

UCH-P&F
D&C-12
R813
C-1

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y

FARMACEUTICAS



ESTUDIO FOTOFISICO Y FISICO-QUIMICO DE

MEMBRANAS MICROSOMALES

DIRECTOR DE TESIS Y PROFESOR PATROCINANTE: Dr. EDUARDO LISSI

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN QUIMICA

HELEN ROSENBLUTH LOPEZ

1996

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS
INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Comisión de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por la Candidata

HELEN ROSENBLUTH LOPEZ

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis para el Grado de Doctor en Química, en el exámen de Defensa de Tesis rendido el 17 de julio de 1996.

Director de Tesis:

Prof. Dr. Eduardo Lissi

Comisión Informante de Tesis:

Prof. Dr. Antonio Zanocco

Prof. Dr. Eduardo Silva

Prof. Dra. Cecilia Rojas

Prof. Dra. Else Lemp

Prof. Dr. Patricio Sotomayor



.....
.....
.....
.....
.....
.....

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis más sinceros agradecimientos:

- Muy especialmente al Dr. Eduardo Lissi, profesor guía de esta tesis, por la valiosa entrega de sus conocimientos y experiencia, así como también por su paciencia.
- Al Dr. Andrés Olea por su constante apoyo, estímulo y aporte intelectual.
- A la Prof. Myriam Orellana por facilitar la infraestructura de su laboratorio.
- A la Prof. Elena Valdes por su desinteresada ayuda.
- Al Prof. Oscar Fuentes por sus valiosas sugerencias y constante apoyo.
- Al Dr. Carlos Gaule por su permanente apoyo y amistad.
- Al Sr. Miladio Ruiz por su valiosa asistencia técnica.
- A todos los integrantes del Laboratorio de Fotoquímica de la Facultad de Ciencias, USACH, por su apoyo y amistad.
- Y a todos los que de una manera u otra hicieron posible el desarrollo de la presente tesis.

INDICE

	Página
Abreviaturas	I
Resumen	1
Summary	3
1 Introducción	5
1.1 Generalidades	5
1.2 Fluorescencia	6
1.3 Polarización de la Fluorescencia	9
1.4 Factores Modificadores de la Fluidéz	12
1.5 Lipoperoxidación	13
1.6 Retículo Endoplásmico	17
2 Objetivos generales	21
2.1 Objetivos Específicos	22
3 Materiales y Métodos	23
3.1 Materiales	23
3.2 Métodos Experimentales	24
3.2.1 Preparación de Microsomas	24
3.2.2 Determinación de Proteínas	25
3.2.3 Incorporación de Derivados del Pireno a la Membrana Microsomal	25
3.2.4 Medición de Polarización de la Fluorescencia	26
3.2.5 Evaluación de la Incorporación Total de la Sonda a la Membrana Microsomal	26
3.2.6 Determinación de las Constantes de Reparto	26
3.2.7 Incorporación del n-Heptanol y del 2,6-dimetil-4-heptanol a la Membrana Microsomal	27
3.2.8 Lipoperoxidación	27

3.2.9	Determinación de Malondialdehído	27
3.2.10	Actividades Enzimáticas	28
4	Resultados	30
4.1	Estudio Fotofísico de las Propiedades Físico-Químicas de la Membrana Microsomal	30
4.2	Efecto del Tetracloruro de Carbono sobre las Propiedades Físicas de la Membrana Microsomal	32
4.3	Efecto del n-Heptanol y del 2,6-Dimetil-4-Heptanol sobre las Propiedades Físicas de la Membrana Microsomal	36
4.4	Efecto del n-Heptanol y del 2,6-Dimetil-4-Heptanol sobre las actividades de las enzimas UDPG-T y N-Desmetilasa	39
4.5	Efecto del Estrés Oxidativo sobre las Propiedades Físicas de la Membrana y de las Actividades de las Enzimas UDPG-T y N-Desmetilasa	40
5	Discusion	41
5.1	Estudio Fotofísico de las Propiedades Físico-Químicas de la Membrana Microsomal	41
5.2	Efecto del Tetracloruro de Carbono sobre las Propiedades Físicas de la Membrana Microsomal	45
5.3	Efecto del n-Heptanol y del 2,6-Dimetil-4-Heptanol sobre las Propiedades Físicas de la Membrana Microsomal	48
5.4	Efecto del n-Heptanol y del 2,6-Dimetil-4-Heptanol sobre las actividades de las enzimas UDPG-T y N-Desmetilasa	50
5.5	Efecto del Estres Oxidativo sobre las Propiedades Físicas de la Membrana y de las Actividades de las Enzimas UDPG-T y N-Desmetilasa	54
6	Conclusiones	58
7	Bibliografía	63

Figura 9B	Efecto del Tiempo de Lipoperoxidación sobre las Anisotropías de Fluorescencia en Estado Estacionario	91
Figura 10	Correlación entre los Valores de r , DPH y Grado de Lipoperoxidación en Membranas Microsomales	92
Figura 11A	Efecto de la Lipoperoxidación sobre la Actividad de la UDPG-T	93
Figura 11B	Efecto de la Lipoperoxidación sobre la Actividad de la N-desmetilasa	94

INDICE DE ESQUEMAS Y FIGURAS

Esquema 1	Pireno y sus Derivados	74
Esquema 2	Sondas Fluorescentes Utilizadas en el Estudio de Fluidez de Membrana	75
Esquema 3	Hipótesis de la Citotoxicidad Inducida por CCl_4	76
Figura 1A	Efecto del Oxígeno sobre la Constante de Desactivación de la Sonda PMTMA por CCl_4	77
Figura 1B	Efecto del Oxígeno sobre la Constante de Desactivación de la Sonda PBTMA por CCl_4	78
Figura 1C	Efecto del Oxígeno sobre la Constante de Desactivación de la Sonda PUTMA por CCl_4	79
Figura 2	Efecto de la Concentración de Proteínas Microsomales sobre la Constante de Desactivación de la Sonda PUTMA por CCl_4	80
Figura 3	Reparto de CCl_4 entre las Fases Microsomal y Acuosa	81
Figura 4A	Efecto del n-Heptanol sobre los Valores de r_s DPH y de r_s TMA-DPH	82
Figura 4B	Efecto del 2,6-dimetil-4-Heptanol sobre los Valores de r_s DPH y de r_s TMA-DPH	83
Figura 5A	Efecto del n-heptanol sobre la Actividad de la UDPG-T Microsomal	84
Figura 5B	Efecto del 2,6-dimetil-4-heptanol sobre la Actividad de la UDPG-T Microsomal	85
Figura 6	Efecto del n-Heptanol y del 2,6-dimetil-4-heptanol sobre la Actividad de la N-desmetilasa Microsomal	86
Figura 7A	Estudio de Correlación entre los Valores de r_s DPH y la Actividad de la UDPG-T. Cambios Inducidos por n-Heptanol	87
Figura 7B	Estudio de Correlación entre los Valores de r_s DPH y la Actividad de la UDPG-T. Cambios Inducidos por 2,6-dimetil-4-heptanol	88
Figura 8	Estudio de Correlación entre los Valores de r_s DPH y la Actividad de la N-desmetilasa. Cambios Inducidos por 2,6-dimetil-4-heptanol	89
Figura 9A	Efecto del Tiempo de Inducción del Estres Oxidativo sobre la Lipoperoxidación	90

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Tiempos de Vida de Derivados del Pireno bajo Distintas Concentraciones de Oxígeno a 37 °C en una Suspensión Microsomal.	95
Tabla 2	Tiempos de Vida de Derivados del Pireno bajo Nitrógeno y Aire a 37 °C en Diferentes Medios	95
Tabla 3	Tiempos de Vida bajo Nitrógeno τ_{Mit} de Derivados del Pireno a 37 °C en Distintos Medios	96
Tabla 4	Constantes de Desactivación de Derivados del Pireno por Ioduro en Diferentes Medios a 37 °C	96
Tabla 5	Constantes de Desactivación de Derivados del Pireno por Acrilamida en Diferentes Medios	97
Tabla 6	Valores de k_{ox}^a para Derivados del Pireno	97
Tabla 7	Parámetros de Anisotropía de los Derivados del Antraceno y del Difenilhexatrieno en una Suspensión Microsomal (0,25 mg proteína/ml)	98
Tabla 8	Constantes de Desactivación por Tetracloruro de Carbono de Derivados del Pireno en Varios Medios	99
Tabla 8A	Constantes Normalizadas de Desactivación por Tetracloruro de Carbono en Microsomas.	100
Tabla 9	Estimación del Efecto del Tetracloruro de Carbono sobre la Constante de Desactivación de Derivados del Pireno por Oxígeno (k_{ox}), a 37 ° C.	101
Tabla 10	Efecto del Tetracloruro de Carbono sobre los Parámetros de Anisotropía del 2-AS, 7-AS, 12-AS y DPH en una Suspensión Microsomal	102
Tabla 11	Efecto del n-heptanol sobre los Parámetros de Anisotropía (r) y de Polarización (P) de la Fluorescencia de DPH y TMA-DPH en Microsomas	103
Tabla 12	Efecto del 2,6-dimetil-4-heptanol sobre P y r del TMA-DPH y del DPH en Microsomas a 37° C	104
Tabla 13	Efecto del n-heptanol y del 2,6-dimetil-4-heptanol sobre los Parámetros de Viscosidad (η) y de Orden (S)	105
Tabla 14	Efecto del n-heptanol sobre las Constantes de Apagamiento por Oxígeno, k_{ox} , y de Desactivación por CCl_4 , k_q , de Derivados del Pireno.	106

ABREVIATURAS

2-AS	: ácido 2-(9-antroil) esteárico
7-AS	: ácido 7-(9-antroil) esteárico
12-AS	: ácido 12-(9-antroil) esteárico
BP	: benzo α pireno
BHA	: 2-(3-terbutil) 4 hidroxianisol
DHP	: 1,6 difenil hexatrieno
ESR	: resonancia del spin electrónico
GP	: glutatión peroxidasa
GSH	: glutatión reducido (gama glutamil-cisteinil-glicina)
GSSG	: glutatión oxidado o glutatión disulfuro
MDA	: malondialdehido
MP	: metil-pireno
NMR	: resonancia magnética nuclear
NADH	: nicotinamida adenin dinucleótido reducido
NADPH	: nicotinamida adenin dinucleótido fosfato reducido
NADP.	: β nicotinamida adenin dinucleótido fosfato
P	: polarización de la fluorescencia
PMTMA	: (1-pirenil) metil-trimetil-amonio
PBTMA	: 4-(1-pirenil) butil-trimetil-amonio.
PUTMA	: 11-(1-pirenil) undecil-trimetil-amonio
Pro-DPH	: ácido 3-(p-(6fenil)hexatrienil) fenil propiónico
PUFA	: ácido graso poliinsaturado
r	: anisotropía de fluorescencia
r.	: anisotropía de fluorescencia en estado estacionario

II

SOD	: superóxido dismutasa
S	: parámetro de orden
TMA-DPH	: 1-(4-trimetil amonio fenil)-6-fenil hexatrieno
TBA	: ácido tiobarbitúrico
TRIS	: tris(hidroximetil) aminometano
TCA	: ácido tricloroacético
TBA-RS	: sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
UDPG-A	: ácido uridín 5-difosfoglucorónico
UDPG-T	: uridín 5-difosfoglucorinil transferasa

RESUMEN

En esta tesis se efectuó un estudio de los cambios físicos producidos en membranas microsomas hepáticas de ratas, por la adición de distintos solutos, así como también por efecto de un estrés oxidativo. Estos cambios fueron monitoreados a través de las propiedades fotofísicas de sondas incorporadas a la membrana.

Los resultados indican que la adición de CCl_4 , induce una fluidificación de la membrana microsomal, y un gran aumento de la solubilidad y/o movilidad del oxígeno. Estos efectos fueron sentidos por cambios en la depolarización de la fluorescencia de derivados del antraceno y por la desactivación de derivados del pireno por oxígeno.

La adición de n-heptanol y 2,6-dimetil-4-heptanol producen un aumento de la fluidez de la membrana. Esta fluidificación es linealmente dependiente de la dosis de alcohol utilizada. Ambos alcoholes inducen un efecto bifásico en la actividad del uridín 5-difosfoglucoroniltransferasa microsomal (UDPG-T), dependiente de la dosis de alcohol. A bajas concentraciones la actividad disminuye y a concentraciones mayores la actividad aumenta. El aumento de la actividad de esta enzima correlaciona linealmente con el aumento de la fluidez de la membrana. El n-heptanol no induce un cambio significativo sobre la actividad de la N-desmetilasa, en cambio el alcohol ramificado disminuye la actividad de esta enzima. Se encuentra que esta última, es menos sensible a los cambios físicos de la membrana microsomal que la UDPG-T. Este hecho se podría interpretar como una

consecuencia de las diferentes regiones donde se ubican estas enzimas.

Al someter los microsomas a un estrés oxidativo con Fe^{2+} y ácido ascórbico, se observa que a pesar de producirse una leve rigidización de la membrana, se inducen cambios notorios en las actividades de las enzimas UDPG-T y la N-desmetilasa. La actividad de la primera aumenta y la de la segunda disminuye.

Estos estudios permiten concluir que tanto la ubicación, como la geometría de los solutos tienen importancia en el tipo e intensidad de los cambios que éstos producen en las actividades de las enzimas microsomales analizadas.

En la evaluación de los cambios físicos y funcionales de las membranas, producidos por el proceso de lipoperoxidación, es necesario considerar el nivel de lipoperoxidación logrado y el tipo de productos formados.

SUMMARY

A study of the physical changes of microsomal membranes, induced by the addition of different substrates and oxidative stress was made. These changes were followed through the photophysical properties of molecular probes incorporated into the membrane.

The results indicate that the addition of CCl_4 induces a fluidification of the microsomal membrane, and a huge increase in solubility and/or mobility of oxygen. These effects were probed by changes in fluorescence depolarization of anthracene derivatives, and by oxygen quenching of pyrene derivatives.

The addition of n-heptanol and 2,6-dimethyl-4-heptanol produces an increase in the membrane fluidity. This effect is directly proportional to the dosis of alcohol used. Both alcohols induce a biphasic effect on the UDPG-T activity, which is dependent on alcohol dosis. At low alcohol concentration the activity decreases, while at higher concentrations the activity increases. This enzyme activity increase is linearly related to the membrane fluidity increase. n-Heptanol does not induce a significative change on the N-demetilase activity, but the branched alkanol makes it to decrease. The latter enzyme is less susceptible to physical changes in the microsomal membrane. This fact is due to a different topology of both enzymes.

A microsome submitted to oxidative stress, produced by Fe^{2+} and ascorbic acid, shows a slight membrane rigidization, and a big change in the activities of UDPG-T (increase) and N-

demetilase (decrease).

These studies allow to conclude that both the localization and geometry of solutes determine the intensity and kind of change produced upon the microsomal enzyme activity.

To evaluate the physical and chemical changes induced by the lipoperoxidation process, we need to consider the level of lipoperoxidation and the kind of formed products.

1. INTRODUCCION

1.1 GENERALIDADES

Las membranas celulares, además de servir como barreras selectivamente permeables, poseen un rol fisiológico fundamental en el control de la funcionalidad de proteínas asociadas a ellas, tales como canales iónicos, receptores y enzimas [1,2].

La organización y la dinámica de los lípidos son influenciadas por las proteínas y a su vez la funcionalidad de éstas es afectada por el medio lipídico [2]. Al respecto cabe resaltar una propiedad clave: la fluidez. Esta propiedad no tiene una definición precisa y generalmente se interpreta como la libertad de movimiento relativo de los constituyentes de membrana, particularmente los lípidos.

En líquidos isotrópicos homogéneos la viscosidad puede definirse como la resistencia al flujo en cualquier dirección para cualquier punto del líquido.

Las bicapas lipídicas que constituyen las membranas son anisotrópicas y heterogéneas en composición. La resistencia al flujo en cualquier punto de la bicapa es completamente dependiente de la dirección de la fuerza aplicada y de la clase de movimiento.

Existen diferentes tipos de movimientos descritos para los lípidos: a) difusión lateral en el plano de la hemicapa, b) difusión de la molécula alrededor de un eje perpendicular al

plano de la bicapa, y c) difusión transversa o "flip-flop" (desde una hemicapa a otra). Los dos primeros tipos de movimientos son rápidos (en el orden de los 10^{-7} - 10^{-9} s) en contraposición con la difusión transversa.

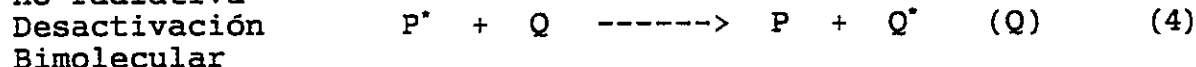
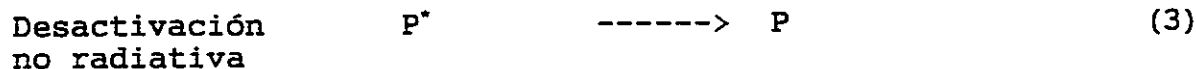
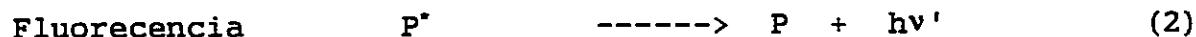
La fluidez en una bicapa podría definirse como la suma ponderada de todos estos movimientos, pero desgraciadamente no existe ningún método que dé una información separada de cada uno de ellos. Dentro de los métodos usados para cuantificar la fluidez de membranas destacan las espectroscopías de NMR, ESR, y de fluorescencia. Esta última técnica ha sido una de las más utilizadas debido a su versatilidad, sensibilidad, y simplicidad de instrumentación.

1.2 Fluorescencia.

Cuando una molécula alcanza por absorción de luz un estado electrónicamente excitado puede perder su energía de excitación por numerosos caminos. Uno de estos procesos de desactivación involucra la emisión de luz, desde el primer estado singulete excitado. Este proceso se conoce como fluorescencia.

La desactivación de un estado excitado también puede ocurrir por transformación de la energía electrónica en energía vibracional, rotacional o cinética. Estos procesos de desactivación se denominan no radiativos e incluyen procesos unimoleculares dependientes de la estructura de la especie excitada; y procesos bimoleculares en los cuales participa otra especie. Esta última recibe el nombre de desactivador o "quencher" y su efecto se manifiesta por la disminución en la intensidad de emisión.

En forma muy simplificada se puede proponer el siguiente esquema cinético



donde P es la molécula en el estado fundamental, P* es la molécula electrónicamente excitada, Q y Q* representan al desactivador en el estado basal y excitado respectivamente.

La aplicación de la hipótesis de estado estacionario lleva a una relación simple entre las razones de las intensidades de emisión de fluorescencia en ausencia (I_0) y en presencia (I) del desactivador y la concentración de éste. Esta relación se conoce como la ecuación de Stern Volmer y tiene la siguiente forma

$$I_0/I = 1 + k_q \tau_0 [Q] \quad (5)$$

I_0 e I son las intensidades de emisión en ausencia y presencia de una concentración [Q] del desactivador, respectivamente; k_q es la constante de velocidad para el proceso de desactivación bimolecular, τ_0 es el tiempo de vida del estado excitado en ausencia del desactivador.

El tiempo de vida, τ_0 , corresponde al inverso de la sumatoria de todas las constantes de velocidad de los procesos que desactivan el estado excitado

$$\tau_0 = \frac{1}{\sum k_i} = \frac{1}{k} \quad (6)$$

El tiempo de vida se puede determinar experimentalmente por medidas de fotólisis de pulso donde se obtiene la intensidad de emisión en función del tiempo. Un gráfico de $\log I$ versus t permite obtener k desde la pendiente.

El tiempo de vida en presencia del desactivador incluye la constante de velocidad del proceso bimolecular

$$\tau^{-1} = \tau_0^{-1} + k_q [Q] \quad (7)$$

y por lo tanto

$$\tau_0/\tau = 1 + k_q \tau_0 [Q] \quad (8)$$

que es otra forma de la ecuación de Stern Volmer.

El valor de la constante de desactivación depende de las características del par dador-aceptor. En el caso que este proceso sea altamente favorable, su velocidad estará determinada por el tiempo que tarda en formarse una pareja dador-aceptor. Así la velocidad máxima de este proceso dependerá de la velocidad de difusión de las moléculas, y por lo tanto será una función de la viscosidad del medio en que se encuentran [3]. De este modo la evaluación de k_q para un proceso de desactivación controlado por difusión puede emplearse para medir la viscosidad (o fluidez) del microentorno donde ocurre el encuentro [3].

Además de la intensidad y el tiempo de vida de la fluorescencia, existen otras propiedades de ella que dan información acerca de las características del medio donde se encuentran. Entre éstas podemos mencionar, la posición de la banda de emisión, su estructura vibracional y su polarización [4]. Por ejemplo, en algunas moléculas, la posición de la banda

de fluorescencia y su estructura vibracional dependen de la polaridad del medio en que se encuentran [4]. Por otra parte, la polarización de la fluorescencia ha sido relacionada con la viscosidad del medio [3,5,6,7]. Así estas propiedades han sido utilizadas para caracterizar físico-químicamente microdominios tales como: micelas [8,9], vesículas [3,10,11] y membranas biológicas [3,5,12,13]. Obviamente, estos métodos requieren de la incorporación de una sonda fluorescente al medio en estudio. Entre las moléculas más usadas destacan el pireno y sus derivados (ver Esquema 1, Pág. 74), debido principalmente a que sus propiedades fotofísicas son muy favorables: absorben en el UV cercano; tienen un alto rendimiento cuántico de fluorescencia; su tiempo de vida es largo; la forma de sus espectros de fluorescencia depende fuertemente de las características del microentorno.

Una propiedad importante de las membranas es su permeabilidad al oxígeno disuelto en la fase acuosa y la velocidad de difusión de éste en su interior. El oxígeno es un eficiente desactivador de los estados singulete excitado de moléculas orgánicas [12], y la velocidad de éste proceso es controlada por difusión. Por lo tanto, este proceso puede usarse para determinar la facilidad con que el oxígeno difunde hacia las sondas fluorescentes incorporadas a diferentes profundidades de la bicapa [12].

1.3 Polarización de la Fluorescencia.

Este método consiste en una excitación de la sonda con luz polarizada y la medición de la emisión a través de

polarizadores ubicados en forma paralela y perpendicular al eje de polarización de la excitación.

La información se recoge como polarización, P , o anisotropía de fluorescencia, r . Estos parámetros se definen como

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} \quad (9)$$

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (10)$$

I_{\parallel} y I_{\perp} son las intensidades de emisión medidas paralela y perpendicularmente a la dirección de polarización de la luz de excitación, respectivamente.

La polarización de fluorescencia depende de la capacidad de la sonda para rotar durante el tiempo de vida de su estado excitado. Tanto P como r dan una estimación de la movilidad de la sonda en un determinado microentorno [1,7,13].

En el esquema 2 (Pág. 75) están representados algunos de los fluoróforos liposolubles utilizados para monitorear fluidez de membranas biológicas a través de la polarización. La característica principal de estas sondas es poseer un tiempo de vida de fluorescencia muy corto.

Las sondas fluorescentes se clasifican en dos categorías generales; a) Sondas lineales (DPH y sus derivados), las cuales son moléculas rígidas que se alinean con las cadenas apolares de los fosfolípidos. Se caracterizan porque los dipolos de excitación y de emisión son colineales con sus ejes

moleculares. Este hecho hace que sólo las rotaciones ortogonales a sus ejes moleculares contribuyan a la depolarización. b) Sondas no lineales, se caracterizan porque los dipolos de excitación y de emisión no coinciden con el eje principal de rotación de la molécula, poseen rotaciones con depolarización en el plano y fuera del plano de la bicapa. Sus movimientos son complejos y difíciles de interpretar. La ventaja de estas sondas reside en la capacidad de sensar fluidez a diferentes profundidades de la bicapa.

