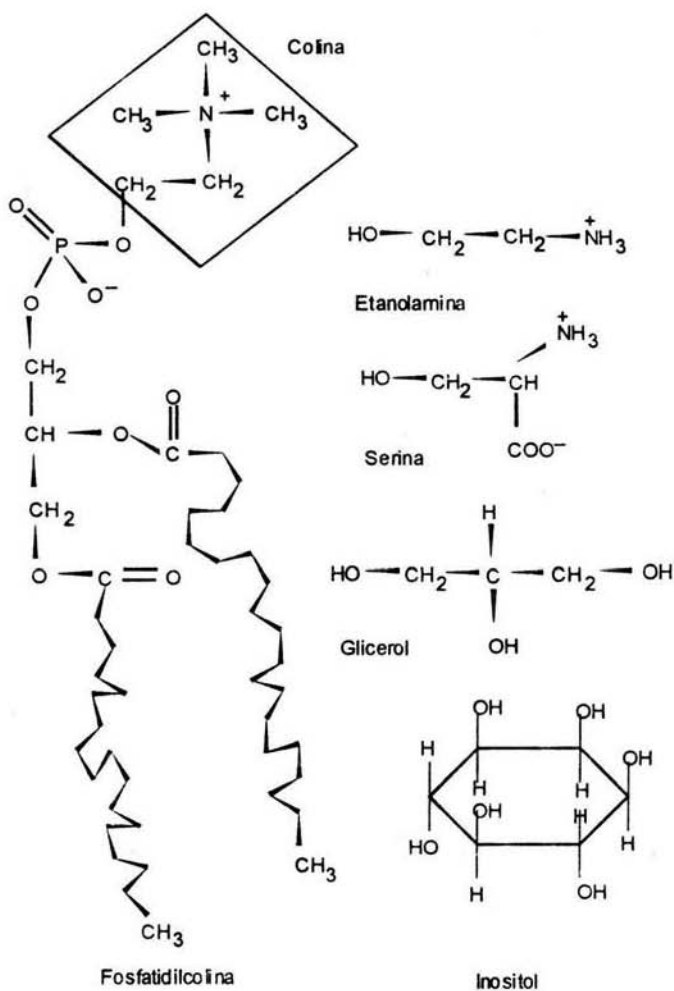


Figura 1.- Estructura de los alcoholes que habitualmente contienen los fosfoglicéridos.

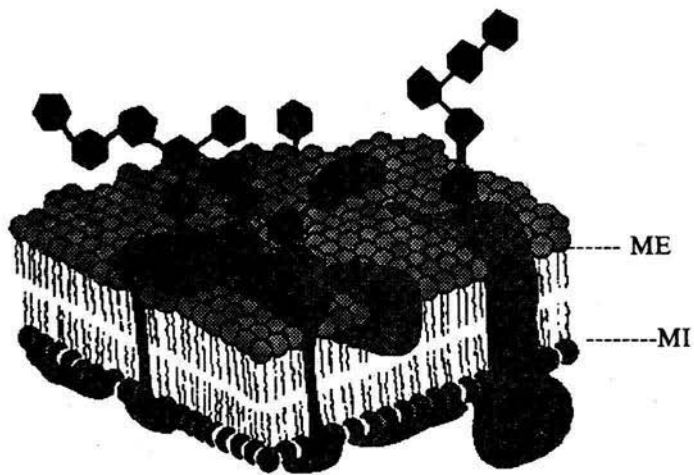


Figura 2.- Modelo de membrana donde pueden observarse las monocapas externa (ME) e interna (MI).

las de 16 y 18 las mas comunes; asi mismo, se ha encontrado que el cociente de ácidos grasos saturados/no saturados es cercano a uno.

Algunos autores han mostrado que diferentes grupos de fosfolípidos pueden tener diferente composición de ácidos grasos; por ejemplo, en eritrocitos humanos se ha encontrado que la fosfatidilserina (FS) y la fosfatidiletanolamina (FE) contienen mayor número de ácidos grasos insaturados que la fosfatidilcolina y la esfingomielina (13,38). Lo anterior hace pensar que las modificaciones en la composición de ácidos grasos de los diferentes grupos de fosfolípidos podrían tener importancia no sólo estructural, sino también funcional.

Los ácidos grasos que componen un fosfolípido tienen influencia sobre algunas propiedades características de la membrana plasmática, tal como la fluidez y la permeabilidad (40). También se ha encontrado que los ácidos grasos participan en algunas funciones regulatorias de la membrana, como segundos mensajeros; tal es el caso del ácido araquidónico, un precursor de prostaglandinas, prostaciclina y leucotrienos, moléculas de importancia en la regulación metabólica (39).

Otra propiedad característica de las membranas biológicas es la asimetría entre sus dos caras; se sabe que funcionalmente ambas caras de la membrana son diferentes, y estudios recientes indican que tanto la composición de las proteínas como la de fosfolípidos, difieren entre ambas caras de la membrana; es decir, que la asimetría funcional de la membrana tiene un sustento estructural.

En estudios realizados con liposomas se ha encontrado cierta dependencia de la

distribución externa-interna de los fosfolípidos con la densidad de carga y el tamaño de la cabeza polar, además de las cadenas hidrocarbonadas. Debido a la configuración de los dobles enlaces, los fosfolípidos con ácidos grasos insaturados tenderían a predominar en la monocapa menos compacta, según el equilibrio termodinámico (39); en las células, la compactación de la monocapa interna de la membrana plasmática no es tan pronunciada, debido a que no existe una gran curvatura de la membrana, dado por el tamaño de la misma. De cualquier manera, el que los ácidos grasos insaturados de los fosfolípidos tuvieran predominancia en la cara externa no podría explicar su empleo como segundos mensajeros, dado que las enzimas de degradación son intracelulares (39).

Uno de los mecanismos que se ha propuesto para la formación de membranas asimétricas es el movimiento transmembranal de los lípidos, el cual se ha propuesto que puede ocurrir a través de varios mecanismos: la traslocación simple, la traslocación facilitada o la traslocación activa, existiendo diferentes ejemplos en la literatura al respecto (13,18). La traslocación simple se explicaría por mecanismos puramente fisicoquímicos y de gradiente, a diferencia de las traslocaciones facilitada y la activa, que involucraría proteínas encargadas del proceso de "flip-flop". En estos mecanismos no se conoce la participación de las cadenas hidrofóbicas de los fosfolípidos, las cuales podrían participar facilitando la translocación de ácidos grasos libres o confiriendo especificidad a las enzimas translocasas.

Actualmente se tienen abundantes datos sobre la distribución asimétrica que presentan, en diferentes células, los aminofosfolípidos (fosfatidilserina (FS) y

fosfatidiletanolamina (FE)); aunque menos contundentes, también se tienen algunos datos sobre la distribución de fosfatidilcolina, fosfatidilinositol, esfingolípidos y colesterol.

En el caso de la distribución que presentan los ácidos grasos en las membranas biológicas, sólo se cuenta con evidencias muy indirectas. Dada la importancia estructural y funcional que estos componentes tienen, consideramos relevante estudiar la distribución de los ácidos grasos en la membrana plasmática; en el presente trabajo se enfatizó sobre la distribución de los ácidos grasos en el fosfatidilinositol de la membrana plasmática de la levadura.

Se utilizó a la levadura como modelo, debido a que es una célula que se maneja fácilmente, en cuanto a su crecimiento y a su curva de desarrollo; además de que se cuenta con datos recientes sobre su distribución de fosfolípidos membranales y, por otra parte, se tienen muy pocos datos sobre asimetrías membranales de células con pared celular, como es el caso de las levaduras y células vegetales. Además, la levadura es una célula que tiene varios de los mecanismos que se presentan en eucariontes superiores, y es factible de ser analizada por medio de marcaje radioactivo, como el del fósforo 32, entre otros.

## ANTECEDENTES

Los fosfolípidos de las membranas biológicas tienen una composición diferente en su cara interna y externa. Esta organización asimétrica de los fosfolípidos fue primero reportada por Bretscher (7,8), en membranas de eritrocitos humanos y posteriormente en otras membranas biológicas, aunque muy poco se sabe sobre la asimetría de los lípidos en células vegetales (13).

En eritrocitos, que es el modelo biológico mejor estudiado, los aminofosfolípidos (FS y FE) se localizan principalmente en la cara interna de la membrana, mientras que la fosfatidilcolina (FC) y la esfingomielina (EM) se encuentran esencialmente en la cara externa (4,8,24,25,33).

Adicionalmente a la asimetría en la distribución de los fosfolípidos, también se ha reportado que existen cambios en las composiciones de ácidos grasos que forman a los diferentes fosfolípidos; por ejemplo, FC, EM y otros esfingolípidos muestran una menor proporción de ácidos grasos insaturados que FE y FS; estos últimos son ricos, particularmente, en ácido araquidónico (13,38).

Por otra parte, dentro de una misma clase de fosfolípido se han encontrado diferencias en la composición de ácidos grasos entre el fosfolípido que se encuentra en la cara externa y el de la cara interna; en membranas de eritrocitos humanos se ha encontrado una distribución asimétrica de ácidos grasos en la EM (6); sin embargo, otros autores en el mismo sistema, no han encontrado diferencias entre la composición de los ácidos grasos de la FE externa con respecto a la interna (25).

