

03062
29-3



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

Instituto de Fisiología Celular

**VARIACIONES DE LA ACTIVIDAD LIPOPEROXIDATIVA Y DE
LOS COMPONENTES LIPIDICOS DE LA CORTEZA CEREBRAL
DE LA RATA DURANTE EL PERIODO LUZ-OSCURIDAD**

T E S I S

que para obtener el grado de
MAESTRO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

p r e s e n t a :

Mauricio Díaz Nuñez

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

México, D. F.

1987



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 está 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.

...Eternity is in love with the

productions of time...

William Blake (1757-1827).

INDICE.

I. Introducción.....	1
1.- Estructura y función de las membranas biológicas.....	3
2.- Características de las membranas excitables.....	15
3.- Fenómeno lipoperoxidativo en biología.....	22
4. Implicaciones temporales de los procesos biológicos.....	35
II. Publicaciones.	
Day-night cycle of lipid peroxidation in rat cerebral cortex and their relationship to the glutathione cycle and superoxide dismutase activity. <i>Neurosciencia</i> . 16:859-863.1985.	
Day-night cycle of lipidic composition in rat cerebral cortex. <i>Neurochemical Research</i> . En prensa. 1987.	
III. Discusión	52
1. Significado de los hallazgos reportados.....	52
2. Heterogeneidad del sistema nervioso.....	57
3.- Osciladores biológicos.....	60
IV. Conclusiones.....	63
V. Bibliografía.....	64

INTRODUCCION

El estudio del funcionamiento y estructura de las membranas celulares, así como de sus repercusiones biológicas, ha venido cobrando una gran importancia en el contexto del control homeostático de los organismos superiores. El interés en esta faceta de la organización de los sistemas biológicos se explica principalmente por las posibles aplicaciones que surgirán en las ciencias biomédicas, al entender de una manera más precisa el papel que desempeñan las membranas biológicas en el funcionamiento celular. Desde el surgimiento de la estructura eucarionte en el flujo evolutivo del planeta, las funciones de las membranas pasaron a ser las funciones de los diversos organelos que conforman el organismo eucarionte. Este nivel de organización biológica, permitió la aparición y el desarrollo de organismos pluricelulares y, eventualmente, la conquista de hábitats terrestres por éstos.

Dentro de la tendencia evolutiva hacia una mayor complejidad, -- los seres vivientes fueron seleccionándose según sus capacidades adaptativas, siendo determinante la capacidad de respuesta hacia los estímulos provenientes del entorno ecológico.

En este contexto, en un grupo importante de organismos resultó exitoso el desarrollo de un tejido especializado en la captación e integración de los estímulos exteriores, permitiendo de esa manera una respuesta adecuada a las demandas del medio ambiente. Este tejido especializado en el manejo de la información pasó a ser el sistema nervioso de los organismos invertebrados y vertebrados que poblan actualmente en el planeta.

El tejido nervioso, así como el muscular, forma parte de los sistemas excitables en los organismos. Han alcanzado una considerable complejidad en los vertebrados superiores. En estos organismos las células nerviosas se disponen en una intrincada trama anatómico-funcional, que tras como consecuencia la aparición de compartimientos, tanto celulares como intracelulares.

Entre los parámetros que más influencia tienen sobre los seres vivos y en especial sobre los tejidos excitables, podemos contar la atmósfera oxidante actual y la sucesión del período de luz-oscuridad.

Una gran cantidad de literatura se ha escrito con relación al papel del O_2 sobre el metabolismo energético y su papel tóxico en los organismos. Estos dos aspectos tienen como común denominador la interacción del oxígeno con algún sistema membranal de la célula. En el primer caso se relacionaría con la mitocondria y en el segundo, de una manera más general, el oxígeno desencadenaría el proceso lipoperoxidativo en los ácidos grasos de las membranas celulares.

La sucesión luz-oscuridad que en gran parte de nuestro planeta oscila con un período cercano a las 24 h, determina fluctuaciones conocidas como circádicas en gran número de reacciones metabólicas y eventos celulares.

Basándonos en las consideraciones anteriores, esta introducción puede ser dividida en cuatro secciones:

1. ESTRUCTURA Y FUNCION DE LAS MEMBRANAS BIOLÓGICAS.
2. CARACTERÍSTICAS DE LAS MEMBRANAS EXCITABLES.
3. FENÓMENO LIPOPEROXIDATIVO EN SISTEMAS BIOLÓGICOS.
4. IMPLICACIONES TEMPORALES DE LOS PROCESOS BIOLÓGICOS.

1.- ESTRUCTURA Y FUNCION DE LAS MEMBRANAS BIOLOGICAS

Una característica sobresaliente de las células es que la relación entre sus actividades internas y el medio externo está regulada por una estructura divisional. La complejidad de esta barrera varía considerablemente, pero ciertos patrones organizacionales parecen comunes a todas las células.

A lo largo de la filogenia de los seres vivientes, se han presentado diversos modelos de organización celular. En este sentido, podemos clasificar a los organismos en dos grandes grupos; en primer lugar, aquellos que no tienen sistemas internos de membranas, conocidos como procariontes; y en segundo, los que poseen endomembranas y por lo tanto una complejidad mayor, reconocidos como eucariontes. En el contexto de este último grupo encontramos que las endomembranas forman organelos especializados en funciones celulares específicas, lo que implica una división interna de microambientes. La delimitación de cada uno de estos microambientes, así como su función a desempeñar, dependen de las membranas de cada uno de ellos. En este sentido, podemos considerar que los organismos eucariontes deben su complejidad a la especialización de sus diferentes membranas.

Las membranas, ya sea en la superficie celular o dentro de la célula, son esencialmente estructuras lipoprotéicas. La complejidad y la importancia de las membranas celulares se pudo constatar sólo después del desarrollo del microscopio electrónico, ya que este instrumento reveló a las membranas como estructuras rápidamente reconocibles de todas las células.

Los tipos de moléculas que forman parte de las membranas biológicas son parcialmente hidrofílicas y parcialmente hidrofóbicas, por lo que -

4

se dice que son anfipáticos. Las propiedades físico-químicas de estas clases de sustancias permiten la formación espontánea en solución, de estructuras - como las miscelas y eventualmente de bicapas, que delimitan un medio interno y otro externo, bien definidos. La principal fuerza que hace posible la constitución de las estructuras anteriores es el rechazo al agua de los componentes hidrófobos de las membranas.

Los principales constituyentes de las membranas biológicas son lípidos y proteínas, siendo frecuente encontrar oligosacáridos asociados a ambos.

1.1.- Lípidos.

Los principales lípidos que se encuentran en las membranas biológicas son los siguientes:

a) Fosfolípidos.

Los fosfolípidos, aunque abundan en el cerebro, están presentes en todas las células animales y vegetales. Las propiedades físicas de los fosfolípidos son importantes en la transferencia de sustancias hacia dentro y hacia fuera de la célula. Los fosfolípidos son constituyentes primarios de los núcleos, microsomas y mitocondrias. Similarmente a las grasas neutras, los fosfolípidos desempeñan un papel en la lubricación de las superficies biológicas e intervienen en el transporte de grasa nuestra por el cuerpo. Los fosfolípidos se caracterizan por contener ácido fosfórico y una base nitrogenada. Se han identificado siete tipos de estas moléculas: lecitinas, cefalinas, fosfatidilserinas, plasmalógenos inosítido-fosfatos, ácidos fosfatídicos y esfingomielinas.

Lecitinas (fosfatidilcolina). La hidrólisis alcalina de esta clase de fosfolípido de glicerol, jabones, fosfato sódico y una base orgánica, la colina, que es un hidróxido amónico sustituido de propiedades básicas y alcohólicas. El precursor estructural más importante de las lecitinas es el ácido glicerofosfórico, que fisiológicamente se presenta en su forma enantiómera alfa. Los principales ácidos grasos presentes en las lecitinas son los siguientes: palmítico, esteárico, oleico, linolénico y araquidónico.

Cefalinas (fosfatidiletanolamina). Estos fosfolípidos se relacionan estructuralmente con las lecitinas. La única diferencia radica en la na

turalidad del componente básico, que en las cefalinas es el amino-etil alcohol o etanolamina.

Fosfatidilserinas. Se encuentran en gran concentración en el cerebro. La base presente en estos fosfolípidos es el aminoácido serina.

La etanolamina puede obtenerse por descarboxilación de la serina, y la colina por metilación de la etanolamina.

Fosfoinosítidos. Estos fosfolípidos no contienen una base como los anteriores ya que presentan el azúcar inositol en su lugar. El inositol de esta clase de fosfolípido puede ser sustrato de fosforilaciones adicionales que resulta en la formación de polifosfoinosítidos.

Plasmalógenos. Estos fosfolípidos poseen como característica distintiva un enlace éster en el carbono alfa de la cadena glicérica. Este tipo de unión implica que la molécula que se une en esa posición debe ser un aldehído graso, en lugar del ácido graso usual. En las arqueobacterias se han reportado como los constituyentes principales de membrana y, aunque en los demás seres vivos se presentan en cantidades menores que el resto de fosfolípidos, los plasmalógenos alcanzan niveles importantes en el sistema nervioso.

Ácidos fosfatídicos. Pueden considerarse como fosfolípidos que no tienen base alguna unida al grupo del ácido fosfórico. Los ácidos fosfatídicos se reconocen como fases intermedias en la biosíntesis de las grasas neutras y de los fosfolípidos.

Esfingomielinas. Esta clase de fosfolípidos se diferencia de los anteriores por su ausencia de glicerol, en su lugar encontramos la base esfingosina. Este compuesto se considera como derivado del aldehído palmítico y de la serina. Sólo se localiza en tejidos animales y no en vegetales. Los

demás componentes de las esfingomielinas son los mismos de la lecitina, es decir, ácido graso, ácido fosfórico y colina. Sin embargo, algunas esfingomielinas contienen la base saturada dehidroesfingosina en lugar de esfingosina.

b) Cerebrósidos.

Se encuentran en gran concentración en sistema nervioso, su estructura consta de un glúcido, casi siempre galactosa, unido a una molécula de esfingosina. Los ácidos grasos presentes son característicos y los más comunes son el cerebrónico o frenosínico, el lignocárico y el nervónico. La unidad esfingosina-ácido graso se denomina ceramida. En algunos cerebrósidos, la ceramida está unida a glucosa o a diotrisacáridos en lugar de agalactosa.

Otro tipo de cerebrósidos, los gangliósidos contienen (además de ceramida y azúcares) aminosúcares y ácido sílico (ácido n-acetil-neurámico). Los patrones de gangliósidos en el cerebro son complejos y se han reportado cambios en los tipos de gangliósidos durante la ontogenia.

c) Esteroles.

Este tipo de lípido tiene como estructura base la del ciclo-pentahidrofenantreno. El compuesto más representativo de esta clase es el colesterol. El colesterol constituye cerca del 17% de los sólidos del cerebro. Se sintetiza principalmente en el hígado y en la mayoría de los tejidos suele encontrarse esterificado.

1.2.- Proteínas

Las proteínas de las membranas son responsables de una amplia variedad de actividades enzimáticas que caracterizan diferentes membranas. Como se esperaba, la fuerza de unión de las proteínas con la membrana varía con los diferentes tipos. Algunas proteínas, por ejemplo citocromo C, son solubles en agua pero funcionan al unirse a las superficies membranales. Ta las moléculas se conocen como proteínas periféricas o extrínsecas, ya que su unión a la membrana es débil. Los tipos de interacción entre las proteínas periféricas con la membrana son diversos; se encuentran desde uniones iónicas y puentes de hidrógeno hasta fuerzas de enlace hidrofóbicas.

A diferencia de las anteriores, las proteínas intrínsecas o integrales se unen fuertemente a las membranas, y algunas de ellas, la atraviesan de parte a parte. Es obvio que esta clase de moléculas deben adoptar una configuración de mínima energía al interactuar con la región lipofílica y los grupos polares de las membranas biológicas, por lo que es de esperar que entre más embebida se encuentre la proteína en la bicapa lipídica, mayor proporción de aminoácidos hidrofóbicos o neutros tendrá.

Muchas de las proteínas que se encuentran formando parte de las membranas biológicas incorporan a su estructura residuos de carbohidratos, los cuales siempre se van a localizar hacia la parte externa de la membrana plásmica. Estas glicoproteínas son importantes en la función de reconocimiento celular entre células del mismo tejido y también se ha descrito un papel como receptor específico de mensajes hormonales.

1.3.- Organización de las membranas biológicas.

Los fosfolípidos y las proteínas membranales se organizan en una matriz bi-dimensional como consecuencia del acomodo a modo de bicapa de los fosfolípidos. La cohesión de los componentes de esta matriz se basa en fuerzas no covalentes, siendo la principal la interacción hidrofóbica. Los movimientos moleculares (rotacional y segmental) de las cadenas metilénicas de los fosfolípidos da lugar a un gradiente de libertad motriz (fluides) a través del grosor de la bicapa de fosfolípidos. La flexión de las cadenas acílicas (movimiento segmental) incrementa el "desorden" de la bicapa con un máximo en el centro de la matriz. De igual manera, la constante dieléctrica, que toma un valor de dos en el centro de la bicapa y de noventa en la fase acuosa, no cambia abruptamente en la interfase. Una de las consecuencias de tales gradientes es la existencia de barreras de activación energética para la partición y difusión de solutos a través de la bicapa.

Los componentes de las biomembranas muestran una asimetría que repercute en la función de éstas. La composición fosfolípídica de las dos monocapas son generalmente muy diferentes. Se ha determinado que en la monocapa externa se encuentra preponderantemente fosfatidilcolina y una proporción del total de la fosfatidiletanolamina; en la monocapa interna además de la fosfatidiletanolamina restante, se localizan en exclusividad la fosfatidilserina y el fosfatidilinositol. Otro elemento de asimetría de las membranas biológicas es la presencia en la monocapa externa de carbohidratos, adosados a proteínas y lípidos, que constituyen el glicocálix celular. -- Las proteínas membranales, extrínsecas o intrínsecas, proporcionan un elemento extra en la asimetría de las membranas. La existencia de asimetría -

implica que el recambio entre los componentes de las dos mitades de la bicapa es muy lento (un tiempo medio de varias horas) o inexistente.

Los fosfolípidos en solución acuosa tienen la capacidad de adoptar una gran variedad de modelos (bicapa, micela, disposición hexagonal), -- que se han invocado para explicar algunas funciones membranales como la endocitosis, la secreción, la fusión y el recambio entre las dos monocapas -- (flip-flop). Existen evidencias que bajo condiciones fisiológicas, las biomembranas pueden presentar formas polimorfas como fases micelares y hexagonales (1 - 4). El papel de estas formas polimorfas en la organización lateral de las membranas es un punto a desarrollar de mucha importancia para el futuro. Por el momento, existe un consenso de que uno de los parámetros que determinan la aparición de estas formas polimorfas son las áreas seccionales de los grupos polares y la longitud de la cadena acilica de los fosfolípidos. Obviamente, los tamaños efectivos de los grupos polares y no polares están determinados no sólo por su estructura, sino también por la temperatura, estado de transición, unión de iones y asociación con otros componentes de membrana.

El ordenamiento selectivo y la segregación de componentes en el plano de una membrana puede producir una organización no azarosa (5). Tal ordenamiento surge a partir de restricciones favorables de empaquetamiento e interacciones específicas entre los componentes de membrana. La organización lateral trae como consecuencia una separación de fases, zonaciones, relajaciones múltiples y dependencia anómala a la temperatura de los procesos membranales.

Las bicapas de fosfolípidos exhiben transiciones termotrópicas. -- Con fosfatidilcolina se han reportado tres transiciones: a) la principal es

debe a un incremento en la conformación cis (gauche) de los acilos fosfolípidos que origina una fase desordenada; b) una pretransición debida probablemente a un cambio en la orientación de las cadenas acílicas; y c) una subtransición a una temperatura más baja cuyo origen es aún desconocido.

Los sistemas de fosfolípidos puros que se encuentran a una temperatura menor a la de su transición principal, se dice que están en una fase ordenada, sólida o de gel; y en fase desordenada, fluida o líquida arriba de este punto. Las tres transiciones presentan el fenómeno de histéresis durante los ciclos de calentamiento y enfriamiento. Se ha teorizado que la histéresis se debe a pequeñas impurezas que causan imperfecciones en la fase sólida y predisponen procesos de nucleación en la fase líquida. La presencia de estas imperfecciones o fallas en la organización de las bicapas ha sido demostrada con estudios de microscopía electrónica y criofractura.