El difenilhexatrieno, DPH, se distribuye entre todas las zonas hidrofóbicas de las bicapas, motivo por el cual se ha constituido en la sonda mas usada en el estudio de sistemas biológicos organizados. El TMA-DPH tiene propiedades espectrales idénticas al DPH pero, debido a que posee un grupo positivamente cargado, se ancla en la superficie de la membrana.

Las anisotropías de fluorescencia en estado estacionario entregan información no sólo de la movilidad de las cadenas de fosfolípidos, sino que también reflejan el ángulo de rotación de la sonda en el microambiente donde se ubica. Es decir proporcionan información tanto de la dinámica como de la estructura de las cadenas de los fosfolípidos (grado de orden). Por esta razón cada vez que se mencione el término fluidez en este trabajo se está refiriendo al grado de movilidad y de orden de los lípidos de la membrana.

1.4 FACTORES MODIFICADORES DE LA FLUIDEZ

La movilidad de lípidos de membranas es influenciada por factores físicos y químicos. Entre los primeros destaca la temperatura, al producirse un aumento en la magnitud de este parámetro se incrementa la fluidez de la bicapa. Entre los factores químicos se cuentan: a) la razón colesterol/fosfolípido, el colesterol disminuye la fluidez sobre la temperatura de transición de fase, b) grado de insaturación de las cadenas fosfolipídicas, la introducción de dobles enlaces en posición *cis* induce un marcado aumento de volumen de la cadena, lo que trae como consecuencia un aumento de la fluidez [1], c) razón lecitina/esfingomielina, a mayor razón menor viscosidad, d) razón lípido/proteína, las proteínas producen una rigidización de la bicapa. Tanto el contenido de colesterol como el grado de insaturación están controlados por enzimas asociadas a membranas (colesterol-7- α -hidroxilasa, desaturasas) (1,2,5,55). Las actividades de estas enzimas son, a su vez, moduladas por cambios de fluidez (1,2).

La solubilización de moléculas en la bicapa lipídica produce una perturbación física, la cual en términos fisiológicos, es instantánea. Anestésicos y alcoholes han sido los perturbadores físicos más estudiados con el fin de dilucidar su mecanismo de acción [14-18].

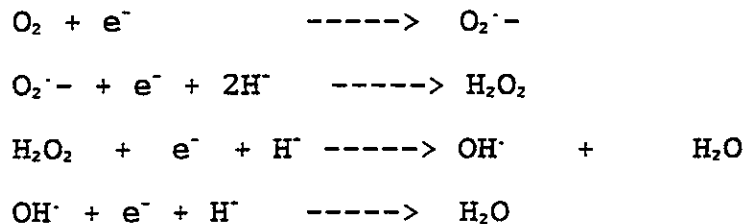
En muchas patologías [19-23] e intoxicación por xenobióticos [24-27], ocurren además cambios químicos en las bicapas como consecuencia del fenómeno conocido como lipoperoxidación.



1.5 Lipoperoxidación.

Debido a la naturaleza aeróbica del metabolismo celular, la reducción del oxígeno a agua constituye un evento de gran importancia para los sistemas biológicos. Esta reacción procede por dos vías alternativas: i) reducción tetravalente por citocromo oxidasa y, ii) reducción no enzimática univalente. La primera da cuenta del 95% del consumo de oxígeno por los organismos vivos.

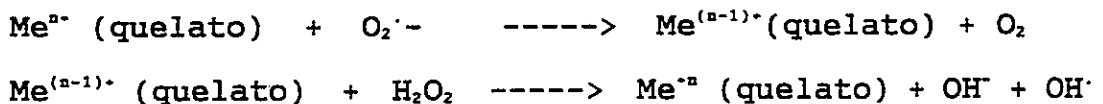
La reducción univalente conduce a la formación de intermediarios de naturaleza radicalaria y no radicalaria de gran reactividad química [28].



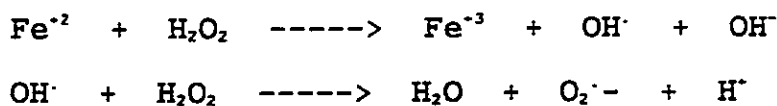
donde $\text{O}_2^{\cdot-}$ es el llamado anión superóxido.

El H_2O_2 es una especie química que puede reaccionar con metales divalentes dando origen a radicales oxidrilos (OH^{\cdot}) y anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), los cuales son muy tóxicos [29]. Estas son las conocidas reacciones de Haber-Weiss y Fenton [30].

Reacción de Haber Weiss

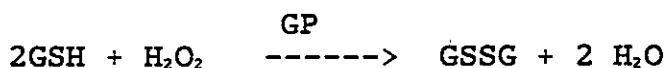
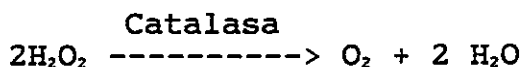


Reacción de Fenton



En los organismos aeróbicos existe un complejo mecanismo

que evita que los radicales $\text{OH}\cdot$, $\text{O}\cdot$ y H_2O_2 se acumulen, constituyendo los llamados agentes antioxidantes [29,31]. Entre éstos se encuentran las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa, y glutatión peroxidasa (GP). Las reacciones en las que intervienen se describen a continuación

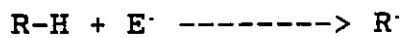


donde SOD es superóxido-dismutasa; GSH es la forma reducida del glutatión; y GSSG es la forma oxidada del glutatión.

En determinadas circunstancias la producción de intermediarios tóxicos provenientes de la reducción del oxígeno puede aumentar en forma descontrolada, sobrepasando los mecanismos de defensa, situación conocida como estrés oxidativo. Uno de los intermediarios mas tóxicos es el radical $\text{OH}\cdot$, el cual es extremadamente reactivo, su vida media es de millonésimas de segundo e interactúa en forma instantánea con la molécula mas próxima, oxidandola y por ende alterando su estructura. Cualquier molécula que se encuentre en la vecindad del $\text{OH}\cdot$ se verá de esta manera afectada y se transformará a su vez en un radical libre. Se desata así una reacción en cadena, siendo el proceso de lipoperoxidación la consecuencia mas frecuente. Esta reacción se caracteriza por ser autocatalítica, y afectaría a los ácidos grasos insaturados que son los principales componentes de la membrana celular [29,31].

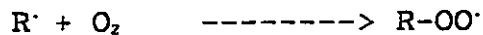
Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), poseen tres o más uniones carbono-carbono con doble ligadura, lo que les confiere una zona de enlace lábil que permite que una molécula activa como el OH^\cdot sustraiga un átomo de hidrogeno del carbono bis-alílico.

La primera etapa del proceso de lipoperoxidación es la abstracción de un hidrógeno:



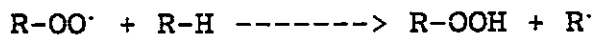
donde R-H representa al PUFA, R^\cdot es el radical del ácido graso y E^\cdot representa una especie radicalaria.

El radical del PUFA (R^\cdot) sufriría reordenamientos moleculares dando origen a dienos conjugados, los cuales reaccionarían con el oxígeno formando radicales peróxidos:



donde R-OO $^\cdot$ es el radical lipoperóxido.

Este radical peróxido puede retirar un nuevo hidrógeno de otra molécula de ácido graso:



donde R-OOH representa al hidroperóxido formado.

La lipoperoxidación sigue propagándose de esta manera y llega a su término cuando dos radicales reaccionan entre si o cuando son neutralizados por alguna molécula atrapadora de radicales que forma parte del sistema antioxidante, tal como la vitamina E.

Los hidroperóxidos pueden dar origen a peróxidos y endoperóxidos cíclicos, los cuales son susceptibles de fragmentarse y generar compuestos orgánicos de pequeño tamaño,

tales como malondialdehído, etano, y pentano. Además de estos productos terminales se produce una gran diversidad de productos oxidados que inducen una considerable variación en el empaquetamiento y orientación de la membrana [32,33]. La gran mayoría de los métodos de laboratorio evalúan el daño por radicales libres a través de la medición de los niveles de formación de malondialdehído, dienos conjugados, y consumo de oxígeno [34,35], así como también por la medición de la quimiluminiscencia originada [34,35]. Los radicales peróxidos ($ROO\cdot$) pueden recombinarse entre sí, generando estados excitados tales como el oxígeno singulete y carbonilos en estado excitado [34]. Estos estados excitados decaen al estado energético basal, generando luz de longitudes de onda características y cuya emisión puede ser fácilmente detectada.

Aunque estos métodos dan un índice del daño peroxidativo, contribuyen poco a la estimación de los efectos de la lipoperoxidación en la estructura y funcionalidad de la membrana.

Una información detallada de la naturaleza e intensidad del efecto de la lipoperoxidación sobre las propiedades físicas de las membranas, ayuda a la comprensión de los mecanismos de citotoxicidad en los que están involucrados radicales libres. Para este tipo de estudios se recurre a métodos fotofísicos como la polarización de la fluorescencia.

En sistemas biológicos el retículo endoplásmico constituye el organelo mas susceptible a la lipoperoxidación, tanto por ser un buen sustrato peroxidable, como por poseer actividades

enzimáticas que inician el proceso. Como intermediario de las reacciones de oxidación que ocurren en el metabolismo de xenobióticos, se forma un complejo ternario: citocromo $P_{450}Fe^{3+}-O_2^-$ -xenobiótico, cuya disociación implicaría la liberación de anión superóxido (O_2^-), el cual podría dismutar a H_2O_2 [38].

Los estudios de la estructura y función del retículo endoplásmico se realizan en los microsomas, que corresponden a la fracción subcelular obtenida por ultracentrifugación del sobrenadante, proveniente de la centrifugación a 10000 g de homogenizado de tejido. En ésta fracción las membranas se encuentran en forma de vesículas cerradas [36].

1.6 Retículo endoplásmico

Los animales, incluyendo al hombre, han desarrollado sistemas enzimáticos que les permiten defenderse del gran número de compuestos tóxicos de carácter endógeno y exógeno (drogas, agentes carcinogénicos, aditivos de alimentos, pesticidas, contaminantes ambientales) a los que se ven expuestos. Estas enzimas catalizan reacciones cuyo objetivo es aumentar la polaridad del compuesto, facilitando de esta manera su eliminación vía urinaria o biliar [36].

La mayor parte de estas reacciones se realizan en el retículo endoplásmico del hepatocito y se clasifican en dos tipos de reacciones generalmente secuenciales:

Fase I: comprende reacciones de oxidación del sustrato, reducción del citocromo P_{450} . En ellas intervienen dos flavoproteínas (NADH -citocromo b_5 reductasa y NADPH citocromo P_{450} reductasa) y dos hemoproteínas (citocromo b_5 y citocromo

P₄₅₀). Este sistema enzimático recibe también el nombre de sistema monoxigenasa u oxidativo, ya que la reacción mas frecuentemente catalizada es la introducción de un oxígeno en la molécula del sustrato.



donde R es el sustrato.

Fase II: son reacciones de conjugación e hidrólisis, las cuales tienen por finalidad aumentar la polaridad de los metabolitos.

En las reacciones de conjugación una molécula (generalmente, metabolitos procedentes de reacciones de la fase I) reacciona con sustancias endógenas (agentes conjugantes), formando compuestos más polares y en consecuencia facilitando su eliminación. Un ejemplo de este tipo de reacciones es la conjugación del UDPG-A con gran número de metabolitos de xenobióticos (morfina, cloramfenicol, ácido benzoico etc). Esta reacción es catalizada por la UDPG-T.

Dentro de las reacciones de hidrólisis, catalizadas principalmente por las esterasas, se encuentran las de enlaces ésteres de los ácidos carboxílico y fosfórico, entre otros.

Las reacciones de la fase I pueden producir metabolitos de mayor reactividad que el compuesto inicial, que dan origen a actividades biológicas deseables y/o dañinas [37]. Este efecto ha sido relacionado con la hepatotoxicidad generada por muchos xenobióticos [37]. Se han propuesto tres formas de generar metabolitos potencialmente citotóxicos:

- Producción de un metabolito más polar, pero de mayor reactividad (diclorometano, acetonitrilo, metoxiflurano).

- Formación de radicales libres en el sustrato (CCl_4).
- Generación de intermediarios reactivos del oxígeno, tales como el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno (nitrocompuestos, quinonas, paraquat).

De estos metabolitos los radicales libres son especialmente importantes, ya que en el caso que sobrevivan a los mecanismos de defensa antioxidante, podrían reaccionar con macromoléculas induciendo alteraciones genéticas, inactivación de enzimas y lipoperoxidación de membranas [37,38,39].

Considerando que la membrana del retículo endoplásmico posee un alto nivel de ácidos grasos insaturados, las reacciones de lipoperoxidación adquieren especial relevancia y dan cuenta de muchas de las alteraciones de la actividad de enzimas microsomales observadas en intoxicación con xenobióticos y en patologías asociadas con estrés oxidativo [40-44]. Estos efectos han sido asociados a los cambios de fluidez de la membrana [45-46] y/o al daño oxidativo directo de las enzimas por los radicales libres generados por el sistema microsomal [41,43].

Entre los xenobióticos más estudiados destaca el tetracloruro de carbono cuya administración conduce a los más variados efectos citotóxicos, tales como disminución de las actividades enzimáticas microsomales, acumulación de triglicéridos y ruptura de membranas celulares [24,25,47,48]. Todos estos efectos se representan en el Esquema 3 (Pág. 76).

Como consecuencia del metabolismo del CCl_4 , vía citocromo P_{450} , se postula la formación del radical triclorometano ($\text{CCl}_3\cdot$).

Este radical se uniría covalentemente a lípidos y proteínas, disminuyendo la actividad de enzimas microsomales, tales como las del sistema multienzimático citocromo P₄₅₀ y la UDPG-T [45,49-52].

Los efectos observados por intoxicación con tetracloruro de carbono han sido atribuidos a la acción directa del radical triclorometano sobre macromoléculas y/o a la lipoperoxidación de fosfolípidos de membranas. Aún cuando, el tetracloruro de carbono posee un reconocido efecto solvente, no se le ha asignado importancia alguna a la acción solvente o perturbadora de membrana en la generación de estos efectos [24,50,51]. Sin embargo, estudios realizados en hepatocitos indican un posible efecto tóxico directo [48]. Estas investigaciones se realizaron usando marcadores biológicos para estimar daño a membranas.

2. OBJETIVOS GENERALES.

El objetivo principal de esta tesis es hacer un estudio fisico-químico de membranas microsomaes bajo condiciones de estrés oxidativo, y de incorporación de aditivos.

En este estudio se incluirán dos enzimas microsomaes obtenidas de hepatocitos de ratas, cuyas actividades son alteradas por la intoxicación con CCl₄. Estas son la aminopirina desmetilasa y la UDPG-T las cuales son enzimas integrales de membrana microsomal [36]. La primera forma parte del sistema multienzimático citocromo P₄₅₀ y la segunda participa en la fase II del metabolismo, desempeñando un rol clave en el proceso de desintoxicación. Los mecanismos regulatorios de la actividad de la UDPG-T son complejos y han sido objeto de muchos estudios, especialmente del efecto que ejercen los fosfolípidos de membrana sobre su actividad [46,53-56].

Como ya se dijo anteriormente la lipoperoxidación induce cambios físicos en la membrana los cuales redundarían en cambios en la actividad enzimática. En estudios realizados en animales de experimentación intoxicados con CCl₄, se encontró una disminución de la actividad de la UDPG-T asociada con un aumento de fluidez de la membrana microsomal [45]. Debido a que estos estudios fueron realizados in vivo resulta difícil evaluar el papel que desempeña el efecto solvente del CCl₄, en la alteración de la fluidez descrita. En esta tesis se compararán los efectos producidos por un estrés oxidativo y los producidos por perturbadores físicos de membrana, tanto en la

fluidez de la membrana microsomal como en la actividad de las enzimas en estudio. De esta forma se podría estimar el efecto de los cambios físicos y/o de la lipoperoxidación a nivel de las alteraciones de la actividad enzimática. Para aumentar la fluidez de membrana se usarán dos alcoholes de cadena larga y geometría distinta: n-heptanol y 2,6-dimetil-4-heptanol. Los alcoholes alifáticos y aromáticos pueden modificar algunas propiedades de las bicapas lipídicas como la temperatura de transición de fase, y la movilidad de la fase lipídica [5,17,18].

Además, considerando que no se ha efectuado (hasta nuestro conocimiento) ningún estudio destinado a evaluar el efecto perturbador de membrana del CCl_4 , en este trabajo se realizará un estudio sistemático de este efecto con el fin de determinar la magnitud y zona de la bicapa que se ve mayormente afectada. Este estudio se hará por métodos fotofísicos, utilizando diversas sondas fluorescentes que se ubican en diferentes regiones de la bicapa. Los resultados que se obtengan permitirán establecer la importancia relativa del efecto solvente del tetracloruro de carbono en la generación de su toxicidad.

2.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Analizar el efecto producido en la membrana microsomal hepática por la adición de CCl_4 a través de: a) cambios en la difusión rotacional de los lípidos constituyentes de la bicapa y b) medida de la difusión de moléculas pequeñas como por ejemplo, el oxígeno.

- Efecto de dosis crecientes de alcoholes de cadena larga de geometría distinta (lineal y ramificado) sobre la difusión rotacional.
- Medición de las constantes de reparto del CCl₄ y de los alcoholes entre los microsomas y el buffer utilizado. De esta forma se determinarán las concentraciones intramicrosomales de estos aditivos.
- Medición en el tiempo del grado de lipoperoxidación inducido por estrés oxidativo.
- Efecto de concentraciones crecientes de alcoholes sobre las actividades de la UDPG-T y de la aminopirina desmetilasa.
- Efecto de la lipoperoxidación, inducida por estrés oxidativo sobre la difusión rotacional.
- Efecto de la lipoperoxidación sobre las actividades de la aminopirina desmetilasa y de la UDPG-T.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

Como animales de experimentación se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, provenientes del vivero del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Estas ratas fueron alimentadas ad libitum con una dieta balanceada sólida (Alimentos Cisternas S.A.) y agua. A los 45 días fueron sacrificadas por decapitación.

3.1 Materiales.

Acido ascórbico, ácido tiobarbitúrico (TBA), 2-(3-terbutil) 4-hidroxianisol (BHA), aminopirina, ácido isocítrico,

deshidrogenasa isocítrica, β -nicotinamin adenina dinucleotido fosfato (NADP), acetato de amonio, 2,4-pentanodiona, p-nitrofenol, ácido uridin 5-difosfogluconico (UDPGA), fueron obtenidos de Sigma y usados sin mayor purificación.

Las siguientes sondas fluorescentes se obtuvieron de Molecular Probe 1-metilpireno (MP); (1-pirenil)metilbutil trimetilamonio (PMTMA); 4-(pirenil)butiltrimetilamonio (PBTMA); 11-(1-pirenil)undeciltrimetilamonio (PUTMA); ácido 2-(9-antioil)esteárico (2-AS); ácido 7-(9-antioil)esteárico (7-AS); 12-(9-antioil)esteárico (12-AS); 1,6-difenilhexatrieno (DPH); 1-(4-trimetilaminofenil)-6-fenilhexatrieno (TMA-DPH); ácido 3-(p-(6-fenil)hexatrienil) fenilpropionico (Pro-DPH).

Tetracloruro de carbono (CCl_4); n-heptanol; 2,6-dimetil-4-heptanol y el resto de los reactivos utilizados se obtuvieron de Merck Quimica Chilena, y fueron usados sin mayor purificación.

3.2 Métodos Experimentales.

3.2.1 Preparación de microsomas.

Se utilizó la técnica convencional propuesta por Rumbough y col. [57], los hígados procedentes de las ratas fueron pesados, cortados en pequeños trozos, lavados varias veces con una solución de KCl al 1,14%. Posteriormente se homogenizó en 4 volúmenes de una solución 0,01 M de hidroximetil aminometano (TRIS); 0,25 M de sacarosa pH 7,5. El homogenizado así obtenido fue centrifugado dos veces a 10.000 x g durante 10 minutos en una centrífuga Sorvall modelo RG-53. El sobrenadante se ultracentrifugó a 105.000 x g durante 35 minutos en una

ultacentrífuga Sorvall modelo OTD-65B usando un rotor T-865. Todas estas operaciones se realizaron a una temperatura entre 0-4 °C. El sedimento (microsomas) se guardó a -70 °C en una solución 0,15 M de KCl y 20% de glicerol.

3.2.2 Determinación de proteínas .

La proteína microsomal se determinó por el método de Lowry et al [58]. Se utilizó como estándar de proteína una solución de sero albúmina de bovino en una concentración de 0,5 mg/ml.

3.2.3 Incorporación de derivados del pireno a la membrana microsomal.

Los microsomas fueron resuspendidos (1 mg de proteína por ml de suspensión) en una solución 0,05 M TRIS pH 7,5. Se prepararon soluciones alcohólicas de MP, PMTMA, PBTMA, PUTMA y BP (benzo- α -pireno), y se adicionaron alícuotas de estas soluciones a la suspensión microsomal de manera de lograr una concentración final de la sonda respectiva en el orden de los micromoles. Las membranas se incubaron durante una hora a 37 °C.

Los tiempos de vida de las sondas excitadas fueron medidas a través del decaimiento de su fluorescencia después de un pulso de excitación por un laser de nitrógeno modelo Nitronite LN 100. La intensidad de la emisión en función del tiempo se registró en un osciloscopio modelo Tektronix 7633.

Los experimentos de apagamiento de estas sondas con CCl₄ se realizaron en estado estacionario midiendo la disminución de la fluorescencia en función de la concentración de tetracloruro de carbono. Estas mediciones se efectuaron en un

espectrofluorómetro Perkin-Elmer modelo LS 50.

3.2.4 Mediciones de la polarización de la fluorescencia

Se prepararon soluciones alcohólicas de 2-AS, 7-AS, 12-AS y soluciones en tetrahidrofurano de DPH, TMA-DPH y Pro-DPH. Se adicionaron alicuotas de estas soluciones a la suspensión microsomal (0,20 mg proteína por ml) de manera de lograr una concentración final de la sonda en estudio de 0,25 μM . Se incubaron las membranas durante una hora a 37 °C, las mediciones fueron realizadas en un espectrofluorómetro Greg 200.

3.2.5 Evaluación de la incorporación total de la sonda a la membrana microsomal.

La suspensión microsomal, con la sonda incorporada, se ultracentrifugó a 105.000 x g durante 35 minutos, y se verificó que no había emisión de fluorescencia en el sobrenadante. Otra forma utilizada para comprobar la incorporación total de la sonda fué a través de la acrilamida, la cual es un apagador efectivo de la fluorescencia de los derivados del pireno y de los derivados del ácido 9-antroil esteárico en medio acuoso, pero es totalmente inefectivo en medio lipídico [8].

3.2.6 Determinación de las constantes de reparto

La constante de reparto del tetracloruro de carbono entre la fase microsomal y la fase acuosa se determinó por el método propuesto por Encinas y Lissi [9], que se describe con más detalle en la parte Resultados. Las constantes de reparto de los alcoholes, n-heptanol y 2,6-dimetil-4-heptanol, se determinaron por ultracentrifugación. La suspensión microsomal fué ultracentrifugada a 100.000 x g por 35 minutos, la cantidad

de alcohol presente en el sobrenadante y en el sedimento resuspendido se evaluó por cromatografía de gases. La constante de reparto se define como

$$K = \frac{[\text{Alcohol}]_M}{[\text{Alcohol}]_T} \quad (11)$$

donde $[\text{alcohol}]_M$ corresponde a la concentración de alcohol por mg/ml de proteína microsomal, y $[\text{alcohol}]_T$ es la concentración de alcohol en el tampón.