Los estudios de fosfatidilinositol (FI), en cuanto a su distribución, han sido muy pocos, lo cual se debe en parte a la falta de estrategias de estudio adecuadas; en contraste, este fosfolípido aniónico tiene gran importancia, no sólo como responsable de la densidad de carga de superficie de las membranas, como se ha demostrado en levaduras (10), sino también por su vital papel como segundo mensajero en múltiples respuestas hormonales y por la posibilidad que de sus ácidos grasos se generen prostaglandinas (39).

Las técnicas utilizadas para determinar la asimetría de los lípidos en las membranas biológicas comprenden: A) agentes químicos que no penetran la membrana plasmática, por ejemplo el trinitrobenzeno sulfonato (TNBS) o la fluorescamina (17,18,25); B) métodos inmunológicos (14,22); C) digestión con fosfolipasas (10,42,43) y D) métodos fisicoquímicos, como resonancia magnética nuclear (3). Estas técnicas pueden tener diferentes utilidades, dependiendo del sistema y el fosfolípido que se trata de estudiar; sin embargo, para FI, y menos aún para ácidos grasos de fosfolípidos, no se cuenta en la actualidad con una técnica adecuada, por lo cual sería de gran importancia desarrollar una estrategia experimental que permitiera resolver este problema.

Frecuentemente, cuando un mismo sistema ha sido estudiado por varios laboratorios, los resultados difieren considerablemente, debido a: los problemas inherentes a las técnicas; lo variable que puede ser el estadio celular; las alteraciones de la permeabilidad de la membrana; la accesibilidad del compuesto y a los tiempos prolongados de reacción. Sin embargo, las diferentes técnicas son susceptibles de ser estandarizadas y de ofrecer una gama de resultados que, adecuadamente analizados,



constituyan un valioso avance en el estudio de la distribución de los componentes membranales.

La degradación enzimática de los fosfolípidos, con fosfolipasas, es una técnica usada ampliamente para determinar su distribución transmembranal. Las fosfolipasas tipo A, C y D, así como la esfingomielinasa, se han empleado con frecuencia para determinar topologías de diferentes fosfolípidos.

Las fosfolipasas son enzimas hidrolíticas que desdoblan las moléculas de fosfolípidos en sitios específicos. Como las enzimas se consideran no permeables, se puede argumentar que la acción de las fosfolipasas en la membrana plasmática intacta se restringe a aquellos fosfolípidos que están presentes en la cara externa de la membrana plasmática.

Si bien los productos de hidrólisis de las fosfolipasas pueden alterar la integridad de la membrana plasmática, con los controles adecuados, de los cambios de permeabilidad y estabilidad que pueda sufrir la membrana, se pueden obtener resultados cuantitativos confiables.

La mayoría de las fosfolipasas pueden actuar contra cualquier fosfolípido, pero en general tienen mayor especificidad por la fosfatidilcolina. Sin embargo, existen fosfolipasas específicas, como la fosfolipasa tipo C específica para fosfatidilinositol, que actúa sobre el FI y lo desdobla a diacilglicerol (DAG) e inositol-fosfato; esta enzima no actúa sobre la fosfatidilcolina, lo que permite tener mayor eficiencia de hidrólisis sobre el FI y aleja la posibilidad de dañar la membrana con los productos de degradación, ya

que al limitarse el sustrato (el FI constituye menos del 15 % del total de los fosfolípidos) se autolimitan los productos (10).

Recientemente, en nuestro laboratorio se han determinado las asimetrías de fosfolípidos (FS, FE y FI) de levadura, utilizando agentes químicos y enzimáticos, encontrándose una mayor proporción de FI en la cara externa de la membrana plasmática y una menor proporción de FS y de FE (10); en este trabajo se involucró a la densidad de carga de superficie y al potencial de superficie en la determinación de la asimetría de FI. Sin embargo, otros factores podrían estar involucrados.

En el presente trabajo se trató de determinar la composición de ácidos grasos de los fosfoinosítidos de la membrana plasmática de levadura (*Saccharomyces carlsbergensis*), utilizando la fosfolipasa C específica para FI, para conocer la composición de ácidos grasos de FI en ambas caras de la membrana plasmática.

## **HIPOTESIS**

Los ácidos grasos del fosfatidilinositol de la membrana plasmática se distribuyen asimétricamente, encontrándose los insaturados preferentemente en la cara interna.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la composición y distribución de los ácidos grasos del fosfatidilinositol, de la membrana plasmática de levadura.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- 1) Cuantificar los ácidos grasos de membrana de *Saccharomyces carlsbergensis*.
- 2) Conocer la distribución que tienen los ácidos grasos en la membrana plasmática con respecto al total de la célula.
- 3) Conocer la distribución de ácidos grasos del fosfatidilinositol con respecto a los otros fosfoglicéridos de la membrana plasmática.
- 4) Determinar la distribución de ácidos grasos en el fosfatidilinositol de las caras externa e interna de la membrana plasmática.

## **ESTRATEGIAS**

Para analizar los ácidos grasos de la membrana plasmática de levadura se retirará primero la pared celular por digestión enzimática con litocasa y posteriormente la membrana plasmática de los protoplastos se purificará por el método de Patton, y cols.

(2). Para determinar la composición de los fosfolípidos se emplearán células crecidas con  $^{32}\text{P}\text{-Pi}$ . La composición de los ácidos grasos del FI interno y externo se estudiará empleando la fosfolipasa C, específica para fosfatidilinositol, cuantificando los ácidos grasos en el diacilglicerol generado y el fosfatidilinositol residual. Los ácidos grasos serán determinados con cromatografía de gases.

## **MATERIALES Y REACTIVOS**

La cepa de *Saccharomyces carlsbergensis* (ATCC-9080) se obtuvo del cepario del departamento de Biotecnología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV). El  $^{32}\text{P}$ -Pi como ácido ortofosfórico, fue obtenido de New England Research. Los solventes orgánicos: cloroformo, metanol y ácido acético se compraron en E. Merck y Baker; la liticasa en Lakeside B; y la fosfolipasa C, específica para foafatidilinositol, en Sigma, J. T. Las placas para cromatografía en capa fina se elaboraron con sílica gel-G60 de Merck; el análisis de ácidos grasos se realizó en el laboratorio de cromatografía de gases del departamento de Biotecnología del CINVESTAV, en un cromatógrafo de gas, modelo Hewlett- Packard 5710A. En todos los casos se utilizaron los estándares adecuados (Lakeside B.).

## **METODOLOGIAS**

### **Cultivo de levaduras.**

Las levaduras se cultivaron durante 12 horas en un medio de cultivo que tenía: caldo de cultivo 8 g/l; extracto de levadura 3 g/l y maltosa 5 g/l. Se subcultivaron en el mismo medio durante 6 horas antes de emplearlas, en algunos casos, en presencia de 5  $\mu\text{Ci}$  de  $^{32}\text{P-Pi}$ , para marcar uniformemente los fosfolípidos.

### **Formación de protoplastos.**

El cultivo de levaduras se lavó una vez con amortiguador de fosfatos de potasio 50 mM y azida de sodio 5 mM a pH de 7.5. Después se centrifugó a 500xg por 5 min y el precipitado de levaduras se resuspendió en amortiguador de fosfatos de potasio 50 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM y sorbitol 1 M, a pH de 7.5, para tener una suspensión de células con una absorbancia de 0.8, a 600 nm. En seguida se agregaron 90 U de liticase (0.3 % del volumen final de la suspensión de células) y se incubó a 37°C durante 30 min. Posteriormente se centrifugó (500xg por 5 min) y los esferoplastos se lavaron dos veces con sorbitol 1 M.

### **Purificación de membrana plasmática.**

Los protoplastos se lavaron dos veces con amortiguador de fosfatos de potasio 50 mM y sorbitol 1 M, centrifugando a 500xg durante 5 min.; el precipitado se resuspendió

agregando gota a gota un amortiguador de fosfatos 50 mM con concanavalina-A (3.5 mg/g cel.), agitando suavemente, y se dejaron reposar 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 500xg por 5 min; se realizaron dos lavados con amortiguador y concanavalina, y se resuspendió en amortiguador de lisis: Pipes 5 mM y EDTA 2 mM a pH de 7.5 (50 ml/3 g cel.). Los protoplastos se homogenizaron en baño de hielo sonicando 5 ciclos de 30 seg. a 60 watts y el lisado se centrifugó a baja velocidad (100xg durante 5 min) para separar las células que pudieran haber quedado intactas.

El sobrenadante se centrifugó a 1500xg a 4°C durante 15 min. El precipitado conteniendo las membranas plasmáticas se incubó con cloroformo-metanol 1:1 (v/v) para extraer los lípidos de la membrana plasmática e hidrolizar y analizar sus ácidos grasos, o bien, para separar los diferentes fosfolípidos y el diacilglicerol. Una alícuota de este precipitado también se empleó para determinar la pureza de esta membrana.

#### **Actividad de la fosfolipasa C específica para FI.**

Para fosfolípidos aislados se realizó el siguiente ensayo: la mezcla de reacción fue formada por 0.1 ml de enzima (1 UI/ml), 1 ml de desoxicolato 0.8 %, 0.2 ml de borato de sodio 100 mM, pH 7.0 y 0.1 ml de una emulsión de fosfolípidos 10 mM. Se incubó por 20 min. a 37°C. La reacción se detuvo con 2.5 ml de cloroformo- metanol-HCl (66:3.3:0.1 v/v/v). Las fases se separaron y en la fase acuosa se cuantificó fosfato (inorgánico o radioactivo) y en la fase del solvente se analizaron los fosfolípidos por

cromatografía y se cuantificó la radioactividad asociada.