La temperatura a la cual la transición de fase se efectúa, incrementa con la longitud de la cadena acíclica; disminuye con la insaturación y la ramificación de los acilos, las dobles ligaduras cis bajan más la temperatura que las trans; un doble enlace localizado en la mitad de la cadena más baja más el punto de transición que uno, colocada en cualquiera de los extremos de la cadena; el punto de transición para fosfolípidos asimétricos, por ejemplo, un fosfolípido que posea en la posición uno un acilo corto y en la dos uno largo, tendrá diferente comportamiento al compararlo con un fosfolípido con un acilo largo en la posición uno y uno corto en la posición dos; durante el punto de transición los fosfolípidos presentan un incremento en el área promedio (de 42 a 45 Å), una disminución en el grosor (cerca de 6 Å), y un aumento (3%) en el volumen. El punto de transi---

ción también depende de la naturaleza de los grupos polares de los fosfolípidos así como también de todos los factores que influyen el estado de ionización de estos grupos; el punto de transición se ve modificado por la presencia en el sistema fosfolipídico de solutos (lípidos, proteínas, compuestos hidrofóbicos como anestésicos).

Se ha demostrado en sistemas sencillos (fusión de hidrocarburos sólidos) que la transición de fase se caracteriza por un incremento en los movimientos rotacional, conformacional y translacional, que se traduce en una estructura menos ordenada en el paso de sólido a líquido. Los datos -- disponibles sugieren que la transición en bicapas se acompaña de un incremento en la conformación cis en las cadenas metilénicas, lo que probablemente promueva varios estados conformacionales, incluyendo las torciones -- conocidas como "kinks".

Es posible inducir un cambio de fase a temperatura constante por una variedad de factores que modulan el empaquetamiento de las cadenas acilicas en las bicapas. Por ejemplo, alterando el pH, el medio iónico o la -- concentración de iones divalentes; así como incorporando agentes liposolubles como anestésicos y detergentes. Otra manera de realizar este cambio -- de fase y de potencial importancia fisiológica, es la incorporación de -- otros lípidos como el colesterol y lisofosfolípidos.

El colesterol es uno de los componentes más importantes de la -- membrana plasmática en los mamíferos. Estudios de calorimetría diferencial realizados en mezclas de fosfolípidos y colesterol (6 - 9) sugieren una -- separación de fase entre los dominios que contienen colesterol de aquellos en los que está ausente. Estudios de criofractura (10) mostraron que bicapas con menos del 20% de colesterol contenían dominios de fosfolípidos pu-

ros y otros de colesterol más fosfolípidos (probablemente en relación 1:4). Esto aunado a una permeabilidad incrementada al agua y a un coeficiente de difusión lateral anómalo sugieren que la presencia de colesterol en un sistema de fosfolípidos delimita dominios con interfases bien definidas. Esta separación de fases inducida por el colesterol puede ser responsable de la activación de la adenilato ciclase reconstituida (11).

El colesterol tiene afinidades diferentes por los fosfolípidos - que forman la bicapa membranar, el orden es el siguiente: esfingomielina, fosfatidilserina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina. Se han esquematizado algunos modelos para demostrar la interacción del colesterol con bicapa de fosfolípidos, en ellos se hace énfasis al empaquetamiento de las moléculas participantes, ya que se ha demostrado que las moléculas de colesterol tienden a juntarse unas con otras, produciéndose una alternancia entre los acilos y el colesterol. Los acilos no se ven influidos por el colesterol desde el momento que no presentan incremento en la conformación cis, por lo que el efecto del colesterol se tiene que visualizar como el establecimiento de microdominios en la bicapa fosfolípida.

Los efectos de los cambios de fase en las membranas se visualizan en un cambio en la distribución de las partículas intramembranales, - así como en la conformación y en el desplazamiento vertical de las proteínas (12). Existe una estrecha correlación entre las propiedades de fase de los lípidos y las propiedades moleculares de las proteínas membranarales; esta relación se hace más obvia al revisar las discontinuidades en las gráficas de Arrhenius. Se ha reportado que alterando la composición de ácidos grasos en las membranas se influye de manera im---

portante la forma de las gráficas de Arrhenius, al estudiar el funcionamiento de ciertas proteínas membranales. Estas discontinuidades se presentan como sesgos en la gráfica o como cambios en la pendiente a temperaturas características. Estas anomalías se interpretan generalmente como cambios en las propiedades de fase de los lípidos. Es frecuente observar transiciones múltiples en un mismo proceso de una membrana, o que procesos diferentes en la misma membrana exhiban transiciones diferentes. Además, no siempre un sesgo en la curva de Arrhenius, significa un cambio de fase en los lípidos membranales, aunque existen numerosos reportes en donde la correspondencia entre los dos fenómenos ha sido testificada. Una de las posibles explicaciones de este comportamiento es que las membranas contienen proteínas en diferentes microambientes los cuales surgen por la formación de agrupamientos temporales o se deben a la segregación de dominios lipídicos. Una diferencia en la organización y/o composición de la fase lipídica en la vecindad de las proteínas membranales, comparada a la de la membrana como un todo, está implicada en el postulado de los lípidos del "annulus". Esta población segregada de lípidos se puede detectar por calorimetría diferencial, espectroscopía Raman, y resonancia del spin electrón; sin embargo, la inmovilización de esta población de lípidos no se detecta por resonancia magnética nuclear. Al unirse las proteínas a la bicapa se incrementa la temperatura de transición de fase y disminuye la cooperatividad de transición como se indica por el perfil amplio obtenido en diversos modelos. Esto sugiere un incremento en la relación de conformeros Trans/Cis, lo que ha sido confirmado por espectroscopía Raman. Este fenómeno podría tomarse en cuenta para una nueva interpretación de la interacción de proteínas con sitios de la bicapa ricos en configuraciones cis.

2.- CARACTERISTICAS DE LAS MEMBRANAS EXCITABLES.

a) Propiedades eléctricas de las membranas biológicas.

Las membranas biológicas se pueden considerar, desde el punto de vista eléctrico, como capacitores imperfectos que separan dos conductores.- Los conductores son las soluciones acuosas de diferente composición a ambos lados de la membrana. El hecho de que las membranas biológicas se comporten como capacitores implica que una diferencia de voltaje constante está asociada a una separación de cargas entre los conductores. Por definición, la capacitancia (C, en faradios) es la relación entre dos cargas separadas (Q, en cuoulombs) y la diferencia de potencial (V, en voltios). Ya que las membranas biológicas muestran una capacitancia imperfecta, se deduce que tienen la propiedad de conductancia. Por definición, la conductancia (G, en ohms) es la relación entre la corriente (I, en amperes) y la diferencia de voltaje.

Ya que las membranas biológicas se pueden caracterizar eléctricamente por una conductancia en paralelo con una capacitancia, las expresiones anteriores implican que la diferencia de voltaje a través de una membrana -- deberá ser cero cuando no haya corriente a través de ella. Sin embargo, es común encontrar diferencia de voltaje a través de membranas biológicas en ausencia total de corriente. Esta observación implica que en general, las membranas biológicas no se pueden caracterizar solamente por elementos eléctricos pasivos y que existe una fuente de voltaje en ellas (una o más baterías). En las membranas biológicas, la conductancia y la capacitancia son dependientes del tiempo y el voltaje. Un punto interesante es que los caminos conductivos tienden a ser selectivos para un solo ión.

b) Propiedades iónicas de las membranas biológicas.

En los sistemas biológicos es común que las entidades que transportan la corriente eléctrica sean iones. Una de las características más -- distintivas de las células estriba en que la concentración iónica del fluido extracelular es muy diferente a la del comportamiento intracelular. Por ejemplo, la concentración de K^+ es alta dentro de las células; mientras que la distribución del sodio y el cloro son opuestas a la del potasio.

De lo anterior se desprende que en las membranas biológicas se generan gradientes de los iones presentes a lo largo de las membranas. Ya que los iones poseen carga, un gradiente de potencial eléctrico también estará implícito en la distribución desigual de los iones a través de la membrana. En la mayoría de las células existe un potencial negativo interno (por convención, el potencial eléctrico del espacio extracelular se toma como referencia). Por lo tanto, si se presenta una salida neta de potasio de una célula dependerá de si existe o no la suficiente energía libre en el gradiente de concentración para comunicar a las cargas positivas del potasio la energía requerida para desplazarse en contra del gradiente eléctrico. Si la energía libre disponible en el gradiente químico es igual a la del gradiente eléctrico, entonces el ión está en equilibrio y no mostrará ningún movimiento. En este concepto, no importa que tan "permeable" sea un ión, - ya que si la energía libre del gradiente electroquímico es cero, este no se moverá. Es importante recordar que aunque no exista un flujo neto de iones, si se presenta un recambio a través de la membrana. La expresión matemática que explica el equilibrio electroquímico es conocida como ecuación de Nernst.

$$V_x = (RT/Z_x F) \ln (C_x^o / C_x^c)$$

donde V_x es el potencial interno para el ión x en el equilibrio, R la constante de los gases, T la temperatura absoluta, F la constante de Faraday, Z_x la carga del ión, C_x^o la concentración del ión x fuera de la célula, y C_x^c la concentración del ión x dentro de la célula.

Como el paso a través de la membrana de los diferentes iones no es similar se ha postulado otra relación donde la difusión, el coeficiente de partición y el grosor de la membrana son tomados en cuenta, considerando todos estos parámetros en relación al concepto de permeabilidad, para obtener una expresión más fiel del equilibrio electroquímico que se conoce como ecuación de Goldman:

$$V_r = \frac{RT}{ZF} \ln \frac{C_x^o + (P_y/P_x) C_y^o}{C_x^c + (P_y/P_x) C_y^c}$$

donde P_x y P_y son las permeabilidades de los iones x y y, respectivamente.

$$Z = Z_x = Z_y$$

c) Membranas neuronales.

Las células nerviosas o neuronas, reciben, conducen y transmiten señales. El significado de esta comunicación varía según la ubicación y la función de una neurona dada. En una neurona motora, el procesamiento de la información trae como consecuencia la contracción de un músculo en particular. En una neurona sensoria, se procesa la información procedente de un tipo específico de estímulo, como luz, fuerza mecánica o una sustancia química. En una interneurona, la información proveniente de fuentes sensitivas se integra y se comunica a neuronas motoras para generar una respuesta apropiada. Sin importar el tipo o función de las diferentes neuronas, la comunicación en todas ellas es similar, consistiendo en cambios de poten-

cial eléctrico a través de la membrana plasmática neuronal.

Esta clase de comunicación necesita que el cambio eléctrico producido en una parte de la neurona difunda o se propague al resto de la célula. Sin una amplificación activa, la señal eléctrica se atenúa conforme se aleja de su fuente. En distancias cortas la atenuación es pequeña, y de hecho muchas neuronas de dimensiones reducidas conducen sus señales pasivamente, sin amplificación. Para comunicación a distancias mayores, esta propagación pasiva es insuficiente. Por lo tanto las neuronas más grandes han desarrollado un mecanismo de transmisión de señales activo que representa una de las características más particulares de los tejidos excitables. Un estímulo eléctrico que supere un cierto umbral dispara una explosión de actividad eléctrica que es rápidamente propagada a lo largo de la membrana plasmática neuronal. Esta onda viajera de excitación eléctrica se conoce como potencial de acción o impulso nervioso. La información que lleva el potencial de acción puede ser transportada de un extremo a otro de la neurona sin atenuación y a una velocidad de 100 metros por segundo, y en algunas células son más rápido.

Para entender los procesos membranales que se presentan durante un potencial de acción, debemos tener en cuenta que los sistemas neuronales se caracterizan por mostrar varias clases de canales iónicos, que no son más que proteínas especializadas de la membrana neuronal; se han reconocido canales dependientes y no dependientes de voltaje. Este tipo de canales también se encuentran en el músculo. En la fisiología de estos canales iónicos radican las propiedades de permeabilidad que muestra una neurona. Se ha reconocido desde hace tiempo, que el potencial de membrana influye de manera muy importante la permeabilidad de la misma. En condiciones -

basales no se presenta un flujo neto de iones a través de la membrana y se establece un potencial de reposo.

Si tomamos en cuenta la distribución asimétrica de iones y llevamos los valores de cada uno de ellos a la ecuación de Nerst nos encontramos los siguientes hallazgos: el potencial de reposo de la mayoría de las neuronas es de aproximadamente -70 mV; la relación entre el potasio extracelular y el intracelular se acerca mucho a este valor; la misma conducta muestra el cloro; si se considera el sodio, resulta que la ecuación de -- Nerst predice un potencial de $+58$ mV, siendo este un valor muy alejado de las condiciones basales. Otro dato importante es la diferente permeabilidad que muestra la membrana en condiciones basales, ya que el sodio es permeable en muy escasa medida, mientras que el potasio presenta una permeabilidad mucho mayor.

El canal que gobierna la permeabilidad al sodio es sensitivo al voltaje. Si la membrana se lleva a un voltaje cercano a 0 V, los canales de sodio se abrirán súbitamente dejando entrar al catión, siguiendo su gradiente electroquímico. Esta corriente entrante de sodio alcanza un máximo después de medio milisegundo, hasta que el interior de la membrana se vuelve positivo. Sin embargo, este efecto es temporal ya que la conductancia al sodio regresa a valores cercanos a cero en pocos milisegundos, aunque la membrana permanezca despolarizada. Esto se interpreta como una inactivación promovida por el voltaje (positivo) de los canales de sodio. Los canales de sodio sensibles al voltaje hacen a las neuronas eléctricamente excitables y las capacitan para conducir los potenciales de acción.

La serie de eventos que se traducen en un potencial de acción son los siguientes: cuando una membrana con muchos canales de sodio es parcialmente despolarizada por un estímulo momentáneo, algunos de los canales

se abren, permitiendo a los iones sodio entrar a la célula. El flujo de -- cargas positivas despolariza la membrana, y por lo tanto abre más canales, con lo cual se admiten más iones de sodio, causando una despolarización to avía mayor. Este proceso continúa autoamplificándose hasta que el poten-- cial de membrana pierde su valor de reposo (-70 mV) y se acerca al poten-- cial de equilibrio del sodio (+58mV). Es en este punto donde la fuerza -- electroquímica neta para el flujo de sodio es cero y los canales de sodio presentan una inactivación, lo que originaría que el potencial de membra-- na regresara a su valor negativo original. La recuperación del potencial es estimulada por canales de potasio sensibles al voltaje. Como los cana-- les de sodio, estos canales se abren en respuesta a la despolarización de membrana, pero lo hacen de una manera relativamente lenta. Al incrementar se la permeabilidad del potasio, al mismo tiempo que los canales de sodio se inactivan, los canales de potasio conyuvan a que el potencial de mem-- brana rápidamente regrese al potencial de equilibrio del potasio, retor-- nando de esta manera al estado basal. La repolarización de la membrana cau-- sa que los canales de potasio se cierran y permitan que los canales de so-- dio se recuperen de su inactivación. De esta manera la membrana neuronal - puede estar lista en menos de un milisegundo para responder a un segundo estímulo despolarizante.

En una neurona típica se distinguen tres secciones: el cuerpo - celular, las dendritas y el axón. El cuerpo celular es el centro biosinté-- tico, contiene el núcleo, el retículo endoplásmico rugoso, el retículo en-- doplásmico liso y el aparato de Golgi. Las dendritas son un conjunto de ra-- mificaciones, que se extienden a manera de antenas, desde el cuerpo calu-- lar y proporcionan una gran superficie para la recepción de señales prove-

nientes de otras células. El axón es un proceso celular, generalmente más grande que las dendritas, que conduce el potencial de acción desde el cuerpo celular hasta las partes más distantes de la neurona.

Las señales neuronales son transmitidas de una célula a otra en sitios de contacto especializados conocidos como sinapsis. La mayor parte de las neuronas están eléctricamente aisladas de sus vecinas, la célula presináptica está separada de la célula postsináptica por un espacio sináptico. Un cambio de potencial eléctrico en la célula presináptica promueve la liberación de una sustancia química conocida como neurotransmisor, el cual difunde a través del espacio sináptico y provoca un cambio eléctrico en la célula postsináptica. Entonces la comunicación neuronal implica la conversión de una señal eléctrica a una señal química y la generación de una nueva señal eléctrica a partir de esta señal química.

El tejido neuronal no consiste de neuronas solamente sino que -- además incluye células gliales o acompañantes. En las de mamífero, las células gliales son diez veces más numerosas que las neuronas. Las células gliales se agrupan en cuatro clases principales: astrocitos, oligodendrocitos, células ependimales y células microgliales. Los astrocitos funcionan como soportes metabólicos y mecánicos, de los delicados circuitos neuronales. Los oligodendrocitos se encargan de formar capas aislantes de mielina alrededor de los procesos neuronales en el sistema nervioso central. Las células ependimales recubren las cavidades del sistema nervioso, y las células microgliales presentan un funcionamiento similar al de los macrófagos.

