

03466 3  
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

*" ANALISIS DE LOS EFECTOS A NIVEL DE  
MEMBRANA PLASMATICA EN LA LINEA  
CELULAR HEPATICA WRL-68 POR LAS  
EXPOSICIONES CRONICA O AGUDA AL ETANOL "*

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS  
(BIOLOGIA CELULAR),

P R E S E N T A :  
JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

MEXICO, D. F.

TESIS CON  
FALLA DE COPIEN

1992



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.

# I N D I C E

	Paginas
DEDICATORIAS	i
AGRADECIMIENTOS	ii
RESUMEN	iii-iv
I. INTRODUCCION	1 - 22
I.- Componentes estructurales de las membranas	
I.1. - Componentes lipidicos	1 - 12
I.1.1. Fosfolipidos	1 - 9
I.1.2. Colesterol	9 - 12
I.2.- Proteinas	12 - 14
I.3.- Carbohidratos	14 - 15
II.- Alteraciones membranales producidas por la exposici3n al etanol.	15 - 19
III.- Sistemas modelo utilizados para el estudio de la alteraciones producidas por la exposici3n al etanol.	20 - 22
IV.- JUSTIFICACION	23 - 24
V.- OBJETIVOS	25
VI.- HIPOTESIS	26
VII.- MATERIAL Y METODOS	27 - 35
VII.1. Mantenimiento de la linea celular hepatica humana WRL-68.	27

VII.2	Exposiciones al etanol	27 - 28
VII.3	Cuantificación de proteínas	28 - 29
VII.4	Aislamiento de membranas plasmáticas	29 - 30
VII.5	Cuantificación de colesterol	30
VII.6	Extracción de fosfolípidos	30 - 31
VII.7	Separación cromatográfica de fosfolípidos	31 - 32
VII.8	Cuantificación de fosfolípidos por contenido de fósforo.	32
VII.9	Determinación de la fluidez de membrana	33
VII.10	Adición de etanol a la membranas aisladas	34
VII.11	Determinación de la actividad de enzimas membranal.	34 - 35
VII.11	Análisis estadístico	35
VIII.-	RESULTADOS	36 - 54
VIII.1.	Viabilidad de las células WRL-68	36
VIII.2.	Composición lipídica de la membrana plasmática de células WRL-68	36 - 43
VIII.3	Efectos en la fluidez de membrana por la exposición al etanol.	43 - 45
VIII.4	Efectos en la fluidez de membrana aisladas por la adición <i>in vitro</i> de etanol.	45 - 48
VIII.5	Actividad de enzimas membranales	51 - 54
IX	DISCUSION	55 - 62
X	CONCLUSION	63 - 64
XI	BIBLIOGRAFIA	65 - 81

## INDICE DE ESQUEMAS Y FIGURAS

	Página
Esquema 1 Representación esquemática de la membrana plasmática.	1
Esquema 2 Formas de movimientos de los fosfolípidos.	3
Esquema 3 Arreglos moleculares de los fosfolípidos.	4
Esquema 4 Estructura del colesterol.	8
Tabla I. Relación del contenido de fosfolípidos en membranas plasmáticas de células WRL-68	42
Tabla II. Composición de fosfolípidos en membranas plasmáticas de células WRL-68	44
Figura 1 Curva de viabilidad de las células WLR-68 expuestas a etanol.	37
Figura 2 Contenido de colesterol en membranas plasmáticas de células WRL-68 expuestas al etanol.	38
Figura 3 Contenido de colesterol en membranas totales en células WRL-68 expuestas al etanol.	40
Figura 4 Contenido total de fosfolípidos en membranas plasmáticas de células WRL-68 expuestas al etanol.	41
Figura 5 Polarización de fluorescencia en membranas plasmáticas de células WRL-68 expuestas al etanol.	46
Figura 6 Polarización de fluorescencia en membranas totales de células WRL-68 expuestas al etanol.	47
Figura 7 Efecto de la adición de etanol en membranas plasmáticas aisladas de células WRL-68.	49

<b>Figura 8</b>	<b>Efecto de la adición de etanol en membranas microsomales de células WRL-68.</b>	<b>50</b>
<b>Figura 9</b>	<b>Actividad de la 5'-nucleotidasa en células WRL-68 expuestas al etanol.</b>	<b>52</b>
<b>Figura 10</b>	<b>Actividad de la ATPasa Na-K en células WRL-68 expuestas al etanol.</b>	<b>53</b>

## RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó el efecto del etanol en las membranas plasmáticas de células de origen fetal hepático humano (WRL-68).

Para esto, las células WRL-68 cultivaron bajo dos exposiciones de etanol: crónica (0.1 M durante 30 días) y aguda (0.5 M por 24 horas).

Se determinaron la fluidez membranal, el contenido de fosfolípidos, colesterol y actividades de enzimas membranales.

La exposición al etanol modificó la fluidez de manera distinta, en el tratamiento agudo tuvo un efecto fluidizante, mientras en la exposición crónica no varió, cuando se comparó con la fluidez observada en las membranas testigo.

En la composición lipídica, el colesterol se vio alterado por la exposición al etanol y se encontró un aumento significativo para cada grupo tratado respecto al testigo.

En cuanto a la proporción de fosfolípidos, las membranas plasmáticas de las exposiciones al etanol mostraron una disminución significativa en fosfatidilcolina y fosfatidilinositol y aumento en fosfatidiletanolamina.

La actividad de las enzimas membranales se observó alterada de manera distinta, la 5'-nucleotidasa mostró una disminución en ambos tipos de exposición, mientras en la ATPasa Na-K se determinó un ligero aumento, el cual no fue significativo.

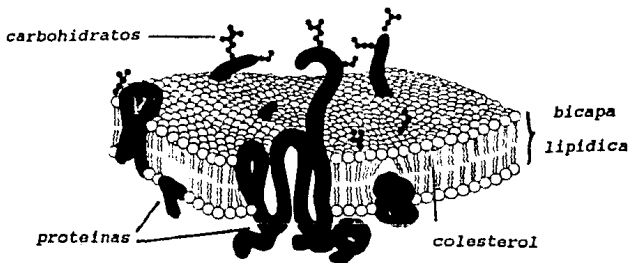


## I. INTRODUCCION

### I. COMPONENTES ESTRUCTURALES DE LAS MEMBRANAS

La comprensión de la función de la membrana plasmática requiere del conocimiento de los componentes individuales que la conforman y las interacciones entre ellos (Sharon. 1979).

Las membranas están constituidas por lípidos, proteínas y carbohidratos. En los modelos de organización de la membrana, a los lípidos se les ha asignado un papel estructural, sirviendo de barrera básica y matriz de anclaje para las proteínas y carbohidratos (Esquema 1).



Esquema 1. Representación esquemática de la membrana plasmática. (tomado de Sharon. 1979).

#### I. 1. COMPONENTES LIPIDICOS

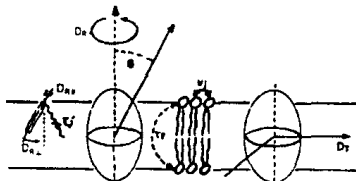
##### I. 1. 1. Fosfolípidos

Los fosfolípidos son moléculas anfipáticas que contienen en su estructura una región polar y otra no polar unidas por una

región de polaridad intermedia. La mayoría de las membranas muestran heterogeneidad estructural en las cabezas polares, en la longitud y grado de insaturación de las cadenas de ácidos grasos (Singer. 1979).

Los fosfolípidos pueden establecer dominios hidrofílicos o hidrofóbicos que difieren en su composición y dinámica (Wood y Schroeder. 1988). Estos dominios determinan agrupamientos conformando bicapas (Hitzemann y col. 1986; Treistman y Wilson, 1987).

Los fosfolípidos dentro de las bicapas presentan tres tipos de movimientos: lateral, rotacional y transversal o "flip-flop" (Esquema 2). El movimiento de rotación es más rápido que los movimientos laterales y transversales lo cual provoca un aumento en la entropía y como consecuencia el movimiento lateral de los fosfolípidos referido como fluidez también se ve aumentado, en tanto que el movimiento transversal se relaciona con la asimetría de la membrana (Hidalgo. 1980).



Esquema 2. Formas de movimiento de los fosfolípidos en una membrana. (DR) rotación en su propio eje. (DT) lateral en el plano de la membrana. (tf) transmembranal o "flip-flop" (tomado de Marsh. 1988).

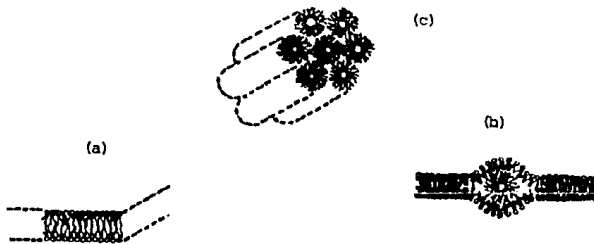
En su ordenamiento los fosfolípidos presentan transiciones de fases, que pasan del estado gel-cristalino a estado líquido-cristalino (Cullis y col. 1976). En el estado de gel las cadenas hidrocarbonadas están completamente extendidas, relativamente rígidas y empaquetadas, mientras que en el estado de líquido-cristalino los ácidos grasos presentan mayor separación entre ellos, lo que causa un aumento en los movimiento de los fosfolípidos en el plano lateral de la membrana (Lee. 1983).

La temperatura de transición, la entalpía y entropía se modifican con el alargamiento de las cadenas hidrocarbonadas. La presencia de dobles enlaces en las cadenas hidrocarbonadas disminuyen la temperatura de transición de gel a líquido-cristalino. Barton y Gunstone (1975) sugieren que la transición de fase depende de la posición de los dobles enlaces a lo largo de la cadena hidrocarbonada.

Las variaciones de la entropía en las membranas biológicas se explican por los cambios en la temperatura de transición conferidos por los dobles enlaces de las cadenas hidrocarbonadas, así como por el tipo de lípidos, contenido de agua, concentración de sales y compuestos orgánicos (Huang y Mason. 1986).

Las membranas celulares muestran una diversidad rica de lípidos, esto ha sido observada en los distintos tipos celulares de un mismo organismo (Ansell y col. 1977).

Los modelos termodinámicos sobre el ensamble de fosfolípidos en fases poliméricas proporcionan el concepto de la forma dinámica de las moléculas de lípidos por una estructura particular (Israelchvili, 1977). Los fosfolípidos con forma cilíndrica se acomodan con facilidad en bicapa, mientras otros fosfolípidos prefieren un empaquetamiento en fase hexagonal II (HII) o se distribuyen formando micelas. El aumento en la longitud de la cadena de los ácidos grasos en un fosfolípido resulta en la transformación de su geometría cilíndrica a una forma de cono invertido (Huang y Mason, 1986) (Esquema 3).



Esquema 3. Arreglos de los fosfolípidos en fases de bicapa y no-bicapa. a) Bicapa, b) Micelar y c) Hexagonal II (tomado de Huang y Mason, 1986).

Los fosfolípidos con geometría irregular permiten un empaquetamiento continuo entre proteínas insertadas en la membrana. Esta geometría espacial la pueden adoptar los

fosfolípidos con cadenas hidrocarbonadas de diferente longitud y pueden jugar un papel importante en la interacción lípido-proteína (Lutz y col. 1977; Burnell y col. 1980).

Los estudios de resonancia magnética nuclear (RMN) empleando fosfolípidos marcados con deuterio y de resonancia del espín electrónico (RES) usando lípidos marcados con nitróxido, han mostrado que el grado de movimiento de los fosfolípidos en las membranas depende de la localización de la sonda en la cadena hidrocarbonada (Seelig. 1979).

El colesterol es otro lípido común en la membrana y tiene la capacidad de modificar la dinámica de las membranas. La difusión lateral de los fosfolípidos en presencia de colesterol determinada por polarización de fluorescencia o RMN indican que el colesterol tiene un ligero efecto en el movimiento lateral de los fosfolípidos (Rubenstein y col. 1979; Estep y col. 1978; Treistman y Wilson. 1987), sin embargo la presencia de colesterol disminuye la temperatura de transición de fase (Yeagle. 1989).