La reacción en las células se llevó a cabo de la siguiente manera: las células previamente marcadas con  $^{32}\text{P}\text{-Pi}$  ( $0.1\mu\text{Ci/ml}$ ) se trataron con liticasa para obtener los protoplastos, los cuales se lavaron en: tris-borato 20 mM y sorbitol 1 M a pH de 7.0; se resuspendieron en el mismo amortiguador y se incubaron a  $36^{\circ}\text{C}$  con 1-2 UI de fosfolipasa C por 20 min; la reacción se detuvo con TCA AL 10 %; de la pastilla, obtenida centrifugando a  $100\times g$  por 10 min., se extrajeron, separaron y cuantificaron los fosfolípidos por cromatografía de capa fina y la radioactividad asociada.

### **Extracción de lípidos, método I**

A las pastillas obtenidas en cada caso se agregaron 10 volúmenes de cloroformo-metanol (1:1 v/v), y se mezcló con agitación mecánica por dos min. Luego se incubó durante una hora con agitación suave y se centrifugó por 10 min a  $500\times g$ ; se colectaron los solventes en otro tubo y se agregaron 5 ml de cloroformo y 3 ml de agua, se mezcló con agitación mecánica y se centrifugó durante 5 min a  $500\times g$  desechándose la fase acuosa. La fase del solvente se purificó agregando 4 ml de cloroformo-metanol-agua (3:48:47 v/v/v), mezclando con agitación mecánica, centrifugando 1 min a  $500\times g$  y removiendo la fase acuosa.

### **Método II**

Las levaduras se lavaron 2 veces con agua y después se agregaron 5 ml de ácido



tricloro-acético al 30%, resuspendiendo las células con agitación mecánica, centrifugando (500xg por 5 min.) y desechando el sobrenadante.

La pastilla se incubó con 3 ml de metanol por 15 min a 50 °C, luego se agregaron 6 ml de cloroformo incubando otras 2 horas a 40 °C. Posteriormente se separó la fracción sólida con un filtro whatman no.1.

Al filtrado se agregaron 5 ml de cloroformo-metanol 2:1 v/v y 5 ml de KCl 2M (con unas gotas de HCl); se separó la fase acuosa después de centrifugar (500xg por 5 min) y se realizó un lavado con 3 ml de cloroformo-metanol (2:1 v/v), centrifugando (500xg por 5 min) y separando la fase acuosa.

### **Cromatografía en capa fina.**

El extracto lipídico se secó bajo una corriente ligera de nitrógeno y se aplicó a una placa cromatográfica para separar las diferentes fracciones lipídicas por corrimiento bidimensional; primer dimensión: cloroformo-metanol-agua (65:25:4 v/v/v); segunda dimensión: cloroformo-metanol-ácido acético-agua (85:20:8:4 por volumen). Los fosfolípidos y el diacilglicerol se identificaron con vapores de yodo, se rasparon de la placa y se recuperaron con cloroformo-metanol (2:1 v/v), identificándolos con estándares y reacciones características (22). En la figura 3 se muestra un cromatograma de la separación del diacilglicerol.

### **Cuantificación de la radioactividad.**

Para medir la radioactividad asociada a los fosfolípidos, estos se suspendieron en 200  $\mu$ l de cloroformo y se tomaron 10  $\mu$ l para cuantificar la radioactividad asociada, usando aquasol y detectando en un contador de centelleo líquido LS6000 TA.

### **Cuantificación de ácidos grasos**

Una alícuota de fosfolípidos, o los lípidos recuperados de las pastillas, se hidrolizaron para transmetilar los ácidos grasos con 0.5 M de hidróxido de sodio y trifluoruro de boro al 14 % en metanol, incubando a 70°C durante una hora (1). Los ésteres metilados de ácidos grasos se aplicaron a un cromatógrafo de gas modelo Hewlett-Packard 5710A, con columna FFAP 15 % Chromasorb HP 80/120m, bajo las siguientes condiciones: temperatura de inyector 250°C; temperatura de columna 235°C-8 min-1°C/min-245°C-10 min; temperatura de detector de ionización de flama 300°C; flujo de nitrógeno: 28 ml/min. La recuperación del estándar interno (C20:0 araquidato) fue del 85.2-99.7 %.

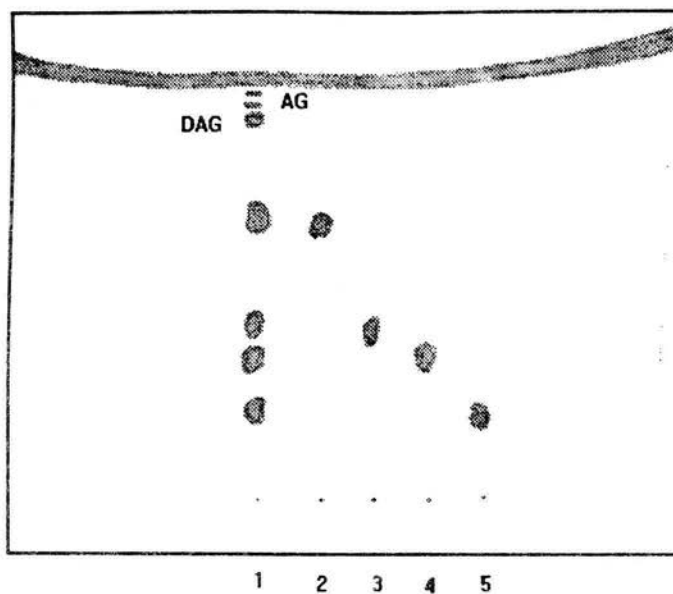


Figura 3.- Cromatograma que muestra la separación del diacilglicerol (DAG).

## RESULTADOS Y ANALISIS

### Extracción de lípidos.

La composición de ácidos grasos en la membrana plasmática (MP) depende, inicialmente, de la distribución que en ésta presenten los fosfolípidos, ya que en ellos se encuentra la mayor parte de los ácidos grasos que estructuran la membrana.

En estudios previos, realizados en nuestro laboratorio, con levaduras (*Saccharomyces carlsbergensis*), se ha encontrado que los fosfolípidos membranales: fosfatidilserina (FS), fosfatidiletanolamina (FE) y fosfatidilinositol (FI), tienen una distribución asimétrica, como se muestra en la tabla 1, tomada de un trabajo anterior (10). Los aminofosfolípidos (FE y FS), al igual que el FI, se encuentran notablemente sesgados hacia la monocapa interna de la membrana plasmática.

Dado que el interés de este estudio es el análisis de la asimetría de ácidos grasos de fosfolípidos se tuvo mucho cuidado en el proceso de extracción y cuantificación de los ácidos grasos.

Para poder cuantificar los ácidos grasos de los fosfolípidos de la MP se estandarizó la técnica de extracción de lípidos, lo cual se llevó a cabo comparando básicamente dos métodos; los resultados se muestran en las tablas 2 y 3, donde se presentan las recuperaciones de los métodos de extracción cuantificados por el  $^{32}\text{P}$ -Pi asociado a los fosfolípidos. Como puede observarse en las tablas, el porcentaje de recuperación de lípidos fue de 57.51 % y 29.86% para el método I y II respectivamente. Por lo cual, el

TABLA 1.- Asimetría de fosfolípidos de la membrana plasmática de levadura.

	% de fosfolípidos	% de fosfolípidos
Fosfolípido	Cara externa	Cara interna
FI	14.5	85.5
FS	10.3	89.7
FE	14.6	85.4

Datos tomados de la referencia 10.

TABLA 2.- Recuperación de fosfolípidos con el método de extracción I.

Fracción	c.p.m.	% de recuperación
Acuosoluble	17151	22.11
Sobrenadante 1	11474	14.79
Sobrenadante 2	4334	5.58
Extracto lipídico	44609	57.51

El método de extracción I consiste en incubar con agitación por una hora con cloroformo-metanol 1:1 y lavar el extracto lipídico. La cuantificación se realizó con  $^{32}\text{P}$ -Pi en las diferentes fracciones. Se muestran los resultados de un experimento representativo.

TABLA 3.- Recuperación de fosfolípidos con el método de extracción II.

Fracción	c.p.m.	% de recuperación
Acuosoluble	34040	29.82
Sobrenadante 1	34080	29.86
Sobrenadante 2	10410	9.12
Extracto lipídico	35600	29.86

El método de extracción II consiste en incubar durante 2 horas con cloroformo-metanol 2:1 y, junto con estos solventes, hacer un lavado con KCl ácido. La cuantificación se realizó con  $^{32}\text{P}$ -Pi en las diferentes fracciones. Se muestran los resultados de un experimento representativo.

metodo I (modificado de Folch) (15), resultó finalmente el mas efectivo, debido a que se obtuvo el mayor porcentaje de recuperación de fosfolípidos, con un error estandar menor del 5%. Es posible lograr una mayor eficiencia en la extracción con procedimientos de recuperación y reextracción, sin embargo, la reproducibilidad disminuye notablemente (desviación estandar de hasta un 35%).