3.- FENOMENO LIPODEROXIDATIVO EN SISTEMAS BIOLÓGICOS.

a) Oxígeno

El oxígeno es un elemento conspicuo de nuestra atmósfera, actualmente alcanza una concentración cercana al veinte por ciento, pero en la historia de nuestro planeta no siempre ha estado en niveles tan elevados. La presencia de oxígeno libre se debió principalmente a la acción de los seres vivos. El proceso de oxigenación de la atmósfera ocurrió lentamente y trajo consigo profundos cambios en la evolución, metabolismos y capacidad adaptativa de todos los organismos. La atmósfera oxidante, al implantarse, coadyuvó al surgimiento de los organismos eucariontes, permitió la oxidación completa de los nutrientes celulares así como la síntesis de moléculas tan importantes como los esteroides y las xantofilas; pero aparejado a estos efectos, el oxígeno actuó como un agente tóxico para los seres vivos, que se vieron sometidos a una gran fuerza de selección que modificó para siempre el patrón funcional de la vida terrícola.

Los efectos dañinos del oxígeno se expresan en varios niveles - en la escala filogenética, por ejemplo, en las bacterias anaerobias estrictas el oxígeno promueve la oxidación de componentes celulares esenciales, como son coenzimas reducidas (NAD(P)H , FADH_2), tioles, proteínas ferrosulfúreas y pteridinas. En los organismos aerobios, el oxígeno en altas concentraciones actúa inhibiendo diversas enzimas como la nitrogenasa y la glutamato decarboxilasa. En los organismos superiores produce irritación e inflamación del tracto respiratorio, degeneración de epitelio semiálfere, hemorragias de oído y nariz, ceguera en infantes, inhibición de las células eritroides, fibrilación cardíaca, disfunción hepática y re-

nel. etc. En 1954, Rebeca Gershman y Daniel L. Gilbert propusieron, al percatarse de la semejanza en el daño producido por las radiaciones ionizantes y el oxígeno, que la toxicidad de este elemento podría atribuirse a la formación de radicales libres a partir del mismo.

Un radical libre se define como cualquier especie de existencia independiente que contenga uno o más electrones desapareados. Un electrón desapareado es aquél que ocupa únicamente un orbital atómico o molecular. La presencia de uno o más electrones desapareados produce que los radicales libres sean atraídos por un campo magnético (paramagnetismo), siendo algunas veces muy reactivos. Los radicales libres se pueden formar fácilmente cuando un enlace covalente se rompe y un electrón es conservado por cada átomo, un proceso conocido como fisión homolítica.

Al hacer una revista de la estructura molecular del oxígeno diatómico, nos percatamos que esta molécula en su estado basal es un radical libre, ya que tiene dos electrones desapareados localizados cada uno en un orbital p_i^+ de antiunión. A pesar de este hecho la molécula de oxígeno en su estado basal es poco reactiva y muy estable por la siguiente razón: los dos electrones desapareados poseen el mismo spin, por lo que cualquier combinación implicaría la unión a una molécula que tuviera sus electrones de valencia igualmente con espines paralelos, ya que de otra manera se violaría el principio de Pauli.

La anterior restricción hace que el oxígeno acepte electrones sólo de uno en uno, por lo que el oxígeno reacciona débilmente con moléculas que no son radicales.

Se conocen formas más reactivas del oxígeno, siendo un ejemplo, el oxígeno singulete. Esta forma de oxígeno activo necesita para su forma-

ción de energía. Existen dos clases principales de oxígeno singulete, conocidos como $^1\text{O}_2$ y $^1\text{S}^+$. El primer estado tiene una energía de 22.4 Kcal - arriba del estado basal, mientras que el segundo es más reactivo con 37.5 - Kcal arriba del estado normal del O_2 . La forma ^1S de oxígeno singulete es - la única de importancia biológica, ya que la forma más reactiva decae rápidamente. Según nuestra definición, el estado $^1\text{S}^+$ no es un radical, ya que no presenta electrones desapareados. En ambas formas de oxígeno singulete - no existe la restricción de spin por lo que su capacidad oxidativa se incrementa grandemente.

El oxígeno singulete se genera frecuentemente por reacciones de - fotosensibilización. Si ciertas moléculas son iluminadas con una longitud - de onda particular, se promueve la formación de "estados excitados". La -- energía de excitación puede ser transferida a una molécula de oxígeno adyacente y transformarse a un estado singulete, mientras que la molécula fotosensibilizadora retorna a un estado basal. Algunos fotosensibilizadores de importancia biológica son: derivados de riboflavina (FMN y FAD), clorofilas a y b, bilirrubinas, retinal y varias porfirinas; mientras que en el laboratorio se emplea comúnmente colorantes como el anaranjado de acridina, azul - de metileno, el rosa bengala y el azul de toluidina.

Las reacciones de fotosensibilización que probablemente impliquen la formación de oxígeno singulete, son importantes en muchas situaciones -- biológicas. Algunas de éstas son: iluminación constante de cloroplastos - produce fenómenos peroxidativos, así como hidrólisis de los fosfolípidos de los tilacoides; iluminación constante con luz brillante causa degeneración de las células visuales de la retina; algunas enfermedades como la -- porfiria en humanos y en animales de importancia veterinaria con disfunción hepática, procesos patológicos después de ingerir dieta rica en fotosensibi

zadores de origen vegetal.

Si un electrón es adicionado a una molécula de O_2 en su estado basal, éste debe entrar a uno de los orbitales pi de antiunión. El producto es el radical superóxido O_2^- . En el contexto de la teoría de toxicidad de oxígeno, se han incrementado los reportes que implican al radical superóxido desde el descubrimiento, en 1968 por J.M. McCord y I. Fridovich, de la enzima superóxido dismutasa. Se han reportado enzimas que reducen directamente el oxígeno a O_2^- , siendo una de las más importantes la xantina oxidasa en hígado y corazón. Se ha reportado, asimismo, que diversos acreedores de electrones en diferentes organelos celulares pierden electrones que reducen el oxígeno transformándolo en radical superóxido. Desde este punto de vista se ubica la producción de O_2^- por membranas en mitocondria, retículo endoplásmico, núcleo y membrana plasmática.

Entre las funciones biológicas en que interviene el superóxido, y que han sido ampliamente comprobadas está la acción bactericida que muestran los macrófagos de diversos organismos (13), la formación de metahemoglobina en los glóbulos rojos (14), la generación de radicales libres por la xantina oxidasa (15), etc.

Cuando la molécula de oxígeno basal capta 2 electrones se forma el ión peróxido, que es otra forma de oxígeno activo. La forma protonada de este ión, el agua oxigenada o peróxido de hidrógeno, es un producto de varias reacciones enzimáticas, como la monoamino oxidasa, glicolato oxidasa, varias oxidases de proxisomas, etc. Se han descrito varias enzimas que desactivan el agua oxigenada como son la catalasa, la peroxidasa y la glutatión peroxidasa; esta última enzima inactiva otros peróxidos orgánicos.

Una de las formas en que comunmente se manifiesta la toxicidad del oxígeno es el fenómeno de la lipoperoxidación.

b) Lipoperoxidación.

Desde hace mucho tiempo se sabe que ciertos alimentos al permanecer en la intemperie presentan cambios que van desde un olor rancio hasta un cambio en su consistencia. Un examen más detallado de este fenómeno demostró que va acompañado de una significativa captación de oxígeno por parte del material por lo que se supuso que este elemento estaba implicado en la descomposición o rancidez de los alimentos. Posteriores estudios demostraron que el material que sufría el fenómeno de rancidez presentaba gran número de insaturaciones en las moléculas que lo contenían, por lo que se concluyó que el fenómeno se suscitaba al reaccionar estas dobles ligaduras con las moléculas de oxígeno atmosférico.

Cuando el proceso anterior ocurre en material lipídico que es rico en ácidos grasos insaturados, se denomina lipoperoxidación.

Ya que la atmósfera, actualmente, es oxidante, y las membranas que constituyen las células de los organismos biológicos son ricas en insaturaciones, el fenómeno lipoperoxidativo puede llevarse a cabo en el seno de los seres vivientes, y de hecho la lipoperoxidación es un proceso que se ha asociado a fenómenos tóxicos y de envejecimiento biológico. Este hecho hace que la lipoperoxidación sea una de las expresiones más usuales del fenómeno de toxicidad del oxígeno, así como de otros radicales libres.

La iniciación del proceso peroxidativo en una membrana con ácidos grasos poli-insaturados se debe al ataque de una especie reactiva, lo suficientemente excitada, para abstraer un átomo de hidrógeno a un grupo

metileno ($-\text{CH}_2-$). Ya que un átomo de hidrógeno tiene sólo un electrón, el fenómeno anterior deja atrás un electrón desapareado sobre el carbón. La presencia de un doble enlace en el ácido graso debilita la unión carbono - hidrógeno en el átomo de carbono adyacente a la doble ligadura, lo que hace más fácil remover el átomo de hidrógeno. El radical en el átomo de carbono tiende a estabilizarse por un rearrreglo molecular que produce un dieno conjugado, el cual reacciona rápidamente con una molécula de oxígeno para dar un radical peroxi, $\text{R}\cdot\text{OO}\cdot$. Los radicales peroxi pueden sustraer un átomo de hidrógeno de otra molécula lipídica, siendo esto el estado de propagación del proceso lipoperoxidativo, por lo que una vez iniciado, tiende a continuarse (reacción en cadena). El radical peroxi al combinarse con el átomo de hidrógeno sustraído forma un hidroperóxido, $\text{R}\cdot\text{OOH}$. Una alternativa de los radicales peroxi es formar peróxidos cíclicos. Los hidroperóxidos son moléculas estables a temperaturas fisiológicas, pero en presencia de complejos de metales de transición, se descomponen rápidamente. Muchos complejos metálicos que pueden hacer lo anterior se presentan in vivo e incluyen complejos simples de sales ferrosas con fosfato, así como proteínas férricas sin la estructura hemo. Tanto el ión Fe^{3+} como el Fe^{2+} son efectivos, pero el último es mucho más.

Un complejo con hierro reducido reacciona de la siguiente manera con un hidroperóxido lipídico:



mientras que un complejo con hierro oxidado promoverá la siguiente reacción:



Los radicales peroxi son menos reactivos que los radicales al-

koxi. En ambos casos, sin embargo, la formación de estos radicales estimulará la reacción en cadena de la lipoperoxidación al promover más fuentes de iniciación.

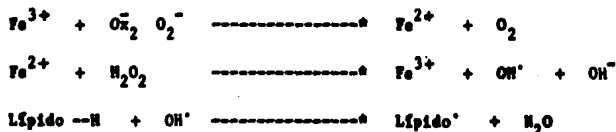
Durante el proceso lipoperoxidativo se producen algunos compuestos colaterales como consecuencia de la degradación de los ácidos grasos - afectados, siendo los principales: el pentano, derivado de la ruptura del quinto carbono a partir del metilo terminal; etano y eteno, gases producidos por una escisión beta; diversos compuestos conteniendo el grupo carbonilo, siendo uno de los más importantes el dialdehído malónico; y productos que muestran actividad de prostaglandinas, probablemente debido a la formación de endoperóxidos cíclicos.

Se acepta actualmente, que la lipoperoxidación puede tener dos orígenes, el primero de ellos no necesita de ningún proceso metabólico para efectuarse; mientras que el segundo requiere enzimas específicas. La lipoperoxidación no enzimática se presenta al propagarse la reacción en cadena debido al Fe^{2+} en el medio. La lipoperoxidación enzimática necesita un poder reductor que transforme el ión Fe^{3+} a su estado reducido, y se puedan llevar a cabo las reacciones de iniciación y propagación antes mencionadas. Se ha reportado que diferentes membranas biológicas presentan el fenómeno lipoperoxidativo, como son el retículo endoplásmico liso, membrana nuclear, mitocondria y otras más, siendo necesario en todos estos casos la participación del NADPH, como agente reductor.

Existen amplias evidencias que indican que las formas de oxígeno activo pueden iniciar el proceso lipoperoxidativo. El oxígeno singulete -- en su estado 1 reacciona rápidamente con compuestos que presentan insaturaciones, formando de esta manera hidropéroxidos. El tiempo de vida media

del oxígeno singlete se incrementa en ambientes hidrofóbicos, y ya que varias moléculas fotosensibles se encuentran en las membranas como clorofilas y porfirinas, existen algunos casos en que se presenta lipoperoxidación generada por oxígeno singlete. Por ejemplo, los segmentos externos de los bastones en la retina de la rana son ricos en ácidos grasos poliinsaturados y forman peróxidos al iluminarlos; en este sistema la molécula fotosensible es probablemente el retinal. La iluminación de eritrocitos en presencia de porfirinas o bilirrubinas causa peroxidación, inhibición de enzimas y acarreadores y eventualmente hemólisis. En hongos del género Cercospora se produce una toxina conocida como carcosporina que puede atacar a las células vegetales en la luz, pero no en la oscuridad. Se ha sugerido que esta toxina actúe como fotosensibilizador para la formación de oxígeno singlete y que la destrucción de las células vegetales se deba a peroxidación de sus membranas.

La literatura donde se reporta la participación del radical O_2^- en la generación del proceso lipoperoxidativo es amplia. Por ejemplo, Fridovich y Porter (16) observaron que la xantina oxidasa, al actuar, es capaz de peroxidizar el ácido arquidónico. El papel del ión superóxido durante la lipoperoxidación es actuar como agente reductor del ión férrico (Fe^{3+}) en el contexto de la reacción de Haber - Weiss:



Los radicales hidroxilos son muy reactivos y fácilmente sustraen átomos de hidrógeno de los lípidos iniciando el fenómeno lipoperoxidativo. Se

ha reportado que la lipoperoxidación generada por la radiación ionizante genera OH^{\cdot} .

Existen numerosos métodos para cuantificar la lipoperoxidación siendo los principales los siguientes:

- a) Captación de oxígeno. Este método se basa en la medición del consumo de oxígeno por un sistema al formarse el radical peroxi durante la lipoperoxidación.
- b) Titulación por liberación de I_2 . Los hidroperóxidos lipídicos al oxidar el ión yoduro lo convierten en yodo elemental, el cual se estima por titulación con tiosulfato de sodio. Este método no se utiliza en sistemas biológicos.
- c) Dienos conjugados. Los rearrreglos atómicos que se presentan al iniciarse la lipoperoxidación en los ácidos grasos insaturados forman dienos conjugados que absorben en el rango de luz ultravioleta, principalmente entre los 230nm. En los sistemas biológicos este método se ve complicado por la presencia de varias moléculas que absorben en la misma región espectral.
- d) Medición de hidrocarburos gaseosos. Esta técnica desarrollada por Riely (17), se basa en la formación de pentano y etano durante la lipoperoxidación. Los gases se detectan por cromatografía de gas-líquido. El principal problema que tiene este método es que los gases mencionados se generan por la descomposición de los peróxidos por metales de transición, por lo que es incapaz de discernir un aumento en la generación de la lipoperoxidación o en la disponibilidad de metales de transición.
- e) Medición de productos terminales. Además de los hidrocarburos mencionados en la sección anterior, la lipoperoxidación genera un gran número de

compuestos con el grupo carbonilo, los cuales forman hidrazonas al reaccionar con hidrazinas.

- f) Pérdida de ácidos grasos. La lipoperoxidación conlleva la destrucción de los ácidos grasos insaturados, por lo que al procesar la membrana en estudio y tratarla adecuadamente obteniendo los ácidos grasos libres -- para que reaccionen esterificándose con metanol, es posible visualizar los cambios en el patrón de ácidos grasos que resulta del proceso lipoperoxidativo valiéndonos de la cromatografía de gas - líquido.
- g) Emisión de luz. Desde la década pasada el uso de la quimioluminiscencia como un índice de la lipoperoxidación se ha incrementado. Se piensa que la presencia de un compuesto parecido al oxígeno singlete es la fuente luminosa. Se ha demostrado aumento en la emisión de luz en microsomas y células enteras durante la lipoperoxidación de sus membranas.
- h) Medición de fluorescencia. La reacción de compuestos carbonilos con grupos amino terminales de proteínas, aminoácidos libres o bases de ácidos nucleicos, producen compuestos conocidos como bases de schiff. El dialdehído malónico, que contiene dos grupos carbonilos, actúa con entrecruzador de proteínas formando las bases de Schiff aminoiminopropeno. No existe una longitud de onda de emisión única, ya que la naturaleza de los compuestos fluorescentes es variada.
- i) La prueba del ácido tiobarbitúrico (TBA). Este método es uno de los primeros que se utilizó para medir la lipoperoxidación. En su versión más sencilla el material estudiado se calienta en presencia de TBA y el color generado se lee a 532 nm. El TBA no es un compuesto que se libere durante la lipoperoxidación, sino que al poner el material de estudio en medio ácido y en altas temperaturas se genera por la descomposición

de los peróxidos e hidroperóxidos ya formados.