La incorporación de colesterol en membranas artificiales compuestas de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, esfingomielina y proteínas disminuye las atracciones electrostáticas y las interacciones por puentes de hidrógeno de las cabezas polares, con las proteínas (Yeagle y col. 1977).

Los lípidos establecen interacciones específicas con las proteínas membranales. Se ha considerado que esta interacción es un mecanismo para la regulación de la función de las proteínas. Yeagle (1989) propone, que las interacciones pueden involucrar la unión del lípido en sitios específicos de la proteína y la formación de un anillo lipídico alrededor de la proteína. Por ejemplo la glicoforina de la membrana del eritrocito humano se encuentra asociada a fosfatidilinositol (Armitage y col, 1977) y la citocromo oxidasa se puede aislar unida a difosfatidilglicerol y cardiolipina (Powell y col. 1987).

Las cabezas polares de los fosfolípidos contienen estructuras cargadas que pueden interactuar con proteínas; en la determinación de estas interacciones Yeagle y Kesley (1989) usando RMN con fosfolípidos marcados con  $^{31}\text{P}$  observaron que el fosfatidilinositol está unido a la glicoforina.

Los fosfolípidos, al igual que el colesterol, son capaces de regular la actividad de las proteínas membranales, por ejemplo, con una baja proporción de fosfatidiletanolamina se estimula la actividad de la bomba de  $\text{Ca}^{+2}$  en el retículo sarcoplásmico (Kowles y Racker, 1975). Hui y col. (1981) reportaron un aumento en la actividad de la ATPasa de calcio en sistemas reconstituidos con fosfatidiletanolamina que permite la formación de fase hexagonal II y sugirieron que los cambios en la estructura de la membrana pueden estar asociados con la alteración en la actividad de la bomba de calcio.

Por otro lado, Hidalgo y col. (1982) reportaron que en el retículo sarcoplásmico la disminución en la actividad de la ATPasa de calcio se relaciona mejor con el contenido de fosfatidiletanolamina y no con la formación de la fase II hexagonal. Un ejemplo, donde estas interacciones son críticas es el caso de la enzima B-hidroxiacetil-CoA deshidrogenasa donde la fosfatidilcolina es un requerimiento único para la funcionalidad de la enzima (Isacson y col. 1979)

*Distribución asimétrica de los fosfolípidos en la membrana.*

La distribución y proporción de los fosfolípidos en ambas capas de una membrana es diferente, esto determina parte de la asimetría. Esta característica de la bicapa lipídica juega un papel importante en la funcionalidad de las proteínas insertadas en la membrana.

Se conoce poco sobre cómo se origina y mantiene la distribución de los fosfolípidos en la membrana en los dominios citofacial, exofacial (Karnovsky y col. 1982) y lateral (Treisman y Wilson. 1987). Por ejemplo, en la membrana del eritrocito, la fosfatidiletanolamina y la fosfatidilserina están localizadas preferentemente en la monocapa citoplásmica y la esfingomielina y la fosfatidilcolina son más abundantes en la monocapa exterior (Van Deenen. 1981).

Sobre el mecanismo del origen y mantenimiento de la asimetría de la bicapa lipídica, Helmkamp (1988) propuso la participación de proteínas en la transferencia de fosfolípidos, la cual parece depender de las asociaciones selectivas entre estas proteínas y los fosfolípidos. Así mismo, Devaux (1988) determinó un flujo rápido de análogos de la fosfatidiletanolamina y la fosfatidilserina de la monocapa exterior en relación con la monocapa citoplásmica, que además, fue dependiente de la hidrólisis de trifosfato de adenosina (ATP).

#### I. 1. 2. Colesterol

La estructura del colesterol está formada por cuatro anillos fusionados, lo que produce una apariencia plana de la molécula (Esquema 4). El sistema de cuatro anillos no está confinado a una conformación, ya que el primer anillo (A) puede adoptar una conformación alterna en cristal, además de haber una mayor flexibilidad en la cola no cíclica de la molécula de colesterol (Duax y col. 1980).



Esquema 4. Estructura del colesterol  
(Tomado de Yeagle. 1989)



La molécula es predominantemente hidrofóbica y el 3 $\beta$ -hidroxilo le confiere un carácter anfipático, esto hace que el colesterol muestre una orientación en una membrana con el grupo hidroxilo hacia el solvente hidrofílico y el anillo esteroide orientado en paralelo a las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos (Yeagle, 1989).

El contenido de colesterol en las membranas de una célula no es uniforme, ya que se presenta en concentraciones mayores en la membrana plasmática en relación a las membranas intracelulares. En membranas plasmáticas de hepatocitos se presenta una relación de 0.5 moléculas de colesterol por una de fosfolípido. Así mismo, las membranas de eritrocitos contienen aproximadamente 45% de colesterol en relación con los lípidos (Cooper, 1978); en tanto que las membranas de retículo endoplásmico liso contienen del 10-12% de colesterol.

El colesterol en la membrana plasmática no está distribuido uniformemente. Por ejemplo, en las células de la mucosa intestinal de rata, se encuentra en una concentración mayor en la superficie basolateral que en la superficie apical (Chapelle y Gilles-Baillien, 1983). Por otra parte, en las regiones involucradas en las uniones de adherencia y comunicantes no hay colesterol (Severs, 1982). Otra región especializada de la membrana plasmática como las criptas cubiertas tienen menor contenido de colesterol que el resto de la membrana (Montesano y col. 1979).

Las propiedades de la membrana pueden ser alteradas por la presencia del colesterol, ya que afecta la permeabilidad a la glucosa en sistemas naturales y artificiales (Yeagle y col. 1977). El cambio de posición del grupo 3-hidroxilo del colesterol con respecto al plano de la molécula, hace variar la permeabilidad, por ejemplo sustituyendo el grupo beta-hidroxilo por alfa-hidroxilo disminuye la permeabilidad (Bittman y col. 1984).

El efecto condensante del colesterol es debido a que provoca una disminución del área superficial ocupada por los ácidos grasos saturados e insaturados (Demel y col. 1977 ; Bittman y col. 1984), disminuyendo la entalpía y cooperatividad de la transición de la fase de gel a líquido-cristalino (Estep y col. 1978).

Se ha propuesto que las proteínas integrales de membrana pueden variar su actividad y estado conformacional por la presencia de colesterol y la naturaleza de la proteína membranar involucrada (Yeagle 1965 y 1989). En relación a esto, Muhlebach y Cherry (1982) encontraron que el colesterol promueve la agregación de la banda 3 del eritrocito humano, además de que la interacción de la banda 3 es más fuerte en monocapas de colesterol que en monocapas constituidas de fosfolípidos.

El colesterol está involucrado en la modulación de la actividad de proteínas integrales de membrana. La ATPasa Na-K y el intercambiador aniónico de membranas de eritrocitos son inhibidos por colesterol en sistemas reconstituidos (Claret y col. 1978; Yeagle, 1983). En tanto que el intercambiador ATP-ADP y el acarreador del lactato y la arabinosa son estimulados por colesterol (Grunze y col. 1980).

## I. 2. PROTEINAS

Las proteínas de la membrana pueden estar insertadas en la bicapa lipídica (integrales) o asociadas a ella (periféricas). El interior de una bicapa es un ambiente energéticamente desfavorable para los enlaces peptídicos, por esta razón, las proteínas insertadas en la bicapa presentan en las regiones transmembranales aminoácidos hidrofóbicos que adoptan preferencialmente la conformación de alfa-hélice (Chin y col. 1986), que es energéticamente favorable (Jennings. 1989). Aunque hay casos excepcionales como el de la porina, que presenta configuración de barril B. En los extremos transmembranales hay una elevada incidencia de aminoácidos cargados, que mantienen a las proteínas en esta posición por el efecto hidrofóbico, ya que las regiones cargadas difícilmente pueden penetrar en el interior de la membrana (Singer. 1971).

En varios tipos de proteínas integrales, se ha supuesto la presencia de un anillo compuesto de 30 o más fosfolípidos (Grant, 1988). London y Feigenson (1981) sugirieron que la composición del anillo lipídico puede tener influencia sobre la rigidez membranal. Así mismo, Blume (1988) propuso que los lípidos en este anillo constituyen un estado energético intermedio comparado con los estados gel o líquido cristalino.

Zambrano y Rojas (1988) encontraron que la ATPasa de Na-K requiere de un microambiente lipídico para realizar su actividad catalítica y que la fluidez de los fosfolípidos en la membrana afectan la translocación iónica.

Las interacciones fosfolípido-proteína son estabilizadas por fuerzas hidrofóbicas, dipolo-dipolo y electrostáticas entre otras (Gitler, 1972). Las proteínas que están asociadas a la membrana presentan una elevada carga negativa, que les permite mantener un contacto con las regiones polares cargadas de la bicapa (Yeagle, 1989).

En membranas de células integras y membranas modelo hay evidencia de que las interacciones fosfolípido-proteína periférica pueden inducir la separación de fases. Por ejemplo, la 5'-nucleotidasa, la fosfatasa alcalina y la acetilcolinesterasa están asociadas con fosfatidilinositol (Low y Zilversmit, 1980).

Las proteínas integrales que realizan funciones de transporte transmembranal están colocadas asimétricamente en la membrana y su orientación es en una u otra dirección perpendicular al plano de la bicapa (Singer. 1971).

La distribución de las proteínas de membrana puede estar influenciada por factores que regulan el arreglo lipídico. Varias cadenas polipeptídicas pueden asociarse formando unidades macromoleculares, por ejemplo las moléculas de bacteriorrodopsina forman un retículo cristalino en la membrana plasmática de Halobacterium halobium (Fisher y Stoecknieus. 1983). Otro ejemplo son las moléculas de conexina que forman las uniones comunicantes en células animales (Unwin y Zampighi. 1980).

Las proteínas integrales interactúan con elementos del citoesqueleto durante la locomoción amiboidea, fagocitosis, pinocitosis y el movimiento de receptores durante la formación de los casquetes en linfocitos (Singer. 1979).

### I. 3. CARBOHIDRATOS

La mayoría de las membranas plasmáticas contienen carbohidratos unidos a proteínas y lípidos (glicoproteínas o glicolípidos) (Gitler. 1972), los cuales están orientados hacia el exterior de la célula, las membranas de los eucariontes

presentan como componente principal ácido siálico que contribuye a la carga neta negativa típica en este tipo de células (Yohe y Rosenberg. 1979).

Su localización y diversidad estructural hace que los carbohidratos actúen como antenas sensibles por las cuales la célula detecta señales extracelulares (Sharon. 1979).

Las glicoproteínas membranales son capaces de reconocer carbohidratos extracelulares; Weigel y col. (1979) demostraron que los hepatocitos se unen a geles con residuos de carbohidratos. Blackburn y Schnaar (1983) observaron que las células epiteliales de hígado se unen a superficies de plástico cubiertas con análogos de glicolípidos.

Los glicolípidos difunden libremente en el plano de la membrana y es posible que estén involucrados en la polarización celular, además presentan temperaturas elevadas de transición de orden-desorden (Spiegel y col. 1985).

El contenido de glicolípidos depende de patrones espaciales y temporales del crecimiento o inducidos por agentes externos. Los patrones involucran probablemente la expresión tridimensional de oligosacáridos en las superficies celulares (Roberts y col. 1986).

En general los carbohidratos participan en funciones celulares de comunicación, control del crecimiento celular, diferenciación y relación huésped-parasito (Sharon. 1979).

## II. ALTERACIONES MEMBRANALES PRODUCIDAS POR LA EXPOSICION AL ETANOL.

Por sus características fisicoquímicas el etanol, puede penetrar rápidamente la bicapa lipídica afectando propiedades fisicoquímicas de la membrana. Se conoce poco sobre la naturaleza de la interacción del etanol con los componentes de la membrana, es probable, que interaccione con la cabeza polar de los fosfolípidos, anclándose por medio del grupo funcional hidroxilo (Wood y Schroeder, 1988).

La acción del etanol sobre las membranas es a nivel físico, ya que las alteraciones son más parecidas a las producidas por la temperatura que a la unión de un receptor membranal (Goldstein y Chin, 1981).