La recuperación de fosfolípidos también podría aumentarse si se reduce la cantidad de lavados de la muestra, sin embargo, en este tipo de trabajos se requiere que la muestra esté lo mas pura posible, ya que la presencia de otros componentes podría modificar notablemente los resultados.

#### **Obtención de protoplastos.**

Dado que la base de la separación de ácidos grasos del FI de la monocapa externa requiere el empleo de una enzima que ataque a este fosfolípido, es indispensable que ésta tenga acceso a la mayor parte posible del FI externo, para lo cual es necesario retirar la pared celular, esto es, formar protoplastos.

La formación de protoplastos se realizó con la enzima liticasa, que ataca la pared celular. Para conocer la eficiencia de formación de protoplastos se determinó la actividad de la liticasa con el método de choque osmótico, en el cual se realiza un ensayo con y sin estabilizador osmótico (sorbitol 1M); basándonos en el hecho de que las levaduras sin pared se rompen al disminuir la osmolaridad, pero quedan íntegras al mantener la osmolaridad con sorbitol, las rupturas pueden ser evaluadas por la disminución de la

dispersión óptica a una longitud de onda de 600nm.

En la tabla 4 se muestran los resultados de los ensayos correspondientes; como se puede observar en la tabla, el agregar sorbitol permite que se establezca el protoplasto y sólo una parte de estos se rompen. La eficiencia en la formación de protoplastos se calculó en un 80%, por lo que esta preparación nos permite hacer los experimentos de manera confiable.

#### **Purificación de membrana plasmática.**

El interés del presente trabajo se centra en el conocimiento de la asimetría de los ácidos grasos que constituyen el FI de la membrana plasmática, para lo cual se tiene que tener una referencia de la composición de FI y de los ácidos grasos asociados a este fosfolípido en tal membrana.

Para poder obtener resultados cuantitativos confiables se analizó la pureza de la membrana plasmática aislada, midiendo la actividad de las enzimas características de los sistemas membranales contaminantes más frecuentes; los resultados de este estudio se muestran en la tabla 5, en la cual puede observarse que la actividad de ATPasa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  sensible a vanadato, enzima que es exclusiva de la membrana plasmática, presentó un porcentaje de  $71.2 \pm 10.2$  (promedio y desviación estándar) en nuestro purificado; mientras que la actividad de otras enzimas de naturaleza microsomal (α-manosidasa) o mitocondrial (NADP-Cit.C reductasa) fue de menos del 10% en nuestra preparación, con respecto al total. Estos resultados concuerdan con otros autores que han



TABLA 4.- Obtención de los protoplastos.

Tiempo (min)	0	15	30	45
Sorbitol - Liticasa +	0.894 ± 0.007	0.478 ± 0.014	0.311 ± 0.017	0.236 ± 0.011
Sorbitol - Liticasa +	0.898 ± 0.002	0.886 ± 0.012	0.872 ± 0.011	0.870 ± 0.014
Sorbitol + Liticasa -	0.906 ± 0.004	0.894 ± 0.008	0.904 ± 0.011	0.890 ± 0.01
Sorbitol + Liticasa -	0.806 ± 0.001	0.726 ± 0.023	0.659 ± 0.029	0.620 ± 0.025

Los datos muestran la absorbancia a 600 nm de las muestras en diferentes condiciones y tiempos de incubación. El sorbitol se empleó a 1 M y se emplearon 90 U de liticasa. Se muestra el promedio de un experimento representativo por triplicado.

TABLA 5.- Parámetros de la purificación de la membrana plasmática.

Parametro	% con respecto al homogenado total
Proteina	7.4 ± 1.9
Lipidos	36.2 ± 6.1
ATPasa (sensible a vanadato)	71.2 ± 10.2
a-Manosidasa	5.3 ± 4.1
NADP-Cit.C reductasa	14.1 ± 9.0

La membrana plasmática purificada se comparó con las células íntegras en los diferentes parámetros. Se muestra el promedio y la desviación estándar de por lo menos 3 determinaciones por triplicado.

empleado la misma técnica de purificación, coincidiendo que los resultados son lo suficientemente aceptables para hacer los cálculos correspondientes (21,27).

### **Cuantificación de ácidos grasos**

Los ácidos grasos de los fosfolípidos fueron cuantificados por cromatografía de gases, después de una hidrólisis alcalina para desesterificar y derivatizar. En la tabla 6 se muestran los datos de los ácidos grasos de los fosfolípidos totales de diferentes fracciones. En general, se puede observar que existen ácidos grasos de entre 14 y 22 carbonos, predominando los de 16 y 18 carbonos (C16 y C18).

El análisis de los ácidos grasos en células íntegras, protoplastos y membrana plasmática, mostró que sólo existen diferencias discretas entre sus composiciones, siendo mas sobresalientes en el ácido graso saturado C16:0 y el ácido graso insaturado C18:2. En general, los datos que obtuvimos son concordantes con los datos generales de la literatura (13,26).

En la tabla 6 también se puede observar que el porcentaje de los ácidos grasos insaturados de la membrana plasmática tiene valores que son cercanos a una distribución equitativa con respecto a los ácidos grasos saturados, siendo el cociente de saturados/no saturados de 1.04; en protoplastos y células íntegras esta relación es de 1.29 y 0.80, respectivamente.

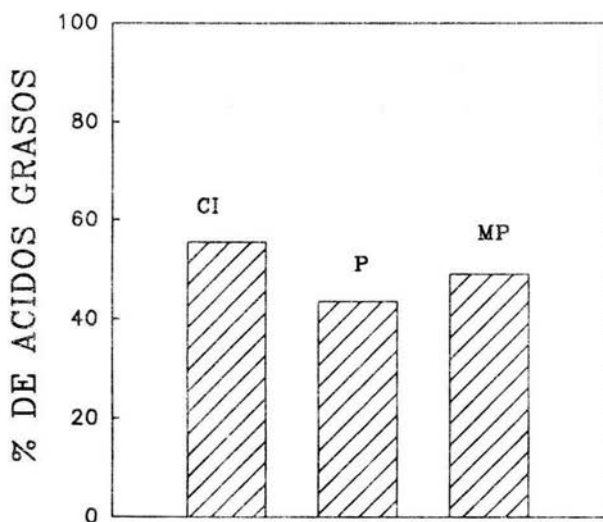
En la figura 4, se muestran los datos de la tabla anterior graficados como la proporción de ácidos grasos insaturados totales en las diferentes fracciones; en la figura

TABLA 6.- Composición de ácidos grasos de diferentes fracciones.

Acidos graso	Células íntegras	Protoplastos	Membrana plasmática
C14:0	0.51	0.73	0.69
C16:0	26.60	33.12	30.04
C16:1	3.14	3.75	2.92
C18:0	15.11	19.06	16.99
C18:1	23.21	18.86	21.08
C18:2	27.42	19.27	23.11
C18:3	0.51	0.21	0.31
C20:0	0.52	0.69	0.64
C22:0	0.90	1.02	0.93
Rel.sat/insat	0.80	1.30	1.04

Los ácidos grasos fueron desesterificados de los fosfolípidos y cuantificados con cromatografía de gases. Se muestran los resultados de un experimento representativo.

Figura 4.- Porcentaje de ácidos grasos insaturados totales de diferentes fracciones (CI= células íntegras, P= protoplastos y MP= Membrana plasmática).



Los datos de esta figura se tomaron de la tabla 6.

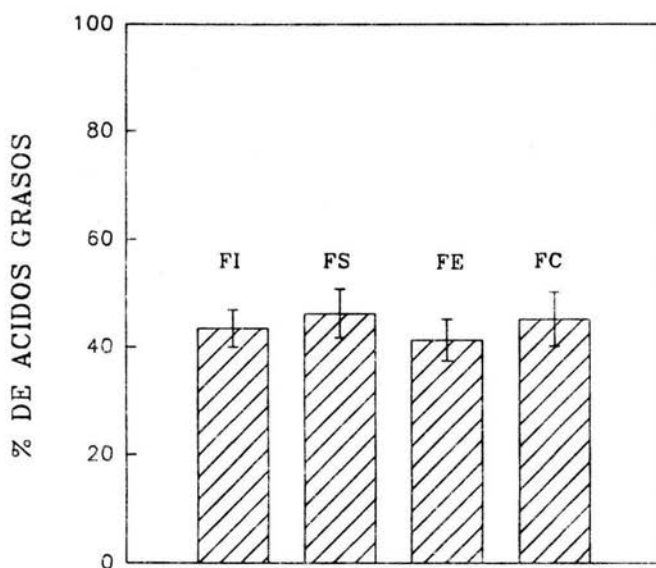
se puede observar que las células íntegras tienen un incremento en la proporción de ácidos grasos insaturados con respecto a los de la membrana plasmática, y sobre todo, esta diferencia es aún mayor con los protoplastos. Las diferencias entre las células íntegras y los protoplastos se pueden explicar como un ajuste metabólico que se logra al estar retirando la pared celular, sin embargo, esta es sólo una explicación especulativa.

Una vez determinada la proporción de ácidos grasos en el total de fosfolípidos de las diferentes fracciones, se procedió a estudiar la distribución de ácidos grasos en los diferentes fosfolípidos, los datos se muestran en la figura 5; como se puede observar, no existen diferencias significativas en la composición de ácidos grasos entre los diferentes fosfolípidos del protoplasto.