Es recomendable que la medición del proceso lipoperoxidativo no se limite a una sola técnica, aunque se acepta como la más práctica y la más sencilla la prueba del TBA.

Existen estructuras y moléculas en el organismo que contrarrestan el proceso lipoperoxidativo. La presencia de colesterol en las membranas celulares puede influir la lipoperoxidación, probablemente reaccionando con alguno de los radicales, o bien afectando la estructura interna de la membrana. Otro dato que indica que la estructura de la membrana afecta el proceso lipoperoxidativo, es el reporte que los iones calcio disminuyen la lipoperoxidación en liposomas o membranas de eritrocitos.

La vitamina E es una molécula hidrosoluble que tiende a concentrarse en el interior de las membranas biológicas. Se ha reportado que en la membrana mitocondrial existe una molécula de vitamina E por cada 2 000 moléculas de fosfolípidos, pero en los tilacoides y en los fotorreceptores se ha localizado en más alta proporción a la vitamina E. Numerosas observaciones han señalado a la vitamina E como uno de los principales antioxidantes celulares y desde ese punto de vista se le cataloga como un agente antilipoperoxidante por excelencia. En este sentido, la vitamina E reacciona en iniciativa al oxígeno singulete y por lo tanto protege a la membrana de esta especie. También reacciona con el radical superóxido, pero el papel más importante de la vitamina E en la mayoría de las membranas es que puede reaccionar con los radicales lípidos peroxi para formar radicales de la vitamina E, los cuales son tan inertes que no continúan con la reacción en cadena del proceso lipoperoxidativo. El grupo de Slater ha demostrado que el radical de la vitamina E puede volver a su estado inicial por medio del

ascorbato.

Algunos antioxidantes que se utilizan en la industria alimentaria y cuyo funcionamiento debe ser similar al de la vitamina E son: hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), propil galato, difenil fenilén diamina (DPPD), hidroxí dimetilcarbazol (HDC), seantocina, etc.

Entre las enzimas que participan en la protección de las membranas contra la lipoperoxidación, una muy destacada es la glutatión peroxidasa (GSH-per). Esta enzima es específica de glutatión reducido (GSH) como sustrato y reacciona in vitro con peróxido de hidrógeno, hidroperóxido cumínico, ter-butilhidroperóxido, etc. En todos los casos los peróxidos son reducidos a alcoholes. La GSH-per es una selenoenzima cuya deficiencia, -- por dietas bajas en selenio, produce patologías muy severas. Se han obtenido evidencias de que la GSH-per juega un papel importante de protección -- contra la lipoperoxidación in vivo. Estudios recientes han revelado la -- existencia de enzimas con actividades similares a la GSH-per, pero que -- muestran diferencias en cuanto preferencia de sustratos. Esta actividad parece ser debida a una clase de glutatión-S-transferasa siendo el mecanismo de acción de estas enzimas la conjugación de GSH con compuestos extraños. -- No todas las transferasas actúan sobre los hidroperóxidos, y además muestran independencia respecto al selenio. El porcentaje de la actividad de -- la actividad de la GSH-per no dependiente de selenio es muy alto en testículo de rata, así como en hígado de bovino y humano. Aunque se ha puesto -- en duda la actividad de la GSH-per selenio dependiente en la protección -- contra el proceso lipoperoxidativo, un punto permanece claro, la descomposición que efectúa sobre el peróxido de hidrógeno previene la generación --

de radicales hidroxilo por la reacción de Fenton.

Otras enzimas importantes en prevenir la lipoperoxidación son la superóxido dismutasa y la catalasa. La primera de ellas inactiva al ión su peróxido y la segunda procesa al peróxido de hidrógeno, siendo ambos formas de oxígeno activo.

La transferrina y la ceruloplasmina se han reportado como agentes antioxidantes pero de localización extracelular. Es muy probable que su acción la lleven a cabo quelando los metales de transición, hierro y cobre, que son elementos necesarios para la descomposición de los peróxidos celulares y la subsecuente propagación del fenómeno peroxidativo.

4.- IMPLICACIONES TEMPORALES DE LOS PROCESOS BIOLÓGICOS.

Las membranas biológicas se comportan de una manera definida según las proteínas que contengan, y atendiendo siempre al ambiente físico-químico expresado en los componentes lipídicos de las mismas. Desde este punto de vista las membranas biológicas se consideran organelos donde se llevan a cabo funciones biológicas tan variadas como el reconocimiento celular o la actividad completa de una ruta metabólica. Desde este punto de vista, es lógico suponer la existencia de mecanismos que controlen o modulen, ya sea de una manera activadora o inhibitoria, las funciones biológicas que se llevan a cabo en las membranas biológicas. Por lo anterior no es extraño que se considere a estos organelos como verdaderos servomecanismos. En el concepto de servomecanismos está implícita la capacidad de detectar y corregir estructuras y funciones de la organización de un sistema, siendo tal capacidad automática y constante.

La existencia de fenómenos oscilatorios en estructuras complejas celulares es una función de la existencia de servomecanismos. Los fenómenos oscilatorios son expresiones de fenómenos cíclicos no lineales en un sistema desplazado lejos del equilibrio y son por lo tanto, ejemplos de estructuras disipativas necesarias para el mantenimiento y evolución de los sistemas biológicos. Tales estructuras son llamadas disipativas porque requieren la disipación de energía a través del sistema para la creación y estabilización de nuevas estructuras.

Los sistemas complejos tienen muchos grados de libertad, lo que en un sistema macroscópico implica la posibilidad de fluctuaciones espontáneas. Estas fluctuaciones retornarán a su estado original, espontáneamente

también, en sistemas en equilibrio o cerca del equilibrio y que posea una cinética lineal, según el principio de Le Chatelier - Braun (18 - 20). --- Sin embargo, una fluctuación en una situación no lineal y fuera del equilibrio no siempre presenta una regresión, sino que puede ser amplificada y - crear una nueva organización, la cual se origina desde una inestabilidad - generada por las fluctuaciones. Este principio ha sido denominado "orden - a través de fluctuaciones" y se basa en la formación de estructuras dissipativas. En el contexto de los sistemas lejos del equilibrio, el orden a través de fluctuaciones reemplaza el principio de orden de Boltzman, el cual dice que conforme la entropía de un sistema disminuye, la probabilidad de - que el sistema llegara a ser más ordenado se incrementa.

En el estado estacionario que caracteriza el metabolismo de todos los organismos es frecuente detectar fenómenos oscilatorios. Esta conducta implica la cooperatividad de las funciones celulares y un control -- propio de los servomecanismos. Ya sea de manera separada o conjunta, se introduce una cinética no lineal en el sistema biológico. La no linealidad - del proceso actúa como generador de las oscilaciones. Algunos ejemplos biológicos de oscilaciones ya estudiados son: oscilaciones en la glicólisis; oscilaciones en el volumen mitocondrial y oscilaciones en los niveles de - AMPc en hongos primitivos (21).

Los servomecanismos en sistemas biológicos actúan de manera coordinada, interaccionando uno con otro de manera tal, que es posible la modulación del metabolismo celular en el contexto de un sistema jerarquizado - de control. En el contexto de este control se presentan, como ya se ha mencionado, fluctuaciones inherentes a los sistemas abiertos que funcionan le

jos del equilibrio y en condiciones de cinética no lineal. Estas oscilaciones son del tipo ciclo limitado, ya que la amplitud y frecuencia que presentan no dependen de las condiciones iniciales.

El conjunto de procesos que llevan a cabo las membranas biológicas implican el acoplamiento entre sus componentes proteicos y lipídicos, con la emergencia de una conducta observable a nivel macroscópico. Las membranas biológicas son estructuras dinámicas que están en constante formación y transformación. Se ha reportado que en las membranas es posible localizar microambientes de características definidas (22), por lo que es posible visualizar a las membranas biológicas como mosaicos biológicos con interfases bien delimitadas. Esta organización hace posible que una membrana biológica actúe como un hiper ciclo, ya que al acoplarse funcionalmente las unidades regionales de una membrana, permiten la cooperación necesaria para la expresión de funciones nuevas y diferentes en la membrana completa (23).

Las oscilaciones aparecen en varios niveles del funcionamiento biológico: Nicolis y Portnow (24) han propuesto un número de situaciones en las cuales las oscilaciones desempeñan un papel regulatorio o generador de procesos. Fisiológicamente en las oscilaciones supracelulares radica la propiedad básica de sincronizar una acción periódica externa, lo que caracteriza a los ritmos circádicos. Esta conducta periódica podría dar al organismo la flexibilidad requerida para adaptarse a las fluctuaciones ambientales mientras mantiene la fase de sus procesos metabólicos en una secuencia idéntica durante las 24 Hrs. No todos los ritmos biológicos se desarrollan en fases de 24 Hrs. Existen algunos tan rápidos como la descarga de impulsos eléctricos en algunas neuronas, con periodos de pocos milisegun-

dos; y otros como ciclos estacionales, de lento desarrollo.

Algunos ritmos y oscilaciones biológicas se han relacionado directamente con las membranas celulares, aunque casi todos ellos son de periodos cortos (de 10^{-3} a 10^3 segundos). Estos ritmos se encuentran en funciones tan variadas como las descargas de impulsos eléctricos en células nerviosas (25), los patrones de actividad en músculo liso (26), esquelético (27) y, cardíaco (28), la actividad de diversas enzimas (29), algunos ciclos de actividad secretora (30) y de desplazamiento de estructuras subcelulares. En el sistema nervioso se han descrito algunas neuronas marcapaso que mantienen continuamente su actividad rítmica; además de un ritmo de actividad sostenida, se manifiestan descargas periódicas de potenciales de acción a intervalos de unos segundos. Un mecanismo propuesto para explicar el origen de estas oscilaciones es la sucesión cíclica de cierres y aperturas de canales iónicos (31).

Un fenómeno oscilatorio que ocurre en el seno de las membranas del sistema nervioso y de un período mucho más grande que los anteriormente descritos, es la ritmicidad que presentan algunos receptores a moléculas neuroactivas a lo largo de las 24 Hrs. del día (32). Estas fluctuaciones se presentan tanto en el número de los receptores como en su estado de afinidad.

Las características de los ritmos cercanos a las 24 Hrs. o circádicos son las siguientes (33):

- a) Son endógenos. Persisten en condiciones ambientales constantes.
- b) La longitud del período de oscilación espontánea es cercana a las 24 Hrs.
- c) La amplitud de las oscilaciones disminuye gradualmente en condiciones constantes.

- d) Una vez amortiguado un ritmo en condiciones constantes, es posible re-tablecerlo por estímulos aperiféricos.
- e) Las variaciones ambientales, sobre todos los ciclos de luz y oscuridad, sincronizan los ritmos endógenos.
- f) La magnitud del efecto ambiental sobre un ritmo depende de la fase del ciclo en la que incida.
- g) La frecuencia de la oscilación circádica es función de la intensidad de la iluminación ambiental.
- h) La frecuencia de la oscilación circádica es independiente de la temperatura ambiental.
- i) Dentro de ciertos límites, la oscilación puede asimilar frecuencias -- distintas a la circádica.
- j) La propiedad de oscilar y la frecuencia natural de la oscilación, son características hereditarias, no así el ángulo de fase.

Los cambios presentados en la sección de resultados de todos -- los parámetros estudiados se realizaron en condiciones de periodos de luz - oscuridad controlados (cada uno 12 Hrs.); por lo que hasta el momento - ignoramos si poseen naturaleza endógena. Lo anterior nos impide conside-- rar las oscilaciones aquí reportadas como estrictamente en circádica. (Pe-- ro lo que es importante destacar es que las fluctuaciones detectadas su-- gieren que las membranas de la corteza cerebral de la rata se comportan - como osciladores, siendo estos osciladores uno más de los que se han des-- crito en el sistema nervioso. La puesta en fase de todo el conjunto de os- ciladores podría explicar algunas de las funciones superiores que desempe-- ña el cerebro como son los ciclos sueño - vigilia, el de ingesta de ali-- mentos o el de reposo - actividad (36).

DAY-NIGHT CYCLE OF LIPID PEROXIDATION IN RAT CEREBRAL CORTEX AND THEIR RELATIONSHIP TO THE GLUTATHIONE CYCLE AND SUPEROXIDE DISMUTASE ACTIVITY

M. DÍAZ-MUÑOZ, R. HERNÁNDEZ-MUÑOZ, J. SUÁREZ and V. CHAGOYA DE SÁNCHEZ

Departamento de Bionergética, Centro de Investigaciones en Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, D.F., México

Abstract—Lipoperoxidation, glutathione cycle components and superoxide dismutase activity show a day-night rhythm in the cerebral cortex of the rat. The highest lipoperoxidative activity is observed during the night (20.00-04.00 h). The enhancement in lipoperoxidation occurs concurrently with a decrease in glutathione peroxidase activity, an increase in superoxide dismutase activity and an increase in the double bonds in the brain cortex lipid fraction. The changes described in this paper seem to be related to a succession of light and dark periods, or to fasting and feeding periods.

We propose that those fluctuations could act as a physiological oscillator with an important role in modulating the membrane properties of the nerve cell.

Lipoperoxidation has been considered a damaging reaction in biological systems usually associated with aging¹ and degenerative processes.² Peroxidation of phospholipid unsaturated fatty acids is accompanied by structural and functional changes of membranes.^{3,4} These changes have been correlated with certain physiological roles of cellular activity such as enzyme activation,¹ inactivation⁵ and modifications in some membrane properties such as fluidity, permeability and surface potential.⁶

The brain is an organ with the highest rate of lipoperoxidation,⁷ probably because of its high oxygen uptake and high unsaturated fatty acid concentration as phospholipid constituents. In the brain, regional differences in lipid peroxidation which have been observed⁸ could result from an unequal production of endogenous free radicals, from different antioxidant activities, mainly of glutathione peroxidase (GSH-per) and of superoxide dismutase (SOD), or from an unequal proportion of unsaturated fatty acids.

Recently, we reported an antilipoperoxidative action of adenosine in liver damage induced by carbon tetrachloride.⁹ We also reported day-night variations of adenosine in the liver, blood and brain.¹⁰ These observations plus the possible role of adenosine as a neuromodulator,^{11,12} suggested the possibility that the nucleoside was involved in the lipoperoxidation activity of the brain.

We therefore looked for day-night changes in brain lipoperoxidation, specifically in the cerebral cortex, which is one of the brain regions with the

largest lipoperoxidative activity.¹³ We also investigated the participation of the glutathione cycle and the superoxide dismutase activity in the lipoperoxidative process.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Male Wistar rats weighing 160-180 g, with free access to food and water were used. The animals were kept in groups of seven in separate cages and adapted to a dark-light cycle (the 12 h of light were from 07.00 to 19.00) for at least two weeks before the experiment; on the day of the study, maximum precautions were taken to avoid stress. Animals were killed at 4 h intervals from 08.00 to 20.00 h and every 2 h from 22.00 to 07.00 h.

All the studies were made in the cerebral cortex. Lipid peroxidation was measured in a 1:10 bidistilled water homogenate, by the thiobarbituric acid method,¹⁴ modified as previously reported.¹⁵ Glutathione was measured by an enzymatic method.¹⁶ Glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9) and glutathione reductase (EC 1.6.4.2) (GSH-R) were assayed according to the method of Sies¹⁷ and Horn,¹⁸ respectively. Superoxide dismutase (EC 1.15.1.1) (SOD) was measured according to McCord and Fridovich¹⁹ and the tissue was handled according to Ledig.²⁰ In order to determine the amount of unsaturated linkages on lipids, three were extracted by the Folch method,²¹ and quantified by the Wijs method²² as follows: the lipid extract obtained after the Folch extraction was suspended in 5 ml of chloroform. 10 ml of Wijs's solution (iodine monochloride) were added and the mixture was maintained in the dark for 30 min. The iodine excess is titrated in the presence of 8 ml of 10% KI with 0.1 N sodium thiosulfate. When the color has practically disappeared, 1 ml of a 1% starch solution is added and the titration is continued until the blue color disappears. A blank with no lipid extract is subtracted from the above values. Protein was determined by the biuret method.²³

The statistical significance of the results was calculated by Student's *t*-test.

Materials

2-Thiobarbituric acid, methylglyoxal, egg albumin, sodium azide, reduced and oxidized glutathione, nicotinamide

Abbreviations: GSH, reduced glutathione; GSH-per, glutathione peroxidase; GSH-R, glutathione reductase; SOD, superoxide dismutase.

adenine dinucleotide phosphate (reduced form) and horse cytochrome Type III were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri) as well as the following enzymes: glyoxalase I, glutathione reductase and xanthine oxidase. Perhydrol was obtained from Merck; and xanthine was purchased from Nutritional Biochemical Corp. (Cleveland, Ohio). Wijs solution was obtained from Sigma of México. Other chemicals used were reagent grade.