No se conoce si el etanol se distribuye en ambos lados de la membrana (Wood y Schroeder, 1988). Sin embargo, se ha encontrado que en liposomas producidos a partir de fosfolípidos aislados de células que han sido expuestas al etanol, presentan una tendencia a desordenarse, al igual que las membranas intactas, por lo que se considera que este efecto no es dependiente de la asimetría de la membrana (Taraschi y col. 1985).

Hill y Bangham (1975) sugirieron que la composición lipídica de las membranas celulares puede cambiar de acuerdo con las condiciones farmacológicas a las que un organismo está expuesto. Este efecto es semejante a la capacidad de bacterias y organismos poiquiloterms para cambiar la composición de los ácidos grasos de los fosfolípidos de acuerdo a la temperatura ambiental (Porta y col. 1965).

Las membranas celulares que han sido estudiadas con mayor interés para evaluar los efectos que el etanol produce, son las mitocondriales y las microsomales, las primeras por ser el sitio de producción de energía (Cunningham y col. 1982; Waring y col. 1982) y las últimas por estar involucrada en la degradación de agentes tóxicos (Cunningham y col. 1982).

Los reportes sobre las alteraciones en las membranas plasmáticas producidas por exposición al etanol, se han encaminado en gran parte a conocer el proceso de adicción que se presenta en organismos expuestos crónicamente a este compuesto, para esto se han aislado principalmente las membranas para su estudio de células cerebrales (Chin y Goldstein. 1977; Harris y Schroeder. 1981)

Se ha reportado que al exponer ratones al tratamiento crónico con etanol las membranas sinaptosomales presentan mayor rigidez en relación a las membranas aisladas de los animales



control; este efecto se ha determinado tanto por resonancia del espín electrónico (Lyon y Goldstein, 1983), como por polarización de fluorescencia (Harris y col. 1984) o bien resonancia magnética nuclear (Goldstein y Chin 1981).

Las membranas aisladas de ratones expuestos *in vivo* al etanol son más resistentes a la adición *in vitro* y se sugiere que las células se adaptan a la presencia permanente de la droga fluidizante (Goldstein y Chin. 1981). Además hay una disminución en el contenido de ácido esteárico, incremento en el ácido araquidónico (Littleton y col. 1980), así como un aumento en la relación de ácidos grasos saturados/ácidos grasos insaturados (Morrison y col. 1984).

El etanol puede inhibir o estimular la actividad de enzimas insertadas en la membrana, por ejemplo la adenilato ciclasa de la membrana plasmática (Luthin y Tabakoff. 1984), la ATP sintetasa y la citocromo oxidasa de la membrana interna mitocondrial (Tayer y Rubin. 1979; Gordon y col. 1982), la ATPasa-Ca<sup>2+</sup> de retículo sarcoplásmico, los canales iónicos (canales para calcio sensibles a voltaje y el canal para Cl<sup>-</sup> mediado por receptores del ácido aminobutírico-GABA). Muchos de estos efectos pueden estar asociados a la modificación de la composición lipídica de la membrana (Wood y Schroeder. 1988; Yeagle. 1989).

El etanol modifica la fluidez de la membrana, esto se ha explicado en función de que la membrana esta organizada en regiones diferenciales, por lo que el efecto es distinto en cada una de estas regiones (Wood y Schroeder. 1988). La incorporación de sondas a diferentes niveles de las cadenas hidrocarbonadas permiten establecer que la región hidrofóbica de la membrana presenta mayor fluidez que la hidrofílica (Chin y Goldstein. 1981).

Se ha sugerido que el etanol no tiene preferencia por alguna de las capas de la bicapa (Wood y col. 1990). Sin embargo, Chanabel y colaboradores (1985) al exponer membranas de eritrocito al alcohol-bencilico determinaron mediante el uso de sondas fluorescentes permeables e impermeables que el alcohol aumenta en mayor grado la fluidez de la monocapa citoplásmica, lo cual permitió proponer que el etanol debe presentar un efecto mayor en la región más fluida.

Las membranas de células de distintos órganos son afectadas de diferente forma por la exposición al etanol (Schuller y col. 1984). A pesar de su importancia en la absorción de nutrimentos, transporte de iones, mantenimiento de la integridad celular y transducción de información a través de receptores específicos, se han realizado pocos estudios empleando la membrana plasmática de los hepatocitos.

Wing y colaboradores (1984) reportaron que en la membrana plasmática de hepatocitos de ratones expuestos al etanol, hay una disminución del contenido de ácidos grasos 18:0 y un aumento en 18:1.

Polokoff y colaboradores (1985) determinaron en células de hepatoma de Reuber H35 expuestas crónicamente al etanol un incremento en la relación fosfatidilcolina/esfingomielina, que está asociado con el aumento en la fluidez de la membrana.

### III. SISTEMAS MODELO UTILIZADOS PARA ESTUDIO DE LOS EFECTOS DEL ETANOL.

El hombre está expuesto a diversos xenobióticos como, fármacos, pesticidas y solventes orgánicos entre otros. Estos difieren en su estructura química y consecuentemente en sus actividades biológicas. La capacidad de un compuesto para causar algún efecto biológico, depende en alguna medida de los grupos funcionales que lo constituyen; el conocimiento de algunos de estos grupos permite predecir el efecto del xenobiótico (Stammati y col. 1981).

Existen pocos estudios realizados en humanos. Los resultados a partir que se han de muestras de biopsias y necropsias. Estas últimas, tienen la desventaja que tres horas posteriores del fallecimiento, hay disminución en la actividad metabólica de los

xenobióticos, por lo que son poco viables para este tipo de estudios (Powis. 1989).

Existe un número considerable de modelos animales, que han mostrado las alteraciones primarias producidas por la ingesta del etanol (hígado graso), pero no los efectos secundarios como la cirrosis. Esto se ha relacionado con variables tales como, la edad, sexo y la nutrición (Lieber y col. 1989; Derr y col. 1990).

Un problema en la estimación de riesgo en el humano esta asociado a la forma en que son transformados los xenobióticos en los diferentes organismos, ya que existe diferencia en la velocidad y vías que son utilizadas para la detoxificación entre el hombre y los animales de experimentación (Benford y Hubbard. 1987).

Actualmente se han desarrollado los cultivos celulares para la evaluación de tóxicos. Entre las principales ventajas que presentan estos sistemas, es que se tiene controlado el ambiente fisicoquímico (pH, temperatura, presión osmótica, oxígeno) la concentración del sustrato y las concentraciones de hormonas que eliminan las complejas interacciones que se presentan in vivo (Ham y Mckeehan. 1979)

Existen varios tipos de cultivos de células de origen hepático empleados en este tipo de estudios; los cultivos

primarios de hepatocitos y las líneas celulares. Los dos crecen adheridos al soporte de cultivo y permiten el estudio de la proliferación, migración, adhesión y regulación del contacto célula-célula.

Sin embargo, los cultivos primarios de hepatocitos tienen una vida media de aproximadamente de dos semanas, que en algunos casos hace poco factible considerar la exposición al etanol de tipo crónico (McQueen y Williams. 1987).

Por otro lado, las líneas celulares pueden ser identificadas considerando las siguientes características: morfología celular, inhibición por contacto, elevada actividad fibrinolítica, re-expresión de antígenos celulares, número ilimitado de divisiones celulares y capacidad de producir progresivamente tumores proliferantes cuando son inoculadas en animales de experimentación (Stamati. 1981).

Las células de origen hepático pueden mantener varias características típicas de hepatocitos como sintetizar albúmina, fibrinógeno, transferrina (Crane y col. 1975) y alfa-feto proteína (Sell y col. 1975).

Además de las características anteriormente mencionadas, algunas mantienen la capacidad de metabolizar xenobióticos, lo que las convierte en una buena herramienta.

A pesar de ser difícil el establecimiento de líneas celulares hepáticas, se pueden adquirir comercialmente algunas provenientes de diferentes especies y diversos grados de diferenciación (Grishman. 1983). Entre ellas están, por ejemplo la línea Chang de adulto normal y la WRL-68 de origen embrionario normal ambos de origen humano.

#### IV. JUSTIFICACION

El desarrollo de estudios sobre los mecanismos por los que el etanol produce alteraciones en distintos organos en el humano es importante; sin embargo, solo se han podido llevar a cabo pocos estudios en necropsias de organos provenientes de individuos con alteraciones severas; a esto hay que agregar el problema de la elevada variabilidad entre individuos, que está asociada a la susceptibilidad.

Se han utilizado animales de laboratorio para reproducir daños crónicos a nivel hepático observados en los humanos. En estos estudios, se les administra el etanol a los animales en el agua, sin embargo el daño por la ingestión se manifiesta como alteraciones gastrointestinales antes que se presente el daño hepático.

Otro modelo para el estudio de los efectos tóxicos son los cultivos celulares hepáticos que por su accesibilidad al xenobiótico permiten determinar el efecto directo sobre la célula, además de lograr una exposición crónica.

En el laboratorio de Fisiología Celular de la Universidad Autonoma Metropolitana-Iztapalapa se han empleado las células hepáticas WRL-68 de origen fetal humano como modelo para evaluar las alteraciones producidas por el etanol y se ha determinado la liberación de enzimas citosólicas (alanino aminotransferasa,

aspartato aminotransferasa) y membranales (gamma glutamil transpeptidasa), el alargamiento en la duración del tiempo de generación, el aumento en las aberraciones cromosómicas y los cambios en las relaciones de los componentes de la matriz extracelular.

A pesar de la importancia que tiene el estudio de la membrana plasmática del hepatocito en el transporte de nutrimentos y la transducción de información extracelular a través de receptores específicos. Se han desarrollado pocos trabajos, donde los resultados obtenidos sobre el efecto a nivel de membrana plasmática del hepatocito han sido contradictorios aparte de que solo se han cuantificado los componentes de membrana o la fluidez, debido a las diferentes condiciones experimentales empleadas.

El etanol influye en los componentes lipídicos y protéicos provocando cambios en la funcionalidad de la membrana; de ahí la importancia de analizar los efectos directos que puede producir el etanol en las células hepáticas, para lo cual se utilizó el sistema de células hepáticas WRL-68, ya que refleja algunos de los efectos observados en tejido adulto.



## V.- OBJETIVO GENERAL

Conocer algunos efectos causados por la exposición crónica o aguda al etanol sobre la composición lipídica (fosfolípidos y colesterol) y fluidez en las membranas plasmáticas de las células hepáticas WRL-68.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Cuantificar el contenido de colesterol en membranas plasmáticas de células WRL-68 expuestas crónica o agudamente al etanol.
- 2) Cuantificar y tipificar el contenido de fosfolípidos en membranas plasmáticas de células WRL-68 expuestas crónica o agudamente al etanol.
- 3) Determinar la fluidez en membranas plasmáticas y homogenados celulares totales aislados de células expuestas crónica o agudamente al etanol.
- 4) Determinar las variaciones en la fluidez por la adición in vitro de etanol a membranas plasmáticas aisladas de células expuestas crónica o agudamente al etanol.

## VI. HIPOTESIS

El etanol es un agente tóxico que causa alteraciones a diferente nivel fisiológico en células hepáticas y ya que la membrana plasmática es el primer sitio de contacto de la célula con este hepatotóxico, al analizar el efecto que este produce en las membranas plasmáticas de la línea celular WRL-68 al ser expuestas a un tratamiento crónico o agudo, encontraremos diferencias en la fluidez y composición lipídica en relación a las células cultivadas en ausencia de etanol.

## VII. MATERIALES Y METODOS

### VII. 1. Mantenimiento de la línea celular hepática (WRL-68).

Las células se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC). Para el crecimiento celular se usó Medio Modificado de Dulbecco (DMEM) adicionado con 8% de suero fetal bovino, 1.0% de aminoácidos no esenciales y 0.1% de antibióticos (penicilina / estreptomycin) con actividad de 10,000 UI/ug/ml. Las células se sembraron en cajas de plástico estériles y se mantuvieron en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de aire con humedad relativa al 80%. Todos los experimentos se llevaron a cabo cuando las células se encontraban en la fase logarítmica de crecimiento.