Sin embargo, a diferencia de la distribución encontrada en los protoplastos, cuando se estudió el contenido de ácidos grasos insaturados en los fosfolípidos provenientes de la membrana plasmática, se encontró que FS y FI presentan una mayor cantidad de ácidos grasos insaturados que la FE y FC, rebasando ambos el 50% del total de ácidos grasos (figura 6). Estos resultados indican que existe un enriquecimiento real de ácidos grasos insaturados en FS y FI de la membrana plasmática; enriquecimiento que no es posible observar cuando se analizan las membranas totales en células completas o protoplastos.

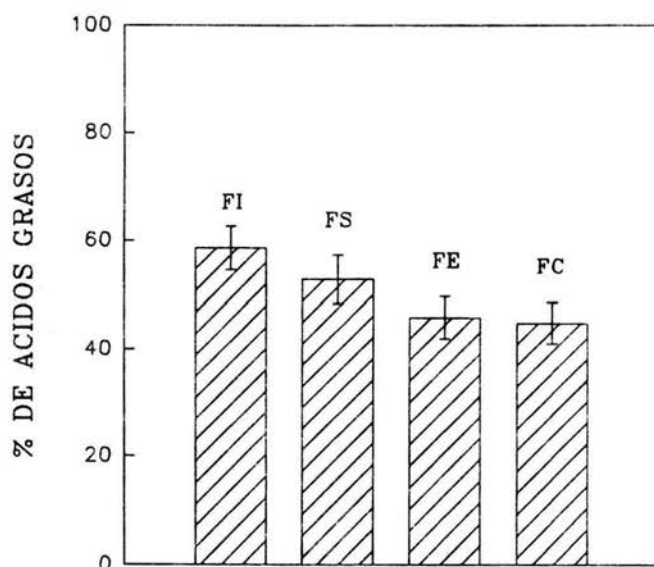
Cabe mencionar que el FI y la FS participan en funciones y propiedades específicas de la membrana plasmática, tanto en su cara externa como en la interna, por lo que podríamos pensar en que esta distribución de ácidos grasos insaturados, responde a funciones específicas de estos fosfolípidos en la membrana plasmática.

Figura 5.- Porcentaje de ácidos grasos insaturados en fosfolípidos de protoplastos.



Los ácidos grasos de los fosfolípidos se cuantificaron por cromatografía de gases. Se muestra el promedio y la desviación estandar de por lo menos 3 determinaciones por duplicado.

Figura 6.- Porcentaje de ácidos grasos insaturados en fosfolípidos de membrana plasmática.



Los ácidos grasos de los fosfolípidos se cuantificaron por cromatografía de gases. Se muestra el promedio y la desviación estandar de por lo menos 3 determinaciones duplicadas.



Si se analiza mas detenidamente la composición de ácidos grasos en FI, podemos observar (figura 7) que el porcentaje de ácidos grasos insaturados en el FI de la membrana plasmática aislada es un 20% mayor que en el total de las membranas (en protoplastos). Un discreto y no significativo incremento en la cantidad de ácidos grasos insaturados también se puede observar en FS, FE y FC de la membrana plasmática, con respecto al total de las membranas (figura 8), lo cual indica que existe una tendencia general de los fosfolípidos a presentar una mayor proporción de ácidos grasos insaturados en la membrana plasmática, diferencia que sólo es significativa para FI.

El predominio de los ácidos grasos insaturados en la membrana plasmática tiene varias ventajas; en primer lugar, le da una mayor fluidez, lo cual favorece el movimiento lateral de sus componentes, principalmente proteínas. Aunque esta interpretación debería de ser contrastada con otros estudios, debido a que los ácidos grasos no son los únicos componentes que pueden influir en esta propiedad, ya que la fluidez también puede ser influenciada por el colesterol, las mismas proteínas y las cabezas polares de los fosfolípidos (39,40).

#### **Distribución de ácidos grasos en FI de la membrana plasmática.**

Una vez determinada la composición de los diferentes fosfolípidos de la membrana plasmática, estuvimos en condiciones de estudiar cuál era la distribución de ácidos grasos del FI en la membrana plasmática. Para esto se realizaron ensayos con fosfolipasa C, específica para FI, pensando en que la enzima, al no poder penetrar al interior del

Figura 7.- Porcentaje de ácidos grasos insaturados del fosfatidilinositol de protoplastos y membrana plasmática.

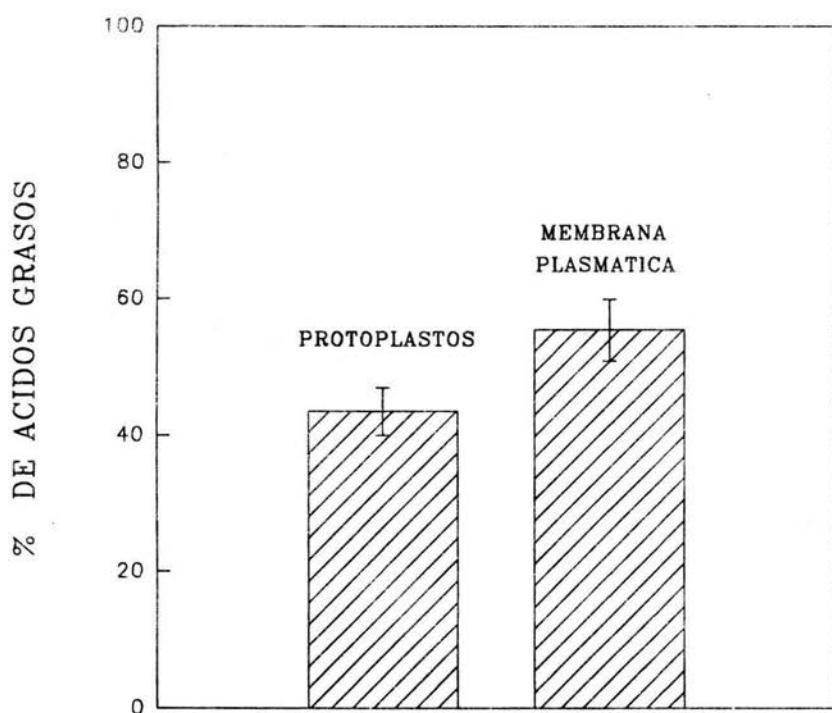
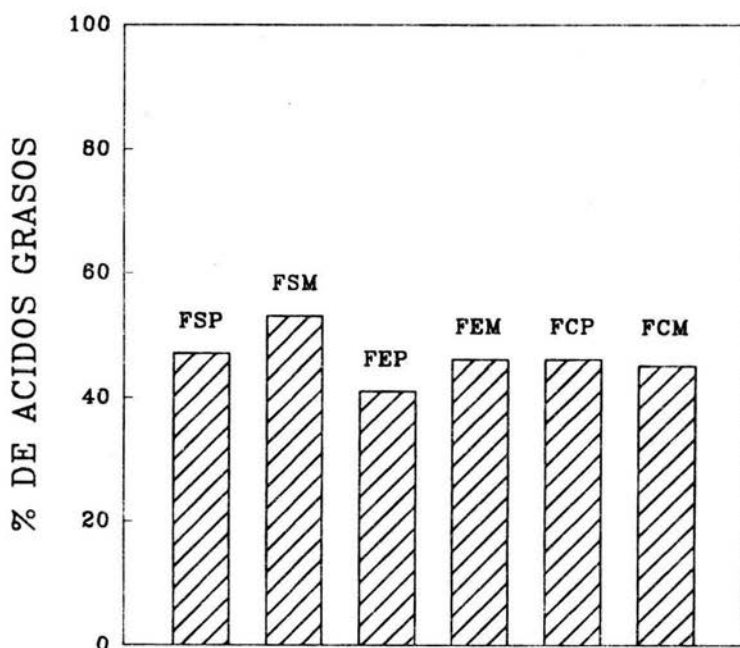


Figura 8.- Porcentaje de ácidos grasos insaturados de los fosfolípidos de protoplastos (P) y membrana plasmática (M).



protoplasto, tendría que atacar solamente el FI de la cara externa de la membrana plasmática.

La anterior aseveración es posible de aceptar si se demuestra que las células no alteran su permeabilidad; en la tabla 7 se muestran resultados que indican que la permeabilidad celular no es afectada durante la acción de la fosfolipasa-C, ya que, como se muestra en esta tabla, la salida de  $K^+$ , fosfatos y proteínas es mínima y comparable al control en los protoplastos tratados con la fosfolipasa C.

La cantidad de enzima y las condiciones del ensayo fueron similares a las empleadas en los trabajos previos del laboratorio, sin embargo, como se muestra en la tabla 8, la degradación de FI que se logró en células íntegras y en protoplastos fue mayor en estos últimos, como era de esperarse. La degradación de FI es casi un 30% mayor en protoplastos que en células íntegras, lo cual está determinado por la accesibilidad de la enzima al protoplasto.

El empleo de la fosfolipasa C, específica para FI, para cuantificar el contenido de ácidos grasos en FI de la cara externa de la membrana plasmática, se basa en principio en la posibilidad de separar el FI de la cara externa e interna y cuantificar los ácidos grasos que contienen. En nuestro sistema, la acción de la fosfolipasa C degrada el FI y forma diacilglicerol e inositol fosfato, quedando los ácidos grasos en el diacilglicerol, como se muestra en la siguiente reacción:

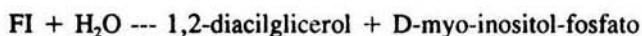


TABLA 7.- Permeabilidad de los protoplastos después de la actividad de las fosfolipasas.