RESULTS

Lipid peroxidation in cerebral cortex changes markedly during the 24 h. The level of lipid peroxidation in the morning (08.00–12.00 h) is low and similar to that reported by Noda²⁰ (Fig. 1). At the onset of the dark period, peroxidation starts to increase and becomes significantly elevated at 20.00 h. This high level (100% increase) of lipid peroxidation is maintained for 8 h during the night (20.00–04.00 h); at this point the process initiates its decline reaching its lowest value at 08.00 h.

We can consider three possible explanations for this result: (a) a decrease in activity of a system that removes hydroperoxides; (b) an increase in peroxide concentration, and (c) an increase in polyunsaturated fatty acids as possible substrates of lipoperoxidative activity.

The first possibility was explored by measuring day-night variations of some of the parameters of the glutathione cycle such as the levels of GSH, GSH-per, GSH-R. The results are shown in Fig. 2. Fluctuations of GSH concentrations (panel A) were inversely related to lipoperoxidation, as reported by Ahmed,¹¹ with a maximum ($2 \mu\text{mol g}^{-1}$) from 12.00 to 22.00 h, and a minimum ($1 \mu\text{mol g}^{-1}$) at 02.00 h. The activity of GSH-per (panel B) shows a similar pattern to that of GSH, except at 22.00 h. The GSH-R profile (panel C) is different from the others;

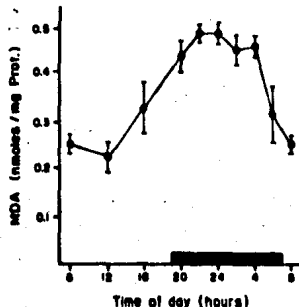


Fig. 1. Day night cycle of lipid peroxidation in the brain cortex of the rat. Malondialdehyde (MDA) was measured by the thiobarbituric acid method. Each value represents the mean \pm SE of 14–16 animals. The abscissa indicate the time of the day and the black region correspond to the dark period.

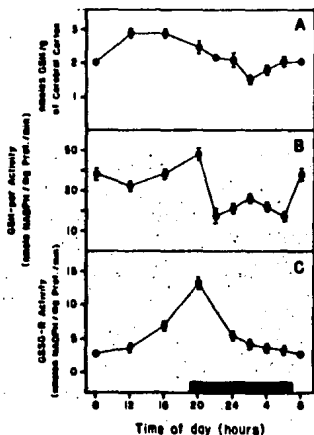


Fig. 2. Day-night changes of some components of the glutathione cycle in the cerebral cortex of the rat brain. The values represent the mean \pm SE of five samples. The abscissa indicates the time of the day and the black region represents the dark period. (A) Reduced glutathione; (B) glutathione peroxidase activity; (C) glutathione reductase activity. Both of them represented as a decrease of NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced.

its activity remains constant during the day except for a peak with an almost fivefold increase in activity at 20.00 h. These results indicate that the activity of the glutathione system is low during the night when lipoperoxidation is high.

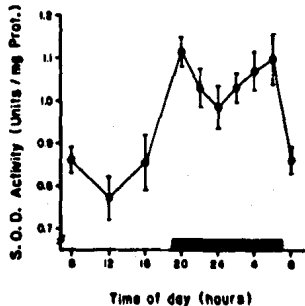


Fig. 3. Day night profile of superoxide dismutase. Each value represents the mean \pm SE of five samples. The abscissa indicates the time of the day and the black region corresponds to the dark period.

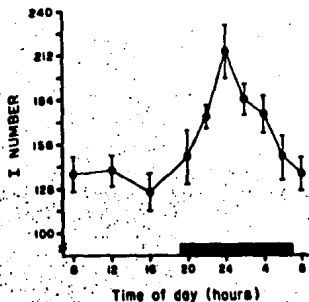


Fig. 4. Day-night cycle of the number of unsaturated bonds (I) in lipids extracted from the brain cortex. They were calculated by the Wijn method. The values represent the mean \pm SE of five determinations. The abscissa indicate the time of the day and the black region corresponds to the dark period.

The second possibility, an increase in peroxide concentration, is feasible since a lowering of GSH-per activity, one of the most important enzymes engaged with peroxide removal, was observed (Fig. 2A); the production of peroxides was also followed through the superoxide dismutase reaction for the 24 h period. The results are shown in Fig. 3; changes in SOD are similar to that of lipoperoxidation (Fig. 1): low during the light period (08.00-16.00 h) and markedly increased during the dark (20.00-06.00 h). These results indicated that there is a major production of peroxides through the SOD reaction during the night.

The third possibility was explored by quantifying the unsaturation of the lipid extract of the brain cortex and determining the iodine number. The results are presented in Fig. 4. The number of double bonds remains low during the light period (08.00-16.00 h), and then starts to increase, reaching a peak at 24.00 h (210 I number). This shows that there is an increase in polyunsaturated fatty acids during the night.

DISCUSSION

Our results showed day-night variations of lipoperoxidation in the cerebral cortex and a corresponding fluctuation of GSH concentration, one of the natural lipid peroxidation inhibitors: GSH-R, GSH-per and SOD, all of them enzymes involved in the antioxidant systems of the cell, also showed fluctuations.

The high concentration of readily oxidizable compounds in the brain and the high oxygen consumption indicate the requirement for an efficient mechanism to prevent reactions of some active spe-

cies of oxygen. During the light period the glutathione cycle works efficiently (Fig. 2); there is a high level of glutathione that is in an inverse relation to lipid peroxidation, as was noted by other authors.¹¹ Possibly, there is a high turnover rate for GSH since there is also an increase in the activity of the GSH-forming enzyme (GSH-R); GSH-per activity that used GSH to remove hydroperoxides, is also increased. At the onset of the dark period and the increase in lipid peroxidation, a decrease in the activity of the glutathione systems was observed; this suggests that a decrease in one of the main systems of removal of hydroperoxides could be partly responsible for the high night lipoperoxidation.

The role of superoxide ions (O_2^-) in the nocturnal increase of rat brain cortex lipoperoxidation is evident, since the variations of SOD activity parallel the changes in lipoperoxidation. Although the causes for SOD activity induction are not clear,¹² an increase in superoxide ion concentration could, among other factors, enhance the cytosolic SOD activity.¹³ Rat motor activity and its feeding period occur in the dark; it is possible that an increase in superoxide ions and SOD activity induction might occur as a consequence to the metabolic burst.

On the other hand, adenosine has been postulated as a physiological modulator of superoxide anion generation in neutrophils;⁷ it could possibly play a similar role in the brain since the day-night variations of brain adenosine seen in our laboratory¹⁴ indicate a high brain adenosine level when SOD activity is low (Fig. 3); as soon as the nucleoside decreases, the activity of SOD increases. The results shown in Fig. 3, indicate that a major production of peroxides via a superoxide dismutation reaction may also be involved in the increase in lipoperoxidation during the night.

A pertinent observation is that simultaneously to a decrease in the glutathione cycle and an increase in SOD activity, there is also an increase in the number of unsaturated bonds of cerebral cortex lipids (Fig. 4), probably related to an increase in polyunsaturated fatty acids from the diet. It has been reported that triglycerides and free fatty acids constitute a low percentage of the total lipids of the brain;¹⁵ the increase in the number of unsaturated double bonds might correspond to the fatty acids of the membrane phospholipids or to other lipids of the brain cortex membrane.

We do not know the sequence of events that participate in the day-night variations of lipoperoxidation, but it seems likely that a decrease in the hydroperoxide-removing system, an increase in the hydroperoxides due to SOD activity and an increase in the substrates for lipoperoxidative activity are involved (Fig. 5). It is possible that during the night there is an accumulation of H_2O_2 , resulting from GSH-per inhibition and SOD stimulation, but we can not comment on this since we have not yet studied H_2O_2 fluctuations through the 24 h cycle.

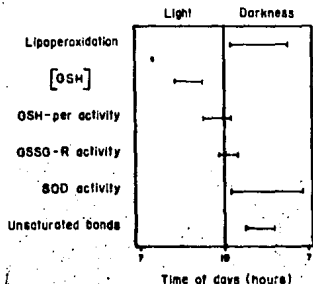


Fig. 5. Time relationship of the length of maximal activities of lipoperoxidation parameters studied in the cerebral cortex of the rat.

After this study was finished, a report of day-night variations of GSH in relation to lipid peroxidation in several rat tissues was published.¹¹ No significant changes were found, either in the levels of GSH or of lipid peroxidation in the brain of the rat. A possible explanation for this difference with our results could be the fact that the authors studied only microsomal lipid peroxidation of the whole brain and, according to Noda,¹² regional differences can mask the day-night changes reported here.

We can try to discuss the physiological meaning of

our results in the light of other authors' findings. Lipoperoxidation modifies the unsaturation of membrane lipids and modulates the activity of several enzymes, such as SOD or adenylate cyclase as has been reported respectively by Badwey¹ and Baba.^{1,3} Lipoperoxidation may also affect prostaglandin production or the turnover of the fatty acids of the membrane phospholipids, since Hemler *et al.*¹³ showed that lipoperoxidation of polyunsaturated fatty acids might regulate prostaglandin biosynthesis and Mead¹⁴ has recently reported that epoxy derivatives of the fatty acids from membrane phospholipids facilitate phospholipase action. The phenomena described are related to light and darkness and perhaps to some physiological functions synchronized by the photoperiod, such as fasting and feeding or the rest and activity periods of the rat. The possible cause-effect relationship has to be tested by further experiments.

We propose that the observed fluctuations in lipoperoxidative activity in the cerebral cortex of the rat are an oscillatory phenomenon in the nervous system, and could play a role in modulating the membrane properties of the nervous cell. Further studies are needed to understand the nature of these fluctuations.

Acknowledgements—This research was partially supported by a grant from the Fondo de Estudios e Investigaciones Ricardo J. Zevada. The authors want to express their gratitude to Dr Pauline Dush for her careful review of this manuscript and to Dr Maria Elena Sandoval and Dr J. A. Garcia-Sainz for helpful discussions.

REFERENCES

- Baba A., Lee E., Ohta A., Tatsuno T. and Iwata H. (1981) Activation of adenylate cyclase of rat brain by lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.* **256**, 3679-3684.
- Baba A., Tatsuno T. and Iwata H. (1984) Modulation of unsaturated fatty acids of norepinephrine- and adenosine-induced formation of cyclic AMP in brain slices. *J. Neurochem.* **42**, 192-197.
- Badwey J. A., Curnutte J. T. and Karnovsky M. L. (1981) Cis-polyunsaturated fatty acids induce high levels of superoxide production by human neutrophils. *J. Biol. Chem.* **256**, 12640-12643.
- Baker S. P. and Hemarworth B. A. (1978) Effect of mitochondrial lipid peroxidation on monoamine oxidase. *Biochem. Pharmacol.* **27**, 805-806.
- Bruch R. C. and Thayer W. S. Differential effect of lipid peroxidation on membrane fluidity as determined by electron spin resonance probes. *Biochem. Biophys. Acta.* **733**, 216-222.
- Butterfield J. D. Jr. and McGraw C. P. (1978) Free radical pathology. *Stroke* **9**, 443-445.
- Kronstein B. R., Kramer S. B., Weissmann G. and Hirschhorn R. (1983) Adenosine: a physiological modulator of superoxide anion generation by human neutrophils. *J. exp. Med.* **158**, 1160-1177.
- Chagoya de Sánchez V., Hernández M. R., Diaz M. M., Suárez J., Vidrio S. and Yáñez L. (1983) Circadian variations of adenosine and its physiological meaning in the energetic homeostasis of the cell and the sleep-wake cycle of the rat. In *Proc. 4th Int. Congr. Sleep Res.* **295**, Bologna, Italy, July 18-22 (1983).
- Chagoya de Sánchez V., Hernández M. R., Diaz M. M., Villalobos R., Glender W., Vidrio S., Suárez J. and Yáñez L. (1983) Circadian variations of adenosine level in blood and liver and its possible physiological significance. *Life Sci.* **33**, 1057-1064.
- Eichenberg K., Bohni P., Winterhalter K. H., Kawato S. and Richter C. (1982) Microsomal lipid peroxidation causes an increase in the order of the membrane lipid domain. *FEBS Lett.* **142**, 59-62.
- Farroqui M. Y. H. and Ahmed A. E. (1984) Circadian periodicity of tissue glutathione and its relationship with lipid peroxidation in rats. *Life Sci.* **34**, 2413-2418.
- Foe J. A., Lees A. C., Bloch P. L. and Neidhart F. C. (1979) The role of superoxide in the induction of superoxide dismutase and oxygen toxicity. In *Biochemical and Clinical Aspects of Oxygen* (ed. Caughey W. S.), pp. 635-658. Academic Press, New York.
- Folch J., Lees M. and Stanley G. H. (1957) A simple method for the isolation and purification of the total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497-510.
- Fox I. H. and Kelley W. N. (1978) The role of the adenosine and 2'deoxyadenosine in mammalian cells. *Ann. Rev. Biochem.* **47**, 655-686.

15. Fredholm B. B. and Hedqvist P. (1980) Modulation of neurotransmission by purine nucleotides and nucleosides. *Biochem. Pharmacol.* **29**, 1635-1643.
16. Harman D. (1981) The aging process. *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 7124-7128.
17. Hassan H. M. and Fridovich I. (1977) Regulation of the synthesis of superoxide dismutase in *E. coli* induction by methyl viologen. *J. Biol. Chem.* **252**, 7667-7672.
18. Hemler M. E., Cook H. W. and Lands W. E. M. (1979) Prostaglandin biosynthesis can be triggered by lipid peroxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **193**, 340-345.
19. Hernández Muñoz R., Glender W., Diaz-Muñoz M., García-Sáinz J. A. and Chagoya de Sánchez V. (1984) Effects of adenosine in liver cell damage induced by carbon tetrachloride. *Biochem. Pharmacol.* **33**, 2599-2604.
20. Hoen H. D. (1965) In *Methods of Enzymatic Analysis* (ed. Bergmeyer H. U.), pp. 875-879. Academic Press, New York.
21. Jacobs E. J. (1965) Uncoupling of oxidative phosphorylation by cadmium ion. *J. Biol. Chem.* **223**, 147-156.
22. Klotz H. and Bergmeyer H. U. (1965) In *Methods of Enzymatic Analysis* (ed. Bergmeyer H. U.), pp. 363-366. Academic Press, New York.
23. Ledig M., Fried R., Ziesel M. and Mandel P. (1982) Regional distribution of superoxide dismutase in rat brain during postnatal development. *Dev. Brain Res.* **4**, 333-337.
24. McCord J. M. and Fridovich I. (1969) Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte hemocuprein. *J. Biol. Chem.* **244**, 6049-6055.
25. Mead J. F., Sevannan A., Stein R. A. and Wu G. S. (1979) Lipid peroxidation in model and natural membranes. In *Biochemical and Clinical Aspects of Oxygen* (ed. Caughey W. S.), pp. 499-708. Academic Press, New York.
26. Noda Y., McGee P. L. and McGee E. G. (1983) Lipid peroxide distribution in rat brain and the effect of hyperbaric oxygen. *J. Neurochem.* **41**, 1329-1332.
27. Ortolenghi A. (1959) Interaction of ascorbic acid and mitochondrial lipids. *Arch. Biochem. Biophys.* **79**, 355-363.
28. Peikau A. (1982) Concluding remarks: a prospective view of active oxygen in medicine. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **60**, 1425-1429.
29. Phillis J. W. and Kostopoulos K. (1975) Adenosine as a putative transmitter in the cerebral cortex. Studies with potentiators and antagonists. *Life Sci.* **17**, 1085-1094.
30. Sies H. and Moss K. M. (1978) Role of mitochondrial glutathione peroxidase in modulating mitochondrial oxidations in liver. *Eur. J. Biochem.* **84**, 377-383.
31. Suzuki K. (1976) Lipids in the nervous system. In *Basic Neurochemistry* (eds Siegel G. J., Wayne Albers R., Katzman R. and Agraroff B. W.), pp. 303-328. Little, Brown, and Company, Boston.
32. Triggs W. J. and Willmore J. (1984) *In vivo* lipid peroxidation in rat brain following intracortical Fe²⁺ injection. *J. Neurochem.* **42**, 976-982.
33. Wijs H. (1980) In *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists* (ed. Horwitz W.), 440 pp. Academic Press, New York.