### VII. 2. Exposición crónica y aguda al etanol.

Para determinar los grados de exposición, se realizó un experimento para ver el efecto de la concentración de etanol sobre la viabilidad celular, para esto las células WRL-68 fueron sembradas a la misma densidad en una placa multiporos. Después de 24 horas el medio fue eliminado y se sustituyó por medio fresco con diferentes concentraciones de etanol (10mM a 2M), además en los controles se colocó manitol o sacarosa para descartar efecto osmótico. La viabilidad se determinó después de 24 horas, por la capacidad de las células vivas para excluir el azul tripano a 0.2% de concentración final.

Una vez establecidos los tiempos y concentraciones de exposición, las células fueron sembradas a una densidad de  $1.6 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> en botellas de 150 ml. Después de 24 horas el medio fue removido y se reemplazó por medio fresco con y sin etanol.

Para el tratamiento crónico las células se expusieron a una concentración 0.1M de etanol durante treinta días y para el tratamiento agudo las células fueron expuestas a una concentración de 0.5 M por 24 horas.

### VII.3. Cuantificación de proteínas.

La concentración de proteínas de los homogenados celulares se determinó de acuerdo al método de Lowry modificado por Markwell y col. (1978). Se preparó una curva de patrón usando albúmina sérica bovina (BSA), colocando en tubos de ensayo 10, 25, 50, 75 y 100 ul de la solución de BSA con una concentración de 0.1 mg/ml y ajustando a un volumen final de 1000 ul de agua. Se adicionó una mezcla de reacción conteniendo, carbonato de sodio (2%), hidróxido de sodio (0.4%), tartrato de sodio y potasio (0.16%), sulfato de cobre (4%) y dodecil sulfato de sodio (SDS) (1%).

La solución se agitó e incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se adicionaron 0.3 ml de reactivo de Folin-

Cicalteau (2N) diluido 1:1 con agua destilada. La solución se incubó a temperatura ambiente por 40 minutos. Se leyó la absorbancia de la mezcla a 660 nm.

Para las muestras problemas se tomaron 10 ul de la suspensión de membranas plasmáticas aisladas y con agua destilada se llevaron a 1000 ul, siguiendo la adición de los reactivos antes descritos para la curva de albúmina.

#### VII. 4. Aislamiento de membranas plasmáticas.

Las membranas plasmáticas se aislaron de acuerdo con lo propuesto por Polokoff y col. (1985). Las células se lisaron por choque osmótico en una solución 1 mM de bicarbonato de sodio durante 20 minutos. El lisado se centrifugó en un rotor Ti-65 a 27,000 X g durante 15 minutos y el pellet se resuspendió en sacarosa ajustándose la concentración a 44% y posteriormente se centrifugó en un gradiente de sacarosa (10, 20, 30 y 40% P/V) a 90,000 X g durante 2.5 horas.

Las fracciones correspondientes a las membranas plasmáticas se localizaron entre las bandas de 20% y 30% del gradiente, que se resuspendieron con bicarbonato de sodio 1 mM, se centrifugó a 48,000 X g durante 30 minutos y al final se guardaron a -70°C hasta el momento de usarse.

#### VII. 5. Cuantificación de colesterol en membranas plasmáticas.

El contenido de colesterol en las membranas plasmáticas se determinó según lo propuesto por Liebermann-Buchard (1957). Se colocaron en tubos de ensayo alícuotas de las membranas plasmáticas con una concentración de 1 mg de proteína y para la curva estandar se tomaron 0.02 ml de una solución patrón de colesterol a una concentración de 300 mg/dl.

A cada tubo se adicionó 1 ml de una mezcla de anhídrido acético (6.33 mol/l) en ácido acético (99%), se incubó a temperatura ambiente durante 30 min y se añadieron 0.2 ml de ácido sulfúrico (97%), se colocó la solución en baño de agua a 25°C y se leyó la absorbancia de las muestras a 578 nm.

#### VII. 6. Extracción de fosfolípidos.

Los fosfolípidos de membrana se extrajeron por el método de Bligh y Dyer, (1959) de la siguiente manera:

A un ml de suspensión celular se le adicionaron 5.0 ml de una mezcla cloroformo:metanol (2:1 V/V) y se mantuvo durante 10 minutos con agitación ocasional. Se centrifugó a 550 X g durante 10 min a 4°C para eliminar las proteínas precipitadas y otros residuos celulares. El sobrenadante se transfirió a otro tubo donde se adicionaron 1.25 ml de cloroformo y 0.5 ml de agua destilada. La solución se mezcló y posteriormente se centrifugó

a 550 X g durante 10 min para separar las fases orgánica y acuosa.

La fase orgánica se colectó con una pipeta Pasteur, se colocó en un tubo cónico graduado y se ajustó el volumen a 8 ml con cloroformo. Los solventes se evaporaron bajo una atmósfera de nitrógeno. Los fosfolípidos extraídos se mantuvieron a  $-20^{\circ}\text{C}$  bajo atmósfera de nitrógeno hasta el momento de emplearse.

#### VII. 7. Separación de fosfolípidos individuales.

Los fosfolípidos individuales se separaron por cromatografía en capa fina de dos dimensiones siguiendo el método de Rouser y col. (1970).

El procedimiento se inició con la saturación de la cámara de cromatografía para la primera dimensión con cloroformo : metanol : hidróxido de amonio en proporción 65:25:5. Se colocaron cincuenta  $\mu\text{l}$  del extracto lipídico sobre placas de vidrio de 20 X 20 cm y 0.25 mm de espesor de sílica gel Sephadex G60 y la placa se colocó en la cámara para desarrollar la primera dimensión. Después la placa se puso en un desecador al vacío durante la noche y posteriormente se corrió en la segunda dimensión con cloroformo: acetona:metanol:ácido acético:agua en proporción

30:40:10:10:5. Después de haber desarrollado la segunda dimensión la placa se colocó en un desecador durante 3 horas; los fosfolípidos se revelaron con vapores de yodo. En un papel celofán se marco el patrón de separación de los fosfolípidos, origen y frente de corrimiento para calcular los Rf.

#### VII. 8. Cuantificación de fosfolípidos por contenido de fósforo.

La cuantificación de los fosfolípidos se realizó según el método propuesto por Dittmer y Wells (1969).

Los fosfolípidos individuales se obtuvieron raspando la placa y colocando la sílica gel en un tubo de ensayo. Las muestras se hidrolizaron añadiendo 1.0 ml de ácido perclórico concentrado y calentando a 80°C durante toda la noche. El hidrolizado se ajustó a 1 ml con agua desionizada y se añadieron 0.25 ml de solución que contiene 2.7% de molibdato de amonio y 2.5 N de ácido sulfúrico. Después de agitar se agregaron 0.065 ml de la solución reductora (ácido 1,2,4-aminonaftol sulfónico al 8%). Paralelamente se preparó una curva patrón de fosfato entre 0.005 a 0.6 nmol/ml bajo las mismas condiciones experimentales que las muestras problema. El color se desarrolló colocando los tubos en agua hirviendo durante 10 minutos. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 830 nm.



VII. 9. Determinación de la fluidez en membranas totales y membranas plasmáticas.

La fluidez de las membranas se analizó mediante la polarización de fluorescencia incorporando el fluorocromo 1,6 difenil-1,3,5 hexatrieno (DPH). En dos mililitros de solución amortiguadora de fosfatos se añadieron membranas para obtener una concentración 200 ug/ml de proteína, la mezcla se incubó a 37°C por una hora. La polarización de fluorescencia se determinó en un espectrofluorómetro SLM Aminco equipado con polarizadores. De una solución 2mM de DPH en dimetilformamida se agregaron 2 ul a cada celda. Se usaron 365 nm como longitud de onda de excitación y 430 nm como onda de emisión.

A partir de la fórmula propuesta por Shinitzky e Ibar, 1976, se obtuvo el grado de la polarización de fluorescencia:

$$P = \frac{(FM / Fm) - 1}{(FM / Fm) + 1}$$

P = grado de polarización de fluorescencia.

FM = lectura de intensidad de fluorescencia en paralelo.

Fm = lectura de intensidad de fluorescencia en perpendicular.

Para cada grupo de membranas plasmáticas de células expuestas al etanol o control se realizaron 10 determinaciones.

#### VII. 10. Adición del etanol a membranas aisladas.

A las membranas aisladas de los cultivos con distintos grados de exposición al etanol contenidas en 200 ug/ml, se les adicionaron 20, 40, 60, 80 y 100 mM de etanol y se determinó la polarización de fluorescencia siguiendo las condiciones descritas en el apartado anterior.

#### VII. 11. Actividad enzimática membranal.

La actividad de la ATPasa Na-K y 5'-nucleotidasa se utilizaron como indicadores de pureza de la preparación de membranas plasmáticas.

La actividad de la enzima 5'-Nucleotidasa se estimó siguiendo el método de Dixon y Purdom (1954). Se colocó en tubos de ensayo, una solución 250 uM de adenosina 5'-monofosfato a pH 7.5 y se agregó el volumen de membranas purificadas conteniendo 1 mg de proteína, se incubó esta mezcla a 37°C durante 2.5 horas, se detuvo la reacción adicionando 1 ml de TCA (ácido tricloroacético) al 30%, se mezcló la solución y se mantuvo en baño de hielo durante 5 minutos. La mezcla de reacción se centrifugó a 550 X g durante 10 minutos para clarificar. El fosfato inorgánico liberado por acción de la 5'-nucleotidasa se cuantificó por el método descrito por Dittmer y Wells (1969).

Actividad de la ATPasa Na-K se determinó siguiendo el método de Swann y Albers (1975). La solución de reacción conteniendo  $MgCl_2$  (3mM), ATP (3 mM), NaCl (130 mM), KCl (20 mM) e histidina (30 mM) a pH 7.5, se equilibro a 37°C durante 5 minutos. Entonces se añadieron 25 ul de suspensión celular a un mililitro de medio de reacción y se incubó la mezcla durante 5 minutos a 37°C. La reacción se detuvo adicionando 0.1 ml de TCA al 50%, los tubos se colocaron en baño de hielo durante 5 minutos y se les añadió un mililitro de agua desionizada, la mezcla se centrifugó a 550 X g durante 10 minutos. El fosfato inorgánico liberado por acción de la ATPasa Na-K, se cuantificó por el método descrito por Dittmer y Wells (1969).

#### VII. 12. Análisis estadístico

Se emplearon métodos descriptivos para las variables cuantitativas individuales (promedio y desviación estandar). Además se emplearon métodos estadísticos inferenciales para obtener conclusiones con nivel de probabilidad de  $p < 0.05$  de las relaciones causales observadas entre las variables mediante la prueba t de Student.

## VIII. RESULTADOS

### VIII. 1. VIABILIDAD DE LAS CELULAS WRL-68.

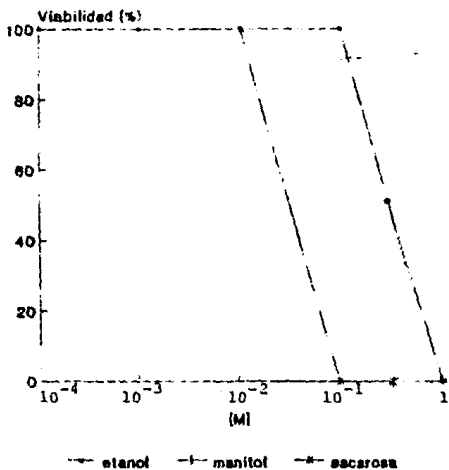
Las células de la línea WRL-68 se pudieron cultivar y crecer como se ha reportado. Como se muestra en la Figura 1, las células presentaron una elevada viabilidad en un amplio intervalo de medios de cultivo conteniendo etanol. Aun a concentraciones superiores a 0.75 M de etanol en medio de cultivo, las células mostraron 50% de viabilidad. En tanto, las células crecidas en medio de cultivo suplementado con sacarosa o manitol murieron en su totalidad a concentraciones entre 0.010 a 0.1M.