3.2.7 Incorporación del heptanol y del 2,6-dimetil-4-heptanol a la membrana microsomal.

A una suspensión microsomal (1 mg de proteína por ml) preparada en una solución 50 mM TRIS pH 7,5; se le adicionaron concentraciones crecientes de los alcoholes respectivos. Se incubó por 10 minutos en un baño termorregulado a 37 °C.

3.2.8 Lipoperoxidación

La lipoperoxidación se indujo por medio de sulfato ferroso y ácido ascórbico en concentraciones de 0,1 mM y 2 mM respectivamente [59]. Estos experimentos fueron realizados a 37 °C en microsomas resuspendidos en buffer 50 mM TRIS pH 7,5 (1 mg de proteína por ml). La reacción se detuvo mediante la adición de BHA en una concentración final de 0,5 mM [59].

3.2.9 Determinación de malondialdehído .

Se determinó la D.O. a 535 nm del producto de la reacción del TBA con los derivados aldehídicos (MDA) provenientes de la ruptura de los ácidos grasos insaturados por acción radicalaria (TBA-RS). Se efectuó una precipitación de cada muestra con ácido tricloroacético (TCA) al 30%, se centrifugó a 4000 x g

por 5 minutos. A un ml del sobrenadante se le agregó TBA al 0,67 % y se calentó a baño maría durante 15 minutos. Se leyó la D.O. del producto de ésta reacción a 535 nm. La concentración de TBA-RS se calculó utilizando el coeficiente de extinción molar del MDA (1.560 1/M cm) [60].

3.2.10 Actividades enzimáticas

a) N-desmetilación de la aminopirina: ésta actividad fué determinada según la técnica de Nash [61], la cual se basa en la determinación espectrofotométrica del formaldehído producido en la reacción de N-desmetilación de la aminopirina.

El medio de incubación contenía 10 mM de aminopirina (sustrato); 50 mM TRIS pH 7,5; 150 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 6 mM isocitrato de sodio; 0,25 U/ml de deshidrogenasa isocítrica; 1 mM NADP; y microsomas en una concentración de 1 mg/ml de proteína en la mezcla de reacción. Se incubó a 37 °C durante 20 minutos, la reacción se detuvo con TCA al 20%, se centrifugó 10 minutos a 10.000 rpm, y en el sobrenadante se determinó la concentración del formaldehído formado [61].

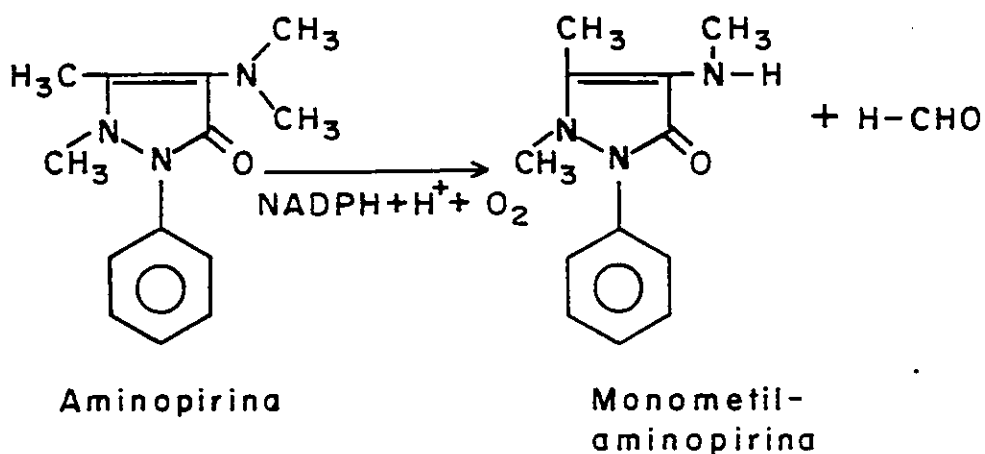
b) Actividad de la UDPG-transferasa: se determinó según el método de Issebacher et al [62]. Esta técnica se basa en medir la desaparición del p-nitrofenol, el cual es conjugado por el UDPGA.

El medio de incubación contenía una mezcla de 5 mM de p-nitrofenol (sustrato); 50 mM TRIS pH 7,5; 25 mM de MgCl₂ y microsomas en una concentración de 2 mg de proteína por ml de la mezcla de reacción. Se incubó 10 minutos a 37 °C; se detuvo la reacción con TCA al 5%; se centrifugó a 10.000 rpm por 10

minutos; y en el sobrenadante se determinó la concentración remanente del p-nitrofenol.

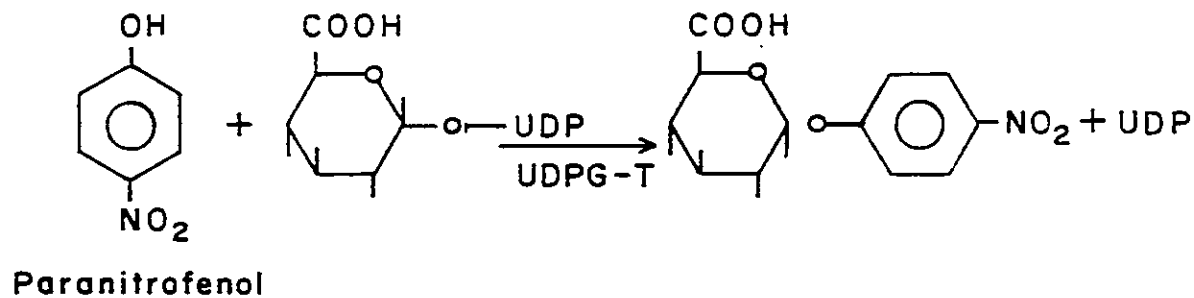
Fase I:

N-Desmetilación de la aminopirina



Fase II:

Glucuronidación del p-nitrofenol



4 RESULTADOS

4.1 Estudio fotofísico de las propiedades fisico-químicas de la membrana microsomal

Las propiedades fotofísicas que se utilizan para la caracterización del microentorno donde se localizan las sondas son: el tiempo de vida de la fluorescencia, las constantes de apagamiento por moléculas cargadas y/o neutras, y la depolarización de la fluorescencia.

Los derivados del pireno que poseen un grupo catiónico se anclan en la superficie de la bicapa, en las zonas en que está cargada negativamente, y sensan a ésta a diferentes profundidades dependiendo del largo de la cadena alquílica que une este grupo con el cromóforo. Así, el PMTMA se ubicaría en la región más externa, el PBTMA en la zona intermedia y el PUTMA en la zona más interna de la bicapa.

En las Tabla 1 y 2 se dan los valores obtenidos para los tiempos de vida, de los derivados del pireno, en microsomas y solventes homogéneos, respectivamente, bajo diferentes concentraciones de oxígeno. El decaimiento de la emisión de fluorescencia de estos compuestos resultó ser monoexponencial en todos los casos estudiados. Esto indica que las sondas utilizadas se incorporaron a un único tipo de microambiente.

En la Tabla 3 se comparan los tiempos de vida bajo nitrógeno obtenidos en distintos medios. Los valores muestran que los tiempos de vida de todas las sondas, a excepción del PMTMA, medidos en las membranas microsomales son menores que los determinados en etanol y en fantasmas.

Es un hecho conocido que el yoduro y la acrilamida son eficientes apagadores de la fluorescencia del pireno y sus derivados, y que la desactivación ocurre por un proceso bimolecular de transferencia de carga [63]. En presencia de membranas microsomales la velocidad de apagamiento se ve drásticamente reducida, llegando a ser indetectable el efecto en el caso de la acrilamida (Tablas 4 y 5). Esto se debe a que tanto el yoduro como la acrilamida se solubilizan exclusivamente en la fase acuosa. Las constantes de velocidad de desactivación por yoduro se dan en la Tabla 4. El valor de la constante disminuye considerablemente al aumentar el tamaño del grupo hidrofóbico en el derivado del pireno.

A partir de los tiempos de vida de las sondas bajo ambiente de nitrógeno (τ_n) y aire (τ_{ox}), (Tabla 1 y 2), es posible obtener las constantes de apagamiento por oxígeno a través de la siguiente relación

$$k_{ox} = 1/\tau_{ox} - 1/\tau_n \quad (12)$$

donde k_{ox} es igual a $k_q[O_2]$. Los valores de la k_{ox} de derivados del pireno en distintos medios se dan en la Tabla 6. En las membranas microsomales y de glóbulos rojos se observa un aumento del valor de esta constante a medida que la sonda se inserta hacia el interior de la bicapa. La magnitud de k_{ox} está determinada por la solubilidad y/o movilidad del oxígeno. Este último factor puede relacionarse con parámetros tales como el orden y la microviscosidad del medio, los cuales pueden ser estimados a través de mediciones, en estado estacionario, de las anisotropías de la fluorescencia de sondas liposolubles

[7].

Los estudios de depolarización de la fluorescencia se realizaron empleando una serie de derivados del antraceno y DPH. En este caso, la localización de los derivados del antraceno a diferentes profundidades de la bicapa nos permite obtener información acerca de la variación de la fluidez de la membrana en función de su ubicación. Los derivados del antraceno (AS) se ubican a diferentes profundidades de la bicapa: el 2-AS se ubica en la zona mas superficial; el 7-AS en una zona intermedia y el 12-AS en la zona más interna. Los resultados obtenidos se dan en la Tabla 7. En ella se incluyen los valores de anisotropía en estado estacionario (r_s), el tiempo de vida de fluorescencia (τ), el coeficiente de difusión rotacional (R), y el tiempo de correlación rotacional, ϕ . Estos parámetros se relacionan entre sí de la siguiente manera:

$$r_0/r - 1 = 6R\tau \quad \phi = 1/6 R \quad (13)$$

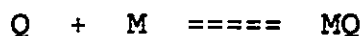
donde r_0 representa la anisotropía en ausencia de movimiento de la sonda (se consideró 0,228 para el 2-AS; 0,233 para el 7-AS; 0,230 para el 12-AS [64]; 0,395 para el DPH [65]; y 0,396 para el TMA-DPH [66]). El análisis de la Tabla 7 muestra que los valores de las anisotropías, y de los tiempos de correlación rotacional disminuyen desde el 2-AS al 12-AS.

4.2 Efecto del tetracloruro de carbono sobre las propiedades físicas de la membrana microsomal.

La incorporación de tetracloruro a la bicapa necesariamente debe producir cambios en las propiedades fisico-químicas de la membrana. La evaluación de estos efectos

requiere en primer término de la medición de la constante de reparto de esta molécula entre la fase acuosa y la fase lípídica con el fin de determinar la concentración de ella en la bicapa. Estas constantes se midieron usando el método propuesto por Encinas y Lissi [9] y que se describe brevemente a continuación.

Consideremos el siguiente equilibrio



donde Q representa la molécula de apagador que se reparte entre la fase acuosa y la fase microsomal, M. En el caso que las moléculas solubilizadas no afecten la incorporación de otras moléculas, ni tampoco alteren las propiedades del microsoma, la distribución de moléculas entre las fases corresponde a una distribución de Poisson y la constante de reparto puede definirse como

$$K = \frac{[Q_M]}{[M][Q_A]} = \frac{k_+}{k_-} \quad (14)$$

donde $[Q_M]$ y $[Q_A]$ denotan las concentraciones de apagador en las fases acuosa y microsomal, respectivamente y $[M]$ es la concentración total de microsoma. k_+ y k_- representan las constantes de velocidad para los procesos de entrada y salida del apagador desde el microsoma. Definiendo el número de ocupación medio como

$$\bar{n} = \frac{[Q_M]}{[M]} \quad (15)$$

se puede reescribir la constante de reparto como

$$K = \bar{n}/[Q_A] \quad (16)$$

que con la siguiente relación

$$[Q_T] = [Q_M] + [Q_A] \quad (17)$$

lleva a

$$K = \frac{\bar{n}}{[Q_A]} = \frac{\bar{n}}{[Q_T] - [Q_M]} \quad (18)$$

que reordenandose da

$$K [Q_T] - K [Q_M] = \bar{n}$$

$$K [Q_T] = \bar{n} + K [Q_M]$$

$$[Q_T] = \bar{n}/K + [Q_M]$$

y con la definición del número de ocupación se tiene

$$[Q_T] = \frac{\bar{n}}{K} + \bar{n}[M] \quad (19)$$

Así un gráfico de $[Q_T]$ versus $[M]$ permite evaluar n y K a partir de la pendiente y la razón pendiente/intercepto respectivamente. Esto es válido solo si el número de ocupación permanece constante, lo cual se logra trabajando con una sonda que esté totalmente incorporada al microsoma, de modo que el apagamiento sea producido solo por los apagadores solubilizados en la fase microsomal. Así para un conjunto de valores de $[M]$, un mismo valor de I_0/I asegura un único valor de n , y de éstos se obtiene un conjunto de valores de $[Q_T]$. La forma más simple de trabajar los datos es obtener el gráfico de Stern-Volmer para distintas concentraciones de microsomas y luego tomar el inverso de la pendiente como la concentración necesaria para que la fluorescencia disminuya a la mitad. Así un gráfico del inverso de la pendiente de Stern Volmer versus la concentración de microsomas equivale a la ecuación (19) que permite

determinar la constante de reparto. Es importante destacar que este método es aplicable independientemente del mecanismo de desactivación que esté operando. Así, aún cuando el gráfico de Stern Volmer se curve, debido a la existencia de quenching estático, todavía la razón I_0/I refleja un único valor de n .

Los experimentos de apagamiento de la fluorescencia se realizaron con el PUTMA como sonda y con tres suspensiones microsomales de diferente contenido protéico a 37 °C. En la Figura 2 se muestran los gráficos de Stern-Volmer obtenidos para el apagamiento del PUTMA por CCl_4 en estos sistemas. En la Figura 3 se muestra el gráfico obtenido usando la ecuación (19). La constante de reparto para el CCl_4 entre la fase acuosa y la fase microsomal es igual a 1,4 ml/mg, este valor implica que el 50% del CCl_4 se asocia a la membrana cuando la concentración de la suspensión microsomal corresponde a 0,71 mg de proteína por ml.

En la Figura 1 se muestran los gráficos tipo Stern Volmer para la desactivación de los derivados del pireno por CCl_4 , en presencia y ausencia de oxígeno. De la pendiente de Stern Volmer, $k_q\tau$, se obtuvieron las constantes de velocidad, k_q , para el proceso de desactivación por CCl_4 usando los tiempos de vida determinados en experimentos de pulso (Tablas 1 y 2). En la Tabla 8 se dan los valores de k_q obtenidos en solventes homogéneos y en el medio microsomal. En esta tabla se incluyen también los valores de las constantes de velocidad de desactivación del metilpireno (MP), y del benzo-(a)-pireno (BP), en el medio microsomal, las cuales fueron obtenidas de

igual forma que para los otros derivados del pireno. Las constantes de velocidad en la suspensión microsomal se obtuvieron en términos de la concentración analítica de CCl_4 . El efecto del CCl_4 sobre la fluidez de la membrana se sensó midiendo las anisotropías de derivados del antraceno y DPH. A partir de éstas mediciones y de los cambios en los tiempos de vida de la fluorescencia, se determinaron las razones entre los tiempos de correlación rotacional en ausencia (Φ^0) y en presencia (Φ) de CCl_4 . Los valores obtenidos se dan en la tabla 10.

4.3 Efecto del n-heptanol y del 2,6-dimetil-4-heptanol sobre las propiedades físicas de la membrana microsomal.

Las constantes de reparto de los alcoholes se determinaron por ultracentrifugación de acuerdo a la forma descrita en Materiales y Métodos. Los valores encontrados fueron 0,15 para el n-heptanol y 0,17 para el 2,6-dimetil-4-heptanol.

En las Tablas 11 y 12 se muestran los efectos de concentraciones intramicrosomales crecientes de estos alcoholes sobre la anisotropía (r) y polarización (P) de la fluorescencia de las sondas TMA-DPH y DPH. Los datos demuestran que ambos alcoholes inducen una depolarización de la fluorescencia de las sondas, siendo el efecto mayor para el DPH.

La anisotropía de la fluorescencia, en estado estacionario, se puede relacionar con la microviscosidad del medio usando la ecuación de Perrin en la forma propuesta por Shinitzky y Barenholz [5]:

$$\eta = 2.4(r_s/r_o) - r_s \quad (20)$$

donde η es la microviscosidad, r_s y r_o son las anisotropías definidas en la ecuación 13.

Además se ha demostrado [7] que la anisotropía de fluorescencia, en estado estacionario, de una sonda incorporada a una membrana biológica tiene dos componentes, $r_s = r_f + r_o$. El primero, r_f , representa el decaimiento rápido o componente cinético, y el segundo, r_o , representa el decaimiento lento. El componente cinético da cuenta de la microviscosidad, mientras el otro componente está determinado por el grado de empaque de las moléculas que forman la bicapa (grado de orden).

Datos empíricos obtenidos con la sonda DPH incorporada a una gran variedad de membranas biológicas [7] demuestran que la contribución de r_o a r_s es cero para valores pequeños de r_s y se aproxima al 100% para valores muy altos de éste parámetro. Además se comprobó que en toda la zona de valores de r_s comprendidos entre 0,13 a 0,28 se cumple la siguiente ecuación:

$$r_o = 4/3 r_s - 0,1 \quad (21)$$

El parámetro de orden, S , para el DPH y sus derivados corresponde a la raíz cuadrada de la razón entre r_o y r_s :

$$S = (r_o/r_s)^{1/2}$$

En la Tabla 13 se dan los valores de la razón de los parámetros de orden, S/S^0 , y viscosidad, η/η^0 en presencia y ausencia de alcoholes, para TMA-DPH y DPH. A medida que la concentración intramicrosomal de alcohol aumenta se produce una disminución de ambos parámetros. Como las sondas utilizadas sensan la bicapa a distintos niveles, el TMA-DPH se ubica en la zona más externa y el DPH en la región mas interna de la

membrana, los resultados de la Tabla 13 indican que la zona más afectada por los alcoholes corresponde al interior de la membrana microsomal.

La incorporación de n-heptanol a la fase microsomal produce también un efecto sobre las constantes de velocidad de desactivación de derivados del pireno por oxígeno y por tetracloruro de carbono. Este efecto está evaluado por la razón de las constantes de desactivación en presencia y en ausencia del alcohol. Los valores obtenidos se dan en la Tabla 14. La presencia de n-heptanol aumenta la velocidad de estas reacciones.

En la Figura 4-A se grafican las anisotropías de fluorescencia de las sondas DPH Y TMA-DPH versus la concentración intramicrosomal de n-heptanol. Para ambas sondas se encuentra una relación lineal entre estos parámetros (coeficiente de correlación de 0,995), con una pendiente de -0,07 para el DPH y de -0,03 para el TMA-DPH. En la figura 4-B se observa que también existe una relación lineal entre los valores de r_v y las concentraciones intramicrosomales de 2,6-dimetil-4-heptanol. Los valores de las pendientes son en este caso -0,07 y -0,02 para el DPH y TMA-DPH respectivamente. Los valores de los coeficientes de correlación son de 0,99 para la primera sonda y de 0,88 para la segunda.

Una vez cuantificado el efecto de los alcoholes sobre el grado de orden de la membrana se procedió a utilizarlos para inducir cambios físicos en la membrana y evaluar la influencia de estos cambios en la actividad enzimática.

4.4 Efecto del n-heptanol y del 2,6-dimetil-4-heptanol sobre la actividad de las enzimas asociadas a membrana microsomal: UDPG-T y N-demetilasa.

En las figuras 5-A y 5-B se observa que ambos alcoholes presentan una conducta bifásica en relación al efecto sobre la actividad de la UDPG-T. A concentraciones intramicrosomales muy bajas de alcohol la actividad disminuye y a medida que aumenta la concentración el efecto se revierte hasta lograr sobrepasar en gran medida la actividad que posee la enzima en ausencia de alcohol. El efecto del 2,6-dimetil-4-heptanol sobre la actividad enzimática es más intenso (Figura 5B).

En la Figura 6 se observa que el n-heptanol produce una leve disminución de la actividad de la N-desmetilasa, mientras que el 2,6-dimetil-4-heptanol induce una disminución significativa de su actividad.

En las figuras 7-A y 7-B se demuestra la existencia de una correlación lineal entre los valores de la anisotropía de fluorescencia del DPH y la actividad de la UDPG-T al utilizar n-heptanol (Figura 7-A) o 2,6-dimetil-4-heptanol (Figura 7-B), en concentraciones superiores a 0,2 nmoles de alcohol/gr prot, como promotor de cambio en los valores de ambos parámetros. El valor del coeficiente de correlación y la pendiente en el gráfico 7-A corresponde a 0,995 y -4602 respectivamente. En el gráfico 7-B se calculó una correlación de 0,998 y una pendiente de -7929.

En la Figura 8 se grafica la actividad de la N-demetilasa versus r , del DPH, observándose que la correlación entre estos

parámetros es menor que en los casos anteriores (0,800).

De todos éstos resultados se infiere que la alteración en la fluidez de la membrana microsomal, inducida por los alcoholes, afecta principalmente a la actividad de la UDPG-T.

4.5 Efecto del estrés oxidativo sobre las propiedades físicas de la membrana y las actividades de las enzimas UDPG-T y N-demetilasa.

En la Figura 9-A se muestra la variación de la lipoperoxidación en función del tiempo. Como índice del nivel de lipoperoxidación, alcanzado a un tiempo dado, se usó la formación de TBA-RS, el cual se expresa como nmoles MDA/mg prot. En la Figura 9-B se grafican los valores de anisotropía de las sondas DPH y TMA-DPH, a distintos tiempos. En ella se observa un ligero aumento en la anisotropía de la sonda DPH como efecto de la lipoperoxidación, y en cambio la anisotropía del TMA-DPH permanece casi constante.

En la Figura 10 se observa el grado de correlación (0,93) entre r_s del DPH y el índice de TBA-RS, la pendiente de este gráfico corresponde a 0,003.

En las Figuras 11-A y 11-B se muestra el efecto del estrés oxidativo sobre las actividades de la UDPG-T y la N-desmetilasa respectivamente. Se observa un aumento en la actividad de la UDPG-T y una disminución en la actividad de la N-desmetilasa con el grado de lipoperoxidación.

5. DISCUSIÓN

5.1 Estudio fotofísico de las propiedades físico-químicas de la membrana microsomal.

Los tiempos de vida de los derivados del pireno en ausencia de oxígeno dependen de la polaridad del solvente [64], i.e. a medida que aumenta la polaridad del solvente los tiempos de vida se acortan. Los resultados que se dan en la Tabla 3 muestran que en la membrana microsomal los tiempos de vida son en general más cortos que en etanol y que en glóbulos rojos. Esto indicaría, que estas sondas están expuestas al medio acuoso, ó bien que sus estados excitados son desactivados por alguna proteína componente de la membrana microsomal, tal como el citocromo P_{450} . Esta última posibilidad es la más probable, considerando que los valores de los tiempos de vida de los derivados del pireno no aumentan significativamente al aumentar el número de átomos de carbono en la cadena sustituyente, lo que indicaría que la sonda se ubica en la zona más hidrofóbica de la membrana microsomal. Otro argumento en el mismo sentido lo constituye el resultado obtenido para la desactivación de los derivados del pireno por acrilamida. Este proceso ocurre a través de un mecanismo de transferencia de carga, y por lo tanto el aumento de la polaridad favorece la desactivación. En la Tabla 5 se ve que esta molécula, que se disuelve en la fase acuosa, es totalmente ineficiente en la desactivación de los derivados del pireno en presencia de la fase microsomal. Este resultado indica que las sondas están totalmente incorporadas a la bicapa.