	Compuesto liberado al medio externo		
	K <sup>+</sup> (pmolas/ml)	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (pmolas/ml)	Peptidos (μg/ml)
Control	2.4 ± 0.04	1.8 ± 0.10	0.7 ± 0.02
Fosfolipasa C	2.9 ± 0.07	2.1 ± 0.22	1.1 ± 0.09
Fosfolipasa A <sub>2</sub>	98.9 ± 10.8	75.5 ± 6.98	15.1 ± 1.8

El control son protoplastos sin tratamiento, la incubación con fosfolipasa C específica para FI (1 μg/ml) y con fosfolipasa A<sub>2</sub> (2 μg/ml), se realizó por 40 min, después de los cuales se centrifugó y en una alícuota del sobrenadante se determinó potasio con espectrofotometría, fosfatos con radioactividad y péptidos con espectrofotometría. Se muestra el promedio y la desviación estandar de 3 experimentos por triplicado.

TABLA 8.- Actividad de la fosfolipasa C específica para FI en células íntegras y en protoplastos.

	FI transformado
Células íntegras	2.82 ± 0.20
Protoplastos	3.89 ± 0.29

Las células o los protoplastos fueron ajustados a 10 millones/ml, la fosfolipasa se empleó en ambos casos a 10 U/ml, el resultado se expresó como la cantidad de FI que desapareció del ensayo comparado con un control sin enzima. Se muestra el promedio y la desviación estandar de tres experimentos por duplicado.

Con una actividad extensiva de la fosfolipasa tendríamos que el FI que quedara en la membrana plasmática, sería el FI de la cara interna de la membrana, el cual podría ser extraído e hidrolizado para conocer el contenido de sus ácidos grasos.

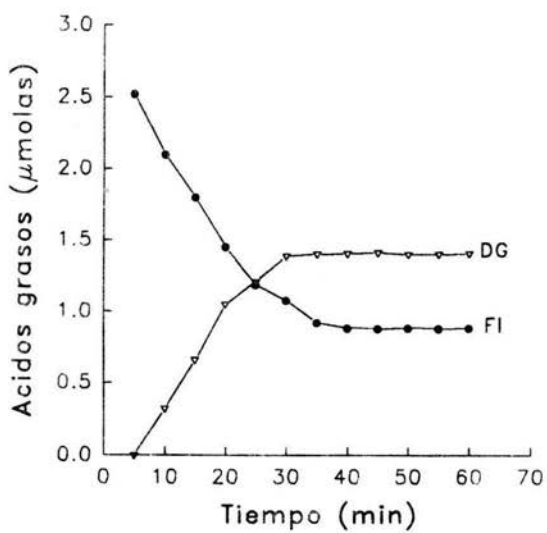
Por otro lado, el diacilglicerol que se encuentre sería el resultado del FI atacado, esto es, el FI externo, por lo que los ácidos grasos del diacilglicerol representarían los ácidos grasos del FI externo. El diacilglicerol separado por cromatografía en capa fina y recuperado con cloroformo-metanol, se pudo fraccionar en sus dos cadenas de ácidos grasos y un glicerol, por medio de una hidrólisis alcalina. De esta manera se pudo cuantificar los ácidos grasos del FI de la cara externa.

Al analizar los ácidos grasos totales del fosfatidilinositol en la membrana plasmática se restaron los obtenidos a partir del diacilglicerol para obtener los ácidos grasos totales de la monocapa interna del FI, de tal manera que los ácidos grasos detectados en el diacilglicerol deben coincidir con los ácidos grasos que se pierden en el FI residual de la reacción de la fosfolipasa C.

Los resultados de los experimentos anteriormente analizados se muestran en la figura 9, donde se puede observar que existe una relación inversa, casi estequiométrica, entre la cantidad de diacilglicerol que aparece con la cantidad que desaparece de FI.

La tabla 9 nos muestra la distribución de ácidos grasos en el FI de las monocapas externa e interna de la membrana plasmática; como puede observarse, el FI de la monocapa interna presentó un mayor porcentaje de ácidos grasos insaturados con respecto al FI de la cara externa. En general, los ácidos grasos saturados (C14:0, C16:0, C18:0,

Figura 9.- Cantidad de fosfatidilinositol (FI) hidrolizado y diacilglicerol (DG) formado a diferentes tiempos de acción de la fosfolipasa C, específica para FI.





**TABLA 9.- Composición de ácidos grasos en el FI externo e interno de la membrana plasmática de levaduras.**

Acido graso	FI externo	FI interno
C14:0	1.44	0.38
C16:0	38.12	18.04
C16:1	1.19	4.92
C18:0	20.04	10.33
C18:1	15.12	29.55
C18:2	16.94	30.88
C20:0	1.88	0.27
C22:0	2.17	0.42

El FI externo fue cuantificado del diacilglicerol después de la actividad de la fosfolipasa C específica para FI. Los ácidos grasos fueron cuantificados por cromatografía de gases. Se muestran los resultados de un experimento representativo.

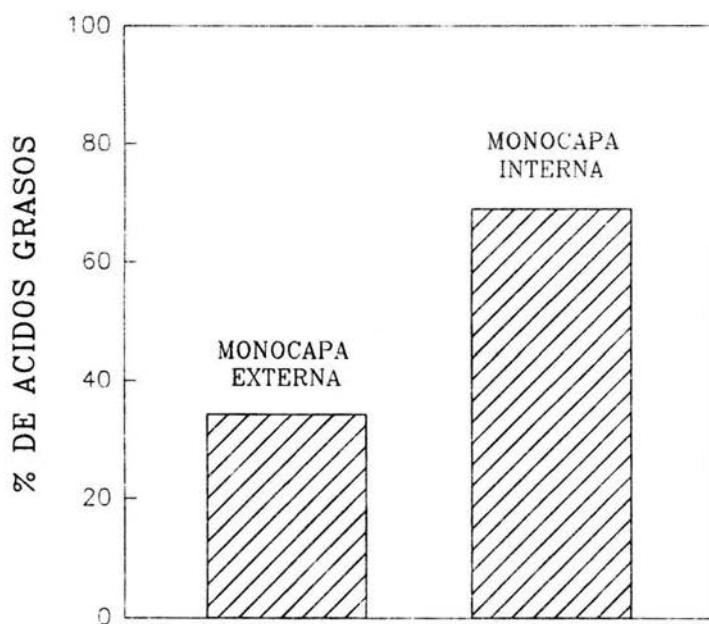
C20:0 y C22:0) se presentaron de 2 a 6 veces incrementados en el FI de la monocapa externa, mientras que en el FI de la monocapa interna los insaturados (C16:1, C18:1 y C18:2) tienen un porcentaje 2 a 3 veces mayor que en el FI externo.

Es importante resaltar que el hecho encontrado en la tabla anterior y remarcado en la figura 10, con respecto a la distribución de ácidos grasos insaturados entre FI de ambas monocapas de la membrana plasmática, no es un efecto de la distribución asimétrica del FI, que en este trabajo y en trabajos previos del laboratorio se ha postulado. Cuando realizamos la corrección de la distribución asimétrica de FI interno/externo, encontramos (figura 11) que la distribución de ácidos grasos insaturados está notablemente a favor del FI interno, lo cual indica que el FI interno contiene más ácidos grasos insaturados que el FI externo de la membrana plasmática de levadura.

No sabemos cuál es la composición de ácidos grasos del resto de los fosfolípidos (FE, FS y FC), sin embargo, si consideramos que también podrían presentar una distribución asimétrica de sus ácidos grasos, la mayor cantidad de ácidos grasos saturados en la monocapa externa podría dar a la membrana plasmática la rigidez y el soporte necesarios para mantener la individualidad necesaria de su entorno, como medio efectivo de evitar la entrada de macromoléculas que pudieran afectar a la célula; y por otro lado, al mantenerse una mayor proporción de ácidos grasos insaturados en la monocapa interna se aseguraría una constante disponibilidad de ácidos grasos que contribuyan a la formación de segundos mensajeros u hormonas, ya que estos elementos se forman a partir de derivados de ácidos grasos insaturados, principalmente, como el araquidonato y el

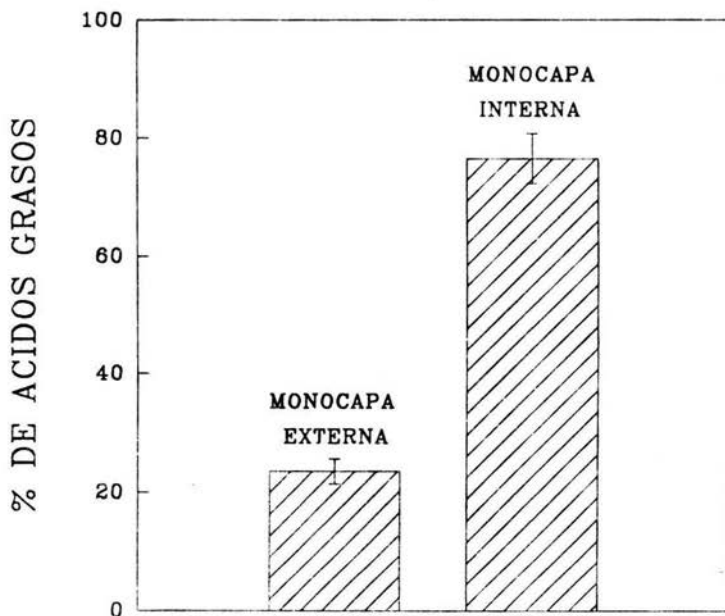
palmitolato.