### VIII. 2. COMPOSICION LIPIDICA DE LA MEMBRANA PLASMATICA.

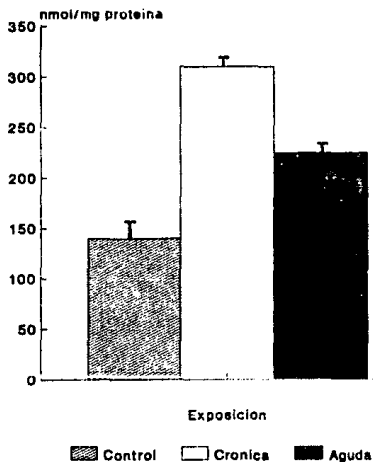
El contenido de colesterol en las membranas control fue de 140 nmol/mg proteína, mientras que las membranas aisladas de células sujetas a exposición aguda mostraron 225 nmol/mg proteína, lo que representa un incremento del 60%. Las membranas de células sometidas a exposición crónica presentaron el mayor contenido (310 nmol/mg proteína) habiendo un incremento del 121% (Figura 2).

Las membranas totales mostraron un comportamiento similar al encontrado en las membranas plasmáticas. Las células control

**FIGURA 1. VIABILIDAD DE LAS CELULAS WRL-68 EXPUESTAS DURANTE 24 HORAS AL ETANOL.**



**FIGURA 2. CONTENIDO DE COLESTEROL EN MEMBRANAS PLASMATICAS DE CELULAS WRL-68.**

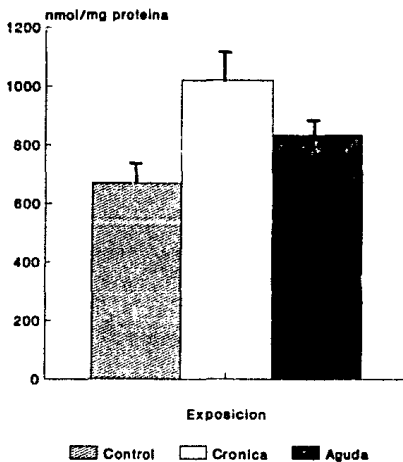


mostraron un contenido de colesterol de 670 nmol/mg proteína, mientras las membranas provenientes de la exposición aguda tuvieron valores de 834 nmol/mg proteína y para la exposición crónica el valor promedio fué de 1020 nmol/mg proteína (Figura 3).

En relación al contenido total porcentual de fosfolípidos, fué modificado por la exposición al etanol, tanto en el tratamiento crónico y agudo. Los valores encontrados, se presentan en la Figura 4, donde se observa que las células control mostraron un promedio de 910 nmol/mg proteína, en tanto en las membranas aisladas después de la exposición crónica el promedio fué de 876 nmol/mg proteína que representó una disminución del 4% y en la exposición aguda el promedio fué de 750 nmol/mg proteína representando una disminución del 18% en comparación a las células control, no mostrando diferencia significativa.

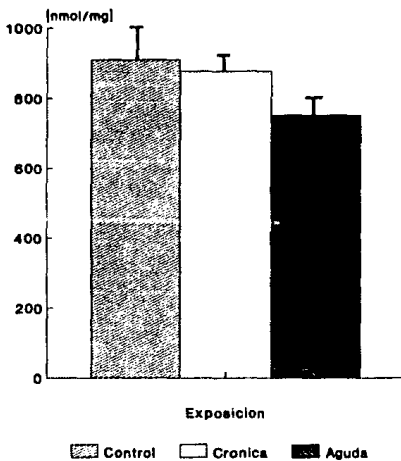
A partir de los resultados antes referidos se obtuvo la relación colesterol/fosfolípido, la cual fue modificada por la exposición al etanol. Se observa que en las membranas control la relación fué del 0.15, mientras para la exposición crónica la relación se incrementó significativamente a 0.35 que representó un aumento del 133%, mientras que en la exposición aguda la relación fué muy similar a la observada en el tratamiento crónico (Tabla I).

**FIGURA 3. CONTENIDO DE COLESTEROL EN MEMBRANAS TOTALES DE CELULAS WRL-68.**





**FIGURA 4. CONTENIDO TOTAL DE FOSFOLIPIDOS  
MEMBRANAS PLASMATICAS DE CELULAS WRL-6**



**TABLA I. RELACION DEL CONTENIDO DE FOSFOLIPIDOS Y COLESTEROL EN MEMBRANAS PLASMATICAS DE CELULAS WRL-68.**

Exposición	Fosfolípidos (nmol/mg prot.)	Colesterol (mmol/mg prot)	Relación Col/Fosf+
Testigo	910±118	140±20	0.15
Crónica	876±70	310±15	0.35*
Aguda	750±93	225±12	0.30*

+ Col = colesterol; Fosf = Fosfolípidos

\* p < 0.05

El contenido de fosfolípidos individuales determinado por cromatografía bidimensional (Tabla II), mostró que tanto la exposición aguda como crónica modificaron el contenido de algunos fosfolípidos.

El contenido porcentual de fosfatidiletanolamina en las membranas control fue del 22.04%, el cual aumentó hasta un 30.98% en la exposición crónica y 28.5% en la exposición aguda, este comportamiento fue significativo ( $p < 0.05$ ). En relación a la fosfatidilcolina, las membranas de células control presentaron 44.63%, mientras en ambos tipos de exposición al etanol hubo una disminución, el contenido porcentual en las células expuestas crónicamente al etanol fue del 38.32% y para el tratamiento agudo del 39.87%, no siendo diferentes significativamente.

Otro fosfolípido que también varió fuertemente fue el fosfatidilinositol, que en las membranas control mostró valores de 10.24%, que en comparación a la exposición crónica mostró una disminución del 18% ( $p < 0.05$ ) y en la exposición aguda disminuyó el 24% ( $p < 0.05$ ).

### VIII. 3. EFECTOS EN LA FLUIDEZ DE MEMBRANAS PLASMATICAS POR LA EXPOSICION AL ETANOL.

El efecto de la exposición al etanol sobre la fluidez de membranas plasmáticas de células WRL-68 fue estimado por la polarización de fluorescencia utilizando difenil-hexatrieno.

TABLE II. COMPOSICION DE FOSFOLIPIDOS EN MEMBRANAS PLASMATICAS DE CELULAS WRL-68.

Fosfolipido	Testigo	Cronica	Aguda
	X + D.E.	X + D.E.	X + D.E.
Esfingomiéline	7.12±0.25	6.56±0.50	6.42±0.65
Fosfatidilcolina	44.63±4.05	38.32±2.80	39.87±0.62
Fosfatidilserina	7.23±0.57	6.23±0.28	6.38±0.93
Fosfatidilinositol	10.24±1.06	8.48±0.62	7.79±0.87
Fosfatidiletanolamina	22.04±1.80	30.98±2.96	28.50±2.18
Otros	8.58±1.20	7.50±1.50	8.64±0.89
TOTAL	99.64±1.24	98.05±1.44	97.60±0.52

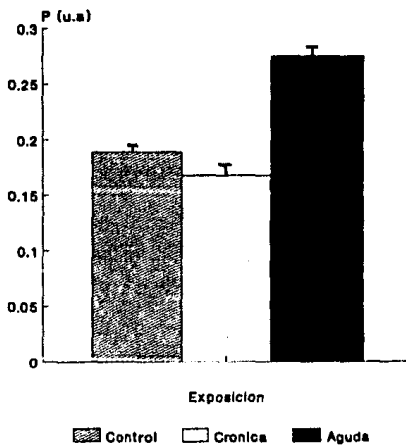
En la Figura 5, se muestran los valores de la polarización de fluorescencia, las membranas plasmáticas provenientes de los tratamientos agudo y crónico al etanol mostraron un comportamiento diferente entre ellos. El promedio en las membranas control fue de 0.189, valor que fue similar al promedio observado en la exposición crónica (0.168 u.a.). Sin embargo, en las membranas plasmáticas correspondientes a la exposición aguda mostraron un aumento considerable en la fluidez en relación al control ( $p < 0.05$ ).

El efecto del etanol sobre la fluidez en las membranas totales fue evaluado y se observó que el control presentó un promedio de polarización de fluorescencia de 0.224 que fue similar al promedio en las membranas del tratamiento crónico, mientras que en las membranas del tratamiento agudo se observó un incremento ligero en la fluidez (Figura 6).

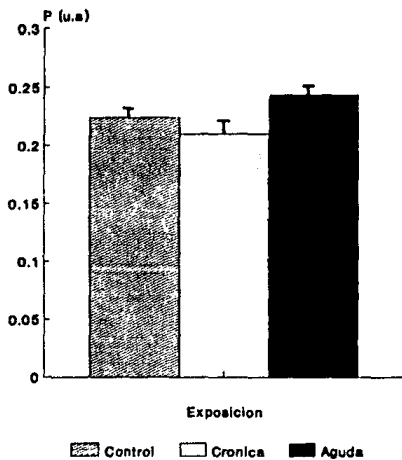
#### VIII. 3. 1 EFECTOS EN LA FLUIDEZ DE MEMBRANAS PLASMATICAS POR LA ADICION IN VITRO DE ETANOL.

Inmediatamente después del término de cada tipo de exposición, se analizó el efecto de concentraciones crecientes de etanol adicionado en el momento de la determinación de la fluidez de las membranas plasmáticas, lo que es referido como el efecto de la adición in vitro.

**FIGURA 5. POLARIZACION DE FLUORESCENCIA EN MEMBRANAS PLASMATICAS DE CELULAS WRL-68.**



**FIGURA 6. POLARIZACION DE FLUORESCENCIA EN MEMBRANAS TOTALES DE CELULAS WRL-68.**



Las alteraciones en la fluidez de membranas plasmáticas provenientes de las exposiciones crónica o aguda fueron diferentes, como se observa en la Figura 7, las membranas de la exposición crónica no mostraron variaciones en la fluidez con el aumento en la concentración de etanol. Mientras las membranas plasmáticas de células expuesta en forma aguda mostraron un aumento en la fluidez conforme aumento la concentración de etanol; a concentraciones mayores de 20 mM, ya no se modificó más. Las membranas de células crecidas en ausencia de etanol mostraron aumento en la fluidez conforme aumentaba la concentración de etanol, siendo este incremento mucho más marcado que en las membranas con tratamiento agudo.

Para determinar si el comportamiento en el efecto de la adición in vitro del etanol es independiente del tipo de membranas celulares en estudio, se analizaron las membranas microsomales aisladas de células crecidas bajo las mismas condiciones de exposición al etanol. En la Figura 8, se observa que la respuesta a la adición de concentraciones crecientes de etanol fué diferente a la observada en las membranas plasmáticas. Así, las membranas control en este caso mostraron aumento en la fluidez conforme se incremento la concentración de etanol. Este mismo comportamiento fue observado con las membranas del tratamiento agudo y crónico solo que en este caso la mayor modificación se presentó en las membranas del tratamiento agudo.



**FIGURA 7. EFECTO DE LA ADICION In Vitro DE ETANOL EN LA FLUIDEZ DE LAS MEMBRANA PLASMATICAS DE CELULAS WRL-68.**

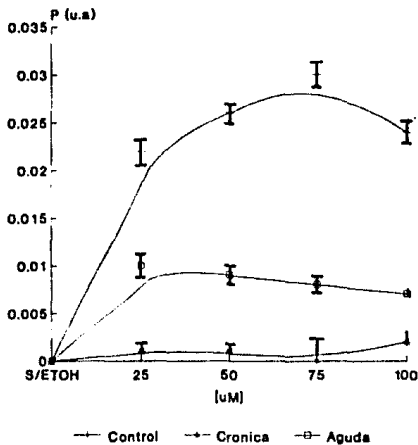
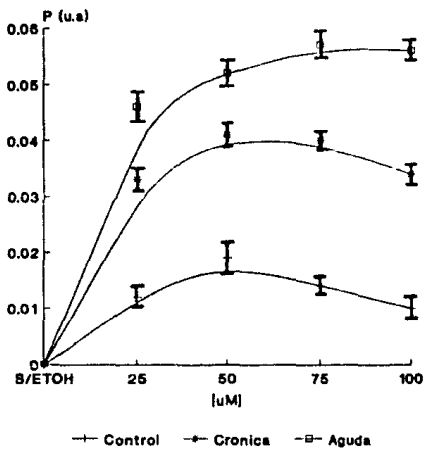


FIGURA 8. EFECTO DE LA ADICION In Vitro DE ETANOL EN LA FLUIDEZ DE LAS MEMBRANAS MICROSOMALES.