Por otro lado, en la Tabla 4 se observa que el yoduro es capaz de desactivar a aquellos derivados del pireno que se localizan más cerca de la superficie microsomal, pero no desactiva a las sondas ubicadas más hacia el interior de la bicapa. En solventes homogéneos la constante de velocidad se acerca al valor difusional, $3 \times 10^9 - 2 \times 10^{10}$, y en cambio en presencia de microsomas este valor disminuye a 6×10^8 . Esta disminución está dentro del rango de lo reportado para reacciones entre moléculas pequeñas y macromoléculas. Ahora, si comparamos los valores de la constante de desactivación por yoduro obtenidos en microsomas y fantasmas [12], se encuentra que en la fase microsomal el proceso de desactivación es tres veces más lento. Este resultado puede ser una consecuencia de una menor concentración de yoduro⁻ en la superficie de la bicapa y/o una inserción más profunda del PMTMA dentro de la membrana microsomal en relación a los fantasmas.

La desactivación por oxígeno de los derivados del pireno incorporados a la membrana microsomal aumenta con el largo de la cadena hidrofóbica. Este resultado es muy similar a lo que se ha encontrado en glóbulos rojos fantasmas (ver Tabla 6). Esto indicaría que en ambas membranas la solubilidad y/o movilidad del oxígeno aumenta hacia el interior de la bicapa. Sin embargo, en la Tabla 6 también se observa que el valor de k_{ox} , para la sonda PMTMA, es mayor en microsomas que en fantasmas. Este resultado podría indicar que la superficie de la membrana microsomal es más fluida que la zona correspondiente de la membrana de glóbulo rojo. Uno de los

factores químicos moduladores de la fluidez lo constituye la razón Colesterol/Fosfolípido, y se han reportado valores de 0,9 y 0,3 para esta razón en glóbulos rojos y microsomas respectivamente [65,66]. Esta información concuerda con el mayor valor de k_{ox} para la sonda PMTMA en microsomas. En la Tabla 6 puede verse también, que los valores de las k_{ox} son menores en membranas que en solventes homogéneos, lo que indica una menor exposición de las sondas al oxígeno tanto en microsomas como en fantasmas. Este hecho tiene relevancia desde el punto de vista biológico, en la medida en que las membranas esten menos expuestas al oxígeno van a estar más protegidas de la lipoperoxidación. Este proceso comienza con la abstracción de un átomo de hidrógeno bis alílico desde un ácido graso de la membrana, formándose un radical libre. Esta especie puede seguir dos vías alternativas: a) reaccionar con otro radical ($R \cdot + R \cdot \rightarrow R-R$) y b) reaccionar con oxígeno, formándose un radical peróxido, especie propagadora de la lipoperoxidación. La elección preferencial de una u otra vía dependerá de la concentración de oxígeno presente en el medio.

Los valores de las k_{ox} de las sondas que no están ancladas a la membrana microsomal (MP y BP) pueden ser utilizados para hacer una estimación promedio de su ubicación dentro de la bicapa. Para la sonda BP se observa que la magnitud de k_{ox} es cercana al valor obtenido para la sonda PUTMA, lo que indicaría que se encuentra inserta hacia el interior de la bicapa. En cambio el valor de k_{ox} de la sonda MP indica que esta prueba se encontraría en una zona cercana a donde se ubica el PBTMA. Es

preciso hacer notar que para llegar a esta conclusión no se considera el movimiento de la sonda no fija, debido a su gran tamaño en relación al oxígeno.

El estudio de la fluidez de la membrana microsomal se hizo por polarización de la fluorescencia usando como sondas derivados del antraceno y DPH. El DPH ha sido extensamente empleado para sensar las regiones hidrofóbicas de las bicapas [5,67,68]. En la Tabla 7 se entrega un valor de r_s para el DPH en microsomas similar al reportado en bibliografía para microsomas de hígado de rata [66], pero mucho menor que el informado para glóbulos rojos fantasmas (r_s igual a 0,28 [69]). Los valores de r_s encontrados para los derivados del AS (Tabla 7) muestran que la fluidez aumenta hacia el interior de la membrana microsomal (menores valores de r_s), lo cual concuerda con los resultados obtenidos para k_{ox} . El valor de Φ de la sonda 12-AS en microsomas es igual a 2,98 ns siendo este valor mucho menor que 7,81 ns encontrado en fantasmas [1]. Este resultado indica que existe una mayor fluidez de la membrana microsomal, en comparación a la de los glóbulos rojos. Por otro lado, las mediciones de k_{ox} indicaban una diferencia sólo en la zona superficial entre ambos tipos de membrana. Esta divergencia se puede explicar en base a que el 12-AS sensa sólo el microambiente que lo rodea, mientras que k_{ox} evalúa un promedio de esta propiedad sobre una región más amplia de la membrana [12], debido a que ella es el resultado de un proceso difusional.

Así se puede concluir que la membrana microsomal es más

rígida en la superficie y se va fluidificando hacia el interior. Comparando los resultados obtenidos en el presente trabajo con los valores reportados para glóbulos rojos se ve que esta última es mas rígida que la membrana microsomal, lo que concuerda con su mayor contenido de colesterol.

5.2 Efecto del CCl_4 sobre las propiedades físicas de la membrana microsomal.

En la Tabla 8 se observa que las constantes de desactivación de los derivados del pireno por CCl_4 , en un medio homogéneo y en ausencia de oxígeno, aumentan con la polaridad del solvente. Los valores de k_d en el medio microsomal son mayores a los obtenidos en los solventes homogéneos utilizados y van aumentando a medida que la sonda se inserta más profundamente en la bicapa. Considerando que la membrana microsomal es un medio apolar, este aumento de la velocidad puede deberse a un aumento de la concentración del aditivo en el microentorno de la sonda. Para realizar una comparación más valedera es necesario normalizar las k_d microsomales, dividiéndolas por las k_d en el solvente de referencia (etanol-heptanol o etanol-agua). Procediendo de ésta forma se encuentra que los mayores valores relativos corresponden a las sondas PMTMA y BP (Tabla 8A). En el primer caso esto se explicaría por la mayor polaridad de la región donde se ubica el PMTMA, y en el segundo caso por una mayor concentración del CCl_4 en los alrededores de la sonda BP. De aquí se infiere que el CCl_4 se ubicaría preferentemente en la zona intermedia de la hemicapa.

En la Figura 1 se muestran los gráficos de Stern Volmer

para el apagamiento de derivados del pireno por CCl_4 , y en ellos se puede observar que la pendiente aumenta en presencia de oxígeno. El hecho de que el gráfico I_0/I versus concentración de CCl_4 sea lineal, a bajas concentraciones de CCl_4 , tanto en ausencia como en presencia de oxígeno implica que k_{ox} debe cambiar linealmente con la concentración intramicrosomal de CCl_4 ,

$$k_{ox} = k_{ox}^0 + \alpha [\text{CCl}_4] \quad (20)$$

donde k_{ox}^0 y k_{ox} son las constantes de apagamiento por oxígeno, definidas en la ecuación (12), en ausencia y presencia de una concentración de tetracloruro respectivamente, y α mide la sensibilidad de la sonda hacia el efecto del CCl_4 . En la Tabla 9 se dan los valores de α para los derivados del pireno utilizados, así como también las concentraciones intramicrosomales de CCl_4 necesarias para aumentar al doble el valor de k_{ox} . Se observa que las sondas más sensibles al efecto del CCl_4 son el PBTMA y el PUTMA, vale decir las que se ubican más al interior de la bicapa. También se dan en la Tabla 9 los valores de α para las sondas MP y BP. El efecto pequeño en la interfase, donde se localiza el PMTMA, se puede atribuir a la poca solubilidad del aditivo en esa zona. En la región donde se ubica el PBTMA una concentración intramicrosomal tan pequeña como 0,09 mmoles de $\text{CCl}_4/\text{g prot}$ aumenta al doble la k_{ox} . Este aumento de la velocidad de desactivación por oxígeno indica una perturbación general de la membrana microsomal por la adición de CCl_4 .

El aumento de la velocidad de desactivación por oxígeno en

presencia de CCl_4 , debe reflejar un aumento en la solubilidad y/o movilidad del oxígeno. El efecto del CCl_4 , sobre el orden y la fluidez de la membrana microsomal se sensó midiendo las anisotropías de derivados del antraceno y DPH, los cuales se ubican a diferentes profundidades de la bicapa. A partir de estas mediciones y de los cambios en los tiempos de vida de fluorescencia, se determinaron las razones entre los tiempos de correlación rotacional en ausencia (Φ^0) y en presencia (Φ) de CCl_4 , (ver Ecuación 13). Los valores obtenidos para estas razones se tabulan en la Tabla 10. A medida que aumenta el tamaño de la cadena alquílica se observa una disminución de esta razón. Esto indicaría un aumento moderado de la movilidad de la sonda debido a la incorporación de CCl_4 . Se observa también que el efecto producido por este aditivo es mayor en la zona sensada por el 2-AS. El efecto intenso del CCl_4 , sobre k_{ox} contrasta con el poco efecto que produce la adición de este aditivo sobre las depolarizaciones de la fluorescencia de las sondas incorporadas a la membrana microsomal. Nuevamente, esta diferencia puede explicarse por el hecho que las medidas de anisotropía sensan propiedades muy locales, mientras que k_{ox} evalúa una propiedad promedio de toda la membrana.

En resumen el CCl_4 , se ubicaría preferentemente en la zona intermedia de la hemicapa, ejerciendo una perturbación en la membrana a todo nivel. El efecto más notable del CCl_4 , lo constituye el aumento de la solubilidad y/o movilidad del oxígeno. Este hecho podría tener implicancias dentro del mecanismo de su hepatotoxicidad.

5.3 Efecto del n-heptanol y del 2,6-dimetil-4-heptanol sobre las propiedades físicas de la membrana.

Se utilizaron dos alcoholes de geometría diferente (lineal y ramificada) con el fin de compararlos en cuanto a su grado de incorporación a la membrana microsomal y el tipo e intensidad de la perturbación física por ellos inducida.

Las constantes de reparto para ambos alcoholes son muy semejantes (0,15 y 0,17 para el n-heptanol y el 2,6-dimetil-4-heptanol respectivamente), lo cual indica igual grado de solubilidad en la membrana microsomal. En vesículas de dipalmitoilfosfatidilcolina se reporta un mayor grado de incorporación del alcohol lineal [11]. Estas diferencias se deben probablemente a la composición heterogénea de la membrana microsomal, existiendo zonas más fluidas que permiten que se acomode el alcohol ramificado.

El efecto físico de estos alcoholes sobre la membrana microsomal se evaluó a través de los cambios observados en las anisotropías de las sondas TMA-DPH y DPH. La primera, por su naturaleza catiónica, se inserta en la zona superficial de la bicapa y la segunda en la región más hidrofóbica [70]. Los valores obtenidos para r , y P (Tablas 11 y 12) nos dan una idea de los cambios de fluidez de la membrana microsomal producidos por la adición de los alcoholes en estudio. La presencia de los alcoholes afecta principalmente las anisotropías del DPH. Dado que las anisotropías en estado estacionario de DPH y sus derivados dan cuenta tanto de los parámetros de orden como dinámicos, se puede tratar de separarlos recurriendo a las

ecuaciones descritas en Resultados (Ecuaciones 20 y 21). En la Tabla 13 se observa el efecto de ambos alcoholes sobre los parámetros de orden y viscosidad evaluados a través de los r , de ambas sondas. Los dos alcoholes afectan estos parámetros en forma muy similar disminuyendo el grado de orden y la microviscosidad principalmente en la zona mas hidrofóbica.

Las Figuras 4A y 4B muestran que las variaciones de los r , del DPH y del TMA-DPH son dependientes de la dosis de alcohol, siendo esta dependencia lineal, a mayor concentración intramicrosomal de alcohol (n-heptanol o 2,6-dimetil-4-heptanol) se induce una mayor fluidificación de la membrana. El efecto es mínimo para la zona sensada por el TMA-DPH. Los dos alcoholes en estudio producen una perturbación prácticamente idéntica en la membrana en cuanto a intensidad y zona afectada. Es probable que, aunque producen una fluidificación general de la membrana, induzcan zonas de mayor rigidez dentro de ella. Un efecto parecido se describe para el colesterol [55], en este caso la adición de colesterol induce una rigidización general y un aumento de la fluidez en algunas zonas. Se postula que este esteroide interaccionaría con los fosfolípidos más saturados, dejando conglomerados de lípidos insaturados, y creando una especie de separación de fases.

La Tabla 14 muestra el aumento en los valores de las constantes de desactivación por oxígeno y por CCl_4 , al adicionar n-heptanol a los microsomas. El n-heptanol al incorporarse a la interfase produce una disminución de la polaridad en el sitio de su incorporación aumentando la solubilidad del oxígeno y del

CCl₄. También podría indicar un aumento de la difusión traslacional de las moléculas por efecto del alcohol.

En resumen ambos alcoholes se incorporan en igual grado a la membrana microsomal y producen una fluidificación de la bicapa principalmente en la zona intermedia de ella. Existe una excelente correlación lineal entre fluidez y dosis de alcohol.

5.4 Efecto del n-heptanol y del 2,6-dimetil-4-heptanol sobre las actividades de la N-demetilasa y de la UDPG-T microsomales.

Teniendo en cuenta las interacciones directas que existen entre lípidos y proteínas de membrana, los cambios en la fluidez de membrana pueden estar asociados con alteraciones en la funcionalidad de muchas proteínas insertas en la bicapa. En esta tesis se ha estudiado el efecto de los cambios en la fluidez inducidos por el n-heptanol y el 2,6-dimetil-4-heptanol sobre dos enzimas de topologías diferentes. La UDPG-T se encuentra orientada hacia el lúmen microsomal [71] y la N-demetilasa hacia el citoplasma [36].

Dentro de cierto rango de concentraciones existe una relación directa entre dosis de n-heptanol o 2,6-dimetil-4-heptanol y aumento de la actividad de la UDPG-T (Figuras 5A y 5B). Al compararse ambas curvas se observa una relación lineal en la Figura 5A, mientras en la Figura 5B se observa un perfil saturable. A pesar de que ambos alcoholes presentan un comportamiento muy semejante en cuanto al grado de perturbación que inducen en la membrana microsomal, el efecto del alcohol ramificado sobre la actividad de la UDPG-T es más intenso. Los tipos de movimiento sentidos por las sondas asociadas a

membrana dependen de su tamaño, forma y tiempo de vida. El uso de otras sondas nos podrían entregar mayor información respecto a la existencia de efectos físicos distintos entre estos dos alcoholes. Existen reportes de la mayor perturbación ejercida por los alcoholes ramificados en relación a los lineales en vesículas de dipalmitoilfosfatidilcolina [14,11], e incluso se describe una mayor potencia anestésica para los alcoholes ramificados. También, se tiene conocimiento de que los alcoholes que poseen entre 5-9 átomos de carbono forman conglomerados que desestabilizan las interacciones entre los fosfolípidos, aumentando la distancia entre ellos [14]. La ramificación podría facilitar la formación de estos agregados, necesitando una concentración menor del alcohol para inducir su formación. A concentraciones muy bajas, ya sea del alcohol ramificado o lineal, se observa una disminución de la actividad de la UDPG-T (Figuras 5A y 5B). Considerando la relación lineal, con un alto coeficiente de correlación, existente entre la disminución del r_s DPH y el aumento de la actividad enzimática (Figuras 7A y 7B), este resultado podría deberse a una rigidización de la membrana no sensada por las sondas utilizadas en este trabajo. M. Campos y col [11] encontraron que a bajas concentraciones de octanol y 2,6-dimetil-4-heptanol se producía una rigidización de las vesículas de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPFC), pero al aumentar la concentración de estos alcoholes la membrana se fluidificaba. Estos resultados fueron encontrados al utilizar las sondas 2-AS y 12-AS. En cambio al utilizar DPH se obtuvo siempre una

fluidización de la membrana en todo el rango de concentraciones utilizado.

El n-heptanol no tiene un efecto significativo sobre la actividad de la N-desmetilasa, en cambio el alcohol ramificado disminuye la actividad de la enzima (ver Figura 6). También se observa una conducta bifásica; aumenta la actividad a bajas concentraciones de alcohol y a concentraciones mayores disminuye. Este resultado confirma la idea de que ambos alcoholes ejercen efectos bifásicos sobre la fluidez. Al igual que en el caso de la UDPG-T el efecto mayor es producido por el alcohol ramificado. Las actividades enzimáticas correlacionan mejor con el aumento de fluidez en el caso de la UDPG-T, que en la N-desmetilasa (comparar Figuras 7B y 8).

La actividad de una enzima unida a una membrana está controlada entre otros factores por la permeabilidad de la membrana a sustratos y cofactores, la velocidad de difusión de éstos y la composición de los lípidos del entorno de la enzima, los cuales son determinantes de la conformación adecuada del sitio catalítico. La UDPG-T es una enzima cuyo sitio activo está orientado hacia el lumen, por lo que el sustrato hidrosoluble tiene acceso a él por medio de una proteína transportadora [36]. Se ha observado que la adición de detergentes a los microsomas puede aumentar o disminuir la actividad de la UDPG-T, dependiendo de la concentración de detergente y/o sustrato [72]. La disminución de la actividad de la UDPG-T observada en éste trabajo a baja concentración de alcohol (n-heptanol o 2,6-dimetil-4-heptanol) se podría

explicar por una reducción de la movilidad del transportador del sustrato hidrosoluble al sitio activo. En una segunda fase, al aumentar la concentración de alcohol, se produciría una fluidificación general de la membrana microsomal facilitando la difusión lateral y transversa del transportador y/o fluidificando los fosfolípidos del entorno de la enzima. Se ha encontrado [54,55] que para la manifestación de su actividad catalítica, esta enzima requiere interactuar con fosfatidilcolinas muy fluidas (alto índice de insaturación). La menor sensibilidad de la actividad de la N-desmetilasa a la presencia de los alcoholes utilizados puede deberse al hecho de que el sitio activo de la enzima está expuesto al tampón y por lo tanto el sustrato tiene libre acceso a él. Se puede inferir que las enzimas con esta topología son menos dependientes a cambios físicos de la membrana a la cual están asociadas. Se ha descrito un halo fosfolípido para ésta enzima más rígido que el promedio de los lípidos de membrana [36], la disminución de actividad observada con el alcohol ramificado puede deberse a que al ubicarse este aditivo en la bicapa produzca un debilitamiento de las interacciones de los fosfolípidos del entorno con la enzima. Engelke y col [73] al utilizar solventes aromáticos en membranas microsomales observaron una disminución de la actividad de las oxidasas dependientes del citocromo P₄₅₀. Estos autores postulan la formación de agregados de este sistema multienzimático al inducir una fluidificación de la membrana.

En resumen, ambos alcoholes en un cierto rango de

concentraciones inducen un aumento de la actividad de la UDPG-T, este aumento correlaciona muy bien con el aumento de la fluidez producida por dichos alcoholes. El alcohol ramificado disminuye significativamente la actividad de la N-demetilasa. Esta última enzima se caracteriza por ser menos sensible al efecto de ambos alcoholes.

5.5 Efecto del estrés oxidativo sobre las propiedades físicas de la membrana microsomal y las actividades de la UDPG-T y de la N-demetilasa.

Se observa un aumento de los valores de la anisotropía de fluorescencia de la sonda DPH asociada a la membrana microsomal en paralelo con la formación de TBA-RS (ver Figuras 9A y 9B). Este resultado indica una leve rigidización de la zona hidrofóbica, lo que concuerda con la mayor parte de la bibliografía [42,47,59,74]. Existen también algunos reportes de fluidificación de membrana por efecto de su lipoperoxidación [33,47]. Estos resultados aparentemente contradictorios pueden estar relacionados con el tipo de productos formados, la composición lipídica de las membranas y tipo de sondas utilizadas.

La disminución de la fluidez observada durante algunos procesos lipoperoxidativos se explica por cambios químicos en las cadenas hidrofóbicas de los fosfolípidos, formación de cross-linking entre lípidos y proteínas de membrana alterados químicamente por el proceso oxidativo. Este cross-linking afecta la movilidad tanto de los lípidos como de las proteínas [32].

Al nivel de lipoperoxidación inducida en este trabajo se afectan notablemente las actividades de las enzimas en estudio, sin producirse un gran cambio en las propiedades físicas de la membrana microsomal (ver Figuras 11A y 11B).

Existe una gran cantidad de bibliografía [43,47,59,75] relacionada con la disminución de las actividades de enzimas asociadas a membranas como consecuencia de un estrés oxidativo. La actividad puede modificarse por un daño directo al sitio activo y/o por un cambio físico inducido por la lipoperoxidación.

La N-demetilasa posee su sitio activo expuesto al medio acuoso (externo), por lo tanto tienen libre acceso a él los radicales hidroxilos generados al adicionar al medio de incubación Fe^{+2} y ácido ascórbico [36]. De esto se infiere que la disminución de la actividad encontrada en este trabajo se podría deber a un daño directo a la enzima. Gut y col [75] encontraron una inmovilización del P_{450} sin cambios notorios en la fluidez por efecto de la lipoperoxidación microsomal, y postularon la formación de agregados de las proteínas integrantes del citocromo.

La actividad de la UDPG-T se encuentra aumentada por efecto del estrés oxidativo (Figura 11A). Esta enzima posee su sitio activo orientado hacia el lumen microsomal [36], por lo que un ataque directo de los radicales generados en el medio acuoso se hace mas difícil. Es probable que la activación se deba a un aumento en la accesibilidad del sustrato al sitio activo de la enzima, provocado por un cambio físico de la

bicapa debido a las reacciones oxidativas de los lípidos. Se ha postulado la formación de endoperóxidos cíclicos, a partir de fosfolípidos insaturados, por efecto de una lipoperoxidación moderada, los cuales podrían aumentar las distancias intermoleculares contribuyendo a un aumento de la movilidad de las moléculas [33]. Si se toma en cuenta que el halo fosfolipídico de la UDPG-T estaría constituido por fofatidilcolinas de un alto grado de insaturación, es factible la formación de estos endoperóxidos en dicha zona. Se ha encontrado, en situación de estrés oxidativo, una disminución de la actividad de la UDPG-T in vivo [45], e in vitro se informa de un aumento de su actividad a bajas concentraciones de MDA, y a medida que se eleva el nivel de este aldehído la actividad disminuye [72]. También se ha reportado una disminución de la actividad de esta enzima, tratada previamente con detergente, por el efecto de un estrés oxidativo [76]. El uso de una sonda específica que se uniera directamente a la UDPG-T podría dar cuenta del estado físico del halo de fosfolípidos a distintos niveles de lipoperoxidación. La información recogida de esta manera podría explicar los resultados contradictorios reportados para esta enzima en términos del efecto de su actividad y cambios físicos producidos por lipoperoxidación.

Resulta interesante explorar, dado su carácter de importante enzima desintoxicante, la posibilidad de una modulación in vivo de la actividad de la UDPG-T, por especies reactivas provenientes del citocromo P₄₅₀. Como referencia se

ha encontrado un aumento de la actividad de la Glutation-Peroxidasa por efecto de un estrés oxidativo, en este caso se postula una dimerización de la proteína [44]. Considerando el papel importantísimo que cumple esta enzima en el mecanismo de defensa antioxidante, resulta lógico suponer que su actividad esta siendo modulada in vivo por las especies reactivas generadas por un estrés oxidativo.

En resumen, al nivel de lipoperoxidación inducido en este trabajo, se encontró una ligera rigidización de la membrana microsomal. Se detectó un aumento de la actividad de la UDPG-T y una disminución de la actividad de la N-desmetilasa.

6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el estudio fotofísico de los microsomas señalan que la fluidez de la membrana microsomal aumenta hacia el interior. Esta conclusión se apoya tanto en las mediciones de desactivación por oxígeno de derivados del pireno, como en las de depolarización de la fluorescencia de derivados del AS.