(Accepted 12 July 1985)

Day-Night Cycle of Lipidic Composition in Rat Cerebral Cortex

Mauricio Díaz-Muñoz,¹ Jorge Suárez,¹ Rolando Hernández-Muñoz,¹ and Victoria Chagoya de Sánchez^{1,2} 3/1

(Accepted August 15, 1986)

A study of the lipidic pattern of the cerebral cortex of the normal adult rat during the day-night cycle was carried out. The changes observed were the following: phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, phosphatidylinositol and phosphatidylserine plus phosphatidic acid showed a peak at 16:00 hr possibly due to a general increase in phospholipid biosynthesis. During the nocturnal period the variations of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine were not clearly observed, they might be due to an increase in the interconversion or exchange reaction, since the ratio phosphatidylcholine/phosphatidylethanolamine showed a significant change at 04:00 hr. This occurred because small but opposite changes in both phospholipids were observed, suggesting an increase in the methylation reactions of phospholipids. Cardiolipin showed a significant peak at 04:00 hr. Plasmalogens exhibited significant changes, an important diminution at 16:00 hr and a prominent peak at 24:00 hr. Cholesterol levels were high during the light period and low in the dark one. Cerebrosides and gangliosides showed no day-night variations. The changes observed indicate a phenomenon of biological rhythmicity synchronized by the photoperiod, suggesting that these fluctuations could act as physiological modulators of the properties and functions of the nerve cell membrane.

KEY WORDS:

INTRODUCTION

With the exception of adipose tissue, brain has one of the largest content in lipids among different organs; half of its dry weight correspond to lipid material. Brain lipids have a dual importance as structural constituents and as participants of the functional activity of the brain (1).

The lipidic composition of the brain shows significant variations among the different brain areas

but it remains relatively constant through adult life and it is unaffected by external factors such as changes in the diet (1). However Moscatelli and Demediuk (2) reported an increase in phosphatidylserine in the whole brain of the rats subjected to a low protein diet, little and controversial information is available regarding the effect of chronic ethanol consumption on brain lipids. Some authors reported an increase in cholesterol level in rat brain synaptosomes (2) and in synaptosomes membranes (3) while others reported a marked increase in phosphatidylserine or in the fatty acid composition of the membrane phospholipids (2-4) after chronic ethanol treatment. The exact functional significance of these changes is not yet clear but possibly are related with alterations of membrane properties.

¹Departamento de Bioenergética, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, D. F. MEXICO.

²Correspondence should be sent to: Victoria Chagoya de Sánchez, Instituto de Fisiología Celular, U.N.A.M. Apartado Postal 70-600, 04510 México, D.F. MEXICO.

and suggest the importance of the lipidic composition in the cell membrane function.

We have recently reported day-night variations in the lipid peroxidation of the cerebral cortex of normal adult rat (5) which suggest there are physiological changes in the membrane structure and possibly membrane properties during the light and the dark periods. These changes are synchronized with metabolic processes such as glutathione metabolism and superoxide dismutase activity and with physiological processes such as fasting and feeding or the resting and activity periods (5). We decided to explore the lipidic pattern of the cerebral cortex, represented by: phospholipids, plasmalogens, cholesterol, gangliosides and cerebrosides during the day-night cycle, as an effort to gain some insight into the physiological meaning of these biochemical changes related to the photoperiod. This study was done mainly in the cerebral cortex, in order to avoid the physiological and structural differences among different brain regions (6-9) and also to correlate our results with previous findings (5).

The results of this study might be of potential value since they report the circadian changes of the neurochemical parameters involved directly in the structural make-up of the brain.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Reagents. Chloroform, methanol, ammonium heptamolybdate, acetic anhydride, sulfuric acid, hexane, ethanol and TLC plastic silica-gel sheets were obtained from Merck; orcinol, resorcinol, ascorbic acid, p-nitrophenylhydrazine, galactose and sialic acid were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri). Other chemicals used were reagent grade.

Animals. Male Wistar rats weighing approximately 200 g. were used in this study. Food and water were supplied *ad libitum*. All animals were adapted for a minimum of 3 weeks to an environmental room equipped with a programmed 12 hour dark-12 hour light cycle at constant temperature and humidity. The light period lasted from 07:00 to 19:00 hours daily, animals were killed at 4 hr intervals, from 08:00 to 20:00 hr and every 2 hr from 22:00 to 06:00 hr; on the day of the study, maximum precautions were taken to avoid the stress. This schedule time for the experiments was chosen since previous studies from our laboratory, related with circadian changes of different components of the liver, blood and brain (5, 10, 11) had shown that during the resting period of the rat (lights on) no oscillatory behavior was observed in the different parameters studied.

Experimental Procedures. All studies were made in the cerebral cortex. Lipid components of this region were extracted by the Folch method (12). The phospholipids cardiolipin, phosphatidylcholine (Pc), phosphatidylethanolamine (Pe), phosphatidylinositol (Pi) and phosphatidylserine (Ps) together with phospho-

tidic acid were separated according to the procedure of García-Sáinz and Fain (13), and after hydrolysis the phosphate was measured by the Ames method (14). Plasmalogens were determined by measuring the aldehydes bound to the lipid fraction by the p-nitrophenylhydrazine method (15). Total cholesterol in the extract was measured by the Abel method (16). Cerebrosides were estimated by the determination of galactose concentrations in the extracts (17). Gangliosides were determined by measuring sialic acid in the lipid fraction (18), after handling the tissue according to Dreyfus et al. (19). Protein was measured by the biuret method (20).

The results of this study are expressed as mean \pm standard error. The statistical significance was calculated with an analysis of variance and when differences were found a Scheffe test (21) for multiple comparison was made.

RESULTS

The profile of the phospholipids: cardiolipin, Pc, Pe, Pi, Ps and phosphatidic acid during the day-night cycle in the brain cortex of the rat is present in Figure 1. In panel A, we can see a significant increase in the cardiolipin content up to 72% at 04:00 hr (Table I); Pc, Pe, Pi and Ps plus phosphatidic acid showed a maximum at 16:00 hr (panels B, C, D, and E respectively), but only Pe and Ps plus phosphatidic acid became significant with a Sheffe test (Table I). The nocturnal increase of these phospholipids was not statistically significant except the increase in Pi and Ps plus phosphatidic acid at 04:00 hr (panels D and E and Table I).

Knowing the changes of the individual phospholipids of the brain cortex, we present then the profile of the total phospholipids (Figure 2). A significant increase observed at 16:00, resulted from the augmentation in all the phospholipids studied (Figure 1). The increase in total phospholipids during the night (24:00-04:00 hr) was not significant.

The amphipathic nature of phospholipids make these compounds the major structural constituents of cell membranes. Considering the importance of the degree of methylation of membrane phospholipids we decided to estimate the methylating activity from the ratios Pc/Pe. The results obtained are shown in Figure 3; the ratio Pc/Pe remained low during the light time (08:00-16:00 hr) showing a significant increase at 04:00 hr (Figure 3) Table I) which result from the small but opposite changes of Pc and Pe observed at that time (Figure 1, panel B and C).

Other lipids that showed important day-night variations were the plasmalogens. The results are

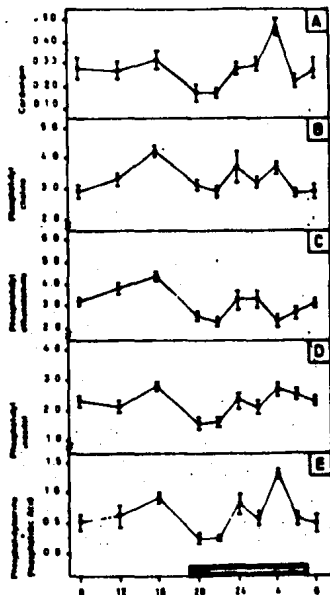


Fig. 1. Day-night variations of phospholipid composition of brain cortex of the rat. All values are reported as nmol of phospholipid per mg of protein of brain tissue. Dark bar indicates the night period. Points represent the mean \pm SEM of 5 to 8 experimental data.

presented in Figure 4. It can be seen that plasmalogens reach a minimum at 16:00 hr and a significant increase from 22:00 hr to 02:00 hr (Table I). One of the major component of the nervous cell membranes is cholesterol. The day-night variations of this compound are shown in Figure 2. Cholesterol was low during the dark period (20:00–04:00 h) and increased markedly since 06:00 hr until 16:00 hr (Table I).

The levels of cerebroside and gangliosides were also measured, but none showed oscillations along the 24 hours. Cerebroside were constant at

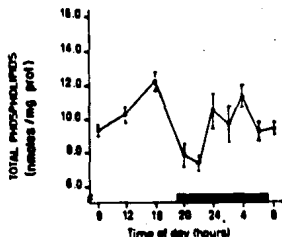


Fig. 2. Day-night variations of total phospholipids of the brain cortex of the rat. The dark bar indicates the night period. Points represent the mean \pm SEM of 5 to 8 experimental data. Values were taken from Figure 1.

$380 \pm 45 \mu\text{g} \cdot \text{mg protein}^{-1}$ while gangliosides had a value of $479 \pm 59 \mu\text{g} \cdot \text{mg protein}^{-1}$ during the day-night cycle.

The statistical analysis of the results of this study was performed by a non parametric test of Mann-Whitney (22), fixing an U value of 0.05. In this analysis most of the changes are significant (not shown results), however we rather to use an analysis of variance and a Scheffe test also with a probability value of 0.05. The results are presented on Table I, it can be seen that the variation of the lipidic parameters studied presented significative difference mainly at two times of the day 16:00 hr and

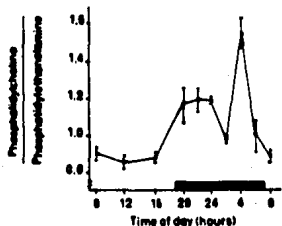


Fig. 3. Day-night variations of the phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine ratio. Dark bar indicates night period. Points represent the means \pm SEM of 5 to 8 experimental data. Values were taken from Figure 1.

Table 1. Statistical Analysis with a Scheffé Test for the Values of the Lipidic Parameters Studied

Parameter	Time of the day (h)									
	08:00	12:00	16:00	20:00	22:00	24:00	02:00	04:00	06:00	
Cardiolipin	—	—	—	a	a	—	—	*a	—	
Phosphatidylcholine	—	—	—	*a	a	—	—	a	—	
Phosphatidylethanolamine	—	—	—	a	a	—	—	a	—	
Phosphatidylinositol	—	—	—	—	—	—	—	*a	—	
Phosphatidylserine + Phosphatidic acid	a	a	*b,a	a,b,c	a,b,c	*c,a	a	*a	—	
Total phospholipids	—	—	*a	—	a	—	—	—	—	
Phosphatidylcholine	a	a	a	—	—	—	a	*a	a	
Phosphatidylethanolamine	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Plasmalogens	—	a	a,b,c	—	*b	*a	*c	a	a	
Cholesterol	—	*b	—	—	—	—	—	a,b	*a	

Probability level for a Scheffé test was fixed on 0.05. The * means that the value is statistically different, the letter of the subindice indicates versus what time-values is significantly different.

04:00 hr, three hours before of the onset of light and darkness.

DISCUSSION

During this work, important changes in the lipidic pattern of the cerebral cortex of normal adult rats during the day-night cycle were observed. The changes suggest a phenomenon of biological rhythmicity associated with metabolic and physiological functions, possibly synchronized by the photoperiod. Two fundamental questions arised from these results: a) How the levels of the lipidic component were change. b) What is the physiological significance of those variations. At the moment it

is difficult to answer them but we can try to discuss our results in the light of other authors findings.

a) In relation to the first question, the main fluctuations were observed in phospholipids (Fig. 1, 2 and 4); at certain times of the day, the concentration equilibrium was lost, probably due to an unbalance between biosynthesis and catabolism. The general augmentation in phospholipids (Figures 1 and 2) observed at 16:00 hr could be due to an increase in the de novo synthesis, since in the nervous cells the enzymatic machinery necessary to form Pe and Pc from choline or ethanolamine by the cytidine pathway (23-26) is present. During the dark period, the variations of phospholipids (Figure 1) are possibly due to an interconversion or to exchange reactions

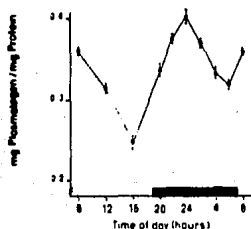


Fig. 4. Day-night variations of plasmalogens of cerebral cortex of the rat. Dark bar indicates night period. Points represent the mean \pm SEM of 5 to 8 experimental data.

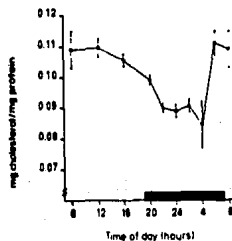


Fig. 5. Day-night variations of total cholesterol of cerebral cortex of the rat. Dark bar indicates night period. Points represent the mean \pm SEM of 5 to 8 experimental data.

(27). The formation of P_c by successive methylations of P_e is suggested by the elevated ratio P_c/P_e at 04:00 hr (Figure 3). Early studies with radioactive precursors (24, 28) had shown that the methylation pathway is not a major pathway for the synthesis of phospholipids in the brain, however these experiments possibly were realized during the day time in which this reaction is negligible (Fig. 3).

Also in the dark the base-exchange reactions seem to be very active. These reactions are responsible for the energy-independent incorporation of choline, ethanolamine and serine into the membrane phospholipids: P_c, P_e and P_s respectively (29, 30). The high level of P_s during the night (24:00 and 04:00 hr) could be explained through the serine base exchange with P_e, this possibility could also be valid for the 16:00 hr increase, since this is the only route known for P_s production in the brain (31). It is also interesting that P_i also can be synthesized by an exchange reaction (32) through an energy independent incorporation of inositol in the presence of manganese and cytidine nucleotides. What mechanisms regulate these interconversions and exchange reactions is not yet clear, but possibly the enzymes encharged of these reactions are modulated by neurotransmitters as was demonstrated by Leprohon et al. (33) for the dopamine activation of the methyltransferases and the stimulation of the synthesis of P_c in rat brain neurons, and by Lapetina and Michell (34) demonstrating that acetylcholine stimulates P_i formation.

Brain is one of the organs with a higher content of plasmalogens (35) being the most abundant the ethanolamine derivative, they have been considered as lipids associated with nonmyelin membranes. Discrete changes during ontogenic development have been reported for these lipids (36). The profile of plasmalogens obtained in this study (Figure 4) is different to that of the other phospholipids (Figure 1). The more evident change is their diminution at 16:00 hr, at the same time in which the other phospholipids increase (Figures 1 and 2), the recovery to its normal level occurs when there is a diminution of the other phospholipids (Figures 1 and 2) at 20-22:00 hr. These results suggest a competence for a common precursor for plasmalogens and phospholipids like P_c, P_e, P_i and P_s or it could be due to a feedback regulation for plasmalogens formation.

Cholesterol levels also showed marked differences between the light and the dark periods; with a decrease at night: (20:00-04:00 hr) at this time there is a metabolic out-burst and a competence for

acetyl-CoA. An important pathway that drains off acetyl-CoA is the synthesis of acetylcholine, this transmitter presents diurnal oscillations (37, 38) with variations in the different cerebral regions (6).

An interesting observation is that the most significant changes in the lipids studied occurred at 16:00 and at 04:00 hr (Table I). Similar schedule-times were previously reported (5) for the changes in lipoperoxidation, unsaturation and superoxide dismutase activities. All these changes suggest that at those times of the day, the cells (in this case of the brain cortex) have been prepared metabolically for the onset of the activity or resting periods which start approximately three hours later. Other general observation is the marked changes at 20:00-22:00 hr, suggesting that this could be a transition time.

b) The physiological significance of the changes here described is difficult to assess now with the present data however if we consider that phospholipids along with cholesterol are the major structural components of cell membranes we can suppose that the changes here described might occur in the plasma or microsomal membranes. In this respect, Hirata et al. (39) showed that the intramembrane methylation of the phospholipids induces its rapid translocation and could modify the membrane fluidity and surface charge. Moreover, a change in composition that is known to alter membrane viscosity is a change in cholesterol/phospholipids ratio. On this basis we might expect that the fluidity of the membrane lipid matrix is altered during the day-night cycle, being more fluid during the night because of a higher methylating activity (Figure 3), low cholesterol levels (Figure 5) and increased number of unsaturated bonds in brain cortex lipids (5).

Membrane fluidity plays an important role in several membrane functions such as the activity of the membrane enzymes (40), accessibility of receptors (41) and neurotransmitter secretion (42) among others.

Although it is difficult to correlate the variations reported here with a modulation of the membrane properties, it is highly probable that the changes in the composition of certain membrane regions might affect nerve cell function. Furthermore, the changes in membrane composition could be a physiological way to modulate membrane function synchronized by the photoperiod, and acting as oscillator related to light and darkness or with some physiological functions such as fasting and feeding or the resting and activity periods of the rat.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors want to express their gratitude to Dr. Antonio Peña and Dra. Aurora Brunner for their careful revision of this manuscript. Drs. Beatriz Fuentes Pardo for helpful discussion, Mr. Jesús Hernández for the statistical evaluation and to Mrs. Susana Vidrio and Miss Lucía Yáñez for their technical assistance. This research was partially supported by a grant from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología PCSABNA 022497.