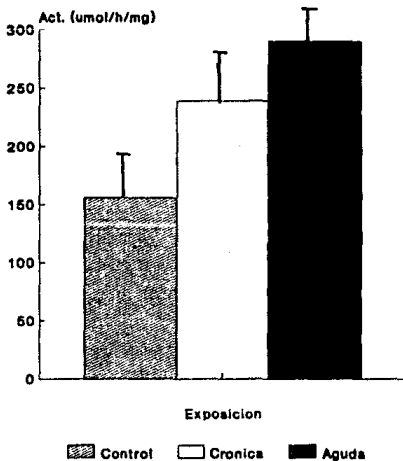
#### VIII. 4. ACTIVIDAD DE ENZIMAS MEMBRANALES.

Además del análisis de los efectos del etanol en la composición y fluidez de las membranas plasmáticas de las células WRL-68, también se determinó la actividad de enzimas características de la membrana plasmática para conocer las alteraciones funcionales.

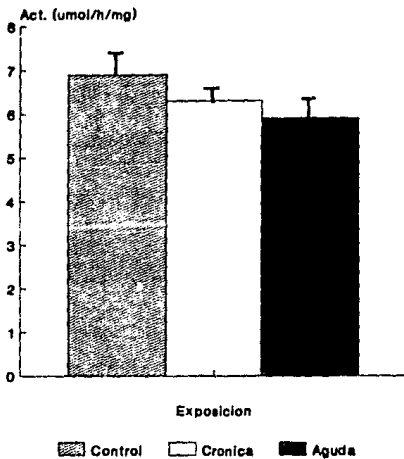
El etanol influyó de manera distinta en la actividad de enzimas marcadoras de la membrana plasmática. La enzima 5'-nucleotidasa mostró un valor promedio de 156 nmol/h/mg de proteína en el control, en relación a esta actividad, se observó que aumento el 85% de la actividad en las membranas de células crecidas bajo tratamiento agudo que mostraron un valor promedio de 290 nmol/h/mg proteína, en tanto que la exposición crónica mostró un valor promedio de 239 nmol/h/mg proteína lo que representó un aumento en la actividad del 53% en comparación con las membranas de células control (Fig. 9).

En la Figura 10, se observan los valores promedios obtenidos en la actividad de la ATPasa Na-K que no mostró alteración significativa por la exposición al etanol. Las membranas aisladas de la células crecidas en ausencia de etanol mostraron una actividad de 6.9  $\mu$ mol/h/mg proteína, en la exposición crónica la actividad fué de 6.3  $\mu$ mol/h/mg proteína observándose una disminución del 10%, mientras que en la exposición aguda se

**FIGURA 9. ACTIVIDAD DE 5'-NUCLEOTIDASA  
EN CELULAS WRL-68 EXPUESTAS AL ETANOL.**



**FIGURA 10. ACTIVIDAD DE LA ATPASA NA-K EN CELULAS WRL-68 EXPUESTAS AL ETANOL.**



observó una actividad de 5.9  $\mu\text{mol/h/mg}$  proteína mostrando  
disminución del 15%.

## IX. DISCUSION

El difenil-hexatrieno es una molécula lipofílica que incorporada en membranas, puede localizarse a lo largo de las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos (Mulders y col. 1986) y permite detectar cambios en los movimientos laterales de las cadenas acilo (Lentz y col. 1976), además Lentz y colaboradores (1989) han sugerido que se distribuye de igual manera en regiones en fases de gel y líquido-cristalino, por lo que permite analizar las propiedades dinámicas de la membrana.

Por la accesibilidad del tóxico en sistemas de cultivos de tejidos, se puede considerar que la membrana plasmática es el primer sitio de contacto con el etanol, lo cual hace que sea susceptible de ser alterada. La polarización de fluorescencia como medida de la dinámica de los fosfolípidos en la membrana mostraron que la alteración de la fluidez dependió del grado de exposición al etanol.

La exposición al etanol por un período corto a una concentración elevada, provocó un efecto fluidizante en las membranas, el cual fue evidenciado por los valores elevados de polarización de fluorescencia, mientras que las sometidas a una baja concentración y a un período de exposición prolongado no mostraron cambios en la fluidez; al compararse con los valores de

polarización de fluorescencia encontrados en las membranas plasmáticas de células cultivadas en ausencia de etanol (Fig. 5).

Este efecto puede estar asociado a la capacidad del etanol de penetrar fácilmente la bicapa lipídica (Wood y Schroeder. 1988) y alterar la región dentro de la membrana que tiene mayor fluidez (Chsbanel y col. 1985).

La diferencia en fluidez entre ambos tipos de exposición parece estar asociada a la modificación en el contenido de agentes que estabilizan la membrana. Por ejemplo, se considera que el calcio unido puede actuar como un protector de agentes que fluidizan la membrana (Seeman y col. 1974), además de inducir transiciones de fase (Viret y Leterrier. 1974) y estabilizar la fluidez (Papahadjopolus. 1974).

Los resultados obtenidos en relación a la exposición crónica coinciden con estudios realizados en membranas aisladas de células de origen no hepático. Las membranas sinaptosomales de ratones expuestos crónicamente al etanol son más rígidas que las membranas control cuando se ha determinado la fluidez por resonancia del espín electrónico (Lyon y Goldstein, 1983) o polarización de fluorescencia (Harris y col. 1984).

Por otro lado, se ha sugerido que el etanol tiene un efecto asimétrico en las membranas. Wood y colaboradores (1990) encontraron en membranas sinaptosomales de animales en exposición



crónica al etanol una reducción en las diferencias de fluidez entre las monocapas citoplásmica y exterior.

Las diferencias de fluidez observadas entre las membranas plasmáticas de células crecidas en presencia y ausencia al etanol, parecen estar asociadas con cambios observados en el contenido de colesterol y fosfolípidos.

Se ha propuesto que el colesterol en las membranas juega un papel importante en la rigidez de las membranas (Vanderkooi y col. 1974). Shuller y colaboradores (1984) encontraron en membranas plasmáticas de ratas tratadas crónicamente con etanol un aumento en el contenido de colesterol y sugirieron que este comportamiento puede ser responsable de las variaciones en la fluidez, que puede estar asociado a su efecto condensante, ya que disminuye el área superficial ocupada por fosfolípidos con ácidos grasos saturados e insaturados (Demel y col. 1977; Bittman y col. 1984). Sin embargo, Taraschi y Rubín (1985) consideran que el aumento en el contenido de colesterol por la exposición al etanol, no es una observación consistente, ya que las diferencias pueden deberse en parte al procedimiento experimental, no se emplean las mismas concentraciones de etanol en los diferentes tipos de exposición, vía de administración, especies y períodos de la exposición.

Una explicación alternativa es que el colesterol disminuye las alteraciones en la fluidez membranal después de una continua exposición al etanol, pero que los cambios ocurren no solo por cantidad total de colesterol, sino también por la distribución del colesterol en las monocapas exterior y citoplásmica.

En relación al efecto asimétrico del etanol en las membranas, Chabanel y colaboradores (1985) encontraron en membranas de eritrocitos expuestas al alcohol-bencilico un mayor efecto fluidizante en la monocapa citoplásmica que en la monocapa exterior. En membranas sinaptosomales de ratones expuestos crónicamente al etanol, este no provoca alteración en el contenido total de colesterol, pero sí diferencias en el contenido de colesterol entre ambas monocapas (Wood y col. 1990).

Además la exposición al etanol de las células WRL-68 causó cambios en el patrón de los fosfolípidos, como se observa en la Tabla II, este se caracterizó por la disminución en el porcentaje de fosfatidilcolina y aumento en fosfatidiletanolamina en las células expuestas al etanol. Estas modificaciones al patrón de fosfolípidos no corresponde a lo que se ha reportado en células hepáticas (Polokoff y col. 1985), aunque esta razón de discrepancia puede estar basada en que la concentración que ellos emplearon fue de 80 mM.

Estas alteraciones inducidas por el etanol se pueden interpretar como el resultado de la disminución en la síntesis de fosfatidilcolina o de la disminución en la conversión de fosfatidiletanolamina a fosfatidilcolina, por lo que sería importante determinar cual de estas posibilidades es cierta.

Así mismo, consideramos que la tendencia a la disminución del contenido total o individual de fosfolípidos puede deberse a un fenómeno degenerativo membranal a través del proceso de lipoperoxidación. Hemos observado que las células WRL-68 expuestas al etanol siguiendo los mismos esquemas de tratamiento muestran un aumento en el grado de lipoperoxidación medido por la producción de malondialdehído.

Podemos considerar que las alteraciones observadas en el contenido de fosfolípidos después de la exposición al etanol pueden estar controladas por respuestas complejas de un variable número de sistemas enzimáticos y la renovación metabólica de los componentes lipídicos individuales.

La adaptación o tolerancia a la exposición crónica al etanol comprende una amplia variedad de eventos fisiológicos. A nivel de membranas plasmáticas que se manifiesta como una resistencia al desorden molecular de los fosfolípidos por la adición de etanol *in vitro* (Chin y Goldstein. 1981; Taraschi y Rubin. 1985).

Recientemente, se ha encontrado que el fosfatidilinositol y la fosfatidilserina pueden conferir la resistencia al desorden provocado por el etanol *in vitro* en vesículas reconstituidas de fosfolípidos de membrana microsomal hepática (Taraschi y col. 1986).

La disminución de fosfatidilinositol observada en las células WRL-68 crecidas en el tratamiento agudo de etanol, parece estar relacionado con los reportes de Rubin y Hoek (1986); Rubin y col (1988) quienes encontraron un aumento en la actividad de la fosfolipasa C específica para fosfoinosítidos en hepatocitos aislados de rata y plaquetas de humano expuestos al etanol.

Por otro lado, Stubbs y colaboradores (1988) reportaron que las membranas microsomales de ratas expuestas crónicamente al etanol desarrollan una resistencia a la hidrólisis por la fosfolipasa A2 comparada con animales control.

Es difícil relacionar las observaciones hechas por diversos investigadores sobre este tópico con las nuestras, debido a los diferentes protocolos, las variaciones en la vía de administración, las concentración, período de la exposición al etanol y las especies de animales utilizadas. Por ejemplo, Polokoff y colaboradores (1985) reportan que las células de hepatoma de Reuber H35 cultivadas en presencia de etanol (80 mM) durante tres semanas, son más resistentes a las alteraciones por

la adición de etanol, una vez que las membranas han sido aisladas. En nuestro estudio el tiempo de exposición fue de 30 días y una concentración de 100 mM, fueron requeridos para conferir la resistencia a la modificación en la fluidez cuando se añadió etanol a las membranas aisladas.

La adaptación de las membranas plasmáticas de las células WRL-68 a la adición de etanol *in vitro* parece involucrar cambios en el contenido de colesterol y fosfolípidos, que es apoyado por el hecho de que la relación colesterol:fosfolípido aumentó a 0.30 en la exposición aguda en comparación al 0.15 en las membranas control.

Esto es contrario a lo propuesto por Taraschi y col (1985) quienes no encontraron diferencias en el orden basal en fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina en microsomas de ratones alcohólicos usando resonancia del espín electrónico. Además sugirieron que los cambios en el colesterol no son responsables de la tolerancia en membranas mitocondriales y microsomales de hígado.

Nuestros resultados concuerdan con el concepto de adaptación o tolerancia, que se ha observado en las células expuestas crónicamente al etanol, en el sentido que las modificaciones lipídicas inducidas son necesarias para que las células puedan llevar a cabo sus funciones dependientes de membrana plasmática aun en presencia del agente fluidizante (Goldstein y Chin. 1981).

El etanol también puede alterar selectivamente microambientes en las proteínas integrales de membrana (Salesse y col. 1982), modificando la conformación o estructura secundaria de las proteínas membranales. Por ejemplo, la actividad de las enzimas puede ser influenciada por la fluidez membranal como en la 5'-nucleotidasa (Dipple y col. 1982) y ATPasa Na-K (Sinensky y col. 1979). Ambas responden de manera distinta a la presencia del etanol, el aumento dependiente de etanol en la actividad de la 5'-nucleotidasa en las células WRL-68, es similar al observado en células cultivadas de glioma C6 (Syapín y col. 1980) y células de hepatoma de Reuber H35 (Polokoff y col. 1985), pero opuesto a lo encontrado en membrana plasmática de hígado de ratas alimentadas con etanol (Nishimura y Teschke, 1982). Estas alteraciones en la funcionalidad de enzimas membranales pueden estar asociadas a la composición del anillo lipídico, que puede tener influencia sobre la rigidez membranal.