La consecuencia mas notable de la incorporación de CCl_4 a la membrana microsomal es el gran aumento de la solubilidad y/o movilidad del oxígeno, particularmente en la zona intermedia de la hemicapa [78]. La adición de CCl_4 a la membrana aumenta el grado de depolarización y la velocidad de desactivación por oxígeno [78]. Este hecho puede tener relevancia de carácter biológico. El CCl_4 es metabolizado por el citocromo P_{450} en microsomas hepáticos. El producto de esta metabolización son los radicales triclorometilos que reaccionan con oxígeno para dar radicales triclorometilperóxidos, los cuales promueven el proceso de lipoperoxidación. El daño producido dependerá de la razón entre los radicales triclorometilo y triclorometilperóxido. El alto grado de solubilidad y/o movilidad del oxígeno en presencia del CCl_4 sin metabolizar, modificaría esta razón en forma significativa. Por otro lado Berger y col [48] proponen dos fases dentro del mecanismo para explicar la citotoxicidad de este solvente observada en hepatocitos aislados. Una primera fase sería inducida sólo por el efecto solvente del xenobiótico, ya que no se observa un efecto protector al adicionar inhibidores del citocromo P_{450} o

antioxidantes. Este efecto se produce a los minutos de exposición al solvente. En la segunda fase el mecanismo de toxicidad estaría dado por la metabolización del CCl_4 a especies reactivas. En este trabajo se encontró un alto grado de alteración en las propiedades físicas de la membrana microsomal por efecto de la adición de CCl_4 , lo que apoya la teoría de la existencia de un efecto tóxico in vivo mediado por su acción perturbadora de membrana.

La solubilización de n-heptanol y 2,6-dimetil-4-heptanol en el microsoma produce un aumento de la fluidez en la membrana. Este efecto se refleja en las mediciones de la depolarización de la fluorescencia de las sondas DPH y TMA-DPH, y se induce principalmente en la zona hidrofóbica de la bicapa. No se observan diferencias entre ambos alcoholes en cuanto a grado de incorporación y tipo de perturbación de la membrana. La fluidez generada por estos alcoholes es linealmente dependiente con la dosis intramicrosomal alcanzada por ellos.

Aunque se encontró que ambos alcoholes inducen un mismo cambio físico sobre la membrana, el efecto ejercido sobre las actividades enzimáticas de la UDPG-T y N-demetilasa son diferentes.

Ambos alcoholes, a partir de una cierta concentración, generan un aumento en la actividad de la UDPG-T. Esto correlaciona linealmente con el aumento de fluidez inducido por dichos aditivos. La disminución de la actividad a bajas concentraciones de los alcoholes se explica por una rigidización no sensada por las sondas utilizadas en este

trabajo. En cambio, la actividad de la N-demetilasa es afectada solamente por el alcohol ramificado. Estas diferencias de comportamiento entre las dos enzimas se atribuyen a las diferencias en sus topologías. Se postula que el hecho que la N-demetilasa tenga su sitio expuesto al sustrato, la hace menos sensible a los cambios físicos de membrana.

Al nivel de lipoperoxidación inducido en este trabajo no se encontraron grandes cambios físicos de la membrana microsomal, sólo una ligera rigidización en la zona más hidrofóbica de la bicapa. A pesar de estas modificaciones discretas en las propiedades físicas de la membrana, se produjeron grandes cambios en las actividades de la N-demetilasa y de la UDPG-T. La disminución de la actividad de la primera enzima se podría explicar por un ataque directo al sitio catalítico, de las especies reactivas generadas por Fe^{2+} y ácido ascórbico. El aumento de la actividad observado para la UDPG-T se explicaría por un aumento de la movilidad del transportador del sustrato hidrosoluble (UDPG-A) y/o una fluidificación de los fosfolípidos del entorno de la enzima por efecto de la lipoperoxidación, situación difícil de probar con las sondas utilizadas.

Se ha encontrado [45] que la administración oral de CCl_4 induce una fluidificación de la membrana microsomal [45,47] y una inhibición de las actividades tanto de la UDPG-T como de la N-demetilasa [45,49]. Los resultados encontrados en este trabajo apuntan en el sentido de señalar que tanto la lipoperoxidación como un aumento en la fluidez, podrían dar

cuenta de la inactivación de la N-demetilasa. En cuanto a la disminución de la actividad de la UDPG-T observada in vivo en una intoxicación con CCl_4 , resulta discutible asociarlo al aumento de fluidez inducido por el xenobiótico y/o sus metabolitos, considerando que en este trabajo se demuestra la existencia de un aumento de la actividad al aumentar la fluidez. Es probable que en un comienzo se induzca una activación de la UDPG-T por un efecto solvente del CCl_4 y/o por un cambio físico de los fosfolípidos del entorno por efecto de una lipoperoxidación moderada, iniciada por la metabolización del xenobiótico. Al aumentar el nivel de lipoperoxidación se induciría una disminución de la actividad de la enzima, alterándose las interacciones fosfolípidos-enzima (única situación visualizada in vivo).

Se puede inferir que tanto la geometría como la ubicación de los solutos incorporados a las membrana, con respecto a la posición de la enzima, tienen importancia en cuanto a tipo e intensidad de los cambios en la actividad de ésta. Considerando que dichas variaciones son consecuencia de cambios físicos particulares producidos por cada aditivo, se torna indispensable el uso de diferentes sondas. El efecto sentido por la sonda depende del tipo de movimiento que posean y de su ubicación dentro de la bicapa, por lo cual cada una de ellas proporciona una información distinta.

En la evaluación de los cambios físicos inducidos por la lipoperoxidación de membranas, es necesario considerar el nivel de lipoperoxidación logrado y el tipo de productos formados,

física y/o química generado en la membrana sea diferente. Es probable también que existan zonas en la membrana más afectadas que otras, por su composición heterogénea.

7. BIBLIOGRAFIA

- 1- D. Schachter, Fluidity and function of hepatocyte plasma membrane, *Hepatology* 4 (1)(1984) 140-151
- 2- M. Shinitzky. Membrane fluidity and cellular functions, Capitulo 1, vol 1, ed. CRC Press (1984).
- 3- E. Blatt and W.H. Sawyer, Depth dependent fluorescent quenching in micelles and membranes, *Biochim. Biophys. Acta.* 822 (1985) 43-62.
- 4- N. J. Turro, *Modern Molecular Photochemistry*, Benjamin, California, 1978.
- 5- H. Garda and R. Brenner, Short chain aliphatic alcohols increase rat-liver microsomal membrane fluidity and affect the activities of some microsomal membrane-bound enzymes, *Biochim. Biophys. Acta.* 769 (1984) 160-170
- 6- A. Macdonal, K. Wahle, A. Cossins and N. Behan, Temperature, pressure and cholesterol effects on bilayer fluidity, a comparison of pyrene excimer/monomer ratios with the steady state fluorescence polarization of DPH in liposomes and microsomes, *Biochim. Biophys. Acta* 938 (1988) 231-234.
- 7- W. J. Van Blitterswijk, R. P. Van Hoever and B. Van Der Meer, Lipid structural order parameters in biomembranes derived from steady state fluorescence polarization measurements, *Biochim. Biophys. Acta* 644 (1981) 323-332
- 8- P. Sepúlveda, G. Gallardo and E. A. Lissi, Fluorescence quenching in cetyltrimethylammonium micelles and in dioctadecyldimethylammonium chloride vesicles. A

- comparison, *J. Coll. Int. Sci*, 152 (1992) 104-113.
- 9- M. V. Encinas and E. A. Lissi, Intracellular quenching of 2,3-dimethylnaphthalene fluorescence by peroxides and hydroperoxides, *Photochem. Photob.* 37 (1983) 251-255.
- 10- E. Abuin, E. Lissi, D. Aravena, A. Zanoco and M. Macuer, A fluorescent probe study of the effect on the size on the properties of dioctadecyldimethylammonium chloride vesicles, *J. Coll. Int. Sci.* 122 (1988) 201-208.
- 11- A. Campos, E. Abuin and E. A. Lissi, Effect of a linear (1-octanol) and a branched (2,6-dimethyl-4-heptanol) alkanol upon the properties of dipalmitoylphosphatidylcholine large unilamellar vesicles. *Coll. Surf.* 100 (1995) 155-163.
- 12- E. A. Lissi and T. Cáceres, Oxygen diffusion concentration in erythrocyte plasma membrane studied by the fluorescence quenching of anionic and cationic pyrene derivatives. *J. Bioenergetics and Biomembranes*, 21 (1989) 375-385.
- 13- Harris and Simon. What should hepatologist know about membrane fluidity? *Hepatology* 7 (1987) 177-180.
- 14- R. Brasseur, P. Chatelain, E. Goormag and J.M. Ruysschaert. A semiempirical conformational analysis of the interaction of n-alkanols with dipalmitoylphosphatidylcholine, *Biochim. Biophys. Acta.* 814 (1985) 227-236.
- 15- K. Jorgensen, J. P. Ipsen, O. G. Mouritsen, D. Bennett and M. J. Zuchermann, A general model for the interaction of foreign molecules with lipid membranes: drugs and

- anaesthetics, *Biochim. Biophys. Acta* 1062 (1991) 227-238.
- 16- Y.-S. Tsa, S.-M. Ma, H. Kamaya and Y. Ueda, Fourier transform infrared studies on phospholipid hydration: phosphate-oriented hydrogen bonding and its attenuation by volatile anesthetics, *Mol. Pharm.* 31 (1987) 623-630.
- 17- T. Thalhammer, R. Kaschnitz, K. Mittermayer and P. Haddad, J. Graf., Organic solvents increase membrane fluidity and affect bile flow and potassium transport in rat-liver, *Biochem. Pharm.* 46 (1993) 1207-121.
- 18- M. Lassner, L. Roth and C.-H. Chen, Structure-functional effects of a series of alcohols on acetyl cholinesterase associated membrane vesicles. Elucidation of factors contributing to the alcohol action, *Arch. Biochem. Biophys.* 17 (1995) 391-396.
- 19- J. Van Rensbrung, W. M. Daniels and B. J. Van der Walt, Lipid peroxidation and platelet membrane fluidity implications for Alzheimer's disease, *Neuroreport* 5 (1994) 2221-2224.
- 20- R. Rabini, G. Ferretti, R. Galassi, M. Taus, G. Curatola, A. Tangorra, P. Fumelli and L. Mazzantini, Modified fluidity and lipid composition in lipoproteins and platelet membranes from diabetic patients, *Clin. Biochem.* 27 (1994) 381-385.
- 21- C. Watal and P. D Winocour. The relation of chemical modification of membrane proteins and plasma lipoproteins to reduced membrane fluidity of erythrocytes from diabetic subjects, *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 30 (1992)

- 513-9.
- 22- S. Urano, M. Hoshe-Hashizume, N. Tachigi, M. Matsuo, M. Shivaki and H. Ito, Vitamine E and susceptibility of erythrocytes and reconstituted liposomes to oxidative stress in aged diabetics, *Lipids* 26 (1991) 58-61
 - 23- V. Fernandez, X. Barrientos, K. Kipreos, A. Valenzuela and L. Videla, Superoxide radical generation, NADPH oxidase activity and cytochrome P₄₅₀ content of rat liver microsomal fractions in an experimental hyperthyroid state. Relation to lipid peroxidation, *Endocrinology* 117 (1985) 496 - 500.
 - 24- T. Castillo, D. Koop, S. Kamimura and H. Tsukamoto. Role of cytochrome P₄₅₀ 2 E₁ in ethanol-CCl₄ and iron dependent microsomal lipoperoxidation, *Hepatology* 16 (1992)992-996.
 - 25- H. A. Yamamoto, Relation of Ca²⁺ acumulation and lipid peroxidation with CCl₄-induced toxicity in the rat liver. *Pharm. and Toxicol.* 66 (1990) 213-216.
 - 26- D. Stoyanovsky, R. Goldman, H. Claycamp and V. Kagan, Dependent generation of reactive oxygen species. Implication for benzene toxicity, *Arch. Biochem. Biophys.* 317 (1995) 315-323.
 - 27- D. Tribble, T. Y. Aw and D. Jones. The pathophysiological significances of lipid peroxidation in oxidative cell injury, *Hepatology* 7 (1987) 337-387.
 - 28- H. Sies, *Biochemistry of oxidative stress*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 25 (1986) 1058-1071.
 - 29- M. Kappus. Lipid peroxidation, mechanism, analysis,

- enzymology and biological relevance on oxidative stress, H. Sies, Ed., Academic Press, London, 1985, p. 273-310.
- 30- B. H. Hammond, H. Kontos, M Hess. Oxygen radicals in the adult respiratory distress syndrome in myocardial ischemia and reperfusion injury in cerebral vascular damage. *J. Physiol. Pharmacol.* 63 (1985) 173-187.
- 31- J. Feher, G. Csomos and A. Vereckei. Free radical reactions in medicine, Springer-Verlay, Berlin, 1987.
- 32- G. Kanginkel and A. Sevnian. Peroxidation effects on membrane structure. *Methods in Enzymology* 233 (1994) 373-357.
- 33- S. Jain, M. Thomas, P. Kumar and M. Laboraraya. Peroxidation of biomembranes generating kinked phospholipids permitting local molecular mobility. A peroxidative theory of fluidity management. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 195 (1993) 574-580.
- 34- B. Halliwell and J. Guttenridge. Free radical in biology and medicine, Clarendon Press, Oxford, 2nd ed., 4 (1989) 218-233
- 35- E. A. Lissi, C. Pascual and M. Del Castillo. Luminol luminescence by 2,2'-Azo-bis(2-amidinopropane) thermolysis. *Free Rad. Res. Comm.* 5 (1992) 299-311.
- 36- I. M. Arias, W. Jakoly, H. Popper, D.-Schachter and D. Shafritz, *The Liver Biology and Phatobiology*, 2nd Ed., Raven Press, New York, 1987, 165-185.
- 37- I. M. Arias, W. Jakoly, H. Popper, D. Schachter and D. Shafritz, *The Liver Biology and Pathobiology*, 2nd Ed.,



- Raven Press, New York, 1987, 389-400.
- 38- S. Bondy and S. Naderi, Contribution of hepatic cytochrome P₄₅₀ systems to the generation of reactive oxygen species. *Biochem. Pharm.* 48(1994) 155-159.
- 39- S. Sies, *Oxidative stress*, Academic Press, New York, 1985.
- 40- W. R. Bidlack and A. L. Tappel. Damage to microsomal membranes by lipid peroxidation, *Lipids* 8 (1973) 177-182.
- 41- R. C. Vickuja and E. Okabe, Oxygen radical mediated lipid peroxidation and inhibition of Ca²⁺-ATPase activity of cardiac sarcoplasmic reticulum, *Arch. Biochem. Biophys.* 261 (1988) 447-457.
- 42- J. chen and B. Pal-Yu, Alterations in mitochondrial membrane fluidity by lipid peroxidation products. *Free Radical in Biology and Medicine* 17 (1994) 411-418.
- 43- P. K. Rudiza, T. Brasitus, Inactivation of rat small intestinal Brush-Border membrane alkaline phosphatase by oxygen free radicals, *Gastroenterology* 105 (1993) 357-366.
- 44- Y. Aniya and W. Anders. Activation of rat liver microsomal Glutathione S-Transferase by hydrogen peroxide: role for protein-dimer formation. *Arch. Biochem. Biophys.* 296 (1992) 611-616.
- 45- G. Deliconstantinos, E. Mykoriatis and D. Papadimitriou. Carbon tetrachloride modulates the rat hepatic microsomal UDPG-T activity and membrane fluidity, *Experientia* 42 (1986) 181-183.
- 46- M. Luquita, E. Sanchez, V. Catania and A. Mottino. Analysis of p-nitrophenol glucoronidation in hepatic

- microsomes from lactating rats. *Biochem. Pharm.* 47 (1994) 1179-1185.
- 47- R. Rednagel, E. Glende and A. Hruszkwycz. Free Radical in Biology and Medicine, W. A. Pryor Ed., Academic Press, New York, vol. 3, 1977, 97-130.
- 48- M. Berger, H. Bhatt, B. Combes and R. Estbrook. Carbon tetrachloride induced toxicity in isolated hepatocytes. The importance of direct solvent injury, *Hepatology* 6 (1986) 36-
- 49- M. Manno, F. D. Matteist and L. King. The mechanism of the suicidal reductive inactivation of microsomal cytochrome P₄₅₀ by CCl₄, *Biochem. Pharmacol.* 37 (1988) 1981-1990
- 50- R. Burk, K. Patel and J. Lane, Reduced glutathione protection against rat liver microsomal injury by carbon tetrachloride, *Biochem. J.* 215 (1983) 441-445.
- 51- R. Burke, J. Lane and K. Patel. Relationship of oxygen and glutathione in protection against CCl₄ induced hepatic microsomal lipid peroxidation and covalent binding in the rat, *J. Clin. Invest.* 74 (1984) 1996-2001.
- 52- M. Shimuju, S. Morita, T. Yamano and A. Yamada. Relationship between hepatic glutathione content and carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in vivo, *Tox. Lett* 47 (1989) 95-102.
- 53- W. Klinger, D. Muller, U. Kleeberg, M. Kretzchmer and F. Splinter, The influence of essential phospholipid on phase I and phase II reactions and on the glutathione status in the liver aging rats, *Exp. Pathol* 41 (1991) 151-156.

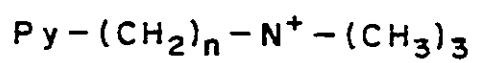
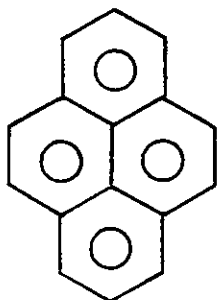
- 54- C. Costuma and R. Brenner. Effect of fatty acid deficiency on microsomal membrane fluidity and cooperativity of UDPG-T, *Biochem. Biophys. Acta.* 729 (1983) 9-16.
- 55- R. Brenner, Role of cholesterol in the microsomal membrane, *Lipids* 25 (1990) 581-585.
- 56- C. Neumann and V. Zannoni, Ascorbic deficiency and hepatic UDPG-T, *Biochem. Pharm.* 39 (1990) 1085-1093.
- 57- R. C. Rumbough, R. G. Kramer and H. Colby, Dose-dependent actions of thyroxine on hepatic drug metabolism in male and female rats, *Biochem. Pharm.* 27 (1978) 2027-2031.
- 58- D. Lowry, N. Rosebrough and J. Farr, Protein measurements with folin phenol reagents, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265-275.
- 59- T. Ohyashiki, Y. Kumada, N. Hatanaka and K. Matsui, Oxygen radical-induced inhibition of alkaline phosphatase activity in reconstituted membranes, *Arch. Biochem. Biophys.* 313 (1994) 310-317.
- 60- A. Buege and S. Aust, Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* 52 (1978) 302-310.
- 61- A. Nash, The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsh reaction. *Biochem. J.* 55 (1953) 416-421.
- 62- J. Isselbacher, F. Chrabas and C. Quin, Solubilization and partial purification of UDPG-T from rat liver, *J. Biol. Chem.* 237 (1962) 3033-3036.
- 63- H. Knauturirst, M. V. Encinas, F. Marcus, S. Latshaw, R. Kemp, P. Frey and E. Cardemil, *Saccharomyces cerevisiae*

- phosphoenol pyruvate carboxykinase: revised aminoacid sequence and microenvironment characteristics of cysteines Biochem. 34 (1995) 6382-6388.
- 64- V. Vincent and B. De Foresta. Anisotropy decays of n-(9-anthroyl) fatty acids in dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles with regard to isotropic solvents, Biochemistry 21 (1982) 708-716.
- 65- S. Kawato, K. Kinoshita and G. Ikigani, Dynamic structure of lipid bilayers studied by nanosecond fluorescence techniques, Biochemistry 16 (1977) 2319-2324.
- 66- G. Zavoico, L. Chandler and H. Kutchai, Perturbation of eggphosphatidylcholine and dipalmitoylphosphatidylcholine multilamellar vesicles by n-alkanols. A fluorescent probe study, Biochim. Biophys. Acta 812 (1988) 299-312.
- 67- E. Bastiaanse, H. Jongasma, A. Van Der Laase and B. Taken Kwak, Heptanol-induced decrease in cardiac gap junctional conductance is mediated by a decrease in the fluidity of membranous cholesterol rich domains. J. Membr. Biol. 136 (1993) 135-143.
- 68- M. Sanchez, M. Carrasco, L. Segovia and C. Marco. Persistence of the effects of ethanol in vitro on the lipid order and enzymes activities of chick-liver microsomes. Eur. J. Pharm. 292 (1995) 215-221.
- 69- M. Antunes-Madeira and M. Madeira. Membrane fluidity is affected by the insecticide lindane. Biochem. Biophys. Acta 982 (1989) 427-427.
- 70- S. Kitagawa and H. Hiroto. Effects of alcohols on

- fluorescence anisotropies of diphenylhexatriene and its derivatives in bovine blood platelets: relationship of the depth-dependent change in membrane fluidity by alcohols with their effects on platelet aggregation and adenylate cyclase activity. *Biochem. Biophys. Acta*, 1112 (1992) 14.
- 71- F. Vanstapel and N. Blanckaert, Topology and regulation of bilirubin UDPG-T in sealed native microsomes from rat liver, *Arch. Biochem. Biophys.* 261 (1988) 216-225.
- 72- L. Lear, R. Nation and L. Stupans. Effects of cyclophosphamide and adriamycin on rat hepatic microsomal glucuronidation and lipid peroxidation. *Biochem. Pharm.* 44 (1992) 747-753.
- 73- M. Engelke, U. Bergmann and H. Diehl. Fluidity of the microsomal membrane and cytochrome P₄₅₀ reduction Kinetics of pig liver microsomes as a consequence of organic solvent impact, *Xenobiotica* 23 (1993) 71-78.
- 74- T. Dinis, L. Almeida and V. Madeira, Lipid peroxidation in sarcoplasmic reticulum membranes: effects on functional and biophysical properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 301 (1993) 256-264.
- 75- J. Gut, S. Kawato, R. Cherry, K. Winterhalter and C. Richter. Lipid peroxidation decreases the rotational mobility of cytochrome P₄₅₀ in rat liver microsomes. *Biochim. Biophys. Acta* 817 (1985) 217-228.
- 76- H. Groot, T. Noll and T. Tölle. Loss of latent activity of rat liver microsomal membrane enzymes evoked by lipid peroxidation. Studies of nucleoside diphosphatase,

glucose-6-phosphatase, and UDPG-T. *Biochim. Biophys. Acta.* 815 (1985) 91-96.