Figura 10.- Porcentaje de ácidos grasos insaturados del fosfatidilinositol de las monocapas de la membrana plasmática.



Los datos de esta figura se tomaron de la tabla 9.

Figura 11.- Porcentaje de ácidos grasos insaturados del fosfatidilinositol de las monocapas de la membrana plasmática.



Los datos de esta figura se tomaron de la tabla 9 y se corrigieron tomando en cuenta la asimetría que presenta el fosfatidilinositol en la membrana plasmática de levadura.

## DISCUSION

Las nuevas técnicas bioquímicas de análisis aplicadas al estudio de la célula y sus componentes han cambiado la idea simplista que se tenía de la membrana plasmática, en el sentido de pensar en ésta como una estructura que separa dos compartimentos; en la actualidad se piensa en la membrana plasmática como un mediador dinámico altamente sofisticado entre el citoplasma y el medio externo de la célula.

Los ácidos grasos son moléculas muy importantes en la membrana plasmática, en diferentes aspectos: como componentes de los fosfolípidos y glicolípidos, como moléculas energéticas y como precursores de hormonas o mensajeros intracelulares; así mismo, los ácidos grasos libres y esterificados pueden modificar de manera importante las propiedades estructurales de la membrana, y podrían también modificar algunas capacidades funcionales dependientes de estos ácidos.

El análisis cuantitativo de los componentes estructurales, de la célula en general, y particularmente de la membrana plasmática, implica varios problemas metodológicos, lo cual ha hecho difícil el estudio de la participación de estos elementos en la fisiología de la membrana. Dentro de estos problemas tenemos la extracción, la identificación y la cuantificación de sus componentes; estos problemas se multiplican cuando queremos estudiar la distribución asimétrica de estos elementos, esta es la razón por lo cual pocos trabajos existen al respecto.

En el presente trabajo nos interesó conocer la distribución de los ácidos grasos de FI entre la cara externa y la interna de la membrana plasmática, para lo cual formamos

protoplastos que se hicieron reaccionar con una fosfolipasa C, específica para FI, en la cara externa, cuantificándose los ácidos grasos en la cara externa (en el diacilglicerol resultante de la reacción) y en la cara interna (en el FI residual de la membrana plasmática).

Con el empleo de esta estrategia experimental, aplicada con los controles adecuados, fuimos capaces de conocer la composición y distribución de los ácidos grasos en el FI de la membrana plasmática.

Esta distribución asimétrica que presentaron los ácidos grasos de el FI podría estar implicada en algunas propiedades de la membrana; sin embargo, es importante mencionar que la insaturación de los ácidos grasos no es la única característica que define las propiedades de la membrana; la longitud de cadena, la posición y número de los dobles enlaces también definen gran parte de la estructura y función de las membranas. La función primaria de los ácidos grasos insaturados, en general, es la de proveer una fase fluida para que las proteínas puedan funcionar óptimamente (40), lo cual es una propiedad de gran importancia.

La participación e importancia que especulamos podrían tener los ácidos grasos de FI en la cara interna de la membrana plasmática, se vería reforzada si otros fosfolípidos presentaran la misma asimetría de ácidos grasos; estudios en nuestro laboratorio se están llevando a cabo para establecer la distribución asimétrica de los ácidos grasos de otros fosfolípidos de la membrana plasmática.

Si no existiera una distribución asimétrica de los ácidos grasos de los otros

fosfolípidos, o incluso si la distribución fuera inversa, en cualquiera de estos casos, la concentración de ácidos grasos en la monocapa interna dependiente de FI podría ser insignificante, y su influencia sobre las propiedades generales de la membrana ser mínima.

En tales circunstancias nos quedarían dos posibilidades; una de ellas es que se formen ámulos de alta concentración de FI en las cercanías de una proteína, lo cual provocaría que se encontrara una alta densidad de estos ácidos grasos en la parte interna de la membrana en las cercanías de la proteína. Otras propiedades que podrían verse influidas por la distribución asimétrica de los ácidos grasos, serían las específicas de los fosfolípidos.

Una función directa del predominio de los ácidos grasos insaturados en la cara interna podría ser la de proveer de precursores de eicosanoides (C20), que son utilizados por el metabolismo de la célula y que en el caso de FI, se ha involucrado como un mediador en la formación de prostaglandinas, prostaciclías y leucotrienos; esta propiedad podría verse aumentada notablemente, ya que la alta densidad de FI con ácidos grasos insaturados en la monocapa interna de la MP, incrementaría notablemente la posibilidad de atacar a un FI con este tipo de cadenas insaturadas; sin embargo, ninguna de estas respuestas hormonales se han demostrado que tengan alguna función determinada en las levaduras.

Un modelo acerca de como visualizamos nuestros resultados se muestra en la figura 12; en este se representa la distribución proporcional del FI en ambas caras de la



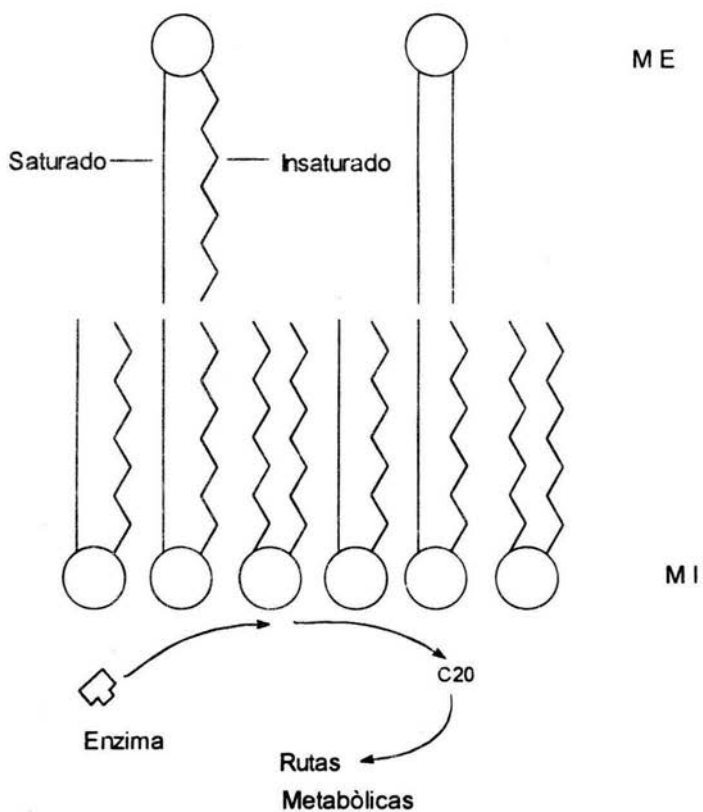


Figura 12.- Representación de la asimetría del fosfatidilinositol y de sus ácidos grasos en la membrana plasmática (ME= monocapa externa y MI= monocapa interna).

membrana, así como de los ácidos grasos que lo componen.

En la figura se resalta que el FI de la cara interna presenta un mayor porcentaje de ácidos grasos insaturados que el de la cara externa, lo cual obligaría a que una proporción de FI en la cara interna presentara dos ácidos grasos insaturados, en lugar de una cadena saturada y una insaturada, como podría esperarse si no existiera una asimetría de ácidos grasos en el FI. De igual forma, una proporción del FI de la cara externa presentaría dos ácidos grasos saturados.

En la misma figura se presenta la posibilidad de que en la monocapa interna los ácidos grasos insaturados puedan ser empleados para la formación de compuestos metabólicamente activos.

Una posible explicación de la distribución asimétrica de los ácidos grasos del FI podría ser el mecanismo de translocación de los fosfolípidos, los cuales podrían ser discriminados por procesos fisicoquímicos o por la enzima encargada del movimiento transmembranal, esto hablaría de una facilitación del FI con menos ácidos grasos insaturados para movilizarse a través de la membrana y/o una dificultad del FI con más ácidos grasos insaturados para realizar este movimiento.

## CONCLUSIONES

Del presente trabajo se puede concluir lo siguiente:

- 1.- Los protoplastos y las células íntegras presentan una relación de ácidos grasos saturados/insaturados diferente a la de la membrana plasmática, siendo esta de 1.30 para el primero y de 0.80 para las células intactas.
- 2.- Los ácidos grasos de la membrana plasmática de levadura (*Saccharomyces carlsbergensis*) presentan una relación de saturados/insaturados de 1.04.
- 3.- Los ácidos grasos de 16 y 18 carbonos son los mas abundantes en la membrana plasmática de levadura.
- 4.- El fosfatidilinositol de la membrana plasmática de levadura presenta mas ácidos grasos insaturados que el resto de los fosfoglicéridos.
- 5.- El fosfatidilinositol de la membrana plasmática de levadura de la cara interna presenta más ácidos grasos insaturados que el fosfatidilinositol de la cara externa.

## LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

C14:0	Mirístico
C16:0	Palmitico
C16:1	Palmitoleico
C18:0	Esteárico
C18:1	Oleico
C18:2	Linoleico
C18:3	Linolénico
C20:0	Araquídico
C22:0	Behenídico
Cit-C	Citocromo C
DAG	Diacilglicerol
EM	Esfingomielina
FC	Fosfatidilcolina
FE	Fosfatidiletanolamina
Fi	Fosfatidilinositol
FS	Fosfatidilserina
K <sup>+</sup>	Potasio
M	Molar
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
$\mu$ Ci	Microcuries
$\mu$ g	Microgramos
$\mu$ l	Microlitros
$\mu$ molas	Micromolas
Na <sup>+</sup>	Sodio
NADP	Niacinadenindifosfato
nm	Nanómetros
<sup>32</sup> P-Pi	Fósforo 32 como fósforo inorgánico
pmolas	Picomolas
TCA	Acido tricloroacético
TNBS	Trinitrobenzenosulfonato
U	Unidades
UI	Unidades internacionales

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Aveldaño, I.M. y Horrocks, A.Ll. (1983) Quantitative release of fatty acids from lipids by a simple hydrolysis procedure. *Journal of Lipid Research*. 24: 1101-1105.
- 2.- Bannon, D.C., Craske, D.J., Felder, L.D., Garland, J.I. y Norman, M.L. (1987) Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability. *Journal of Chromatography*. 407: 231-241.
- 3.- Berden, A.J., Barker, W.N. y Radda, K.G. (1975) NMR studies on phospholipid bilayers. Some factors affecting lipid distribution. *Biochimica et Biophysica Acta*. 375: 186-208.
- 4.- Bergelson, D.L. y Barsukov, I.L. (1977) Topological asymmetry of phospholipids in membranes. *Science*. 197: 224-230.
- 5.- Bishop, G.D., Op Den Kamp, F.A.J. y Van Deenen, M.L.L. (1977) The distribution of lipids in the protoplast membranes of *Bacillus subtilis*. *European Journal of Biochemistry*. 80: 381-391.
- 6.- Boegheim, J.P.J., Van Linde, M., Op Den Kamp, F.A.J. y Roelofsen, B. (1983) The sphingomyelin pools in the outer and inner layer of the human erythrocyte membrane are composed of different molecular species. *Biochimica et Biophysica Acta*. 735: 438-442.
- 7.- Bretscher, S.M. (1972) *Nature (London), New Biol.* 236: 11-12.
- 8.- Bretscher, S.M. (1973) Membrane structure: some general principles. *Science*. 181: 622-629.
- 9.- Calvez, Y.J., Zachowski, A., Hermann, A., Morrot, G. y Devaux, F.P. (1988) Asymmetric Distribution of phospholipids in spectrin-poor erythrocyte vesicles. *Biochemistry*. 27: 5666-5670.
- 10.- Cerbón, J. y Calderón, V. (1991) Changes of the compositional asymmetry of phospholipids associated to the increment in the membrane surface potential. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1067: 139-144.
- 11.- Coleman, R. (1973) Membrane bound enzymes and membrane ultrastructure. *Biochimica et Biophysica Acta*. 300: 1-30.

- 12.- Dawidowicz, A.E. (1987) Dynamics of membrane lipid metabolism and turnover. *Annual Review of Biochemistry*. 56: 43-61.
- 13.- Devaux, F.P. (1991) Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes. *Biochemistry*. 30: 1163-1173.
- 14.- Etemadi, A.H. (1980) Membrane asymmetry a survey and critical appraisal of the methodology. *Biochimica et Biophysica Acta*. 604: 423-475.
- 15.- Folch, J., Lees, M. y Sloane Stanley, H.G. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*. 226: 497-509.
- 16.- Getz, G.S. (1970) Lipids in membrane development. *Advances in Lipid Research*. 8: 175-189.
- 17.- Gordeisky, E.S. y Marinetti, V.G. (1973) The asymmetric arrangement of phospholipids in the human erythrocyte membrane. *Biochemical Biophysical Research Communications*. 50: 1027-1031.
- 18.- Hirata, F. y Axelrod, J. (1980) Phospholipid methylation and biological signal transmission. *Science*. 209: 1082-1090.
- 19.- Hubbell, L.W. (1990) Transbilayer coupling mechanism for the formation of lipid asymmetry in biological membranes. *Biophysical Journal*. 57: 99-108.
- 20.- Jakoucic, S., Getz, G., Rabinowitz, M., Jakob, H. y Swift, H. (1971) Cardiolipin content of wild type and mutant yeasts in relation to mitochondrial function and development. *Journal of Cell Biology*. 48: 490-502.
- 21.- Janki, R.M., Aithal, H.N., Mc Murray, W.C. y Tustanoff, E.R. (1974) The effect of altered membrane-lipid composition on enzyme activities of outer and inner mitochondrial membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Biophysical Research Communications*. 56: 1078-1085.
- 22.- Krebs, R.J.J. (1982) The topology of phospholipids in artificial and biological membranes. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 14: 141-157.
- 23.- Léger, L.C., Daveloose, D. Christon, R. y Viret, J. (1990) Evidence for a structurally specific role of essential polyunsaturated fatty acids depending on their

peculiar double-bond distribution in biomembranes. *Biochemistry*. 29: 7269-7275.

24.- Marin, S.M., Fernandez, A., Sanchez-Yague, J., Cabezas, A. J. y Llanillo, M. (1990) Changes in the phospholipid and fatty acid composition in normal erythrocytes from sheep of different ages. Aminophospholipid organization in the membrane bilayer. *Biochimie*. 72: 745-750.

25.-Marinetti, V.G. y Crain, C.R. (1978) Topology of aminophospholipids in the red cell membrane. *Journal of Supramolecular Structure*. 8: 191-213.

26.- Op den Kamp, F.A.J. (1979) Lipid asymmetry in membranes. *Annual Review of Biochemistry*. 48: 47-71.

27.- Patton, L.J. y Lester, L.R. (1991) The phosphoinositol sphingolipids of *Saccharomyces cerevisiae* are highly localized in the plasma membrane. *Journal of Bacteriology*. 173: 3101-3108.

28.- Pelikánová, T., Kohout, M., Hilgertová, J., Rase, J., Farská, I. y Válek, J. (1989) Insulin binding to erythrocytes and fatty acid composition of erythrocyte membrane phospholipids in healthy men. *Clinica Chimica Acta*. 179: 197-200.

29.- Perret, B.P., Chao, H.J. y Douste-Blazy, L. (1979) Asymmetric distribution of arachidonic acid in the plasma membrane of human platelets. A determination using purified phospholipases and a rapid method for membrane isolation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 556: 434-446.

30.- Plantavid, M., Perret, B.P., Chap, H., Simon, M.F. y Douste-Blazy, L. (1982) Asymmetry of arachidonic acid metabolism in the phospholipids of the human platelet membrane as studied with purified phospholipases. *Biochimica et Biophysica Acta*. 693: 451-460.

31.- Rank, G., Robertson, R. y Bussey, H. (1978) The viscosity and lipid composition of the plasma membrane of multiple drug resistant and sensitive yeast strains. *Canadian Journal of Biochemistry*. 56: 1036-1041.

32.- Renooij, W., Van Golde, G.M.L., Zwaal, A.F.R. y Van Deenen, M.L.L. (1976) Topological asymmetry of phospholipid metabolism in rat erythrocyte membranes. *European Journal of Biochemistry*. 61: 53-58.

33.- Rothman, E.J. y Lenard, J. (1977) Membrane asymmetry. *Science*. 195: 743-753.

- 34.-Sandra, A. y Pagano, R.E. (1978) Phospholipid asymmetry in LM cell plasma membrane derivatives: polar head group and acyl chain distributions. *Biochemistry*. 17: 332-338.
- 35.- Scott, H.J. y Scheckman, R. (1980) Lyticase: endoglucanase and protease activities that act together in yeast cell lysis. *Journal of Bacteriology*. 142: 414-423.
- 36.- Sheetz, P.M. y Chan, J.S. (1972) Effect of sonication on the structure of lecithin bilayers. *Biochemistry*. 11:4573-4581.
- 37.- Singer, J.S. y Nicolson, L.G. (1972) The fluid mosaic model of the structure of membranes. *Science*. 175:720-731.
- 38.- Spector, A.A. y Yorek, A.M. (1985) Membrane lipid composition and cellular function. *Journal of Lipid Research*. 26: 1015-1035.
- 39.- Stubbs, D.C. y Smith, A.D. (1984) The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. *Biochimica et Biophysica Acta*. 779: 89-137.
- 40.- Stubbs, D.C. y Smith, A.D. (1990) Essential fatty acids in membrane: physical properties and function. *Biochemical Society Transactions*. 18: 779-781.
- 41.- Venien, C. y Le Grimellec, Ch. (1988) Phospholipid asymmetry in renal brush-border membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 942: 159-168.
- 42.- Verkleij, J.A., Zwaal, A.F.R., Roelofsen, B., Comfurius, P., Kastelijn, D. y Van Deenen, M.L.L. (1973) The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*. 323: 178-193.
- 43.- Zwaal, A.F.R., Roelofsen, B., Comfurius, P. y Van Deenen, M.L.L. (1975) Organization of phospholipids in human red cell membranes as detected by the action of various purified phospholipases. *Biochimica et Biophysica Acta*. 406: 83-96.