La influencia del etanol en la composición y dinámica de las membranas plasmáticas de células WRL-68 en ambos tipos de exposición, puede tener influencia en la transducción de información exterior-citoplasma a través de receptores y estar relacionadas con cambios en la capacidad metabólica en presencia de otros xenobióticos.

## X. CONCLUSIONES

La exposición crónica y aguda al etanol indujo cambios en la composición lipídica de la membrana plasmática de células WRL-68.

Se observó que en ambos tipos de exposición, hay una tendencia a aumentar el contenido de colesterol en comparación a las membranas control, lo que ocasionó una alteración en la relación fosfolípidos:colesterol.

El etanol provocó diferentes efectos en la fluidez de las membranas plasmáticas, ya que la exposición aguda tuvo un efecto fluidizante, mientras que la exposición crónica no se modificó.

Las membranas plasmáticas de células expuestas crónicamente resistieron el efecto fluidizante del etanol *in vitro*, mientras que las membranas microsomales provenientes del mismo tratamiento la adición del etanol provocó el aumento en la fluidez, por lo que se consideramos que el etanol tiene un efecto diferencial entre las membranas celulares.

El uso de sondas fluorescentes (DPH) en nuestro estudio mostró ser un método útil para conocer alteraciones en la dinámica de las membranas plasmáticas de células hepáticas.

La modificación en el contenido de colesterol no parece ser el único cambio significativo para contrarrestar el efecto fluidizante del etanol, como se ha referido en la literatura, sino también la disminución en el contenido de fosfatidilcolina, fosfatidilinositol y aumento en fosfatidiletanolamina.

Las alteraciones en composición y dinámica en las membranas plasmáticas al parecer influyeron en la actividad de enzimas marcadoras; la ATPasa Na-K y la 5'-nucleotidasa.



## BIBLIOGRAFIA

Ansell, G.B., Hawthorne, J.N. y Dawson, R.M.C (1976). Form and function of phospholipid. Elsevier Scientific Publishing. New York. pp 340.

Armitage, I.M., Shapiro, D.L., Furthmayr, H. y Marchesi, V.T. (1977). <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance evidence for pure phosphoinosite associated with the hidrofobic segment of glycophorin A. Biochemistry., 16: 1317-1320.

Bashor, S., Chenery, R.J., Kremers, P. (1987). Metabolism and toxicity of drugs in mammalian hepatocyte culture. *En: In vitro methods in toxicology* (Atterwill, C.K. y Steele, C.E. eds). Cambridge University Press. New York. pp 211-233.

Barton, P.G. y Gunstone, F.D. (1975). Hydrocarbon chain packing and molecular motion in phospholipid bilayer formed from unsaturated lechitins. J. Biol. Chem., 250: 4470-4476.

Benford, R. y Hubbard, H. (1987). Biochemical toxicology. *En: The isolated hepatocyte use in toxicology and xenobiotic transformation.* (Rauckman, E.J. y Padilla, E.M. eds). Academic Press. New York. pp 241-265.

Bittman, R., Clejan, S., Lund-katz, S. y Phillips, M.C. (1984). Influence of cholesterol on bilayer of ester and ether linked phospholipid. Biochim. Biophys. Acta., 772: 117-126.

Blackburn, C.C. y Schnaar, R.L. (1983). Carbohydrate-specific cell adhesion is mediated by immobilized glycolipid. *J. Biol. Chem.*, 258: 1180-1188.

Bligh, E.G. y Dyer, W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *J. Biochem. Physiol.* 37:911-917.

Blume, A. (1988).  $^2\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  NMR Spectroscopy of lipid model membranes. *En: Physical properties of biological membranes and their functional implications.* (Hidalgo, C. ed). Plenum Press. New York. pp 211-231.

Burnell, E., Van Alphen, L., Verkleij, A. y De kruijff, B. (1980). Reduced lateral mobility of a fluorescent lipid probe in cholesterol-depleted erythrocyte membrane. *Biochim. Biophys. Acta.*, 507: 207-218.

Chapelle, S. y Gilles-Baillein, M. (1983). Phospholipids an cholesterol in brush border and basolateral membranes from rat intestinal mucosa. *Biochim. Biophys. Acta.*, 753: 269-271.

Chin, J.H. y Goldstein D.B. (1977) Drug tolerance in biomembranes: A spin label study of the effects of ethanol. *Science.*, 196: 684-685.

Chin, J.H. y Goldstein, D.B. (1981). Membrane disordering action of ethanol: variation with membrane cholesterol content and of the spin label probe. *Mol. Pharmacol.*, 19: 425-431.

Chin, J.J., Jung, E.K. y Yung, C.Y. (1986). Structural basis of human erythrocyte glucose transporter function in reconstituted vesicles. *J. Biol. Chem.*, 7101-7104.

Claret, M., Garay, R. y Giraud, F. (1978). The effect of membrane cholesterol on the sodium pump in red blood cells. *J. Physiol.*, 274: 247-263.

Crane, L. J., Greenblath, C. y Miller, D.L. (1975). PLasma protein induction by isolated hepatocyte. *Fed. Proc.*, 34: 620-627.

Cooper, R.A. (1978). Tight junction development between cultured hepatoma cells: possible stages in assembly and enhancement with dexamethasone. *J. Supramol. Struct.*, 8: 413-430.

Cunningham, C.C., Filus, S., Bottenus, R.E. y Spach, P.I. (1982). Effect of ethanol consumption on the phospholipid composition of rat liver microsomes and mitochondrial. *Biochim. Biophys. Acta.*, 712: 225-230.

Cullis, P.R., De Kruijff, B., McGrath, A. E., Morgan, C.G. y Radda, G.K. (1976). Lipid asymetry, clustering and molecular motion in biological membranes and their models. En: Structure of biological membranes (Abrahamsson, S. y Pascher, I. eds). Plenum Press. New York. pp 389-405

Cullis, P.R. y Hope, M.J. (1978). Effects of fusogenic agent on membrane structure of erythrocyte ghosts and the mechanisms of membrane fusion. *Nature.*, 271: 672-674.

Demel, R.A., Janse, J.W.C.M., Van Dijck, P.W.M. y Van Deenen, L.L.M. (1977). The preferential interaction of cholesterol with different classes of phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta.*, 465: 1-10.

Derr, R.F., Porta, E.A., Larkin, E.C. y Rao, G.A. (1990). Is the ethanol per se hepatotoxic. *J. Hepatol.*, 10: 381-386.

Devaux, P.F. (1988) Phospholipid flippases. *FEBS. Lett.* 234:8-12.

Dipple, I., Gordon, L.M. y Houslay, M.D. (1982). The activity of 5'-nucleotidase in liver plasma membrane is affected by the increase in bilayer fluidity achieved by anionic drugs but not by cationic drugs. *J. Biol. Chem.*, 257: 1811-1815.

Dittmor, J.C. y Wells, M.A. (1969). Quantitative and qualitative analysis of lipids and lipid components. *Meth. Enzymol.*, 16: 486-487.

Dixon, T.F. y Purdom, M. (1954). Serum 5'-nucleotidase. *J. Clin. Pathol.*, 7: 341-345.

Estep, T.N., Mountcastle, D.B., Biltonen, R.L. y Thompson, T.E. (1978). Studies on the anomalous thermotropic behaviour of aqueous dispersions of dipalmitoylphosphatidylcholine cholesterol mixtures. *Biochemistry.*, 17: 1984-1989.

Fisher, K.A. y Stoecknieus, W. (1983). Membranes. En: (Hoppe, W., Lohmann, W., Markl, H. y Ziegler, H. eds). Springer-Verlag. Berlin. pp 418-425.

Gitler, C. (1972) Plasticity of biological membrane. Ann. Rev. Biophys. Bioengin. 1:51-91.

Goldstein, A., Aronow, L. y Kallam, W. (1979). Farmacologia. 2a. ed. Ed. Limusa. México. pp 425-443.

Goldstein, D.B. y Chin, J.H. (1981) Interaction of ethanol with biological membranes. FASEB. J. 40:2073-2471.

Gordon, E.R., Rochman, J., Arai, M. y Lieber, C.S. (1982). Lack of correlation between hepatic mitochondrial membrane structure and functions in ethanol-fed rats. Science.,

Grant, C.W.M. (1988). Lateral phase separations and the cell membrane. En: Membrane fluidity in biology. Academic Press. New York. pp 131-147.

Grisham, J.W. (1983) Cell in rat liver cultures their identification and isolation. Mol. Cell. Biochem. 53:23-33.

Grunze, M., Forst, B. y Deuticke, B. (1980). Dual effect of membrane cholesterol on simple and mediated transport processes in human erythrocytes. Biochim. Biophys. Acta., 600: 860-869.

Ham R.G. y Mckeshan, W.R. (1979). Media and growth requeriments. Meth. Enzymol., 58: 44-93.

Harris, R.A. y Schroeder, F. (1981). Ethanol and the physical properties of brain membranes. *Mol. Pharmacol.*, 20: 128-133.

Harris, R.A., Baxter, D.M., Mitchell, M.A. y Hitzemann, R.J. (1984). Physical properties and lipid composition on brain membranes from ethanol-dependent mice. *Mol. Pharmacol.*, 25:401-409.

Helmkamp, G. M. (1988). Phospholipid transfer proteins and membrane fluidity. *En: Membrane fluidity in biology.* (Aloia, R.C. ed). Academic Press. New York. pp 151-183.

Hidalgo, C., Petrucci, D.A. y Vergara, C. (1982) Uncoupling of calcium transport in sarcoplasmic reticulum as a result labeling lipid amino groups. *J. Biol. Chem.* 257:208-216.

Hidalgo, C. (1988). Physical properties of biological membranes and their functional implications. Plenum Press. New York. pp 236.

Hill, M.W. y Baghman, A.D. (1975). General depressant drug dependency: a biophysical hypothesis. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 59: 1-9.

Hitzemann, R.J., Schueler, H.E. Graham-Brittai, C. y Kreishman, G.P. (1986) Ethanol-induced changes in neural membrane order: An NMR study. *Biochim. Biophys. Acta.* 859:189-197.

Huang, C. y Mason, J.T. (1986) Structure and properties of mixed-chain phospholipid assemblies. *Biochim. Biophys. Acta.* 864:423-470.

- Hui, S.W., Stewart, T.P. y Albert, A.D. (1981). Bilayer to non-bilayer transition in mixtures of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine: implications for membrane properties. *Arch. Biochem. Biophys.*, 207: 227-240.
- Isaacson, Y.A., Deroo, P.W., Rosenthal, A.F., Bittman, R., McIntyre, J.O., Bock, H.G., Bazzotti, P. y Fleischer, J. (1979). The structural specificity of lecithin for activation of purified D-B hydroxybutyrate apodehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, 254: 117-126.
- Israellchvilli, J.N. (1977). Refinement of the fluid-mosaic model of membrane structure. *Biochim. Biophys. Acta.*, 469: 221-225.
- Jennings, M.L. (1989). Topography of membrane proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, 58: 999-1027.
- Karnovsky, M.J., Kleinfeld, M.A., Richerd, L., Hoover, L. y (1982). The concept of lipid domains in membranes. *J. Cell Biol.*, 94: 1-6.
- Kowles, A.F y Racker, E. (1975) Propierties of a reconstituted calcium pump. *J. Biol. Chem.* 250:3508-3544.
- Lee, A.C. (1983). Lipid phase transitions and mixtures. En: Membrane fluidity in biology (Aloia, R.C. ed). Academic Press. NY. pp 43-84.

Lentz, B.R., Bareholz, Y. y Thomson, T.E. (1976) Fluorescence depolarization studies of phase transitions and fluidity in phospholipid bilayers II. Two component phosphatidylcoline liposomes. *Biochemistry*. 15:4529-4537.