- 77- H. Utsumi, J. Murayama and A. Hamada. Structural changes of rat liver microsomal membranes induced by the oral administration of carbon tetrachloride, *Biochem. Pharm.* 34 (1985) 57-63.
- 78- E.A. Lissi, H. Rosenbluth. Disruption effects of carbon tetrachloride on rat liver microsomes. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 17 (1993) 33-40.



n = 1 PMTMA

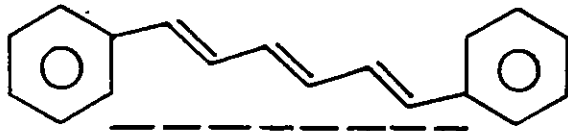
n = 4 PBTMA

n = 3 PUTMA

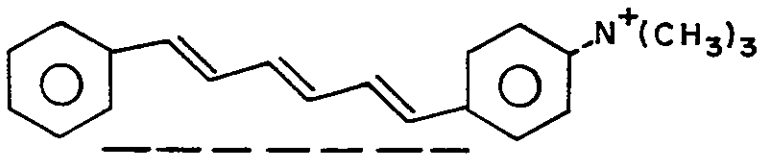
Esquema 1

Pireno y sus derivados

1. Sondas lineales

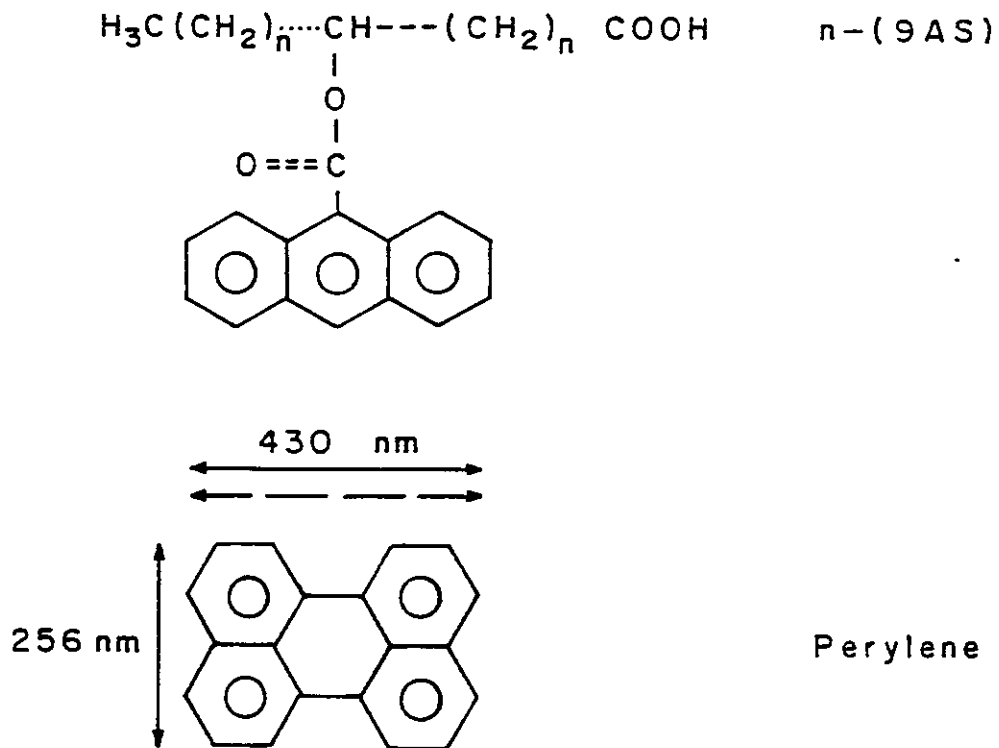


DPH



TMA-DPH

2. Sondas no-lineales



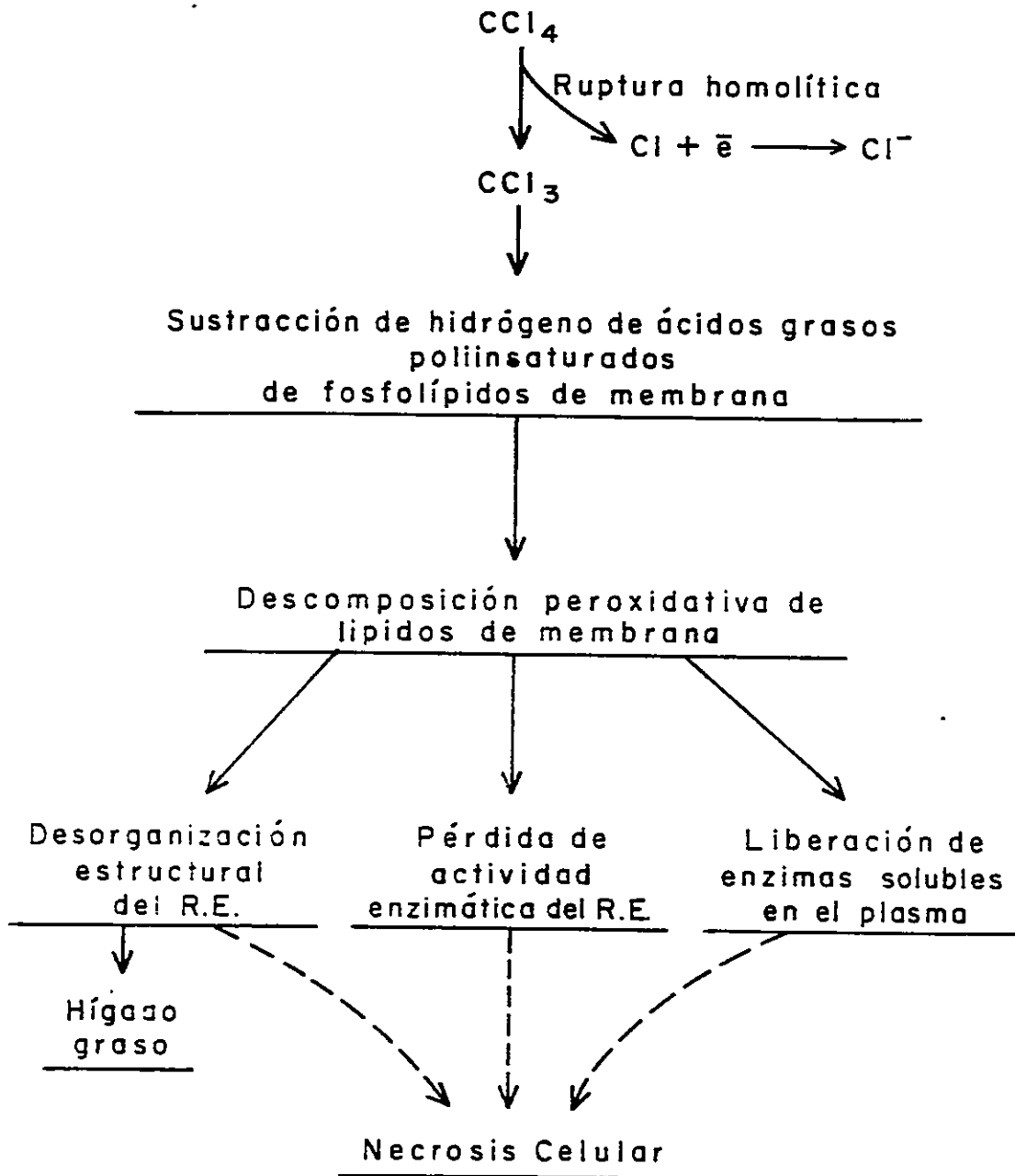
Esquema 2.

Sondas fluorescentes utilizadas en el estudio de fluidez de membrana.

DPH = Difenil hexatrieno.

TMA-DPH = 1-(4'-trimetil-fenilamonio)-6-fenil-1,3,5-hexatrieno.

$n = (9\text{AS}) =$ Derivados del antraceno.



Esquema 3.

Hipótesis de la citotoxicidad inducida por CCl_4

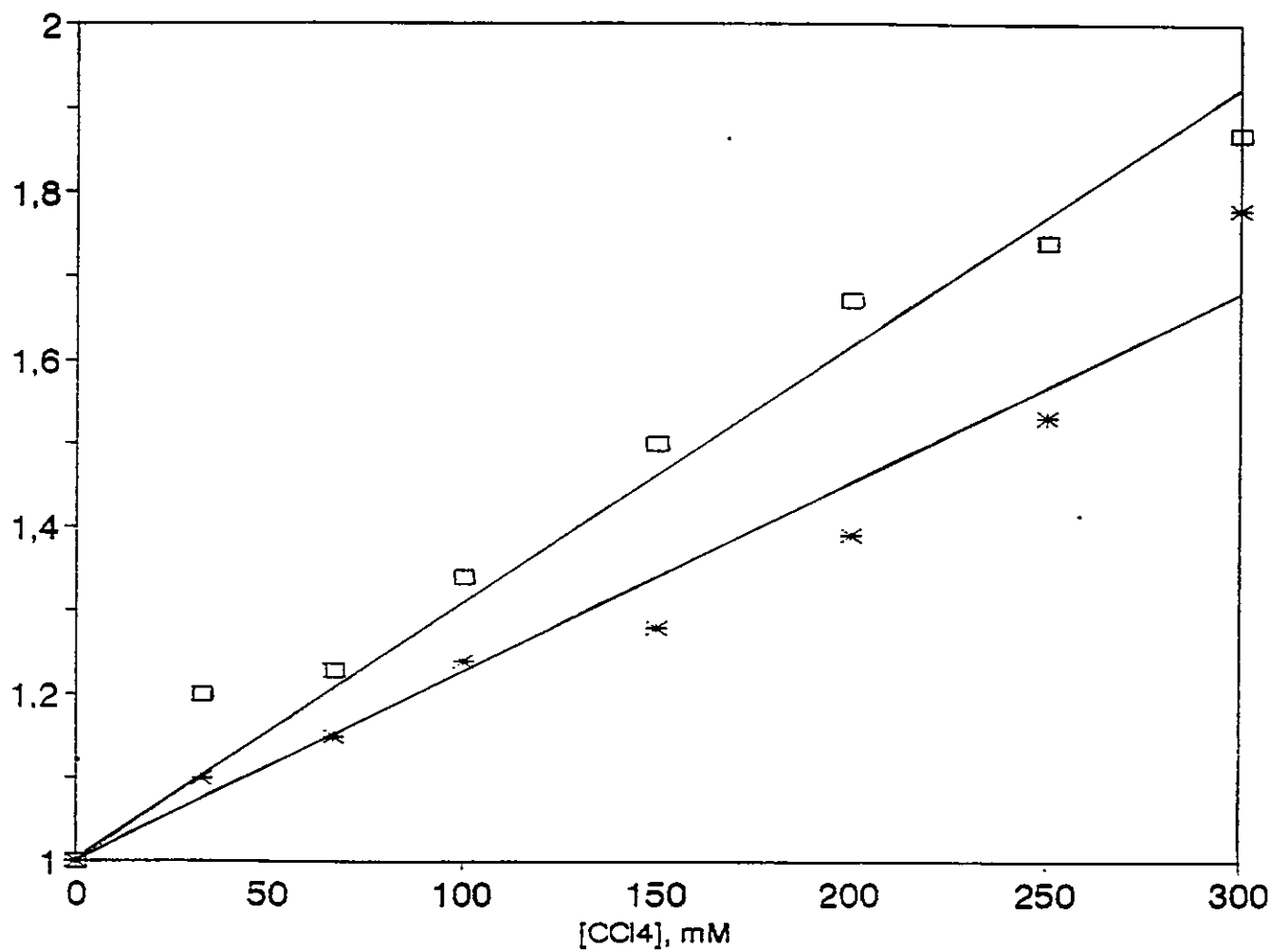


Figura 1 A

Efecto del Oxígeno sobre la Constante de Desactivación de la Sonda PMTMA por CCl₄ en una Suspensión Microsomal (0.9 mg prot/ml) a 37 °C

□ presencia de oxígeno

* ausencia de oxígeno

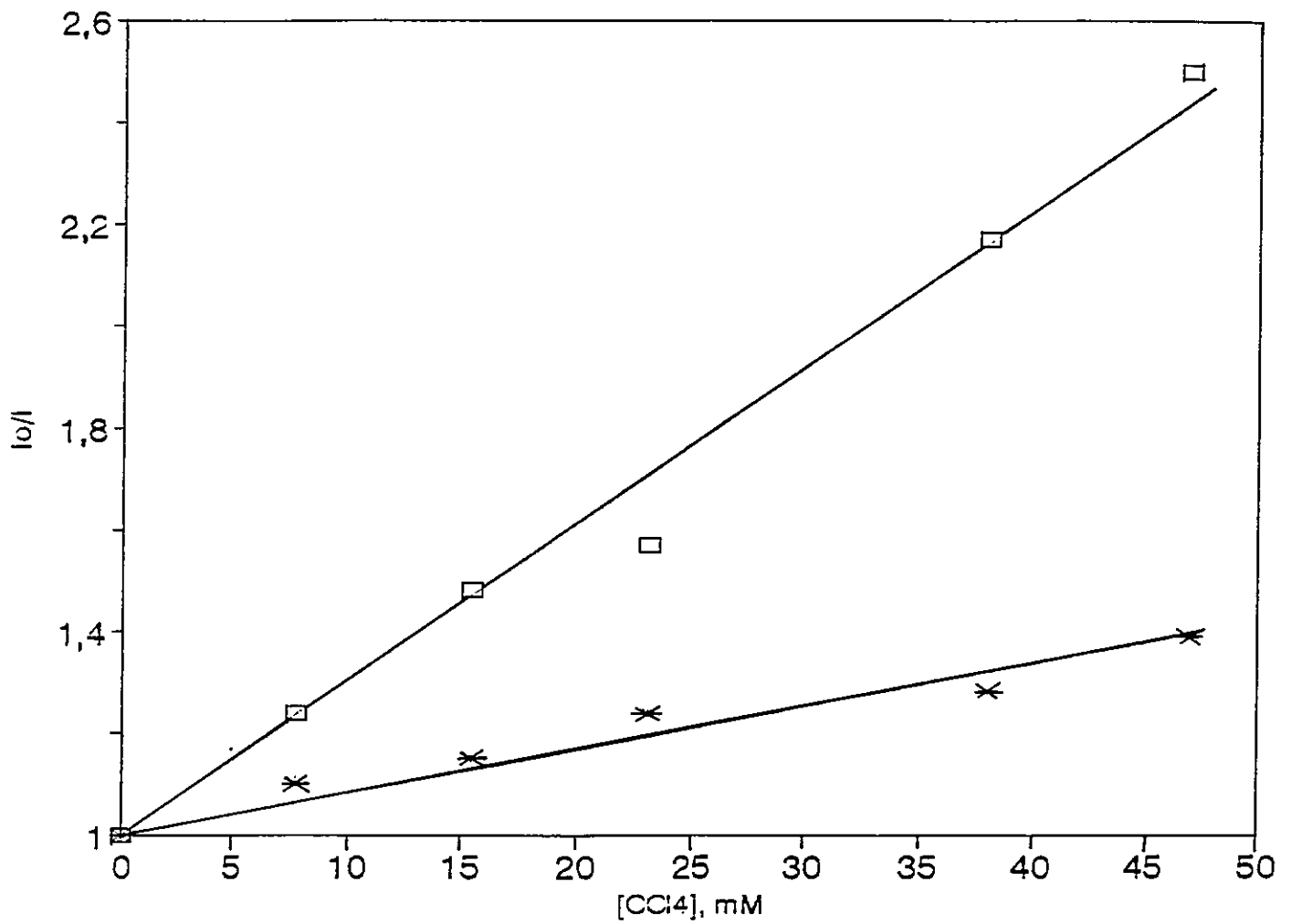


Figura 1 B

Efecto del Oxígeno sobre la Constante de Desactivación de la Sonda PBTMA en una Suspensión Microsomal (0.9 mg prot/ml) a 37 °C.
□ en presencia de oxígeno.
* en ausencia de oxígeno.

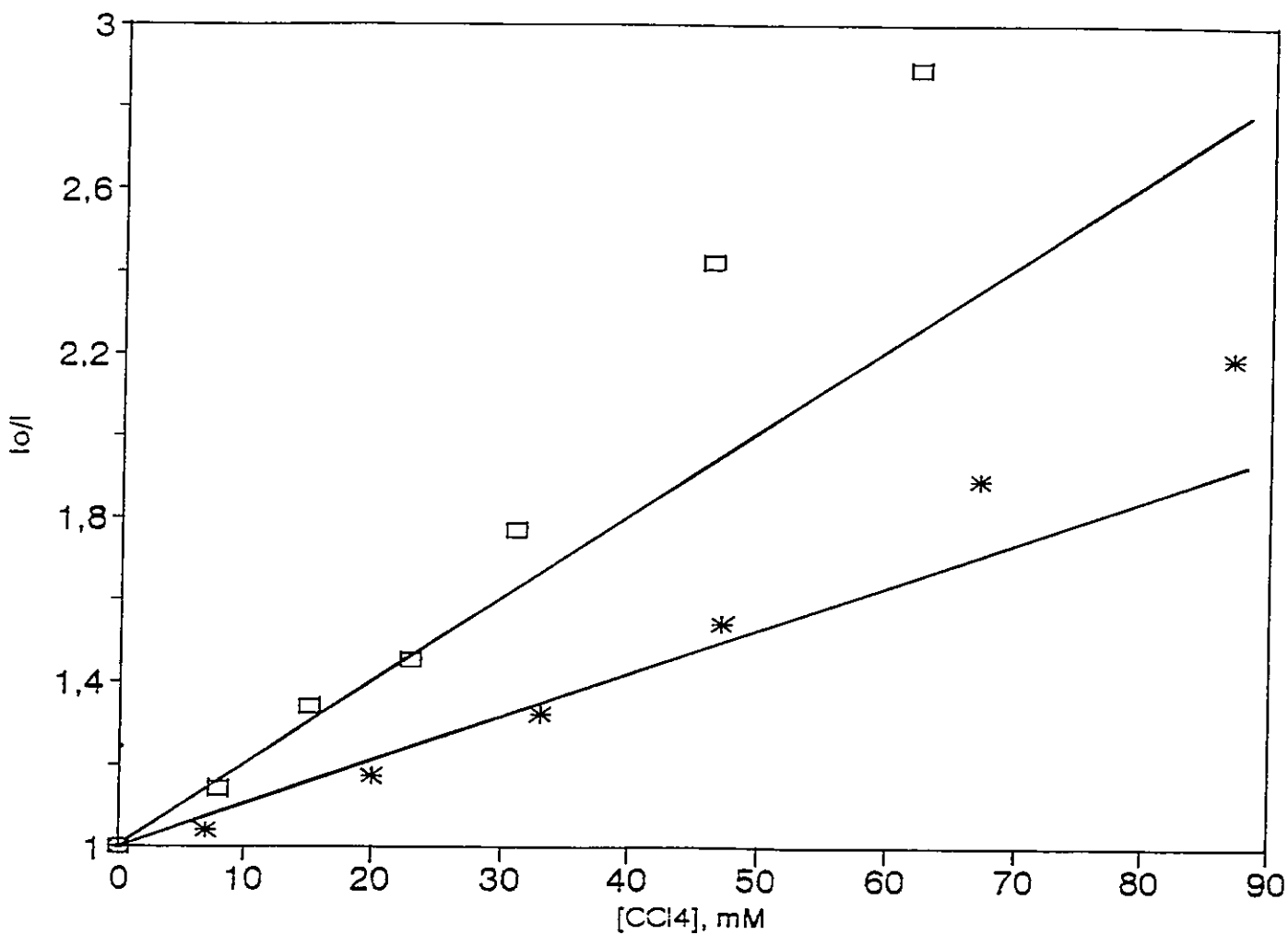


Figura 1 C

Efecto del Oxígeno sobre la Constante de Desactivación de la Sonda PUTMA en una Suspensión Microsomal (0.9 mg prot/ml) a 37 °C.

□ en presencia de oxígeno

* en ausencia de oxígeno

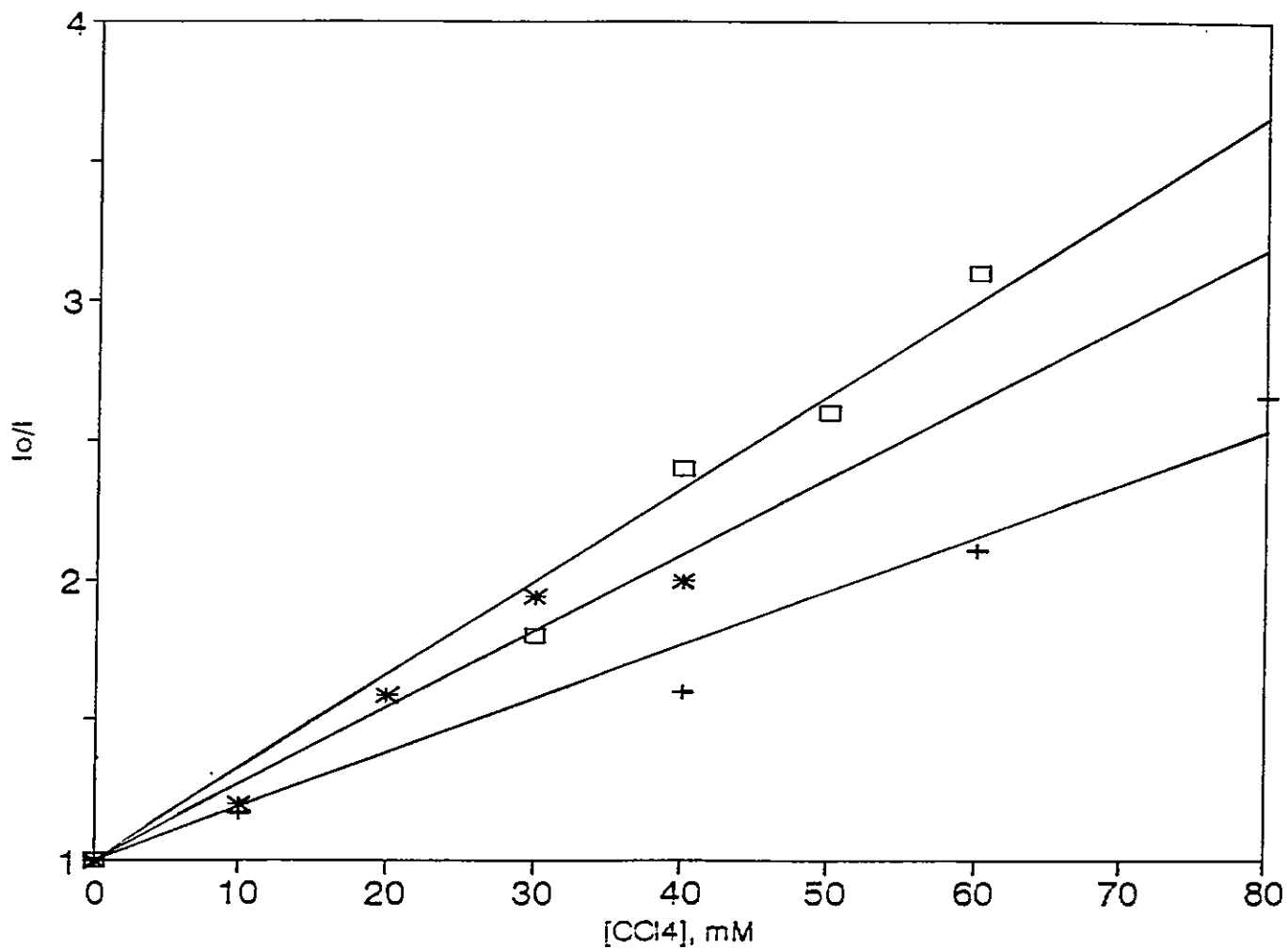


Figura 2

Efecto de la Concentración de Proteínas de la Suspensión Microsomal sobre la Constante de Desactivación de la Sonda PUTMA por CCl_4 a $37^\circ C$.

\square , 0.35 mg prot/ml ; *, 0.7 mg prot/ml ; +, 1.4 mg prot/ml.