REFERENCES

- Suzuki, K. 1976. Chemistry and metabolism of brain lipids. Pages 308-328. In Siegel, G. J., Albers R. W., Katzman R., Agrawal B. W. (eds). *Basic Neurochemistry*. Little Brown and Company, Boston.
- Mosconi, E. A., and Demadick, P. 1969. Effects of chronic consumption of ethanol and low-thiamine, low-protein diet on the lipid composition of rat whole brain and brain membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 59:331-337.
- Chiu, J. H., Purson, L. M., and Goldstein, D. B. 1978. Increased cholesterol content of erythrocytes and brain membranes in ethanol-tolerant mice. *Biochim. Biophys. Acta* 513:356-363.
- Littler, J. M., and John, G. 1977. Synaptosomal membrane lipids of mice during continuous exposure to ethanol. *J. Pharmacol.* 29:375-380.
- Díaz-Muñoz, M., Hernández-Muñoz, R., Suárez, J., Chagoya de Sánchez, V. 1983. Day-night cycle of lipid peroxidation in rat cerebral cortex and their relationship to the glutathione cycle and superoxide dismutase activity. *Neuroscience* 18:859-863.
- Saito, Y., Yamashita, I., Yamazaki, K., Ohada, F., Satomi, R., and Fujieda, T. 1975. Circadian fluctuation of brain acetylcholine in rats. *Life Sci.* 16:281-288.
- Fuchs, J. L., and Moore, R. Y. 1980. Development of circadian rhythmicity and light responsiveness in the rat suprachiasmatic nucleus: A study using the 2-deoxy[1-¹⁴C]glucose method. *Proc. Natl. Acad. Sci. US* 77:1284-1288.
- Neda, V., McGeer, P. L., and McGeer, E. G. 1983. Lipid peroxide distribution in the rat brain and the effect of hyperbaric oxygen. *J. Neurochem.* 40:1325-1332.
- Hough, L. B., Khandewal, J. K., and Green, J. K. 1984. Histamine turnover in regions of rat brain. *Brain Res.* 291:103-109.
- Chagoya de Sánchez, V., Hernández-Muñoz, R., Díaz-Muñoz, M., Suárez, J., Vidrio, S., and Yáñez, L. 1983. Circadian variations of adenosine and its physiological meaning in the energetic homeostasis of the cell and the sleep-wake cycle of the rat. In *Proc. 4th. Int. Congr. Sleep Res.* 235 Bologna, Italy.
- Chagoya de Sánchez, V., Hernández-Muñoz, R., Díaz-Muñoz, M., Villalobos, R., Giender, W., Vidrio, S., Suárez, J., and Yáñez, L. 1983. Circadian variations of adenosine level in blood and liver and its possible physiological significance. *Life Sci.* 33:1057-1064.
- Folch, J., Lees, M., and Sloane Stanley GH. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226:497-509.
- García-Sáinz, J. A., and Fain, J. N. 1980. Effect of insulin, catecholamines and calcium ions on phospholipid metabolism in isolated white fat cells. *Biochem. J.* 180:781-789.
- Amer, L. 1960. Analysis of phosphate in a lipid sample from animal tissue. *J. Biol. Chem.* 235:769-775.
- Pries, C., and Bottcher, C. J. F. 1965. The determination of free and plasmalogen-bound aldehydes in lipid fraction. *Biochim. Biophys. Acta* 98:329-334.
- Abell, L. V., Levy, B. B., Brodie, B. B., and Kendall, F. E. 1952. A simplified method for the estimation of total cholesterol in serum and demonstration of its specificity. *J. Biol. Chem.* 195:357-366.
- Hess, H. N., and Lewin, E. 1965. Microassay of biochemical structural components in nervous tissues-II. *J. Neurochem.* 12:205-211.
- Svensenholm, L. 1957. Quantitative estimation of stialic acids. *Biochim. Biophys. Acta* 24:604-611.
- Dreyfus, H., Harth, S., Giuliani-Debernardi, A., Roos, M., Mack, G., and Mandel, P. 1982. Gangliosides in various brain areas of three inbred strains of mice. *Neurochem. Res.* 7:477-487.
- Jacobs, E. J. 1956. Uncoupling of oxidative phosphorylation by cadmium ion. *J. Biol. Chem.* 223:147-156.
- Scheffé, H. 1953. A method for judging all contrasts in the analysis of variance. *Biometrics*, 48:87-104.
- Mann, H. B., and Whitney, D. R. 1947. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Ann. Math. Statist.* 18:50-60.
- Ansell, G. B. and Spanner, S. 1968. The metabolism of (Me-³H) choline in the brain of the rat in vivo. *Biochem. J.* 110:201-208.
- Ansell, G. B. and Spanner, S. 1967. The metabolism of labelled ethanotamine in the brain of the rat in vivo. *J. Neurochem.* 14:873-883.
- Porcellati, G., Siazon, M. G., and Arienti, G. 1970. Incorporation of phosphorylcholine into phospholipids of brain microsomes in vitro. *Lipids* 5:723-733.
- Ansell, G. B., and Metcalfe, R. F. 1971. Studies on the CDP-ethanolamine 1,2-glyceryl ether ethanolamine phosphotransferase of rat brain. *J. Neurochem.* 18:647-665.
- Dawson, R. M. C. 1965. Enzymic pathways of phospholipid metabolism in the nervous system. Pages 43-73 in Eichberg, J. (ed.) *Phospholipids in nervous tissue*. John Wiley and Sons.
- Chojnacki, T., Korzybski, T., and Ansell, G. B. 1964. The methylation of natural and unnatural analogues of ³²P-labelled phosphatidyl-ethanolamine by brain and liver tissue. *Biochem. J.* 90:18-19.
- Porcellati, G., Arienti, G., Protta, M., and Giorgini, D. 1971. Base-exchange reactions for the synthesis of phospholipids in nervous tissue: the incorporation of serine and ethanolamine into the phospholipid of isolated brain microsomes. *J. Neurochem.* 18:1395-1417.
- Kanfer, J. N. 1972. Base exchange reaction of the phospholipids in rat brain particles. *J. Lipid. Res.* 13:466-476.
- Yavin, E., and Zeigler, B. P. 1977. Regulation of phospholipid metabolism in differentiating cells from rat brain cerebral hemispheres in culture. *J. Biol. Chem.* 252:260-267.
- Hokob, B. J. 1975. Microsomal phosphatidylinositol. *Lipids* 10:483-490.
- Lapobron, C. E., Blustajn, J. K., and Wurtman, R. J. 1983. Dopamine stimulation of phosphatidylcholine (lecithin) synthesis in rat brain neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. US* 80:2063-2066.
- Lapetina, E. G., and Michell, R. H. 1972. Stimulation by acetylcholine of phosphatidylinositol labelling. Subcellular distribution in rat cerebral-cortex slices. *Biochem. J.* 126:1141-1147.
- Masoro, E. J. 1968. The function of lipids in membranes of mammalian cells. Pages 274-292. In Saunders, W. B. (ed.) *Physiological Chemistry of lipids in mammals*. W. B. Saunders Co. London.
- Benjamins, J. A., and McKhann, G. M. 1976. Development.

- regeneration and aging. Pages 365-387, in Siegel, G. J., Albers, R. W., Katzman, R. and Agranoff, B. W. (eds). *Basic neurochemistry*. Little, Brown and Company, Boston.
37. Hanin, I., Massarelli, R., and Costa, E. 1970. Acetylcholine concentrations in rat brain. *Science* 170:341-342.
38. Friedman, A. H. and Walker, C. A. 1969. Circadian rhythm in central acetylcholine and the toxicity of cholinergic drugs. *Fed. Proc.* 28:251.
39. Hirata, F., Axelrod, J., and Strittmatter, J. 1979. Methylation of membrane phospholipids. Pages 231-240, in Usdin E, Borchardt R. T. Creveling C. R. (eds.). *Transmethylation*. Elsevier North Holland, New York.
40. Sanderman, H. 1978. Regulation of membrane enzymes by lipids. *Biochim. Biophys. Acta* 513:209-237.
41. Heron, D. S., Shinitzky, M., Hershkowitz, M., and Samuel, D. 1980. Lipid fluidity markedly modulates the binding of serotonin to mouse brain membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. US.* 77:7463-7467.
42. Crews, F. T., Camacho, A., Phillips, I., Tjeenk Willink, E. C., Calderini, G., Hirata, F., Axelrod, J., McGivney, A., and Siraganian, R. 1982. Effects of membrane fluidity on mast cell and nerve cell function. Pages 21-35, in Horrocks L. et al. (eds). *Phospholipids in the nervous system*, Vol 1. Raven Press, New York.

DISCUSION.

1.- Significado de los hallazgos reportados.

a) Dinámica de las membranas celulares.- Como se ha venido constatando en los últimos años, las membranas biológicas son verdaderos organelos con función y estructura bien definidas. Al estar formadas estas entidades por una mezcla diversa de constituyentes de distinta naturaleza, - se vuelve difícil el estudio de la regulación de las funciones que en ella se llevan a cabo. Otro factor de complejidad que se debe adicionar al punto anterior, es el recambio, las interconversiones, y las oscilaciones temporales de los constituyentes de las membranas, todo lo cual las convierte en estructuras dinámicas y cambiantes. En el presente trabajo se hace énfasis en la ritmicidad que presentan algunos componentes de las membranas -- del Sistema Nervioso Central por lo que a continuación se discutirá la importancia y el posible significado de cada uno de los resultados obtenidos:

1.- Los cambios observados durante las 24 horas de la actividad lipoperoxidativa, sugieren que la generación de oxígeno activo, así como las defensas antioxidativas presentan fluctuaciones, siendo éstas de tal naturaleza que permiten un aumento de casi 100% de la lipoperoxidación cerebral durante el período de oscuridad. Lo anterior se confirma al observarse que el incremento en la actividad lipoperoxidativa coincide con un aumento de las insaturaciones en el extracto lipídico, así como con una disminución de la actividad de la glutatión peroxidasa. Lo anterior se puede interpretar en el sentido de que la elevada lipoperoxidación nocturna podría deberse a un incremento en el sustrato del ataque del oxígeno activo y a una disminución en el procesamiento de los hidroperóxidos generados. Otros parámetros

que convergen con el aumento nocturno de la actividad lipoperoxidativa son una disminución en los niveles de glutatión reducido y un aumento de la actividad de la superóxido dismutasa. Los valores incrementados del glutatión reducido tienen una posible explicación en la ya mencionada baja actividad de la glutatión peroxidasa, ya que al funcionar esta enzima, el glutatión se transforma a su forma oxidada. La superóxido dismutasa aumentada sugiere la participación del ión superóxido en el aumento de la lipoperoxidación nocturna. Es interesante que aunque el ión superóxido sea neutralizado por la acción de esta enzima, es posible todavía generar oxígeno activo por medio de los siguientes eventos: como consecuencia de la dismutación del ión superóxido se genera agua oxigenada (H_2O_2), este compuesto en la mayoría de los tejidos se metaboliza hacia $H_2O + O_2$ por medio de la catalasa, pero en sistema nervioso, esta enzima se encuentra casi ausente (35), por lo que su descomposición del H_2O_2 se lleva a cabo por la glutatión peroxidasa. Como esta enzima se encuentra en baja actividad durante la oscuridad, el H_2O_2 es susceptible de presentar la reacción de Fenton en presencia de hierro o cobre. La reacción de Fenton genera radicales oxhidrilos (OH^{\cdot}), los cuales son sumamente reactivos y podrían eventualmente ser los responsables de la elevada actividad lipoperoxidativa encontrada durante la noche. Se ha reportado variaciones regionales en el cerebro de la rata en el contenido de Fe y Cu, que concuerdan de manera muy aceptable con la actividad lipoperoxidativa observada en cada región, por lo que se podría suponer que estos cationes pudieran actuar como inductores de la lipoperoxidación cerebral (36). Cabe mencionar que como dato aún no publicado, en el trabajo de laboratorio se caracterizaron las variaciones luz-oscuro

ridad del ciclo de las pentosas. La técnica se desarrolló según la técnica de (37) utilizando una preparación sinaptosomal cruda. Se encontró una disminución significativa en la actividad de esta vía metabólica durante el período de oscuridad coincidiendo con la fase de alta lipoperoxidación. Este dato podría interpretarse en el sentido de que el ciclo de las pentosas provee de poder reductor (NADPH) a la glutatión reductasa, la cual convierte al glutatión oxidado en reducido, siendo este el sustrato para la acción de la glutatión peroxidasa que es la enzima que se encarga de procesar los peróxidos formados por oxígeno activo; al estar disminuido el ciclo de las pentosas no hay suficiente glutatión reducido, impidiendo el funcionamiento de la glutatión peroxidasa, siendo ambas predicciones consistentes con los resultados obtenidos en este reporte. Lo más importante de esta correspondencia es que existe una lógica interna entre los datos obtenidos en la corteza cerebral total, como son todos los resultados de los 2 trabajos publicados, y el del ciclo de las pentosas trabajado en sinaptosomas. Lo anterior podría sugerir que algunas de las variaciones reportadas podrían estar verificándose en los sinaptosomas o terminaciones de las neuronas de la corteza cerebral.

2.- Las fluctuaciones de la actividad lipoperoxidativa encontradas en la corteza cerebral del cerebro de la rata parecen ser un fenómeno concertado en el que intervienen varios elementos. La repercusión que a nivel de membrana celular tiene este efecto, es difícil de discernir, pero apoyándose en información de la literatura, se podría suponer que la membrana que sufre el proceso peroxidativo aumenta su rigidez (38). Este corolario podría rectificarse por el hecho del aumento de insaturaciones en el extracto lipídico, el cual haría más fluida la membrana celular. De cualquier modo es

hace necesario verificar que los hallazgos reportados se lleven a cabo en la misma membrana.

3.- Los resultados anteriores sugieren que las membranas celulares de la región cerebral estudiada se ven afectadas por el período de luz-oscuridad. Con el propósito de comprobar si algún otro elemento relacionado con las membranas pudiera presentar oscilaciones temporales, se procedió a cuantificar las diversas clases de lípidos que conforman las membranas del sistema biológico estudiado. De esta manera se verificaron fluctuaciones de la mayoría de las fosfolípidos glicéricos, de plasmalígeos y del contenido de colesterol; mientras que los gangliósidos y cerebrósidos permanecieron inalterables durante el período de luz-oscuridad.

4.- La ritmicidad presentada por los fosfolípidos difirió de la mostrada por la actividad lipoperoxidativa, principalmente, por presentar incrementos en varias horas independientemente de la fase luminosa o de la oscura del experimento, mientras que los niveles altos de la lipoperoxidación se concentraron durante todo el período de oscuridad. Los 5 fosfolípidos ensayados, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina y cardiolipina presentaron fluctuaciones. Integrando los cambios presentados por todas estas moléculas, es interesante notar un aumento de la cantidad de fosfolípidos totales a las 16.00 h., así como un incremento nocturno en la relación fosfatidilcolina/fosfatidiletanolamina. En relación con estos hechos se ha reportado que sinaptosomas aislados de cerebro de rata poseen la capacidad de sintetizar fosfolípidos de manera autónoma del resto de la neurona (39). Además, los cambios encontrados en los fosfolípidos su-

gieren que la distribución asimétrica de éstos en la membrana puede ser objeto de modulación. Se acepta que la monocapa externa es rica en fosfatidilcolina, mientras que la interna capta en su totalidad la fosfatidilserina y el fosfatidilinositol; la fosfatidiletanolamina se localiza en ambas monocapas. Se ha descrito que además de la síntesis de fosfolípidos dependientes de citidín nucleótidos, las membranas celulares son capaces de interconvertir en cierta medida los fosfolípidos presentes en ella. Así por ejemplo, la fosfatidilserina descarboxilasa convierte a la fosfatidilserina en fosfatidiletanolamina y una serie de dos metiltransferasas se encarga de transformar la fosfatidiletanolamina en fosfatidilcolina (40). Esta última actividad, que ha sido ampliamente estudiada por Axelrod y col, trae como consecuencia una translocación de -- fosfolípidos de la monocapa interna a la externa, reflejándose este fenómeno como un aumento en la fluidez de la membrana, el cual permite -- eventos secretorios asociados (41). Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que si el incremento nocturno de la relación fosfatidilcolina/fosfatidiletanolamina se ubica en alguna población definida de membranas neuronales, las propiedades biofísicas de ésta, oscilarían en los diferentes lapsos del período de luz-oscuridad.