Lentz, B.R. (1989). Membrane "fluidity" as detected by diphenylhexatriene probes. *Chem. Phys. Lipids.*, 50: 171-190

Lieber, C., DeCarli, L.M. y Sorrell, M.F. (1989). Experimental methods of ethanol administration. *Hepatology.*, 10: 501-510.

Littleton, J.M., Grieve, S.J., Griffith, P.J. y John, J.R. (1980). Ethanol induced alteration in membrane in phospholipid composition: possible relationship to development of cellular tolerance to ethanol. En: *Biological effects of ethanol.* (Begleiter, R. ed). Plenum Press. New York. 7-19.

London, E. y Feingenson, G.W. (1981). Fluorescence quenching in model membranes. 2. Determination of the local lipid environment of the calcium adenosinetriphosphatase from sarcoplasmic reticulum. *Biochemistry.*, 20: 1939-1948.

Low, M.G. y Zilversmit, D.B. (1988). Role of phosphatidylinositol in attachment of alkaline phosphatase to membrane. *Biochemistry.*, 19: 3913-3918.

Luthin, G.R. y Tabakoff, B. (1984). Changes in the activity of adenylate cyclase during acute and chronic administration of ethanol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 228: 579-586.



Lutz, H.A., Shih-Chun, L. y Polek, J. (1977). Release of spectrin free vesicles from human erythrocytes during ATP depletion. *J. Cell Biol.*, 73:584-560.

Lyon, R.C. y Golstein, D.B. (1983) Changes in synaptic membrane order associated with chronic ethanol treatment in mice. *Mol. Pharmacol.* 23:86-91.

Markwell, A. K., Jaos, S.M., Beiber, L.L. y Tolbert, N.E. (1978). Lipoprotein samples: modified Lowry method. *Anal. Biochem.*, 72: 296-299.

Marsh, D. (1988). Molecular mobility in membranes. *En: Physical properties of biological membranes and their functional implications.* (Hidalgo, C. ed). Plenum Press. New York. pp 123-145.

McQueen, C.A. y Williams, G. N. (1987). Toxicology studies in cultures hepatocyte from various species. *En: The isolated hepatocyte use in toxicology and xenobiotic transformation.* (Rauckman, E.J. y Padilla, E.D. eds). Academic Press. New York. pp 241-265.

Montesano, R., Perrelet, A., Vassali, P. y Orci, L. (1979). Absence of filipin-sterol complexes from large coated pits in surface of culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 76: 6391-6395.

Morrison, W., Wilce, P.A. y Shanley, B.C. (1984). Influence of ethanol on fatty acid composition of phospholipids in culture neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 122: 516-524.

Muhlebach, T y Cherry, R.J. (1982). Influence of cholesterol on the rotation and self association and band III the human erythrocyte membrane. *Biochemistry.*, 21:4225-4228.

Mulders, F., Van Langen, H., Van Ginkel, G. y Levine, Y.K. (1986). The static and dynamic behaviour of fluorescent probe molecules in lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta.*, 859: 209-218

Papahadjopoulos, D. (1974). Studies on the mechanism of action of local anesthetics with phospholipid model membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 265: 169-186.

Polokoff, M.A., Simon, T.J., Harris, R.A., Simon, R.F. y Iwahashi, M. (1985) Chronic ethanol increases liver plasma membrane fluidity. *Biochem.* 24:3114-3120.

Porta, E.A., Bergman, B.J. y Stein, A.A. (1965). Acute alcoholic hepatitis. *Am. J. Pathol.*, 46: 657-689.

Poste, G y Allison, A.C. (1973). Membrane fusion. *Biochim. Biophys. Acta.*, 300: 421-461.

Powell, G.L., Kwoles, P.F. y Marsh, D. (1987) Spin label studies on the specificity of interaction of cardiolipin with beef heart cytochrome oxidase. *Biochemistry*. 26:8138-8145.

Powis, G. (1989). The use of human liver foreign compound metabolism and toxicity studies. *Drug Metab. Rev.*, 20: 379-394.

Roberts, D.D., Williams, S.B., Gralnick, H.R. y Ginsburg, V. (1986). von Wilbrand factor binds specifically to sulfated glycolipids. *J. Biol. Chem.*, 261: 3306-3309.

Rouser, G., Fleischer, S. y Yamamoto, A. (1970). two dimensional thin-layer chromatographic separation of polar lipid and determination of phosphorus analysis of spots. *Lipids.*, 15: 494-496.

Rubenstein, J.L.R., Smith, B.A., McConnell, H.M. (1979). Lateral diffusion in binary mixtures of cholesterol and phosphatidylcholines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 76: 15-18.

Rubin, R. y Hoek B.J. (1988) Alcohol-induced stimulation of phospholipase C human platelets requires G-protein activation. *Biochem. J.* 254:147-153.

Rubin, R. y Hoek, J.B. (1988). Ethanol induced stimulation of phosphoinositide turnover and calcium influx in isolates hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.*, 37: 2461-2466.

Salesse, R., Garnier, J., Leterrier, S., Daveloose, D. y Viret, J. (1982). Modulation of adenylate cyclase activity by the physical state of pigeon erythrocyte membrane. 1. Parallel drug induced changes in the bilayer fluidity and adenylate cyclase activity. *Biochemistry.*, 21: 1581-1586.

Seelig, J. (1979). Physical properties of model membranes and biological membranes. *En: Membranes and intercellular communication* (Balian, R., Chabre, M. y Devaux, P.F. eds). North-Holland. Amsterdam. pp 15-77.

Seeman, P., Chen, S.S., Chau-Wong, M y Staiman, A. (1974). Calcium reversal of nerve blockage by alcohols, anesthetics, tranquilizers and barbiturates. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 52: 526-534.

Sell, S., Skelly, H., Leffort, N.C., Miller-Eberhard, V. y Kida, S. (1975). Relationship of the biosynthesis of  $\alpha$ -fetoprotein, albumin, hemopexin and haptoglobin to the growth state of fetal rat hepatocyte cultures. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 259: 45-58.

Severs, N.J. (1982). Cholesterol distribution structural differentiation in the sarcoplasmic reticulum of rat cardiac muscle cells. *Cell Tissue Res.*, 224: 613-624.

Sharon, N. (1979). Glycoproteins in membranes. *En: Membranes and intercellular communication.* (Balian, R., Chabre, M. y Devaux, P.F. eds). North Holland Publishing. Amsterdam. pp 117-182.

Schuller, A., Moscat, J.E., Diez, C., Fernández-Checa, F.G. y Mucino, A.M. (1984). The fluidity of plasma membranes from ethanol treated rat liver. *Mol. Cell. Biochem.*, 64: 89-95.

Shinitzky, M. y Inbar, M. (1976). Microviscosity parameters and protein mobility in biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta.*, 433: 133-149.

Sinesky, M., Minneman, K.P. y Molinoff, P.B. (1979). Increased membrane acyl chain ordering activates adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.*, 254: 9135-9141.

Singer, S.J. (1971). *Structure and function of Biological membranes*. Academic Press. New York. pp 560.

Singer, S.J. (1976). *Structure of biological membranes*. Plenum Press. New York. pp 460.

Singer, S.J. (1979). The cell membrane. En: *Membranes and intercellular communication* (Balian, R., Chabre, M. y Devaux, P.F. eds). North-Holland Publishing Co. Amsterdam. pp 5-14.

Spiegel, S., Yamada, K.M., Hom, B.E., Moss, J. y Fishman, P.H. (1985). Fluorescent gangliosides as probe for the retention and organization of fibronectin by ganglioside deficient mouse cells. *J. Cell. Biol.*, 100:721-726.

Stammati, A.P., Silano, V. y Zucco, F. (1981). Toxicology investigation with cell culture system. *Toxicology.*, 20: 91-153.

- Stubbs, C.D., Williams, W.B., Pryor, C.L. y Rubin, E. (1988) Ethanol-induced modifications to membrane lipid structure: effect on phospholipase A2-membrane interactions. Arch. Biochem. Biophys. 262:560-573.
- Swaan, A.C. y Albers, R.W. (1975). Sodium and potassium activated ATPase of mammalian brain. Regulation of phosphatase activity. Biochim. Biophys. Acta., 382: 435-456.
- Syapin, P.J. Stefanovic, V., Mandel, P. y Noble, E.P. (1980). A relationship between alcohol intoxication and disordering of C6 glioma cells. Prog. Neuro-Psycopharmacol., 4: 14-30.
- Taraschi, T.F. y Rubin E. (1985) Effects of ethanol on the chemical and structure properties of biological membranes. Lab. Inv. 52:120-130.
- Taraschi, T.F., Wu, A. y Rubin E. (1985) Phospholipid spin probes measure the effects of ethanol on the molecular order of liver microsomes. Biochemistry. 24: 7096-7101.
- Taraschi, T.F., Ellingson, J.S., Wu, A., Zimmerman, R. y Rubin E. (1986) Membrane tolerance to ethanol is rapidly lost after withdrawal: A model studies of membrane adaptation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 83: 3669-3673.
- Tayer, W.S. y Rubin, E. (1979). Effects of chronic intoxication on oxidative phosphorylation in rat liver submitochondrial particles. J. Biol. Chem., 254: 7717-7724.

Treisman, S.N. y Wilson, A. (1987). Alkanol effects on early potassium current in *Aplasia* neurons depend on chain length. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 84: 9299-9304.

Unwin, P.N. y Zampighi, G. (1980). Structure of the junction between communicating cells. *Nature.*, 283: 545-549.

Van Deenen, L.L.M. (1981). Topology and dynamics of phospholipids in membrane. *FEBS lett.*, 123: 3-15.

Vanderkooi, J., Fischkoff, S., Chance, B. y Cooper, R.A. (1974). Fluorescent probe analysis of the lipid architecture of natural and experimental cholesterol-rich membranes. *Biochemistry.*, 13: 1589-1595.

Viret, G. y Leterrier, F.A. (1976) A spin label study of rat brain membranes: Effects of temperature and divalent cations. *Biochim. Biophys. Acta* 436:8111-824.

Waring, A.J., Rottenberg., Ohnishi, T. y Rubin. E. (1981). Membranes and phospholipids of liver mitochondria from chronic alcoholic rats are resistant to membrane disordering by alcohol. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, 78: 2582-2586.

Wing, D.R. Harvey, D.J., Belcher, S.J. y Paton, W.D.M. (1982). Changes in membrane lipid content after chronic ethanol administration with respect to fatty acyl composition and phospholipid typed. *Biochem. Pharmacol.*, 33: 1625-1633.

Wood, W.G. y Schroeder, F. (1988). Membrane effects of ethanol: Bulk lipid versus lipid domains. *Life Sci.*, 43: 467-475.

Wood, W.G, Schroeder, F., Hogg, L., Rao, M. y Nemezc, G. (1990) Asymmetric distribution of fluorescent sterol in synaptic plasma membranes: effects of chronic ethanol consumption. *Biochem. Biophys. Acta.* 1025:243-246.

Yeagle, P.L., Martin, R.B., Lala, A.K., Lin, H. y Bloch, K. (1977). Differential effects of cholesterol and lanosterol on artificial membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 74: 4924-4926.

Yeagle, P.L. (1983) Cholesterol modulation of (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>)ATPase ATP hydrolyzing activity in human erythrocyte. *Biochim. Biophys. Acta.* 727:39-44.

Yeagle, P.L. (1985) Cholesterol and the cell membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* 822: 267-287.

Yeagle, P.L. (1989) Lipid regulation of cell membrane structure and function. *FASEB. J.* 3:1833-1842.

Yeagle, P.L. y Kelsey, D. (1989). Phosphorus NMR. Studies of lipid protein interactions: human erythrocyte glycoporphin and phospholipids. *Biochemistry.* 28:2210-2215.

Yohe, C. y Rosenberg, A. (1977). Action of intrinsic sialidase of rat brain synaptic membranes on membrane sialolipid and sialoprotein component in situ. *J. Biol. Chem.*, 252: 2412-2418.



Zambrano, F. y Rojas, M. (1988). Lipid-protein interactions in the Na<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> pumps: role of sulfatide. *En: Physical properties of biological membranes and their functional implications.* (Hidalgo, C. ed). Plenum Press. New York. pp 211-231.