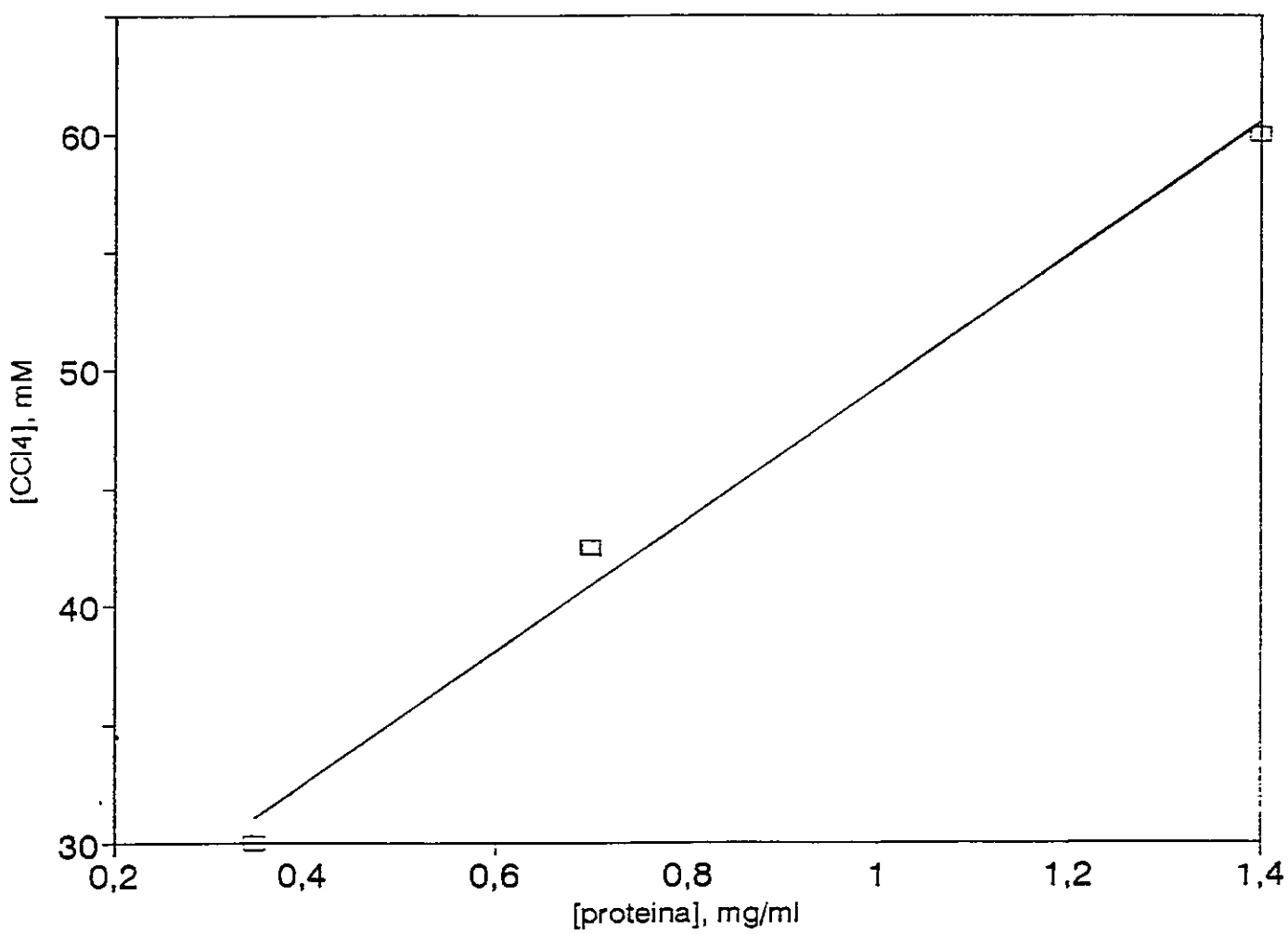


Figura 3

Reparto de CCl₄ entre las fases microsomales
y acuosas a 37°C

Sonda utilizada: PUTMA.

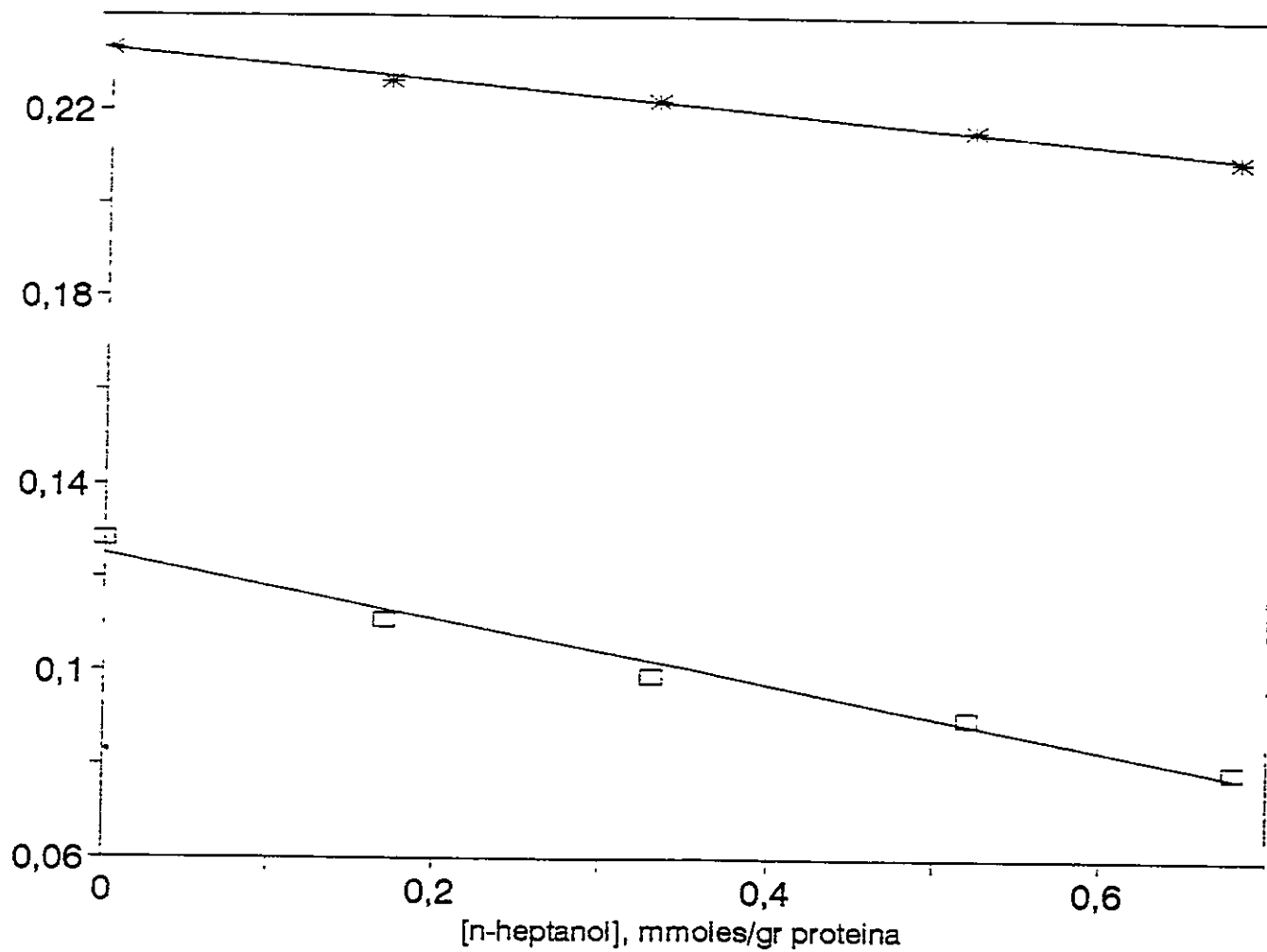


Figura 4 A

Efecto del n-heptanol sobre los valores de anisotropías de la sondas DPH (□) y TMA-DPH (*) asociadas a la membrana microsomal.

Experimento realizado a 37°C.

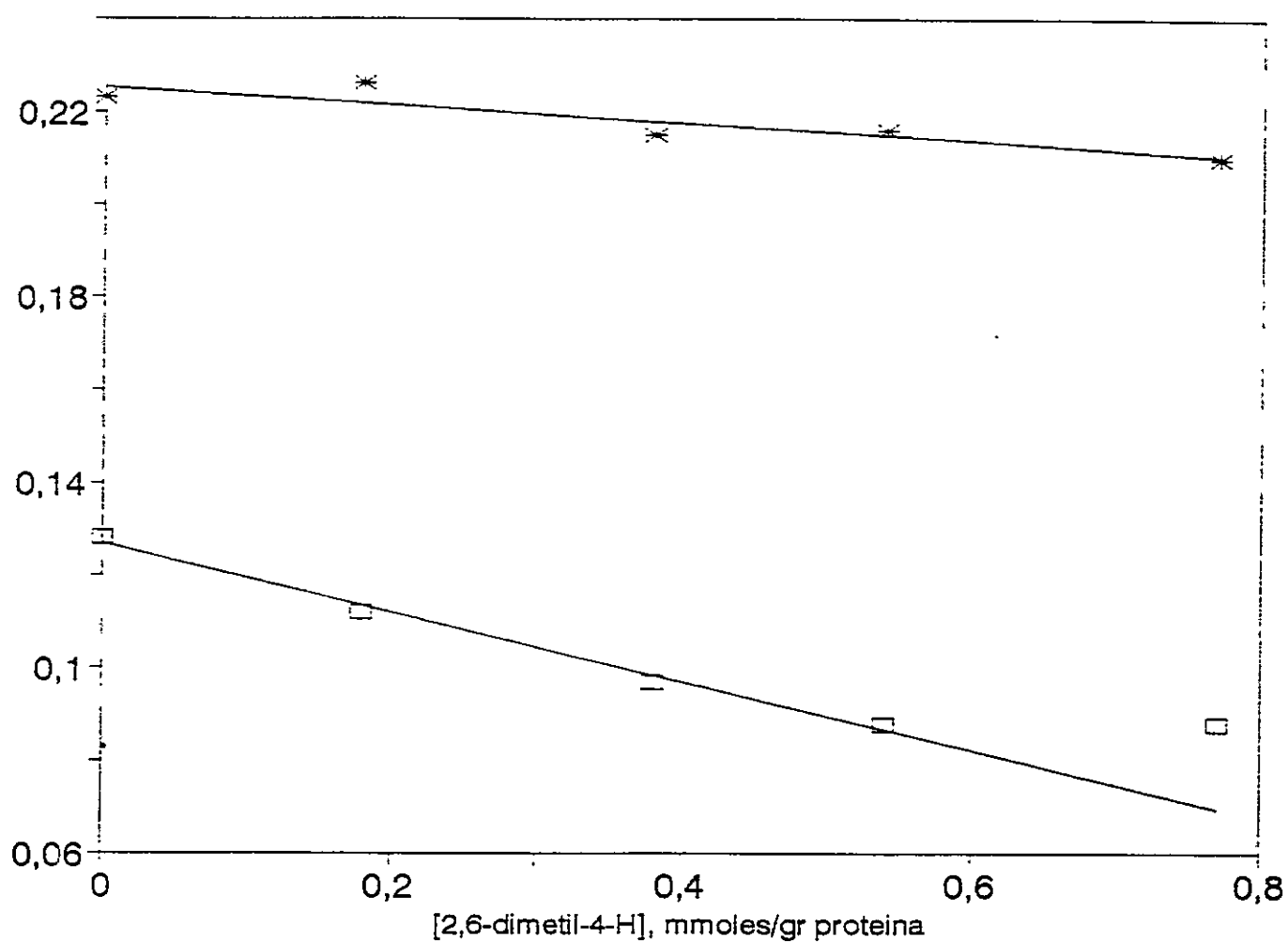


Figura 4 B

Efecto del 2,6-dimetil-4-heptanol sobre los valores de r. DPH (□) y de r. TMA-DPH (*) a 37°C.

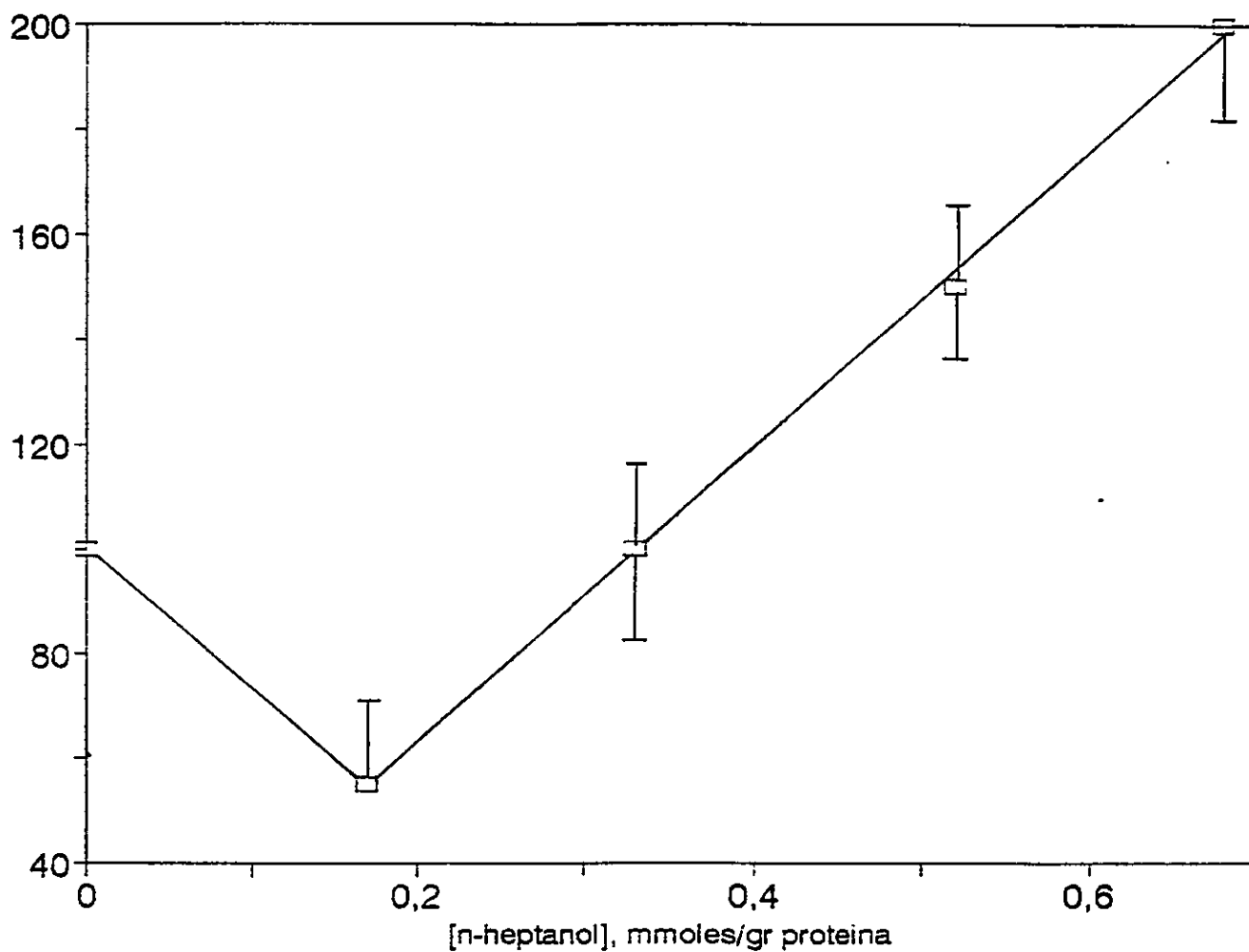


Figura 5 A

Efecto del n -Heptanol sobre la Actividad de la UDPG-T Microsomal a 37 °C.

La actividad enzimática se expresa como porcentaje respecto al control (en ausencia de alcohol) y representa el promedio \pm S.D. de 5 experimentos.

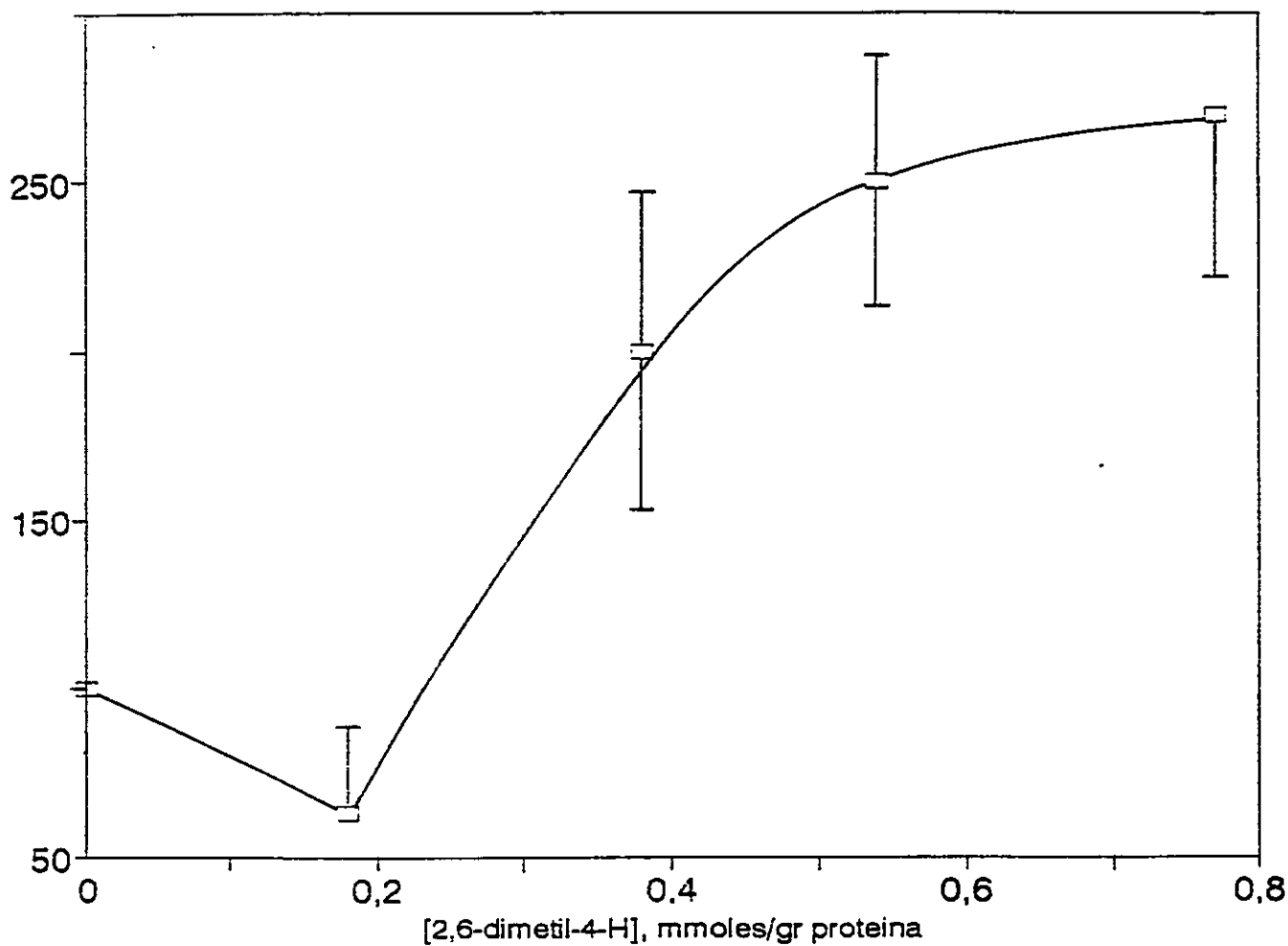


Figura 5 B

Efecto del 2,6-Dimetil-4-Heptanol sobre la Actividad de la UDPG-T Microsomal a 37 °C. La actividad se expresa como porcentaje respecto al control y representa el promedio \pm S.D. de 5 experimentos.

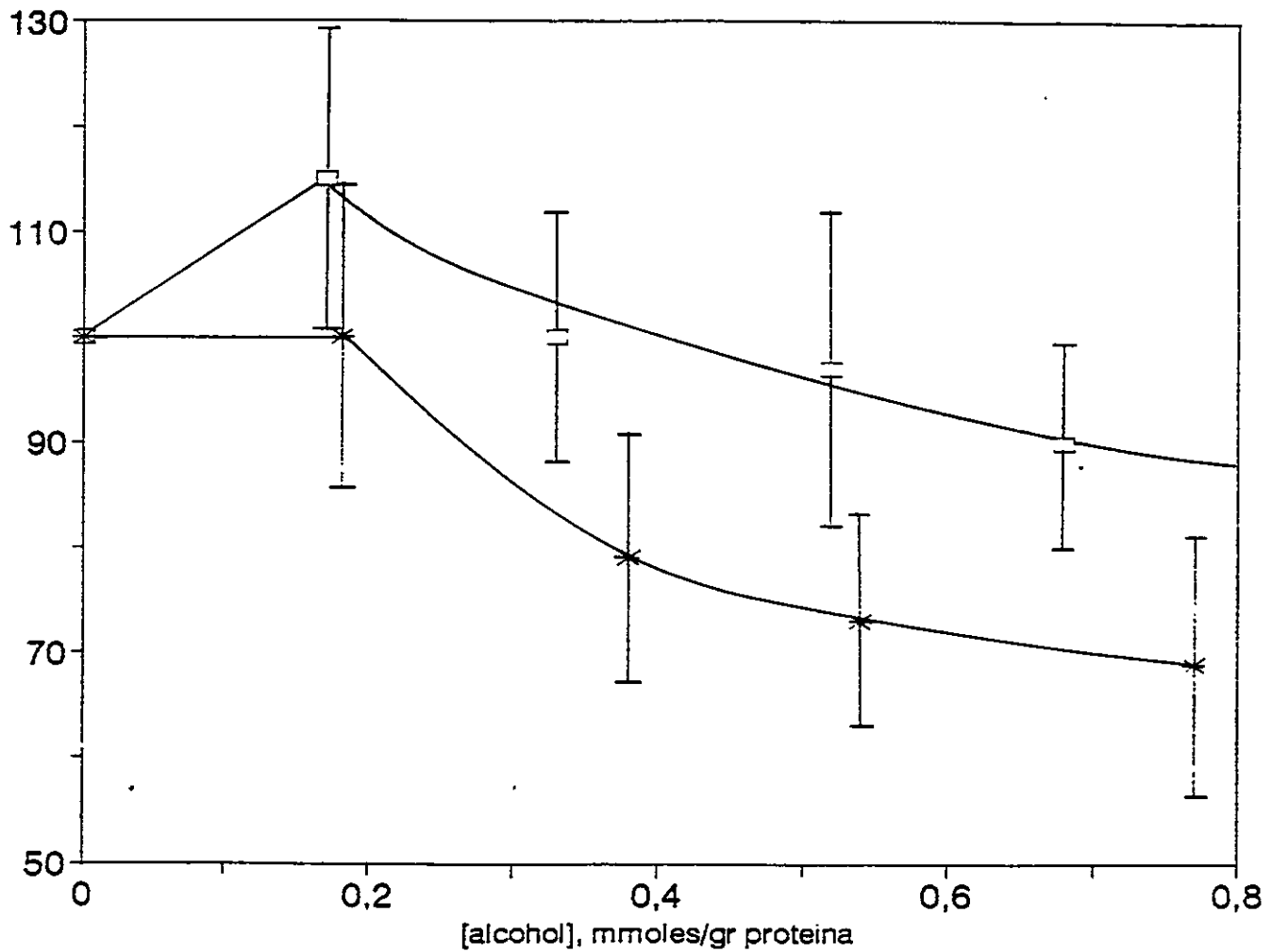


Figura 6

Efecto del n-Heptanol y del 2,6-Dimetil-4-Heptanol sobre la Actividad de la N-Demetilasa Microsomal a 37 °C.

□, n-heptanol; *, 2,6-dimetil-4-heptanol.

La actividad se expresa como porcentaje del control y representa el promedio \pm S.D. de 5 experimentos.