5.- Uno de los factores que más claramente afectan las propiedades físicas de las membranas celulares es la presencia de colesterol. Esta molécula rigidiza las membranas y su contenido en la bicapa fosfolipídica modula diversas acciones enzimáticas (42). El contenido de colesterol en la corteza cerebral presentó una disminución importante en sus niveles durante la fase de oscuridad. Si suponemos que este efecto se presentó en una población homogénea de membranas celulares, debemos inferir que --

esas membranas son más fluidas durante la noche que en el día.

Otro componente lipídico de las membranas del sistema nervioso que presentó una oscilación bien definida, fueron los plasmalógenos. Estos esterofosfolípidos han cobrado recientemente una gran importancia al descubrirse que las membranas de las arqueobacterias tienen como único constituyente lipídico a los plasmalógenos (43). En el sistema nervioso se ha reportado que durante la ontogenia la cantidad de plasmalógenos cerebrales incrementan de manera importante después del nacimiento (44): El patrón temporal que presentaron los plasmalógenos en la corteza cerebral de la rata, a diferencia de los otros fosfolípidos estudiados, muestran una disminución significativa a las 16:00 h.

6.- Aunque los anteriores resultados y comentarios conciernen principalmente con los componentes lipídico de las membranas celulares, existen reportes en la literatura que indican variaciones luz-oscuridad y circádicas de proteínas neuronales de membrana. Estas informaciones se refieren a cambios en el número o en la afinidad de un gran número de receptores a diversos neurotransmisores, tales como la serotonina, la norepinefrina, dopamina, etc. (45). Estos cambios pueden deberse a una síntesis aumentada de la proteína en sí, por una mayor actividad transcripcional y traduccional, o en el caso principal de los cambios de afinidad, a variaciones de la estructura terciaria de la proteína en respuesta a modulaciones del ambiente lipídico de la membrana. Este último punto cobra importancia a la luz de los resultados aquí reportados.

2.- Heterogeneidad del Sistema Nervioso.

Desde hace un buen número de años, en la mente de los científicos existe la inquietud por descifrar el enigma del funcionamiento

del más fascinante de todos los órganos: el cerebro. Esta tarea titánica se dificulta por el alto grado de complejidad que presenta el Sistema Nervioso. Algunos de los niveles de organización que presenta este sistema y que es pertinente revisar en relación a los datos obtenidos en el presente reporte, son los siguientes:

1.- El Sistema Nervioso Central de los mamíferos superiores está formado por regiones con una estructura y función características. En este sentido podemos distinguir áreas de un mayor desarrollo filogenético, como la corteza cerebral y otras más primitivas como las pertenecientes al sistema límbico. La presencia de neurotransmisores y neuromoduladores varía de región a región, así como el número y clase de los receptores de cada uno de ellos. En referencia a los parámetros que se cuantificaron en este trabajo, ya se ha reportado un estudio en el que cuantificaron la actividad lipoperoxidativa en todas las áreas del encéfalo (46); los resultados indican que la sustancia negra es la parte del sistema nervioso -- que más lipoperoxida, teniendo también valores elevados la corteza, el cerebelo y el hipotálamo y con niveles discretos, la médula oblonga y la médula espinal.

2.- Como ya se comentó en la Introducción, en el Sistema Nervioso se localizan una gran cantidad de formas celulares, entre las que podemos distinguir principalmente neuronas y células gliales o acompañantes. Son numerosas las revisiones y los libros de texto que enfatizan la gran diversidad de formas neuronales que podemos encontrar en el cerebro, algunas -- de las más representativas son las células cerebelesas de Purkinje, las células piramidales de la corteza y aquéllas del hipocampo, por mencionar algunos ejemplos. Existen neuronas monopolares, bipolares; otras que for-

man sinapsis químicas con sus vecinas y algunas más que lo hacen de manera electrofónica. Entre las células gliales se localizan entidades de varias clases, siendo la principal, los astrocitos. Aún aquí, se han reportado diversas clases de astrocitos dependiendo la región cerebral estudiada (47). Todo lo anterior nos indica que en Sistema Nervioso debemos considerar varias posibles fuentes de membranas biológicas que estarían representadas - por las diferentes poblaciones celulares del cerebro.

3.- La unidad funcional del Sistema Nervioso es la neurona. Esta célula -- especializada en la conducción de impulsos eléctricos y que desempeña una de las labores de comunicación e integración más notables, posee una morfología muy característica. A pesar de las diferentes formas neuronales que se mencionaron en el punto anterior, la neurona posee una topografía propia. Esta topografía se puede conceptualizar en una parte receptora o dendrítica, una sección conductora o axónica y una terminal efectora o sináptica. Se ha documentado en gran extensión que cada una de estas regiones -- neuronales posee dominios de membrana propios y diferentes a los otros --- dos (48). Para ejemplificar este punto, basta citar que el impulso nervioso se genera en una parte especializada del axón, cercana al soma, que se denomina como axónico. Esta subregión neuronal posee una población de canales iónicos diferente de la dendrítica y del resto del axón (49). La sinapsis es la parte de la neurona especializada en la secreción o liberación - de los mensajeros químicos. La membrana plasmática en este nivel debe ser de tal naturaleza que permita la fusión y el reciclamiento de las vesículas sinápticas. En resumen, aún si consideramos a la población neuronal - como mayoritaria de nuestro sistema biológico de estudio, tendríamos que aceptar la presencia de dominios independientes y definidos de las sub-

estructuras neuronales.

4.- Otro aspecto que interesa a los argumentos de esta discusión, concierne a la naturaleza eucarionte de todas las células distintas que se localizan en el Sistema Nervioso. Ya que el presente estudio se realizó en los extractos lipídicos de corteza cerebral de rata, éstos incluyen todas las endomembranas y organelos de las neuronas y células gliales -- ahí contenidos. Por lo tanto, no es extraño que uno de los fosfolípidos detectados en los estudios de ritmicidad sea la cardiolipina, que se -- considera un lípido marcador de mitocondria. Las implicaciones que tiene este punto en particular son interesantes, ya que se ha documentado variaciones en la relación colesterol/fosfolípidos entre retículo endoplásmico liso y el rugoso (50); así como diferentes poblaciones mito--- condriales, sinápticas y no sinápticas o libres (51). Todo lo cual añade un nivel más de complejidad al estudio del Sistema Nervioso y en particular, al presente trabajo, lo obliga a valorar con precaución los hallazgos obtenidos.

5.- En resumen, el estudio de las membranas celulares del Sistema Nervioso contempla varios niveles de complejidad: el área del encéfalo que se elija como de interés; la clase y proporción de elementos celulares presenta la topografía neuronal y la presencia de membranas internas en cada una de las células de la porción del encéfalo a estudiar.

3.- Osciladores biológicos.

Todos los organismos eucarióticos, desde los protistas a los vertebrados superiores, utilizan osciladores endógenos en el proceso de adaptación al medio ambiente. En los sistemas multicelulares se vuelve imprescindible jerarquizar la amplia gama de osciladores que en ellos se

presenta. La conjunción de las células en el contexto de un tejido, un órgano o un organismo, les confiere la capacidad de oscilar de una manera coordinada resultando esta puesta en fase de los osciladores individuales en la aparición de complejos fenómenos fisiológicos (52). Un ejemplo que ilustra el postulado anterior es la periodicidad cercana a las 24 horas que presenta la actividad del ojo de Aplysia y que resulta de la interacción de una población de neuronas. Si se empieza a eliminar cada una de estas células, se llega al límite en que el período de oscilación de la actividad óptica se hace mucho menor de las 24 horas originales (53). Uno de los principales sincronizadores de los ritmos biológicos es el ciclo luz-oscuridad que en la mayor parte de nuestro planeta se encuentra cercano a las 24 horas. Los hallazgos encontrados en el presente trabajo, a pesar de que no se ha demostrado su naturaleza endógena, constituyen un número importante de ritmos que de manera coordinada, modulan la estructura lipídica de la corteza cerebral de la rata. Gran parte de las fluctuaciones encontradas en este sistema respondieron al período de luz-oscuridad previamente establecido; y de esta manera las oscilaciones concuerdan con las variaciones en patrones generales de conducta, como serían el período de sueño-vigilia, descanso-actividad, o el de ingesta de alimentos, etc. Aunque no se ha demostrado aún una correspondencia o función fisiológica de los ritmos en los componentes membranales de la corteza cerebral, y no sabemos que tan generalizados sean en otras áreas del encéfalo, podemos sugerir a raíz de los datos de la literatura que los cambios día-noche aquí reportados, podrían repercutir en el funcionamiento de las células nerviosas y de esa manera funcionar como uno de los oscilado-

res biológicos responsables del complejo funcionamiento del cerebro.

CONCLUSIONES.

En base a los datos reportados en los dos trabajos publicados, podemos concluir que:

a) Hemos detectado un fenómeno rítmico en la corteza frontal de la rata que comprende componentes y actividades de los sistemas de membrana en dicha región cerebral.

b) La naturaleza de las variaciones es tal, que podemos suponer que un buen número de funciones membranales pueden verse moduladas por las fluctuaciones reportadas.

c) Es necesaria una exploración posterior para definir con precisión el sustrato celular, morfológico y topográfico de las ritmicidades encontradas.

d) Las fluctuaciones responden a un período de luz-oscuridad de 12 h por 12 h por lo que se debe constatar si son de naturaleza endógena.

e) Los ritmos aquí reportados y que tienen como sustrato las membranas del Sistema Nervioso, pueden ser algunos de los osciladores biológicos que influyen en las diferentes conductas que muestra la rata, como son el período de descanso y actividad, el de ingesta de alimentos y el de sueño-vigilia, estando todos ellos regulados por el fotoperíodo.

BIBLIOGRAFIA.

I) Libros.

- 1.- Lehninger, A. 1983. "Lípidos y Membranas". Bioquímica. Ed. Omega.
- 2.- Herman, R.H. Cohn, R. M. y McNamara, P. D. 1980. "Non equilibrium thermodynamics, non covalent forces, and water". Principles of Metabolic Control in Mammalian Systems. Plenum Press. New York and London.
- 3.- Cohn, R.M., Yudkoff, M. y McNamara, P.D. 1980. "Servomechanisms and Oscillatory Phenomena". Principles of Metabolic Control in Mammalian Systems. Plenum Press. New York and London.
- 4.- Lans, G. 1979. "The role of lipids on the structure and function of membranes". Subcellular Biochemistry, Vol. 6. Plenum Press. - New York and London.
- 5.- Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C. 1985. "The Chemistry of oxygen radicals and other oxygen-derived species". Free Radicals in Biology and Medicine. Clarendon Press. Oxford.
- 6.- Halliwell, B y Gutteridge, J.M.C. 1985. "Lipid peroxidation: a radical chain reaction". Free Radicals in Biology and Medicine. Clarendon Press. Oxford.
- 7.- Albers, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K y Watson, J.D. 1983. "The nervous system". Molecular Biology of the Cell. - Garland Publishing Inc. New York and London.

II) Artículos.

- 1.- Abraham, K.A., y Eikhon, T.S. 1972. *Biochem. J.* 149:669-674.
- 2.- Adler, A.J., Grossman, L. y Fasman, H.O. 1969. *Biochemistry*. 8:3846-3859.
- 3.- Davies, R.J. 1973. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 52:1115-1122.
- 4.- Darnell, J.E., Wall, R., y Tushinski, R.J. 1971. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68:1321-1325.
- 5.- Montenay-Garestier, T., Helene, C., y Michelson, A.M. 1969. *Bio -- chem. Biophys. Acta* 182:342-354.
- 6.- Lisardi, P.M., Williamson, R., y Brown, D.D. 1975. *Cell.* 4:199-205.
- 7.- Olans, S. 1970. *Eur. J. Biochem.* 15:464-471.
- 8.- Slater, I., Gillespie, D., y Slater, D.W. 1973. *Proc. Natl. Acad. - Sci. U.S.A.* 70:406-411.
- 9.- Cann, A., Gambino, R., Banks, J. y Banks, A. 1974. *J. Biol. Chem.* 249:756-7540.
- 10.- Wieggers, U., y Hils, H. 1972. *FEBS Lett.* 23:77-82.
- 11.- Torrence, F.F., De Clercq, E., y Witkop. B 1977. *Biochem. Biophys. Acta* 475:1-6.
- 12.- Ruderman, J.V., y Pardue, M. L. 1978. *J. Biol. Chem.* 253: 2018-2025.
- 13.- Bekker, Z.M., y Molin, I.M. 1968. *Biofizika.* 14:740-741.
- 14.- Hirsch, M. y Penman, S. 1973. *J. Mol. Biol.* 83:131-142.
- 15.- Yogo, Y., y Wimmer, E. 1972. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69:1877-1882.

- 16.- Tomlinson, B.L., y Peticolas, W.L. 1970. *J. Chem. Phys.* 52:2154-2156.
- 17.- Bobst, A.M. 1972. *Biopolymers.* 11:1221-1233.
- 18.- Applequist, J. y Davis, V. 1966. *J. Am. Chem. Soc.* 88:3895-3890.
- 19.- Mondal, H., Sutton, A., Chen, V.J., y Sarker, S. 1974. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 56:988-996.
- 29.- Ojala, D., y Attardi, G. 1974. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71: 563-567.
- 21.- Shires, T.K., Fitot, H.C., y Kauffmann, S. A. 1979. *Biomembranes.* 5:81-145.
- 22.- Ikehara, M., Fukui, T., y Usugi, S. 1980. *J. Biochem. (Tokyo).* 76:107-115.
- 23.- Jelinek, W. R. 1982. *Cell.* 2:197-204.
- 24.- Van Amelscoort, J.M.M., De Font, J.J.H.H.M., y Bonting, S. L. -- 1977. *Biochem. Biophys. Acta* 466: 283-301.
- 25.- Kant, J.A., y Steck, T. L. 1973. *J. Biol. Chem.* 252:2134-2142.
- 26.- Eldan, R., y Mayer, F.J. 1981. *Physiol. Plant.* 26:67-72.
- 27.- Morse, D.E., Duncan, H., Hooker, N., y Morse, A. *Science.* 196:298-300.
- 28.- Tuttle, J.V. y Krenitsky, T. A. 1977. *Fed. Proc.* 36:776.
- 29.- Crass, M.F., III. 1983. *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 36:1995-1999.
- 30.- Clark, M.G., Filsell, O. H., y Jarret, I.G. 1977. *Hormone and Metabolic Research.* 9:213-217.
- 31.- Zeiger, E., Moody, W., Hepler, P., y Varela, F. 1984. *Nature (London).* 270:270-271.

- 32.- Van Leeuwen, C., Stam, H., y Oestricheer, A.B. 1979. *Biochem. - Biophys. Acta* 304:642-659.
- 33.- Aréchiga, H. 1980. *Ciencia*. 31:79-89.
- 34.- Drucker, R. y McGaugh, J.L. 1977. *Neurobiology of Sleep and Memory*, pp: 57-74. Academic Press.
- 35.- Dickson, R.B., Willingham, m.C. y Pastan, J. 1981. *Biol. Chem.* 256:3454-3459.
- 36.-Gutteridge, J.M.C., Halliwell, B., Traffry, A., Harrison. P. y - Blake, D. 1983. *Biochem. J.* 290:557-560.
- 37.- Hakim, A. M., Moss, G. y Gollomp, S. M. 1975. *J. Neurochem.* 26: 683-688.
- 38.- Ver referencia 5 del trabajo de *Neurochemical Research*.
- 39.- Miller, E. K. y Dawson, R.M.C. 1972. *Biochem. J.* 126:805-821.
- 40.- Ver referencia 39 del trabajo de *Neurochemical Research*.
- 41.- Ver referencia 42 del trabajo de *Neurochemical Research*.
- 42.- Ver referencia 40 del trabajo de *Neurochemical Research*.
- 43.- Millson, B.C. 1979. *Sci. Amer.* Agosto:9-19.
- 44.- Ver referencia 1 del trabajo de *Neurochemical Research*.
- 45.- Kafka, M. S., Wirs-Justice, A., Nober, D. y Wehr. T. A. 1982. *Neuropharmacol.* 20:421-425.
- 46.- Ver referencia 8 del trabajo de *Neurochemical Research*.
- 47.- Rosen, F. y Milholland, R. 1979. *Fed. Proc.* 19:444-449.
- 48.- Grace, A.A. y Bunney, B.S. 1978. *Neuroscience*. 10:333-348.
- 49.-Llinda, R. y Yaron, Y. 1981. *J. Physiol.* 315:569-584.
- 50.- Pérez Tamayo. R. 1975. En *Patología Molecular, Subcelular y Celular*. pp. 349-356. Prensa Médica Mexicana.

- 51.- Lai, J.C.K., Walsh, J.M., Dennis, S.C. y Clark, J.B. 1977. J. Neurochem. 28:625-631.
- 52.- Pittendrigh, C.S. 1974. En The Neurosciences. pp. 437-456. Cambridge: MIT Press.
- 53.- Seri, S.J. 1982. Neurobiol. 39:326-334.