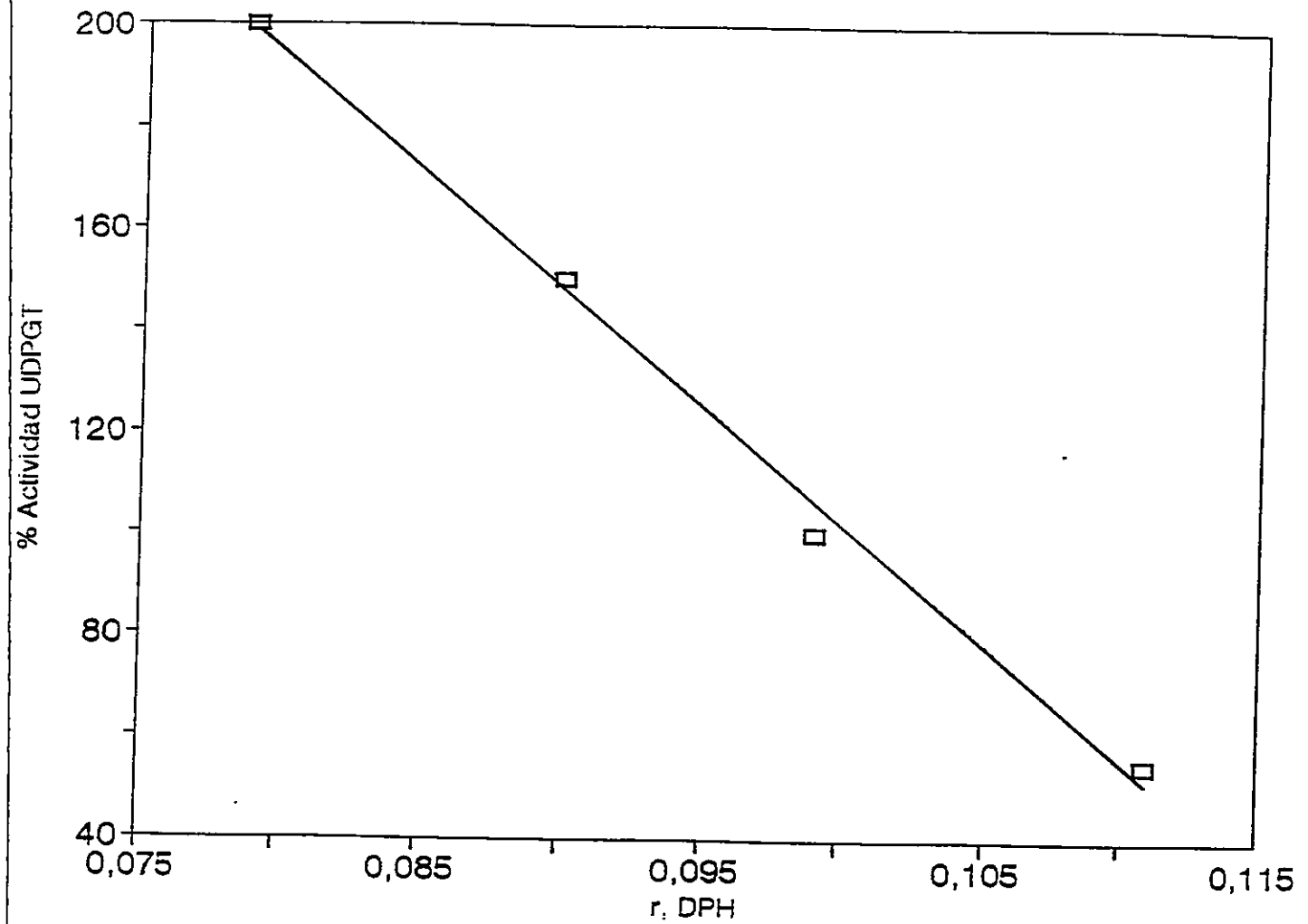


Figura 7 A

Estudio de correlación entre los valores de r, DPH y la actividad de la UDPG-T.

Los cambios en las dos variables fueron inducidos por n-heptanol a 37°C.

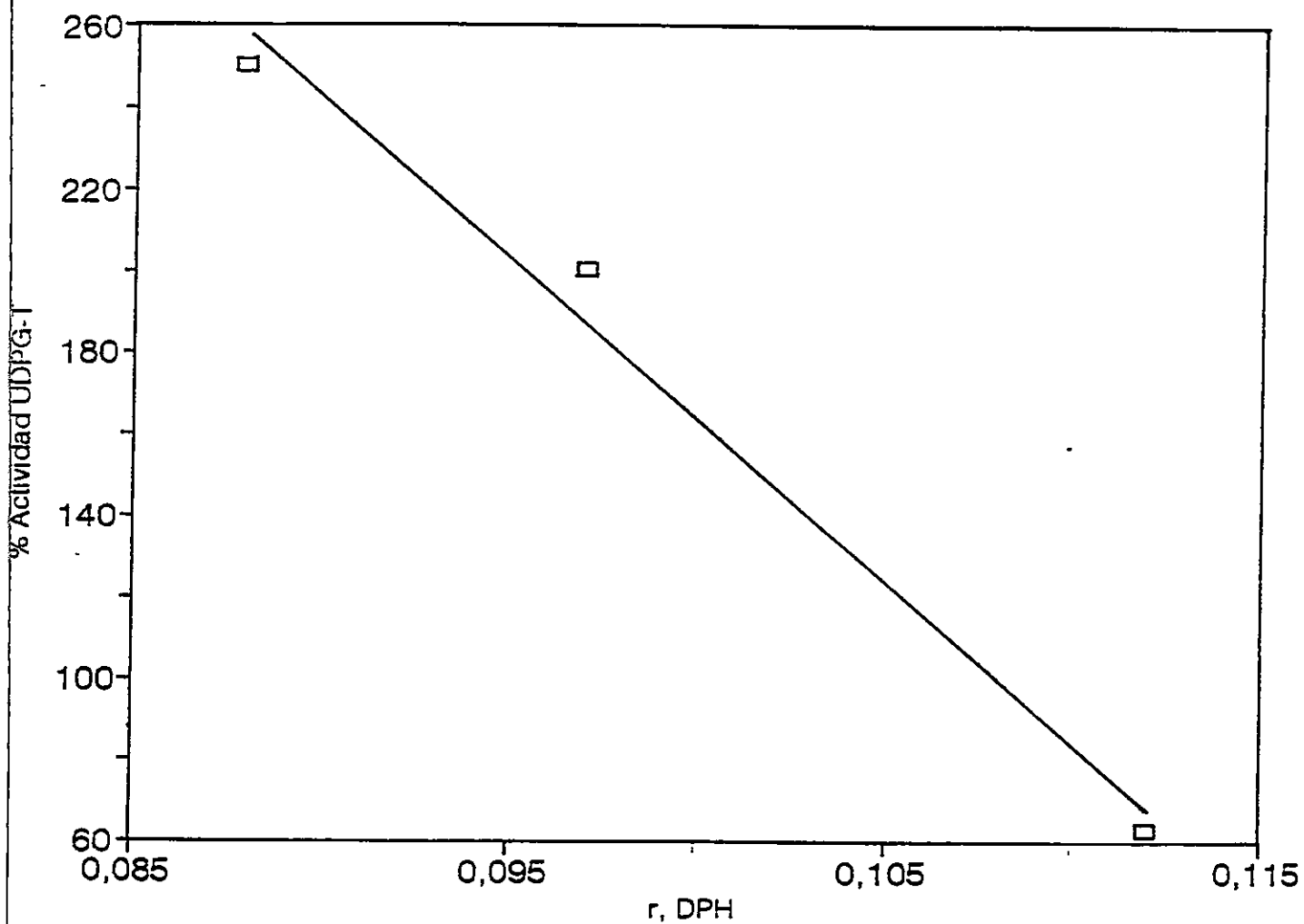


Figura 7 B

Estudio de correlación entre los valores de r, DPH y la actividad de la UDPG-T.

Los cambios en las variables fueron inducidos por 2,6-dimetil-4-heptanol a 37°C.

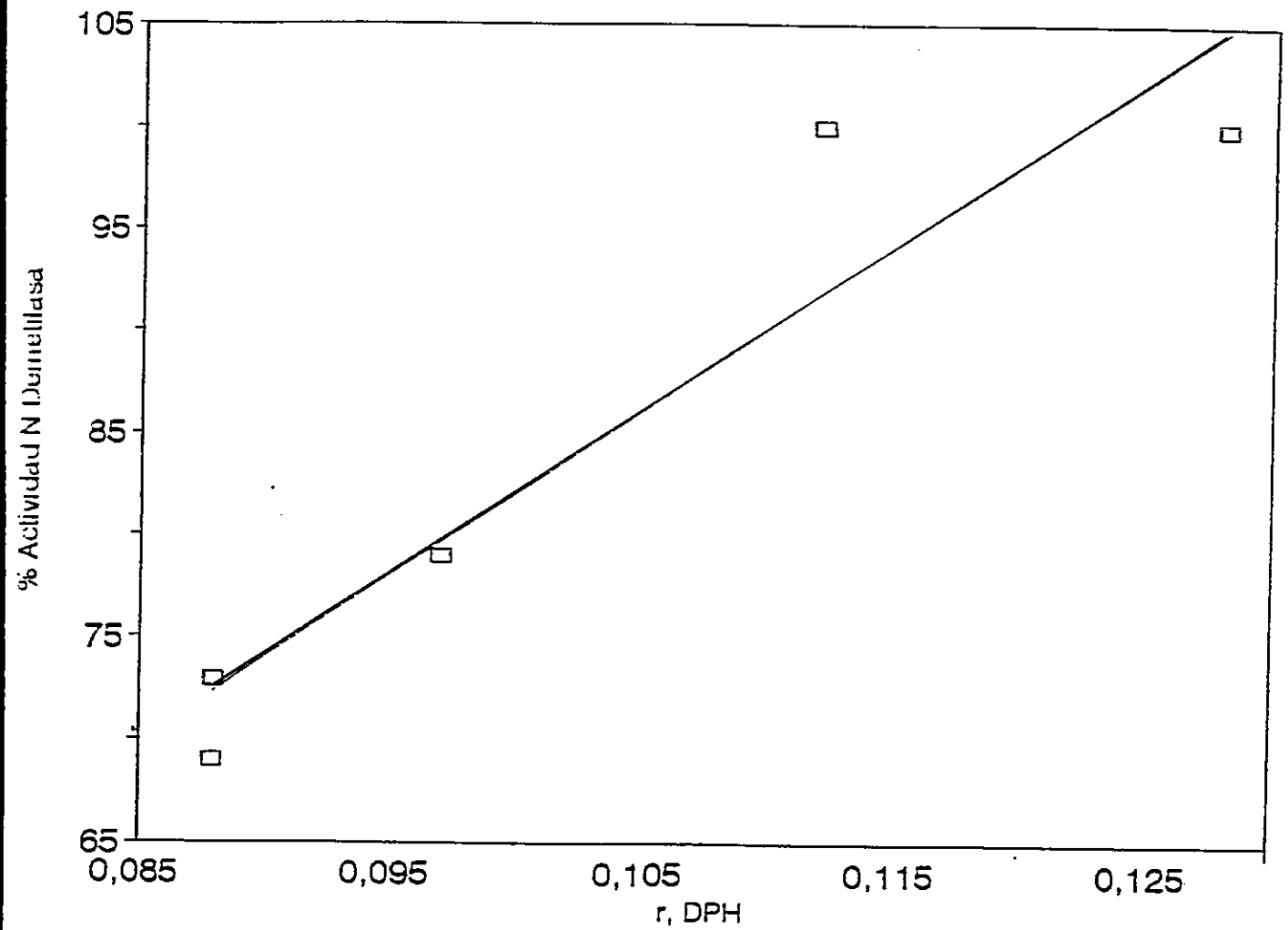


Figura 8

Estudio de correlación entre los valores de r, DPH y la actividad de la N-demetilasa.

Los cambios en las variables fueron inducidas por 2,6-dimetil-4-heptanol.

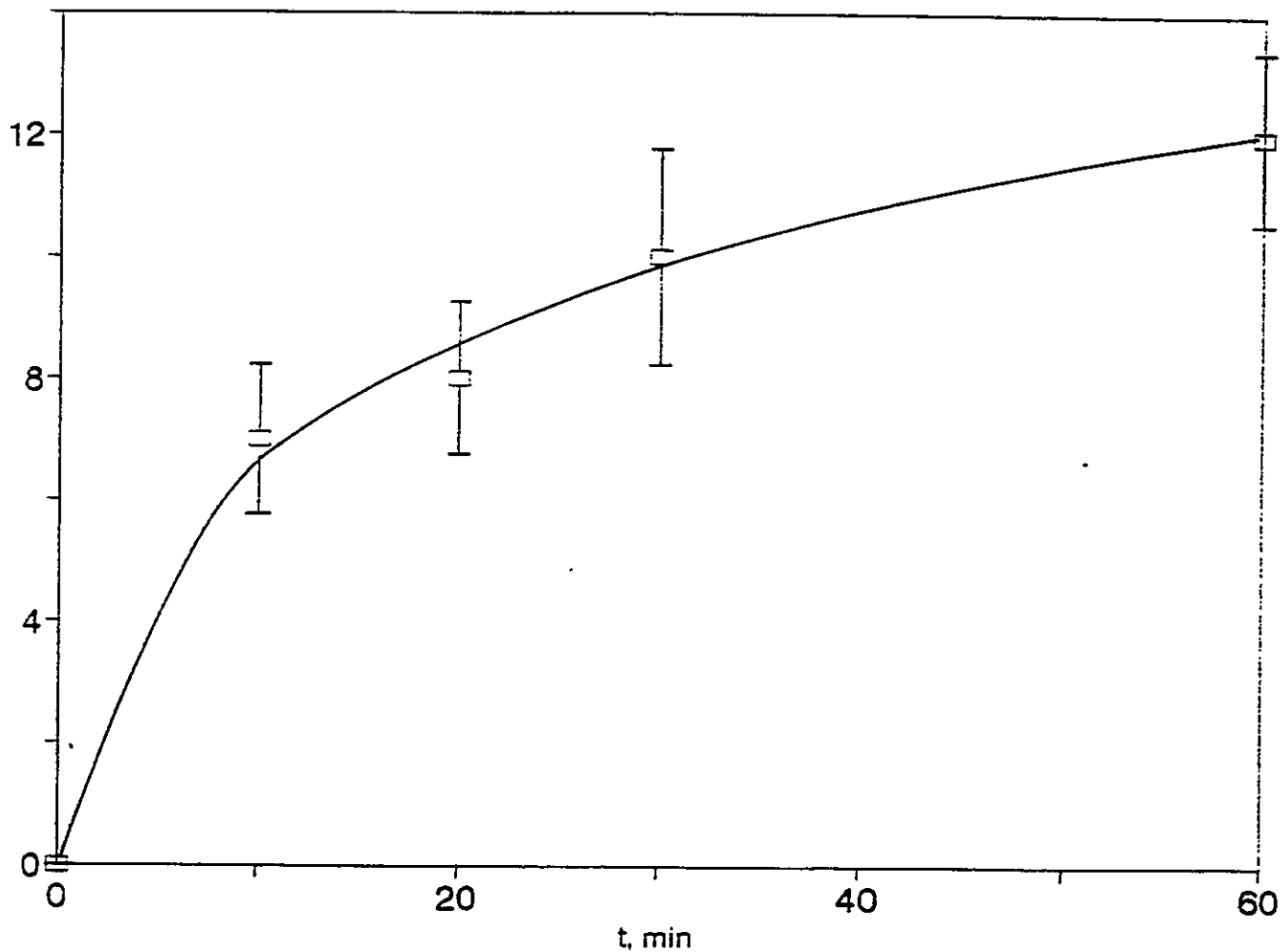


Figura 9 A

Efecto del Tiempo de Inducción del Estrés Oxidativo sobre la Lipoperoxidación en Membranas Microsomales a 37°C.

La formación de TBA-RS se utilizó como índice de lipoperoxidación. Se expresa como n moles de MDA por mg de prot/ml y representa el promedio \pm S.D. de 3-5 experimentos.

Sistema lipoperoxidante: Fe^{2+} y ácido ascórbico

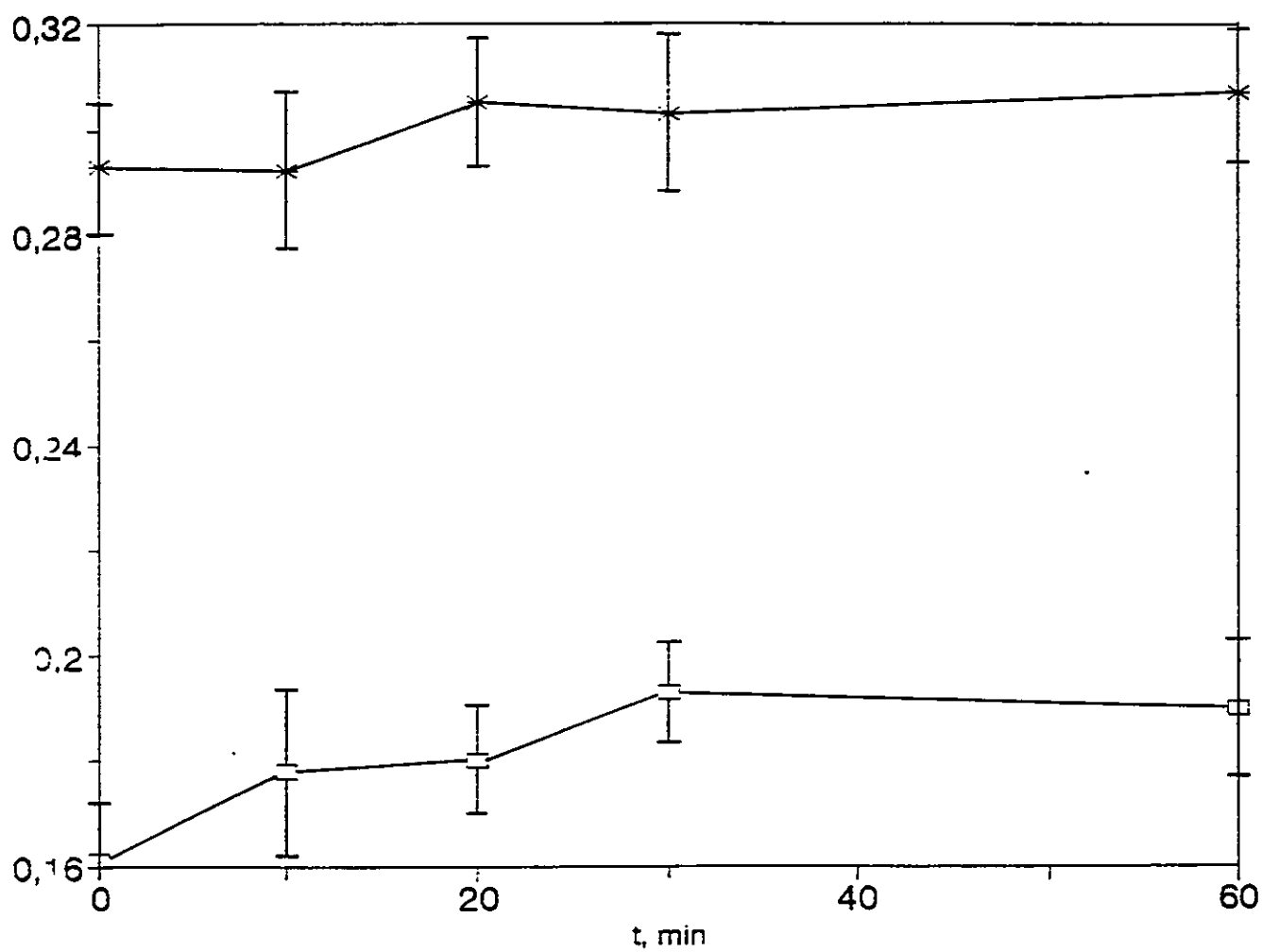


Figura 9 B

Efecto del Tiempo de Lipoperoxidación sobre las Anisotropías de fluorescencia en Estado Estacionario.

Se utilizó una suspensión microsomal de 0.2 mg prot/ml

□, DPH ; *, TMA-DPH.

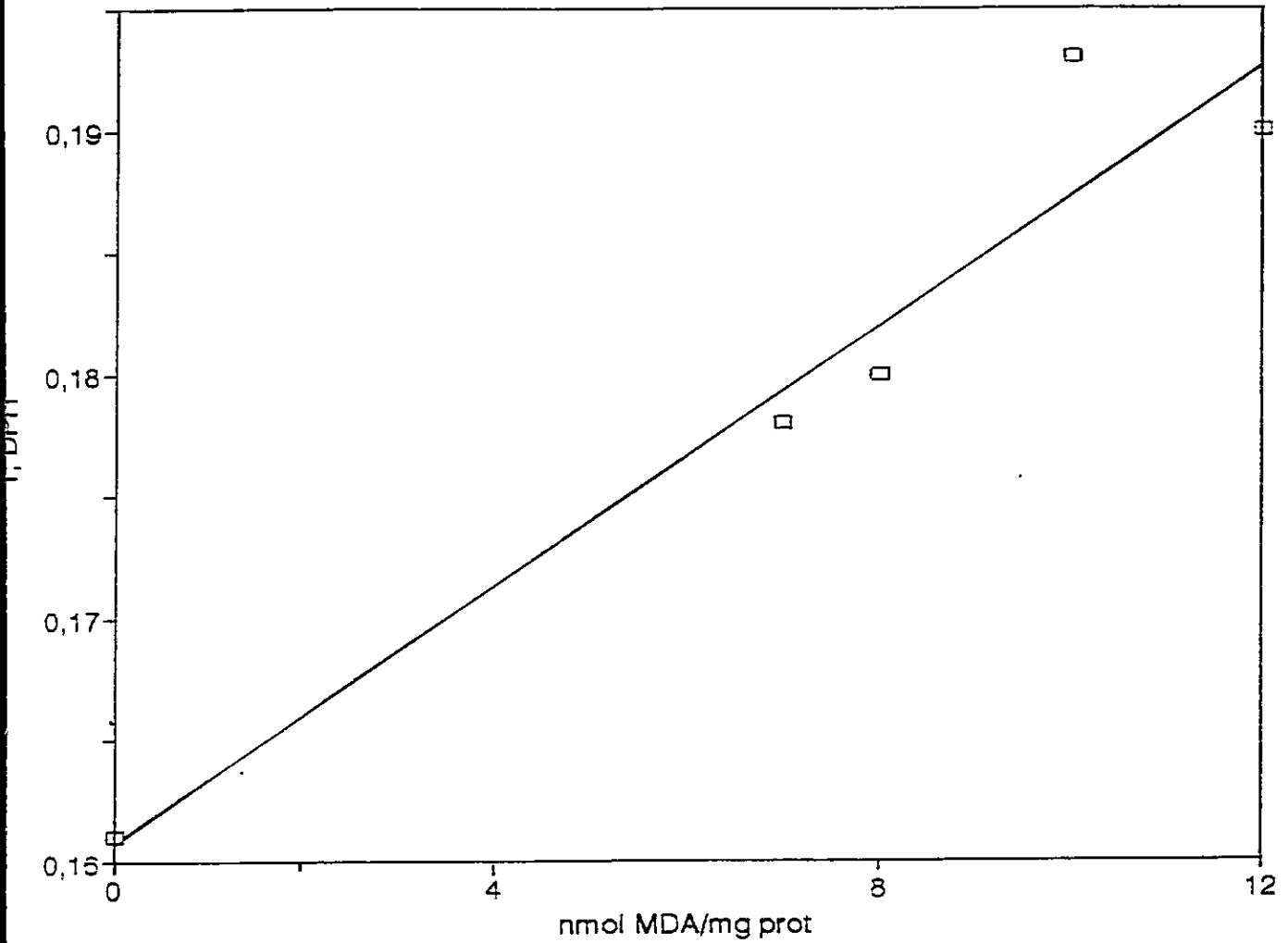


Figura 10

Correlación entre los valores de r, DPH y grado de lipoperoxidación en membranas microsomales.

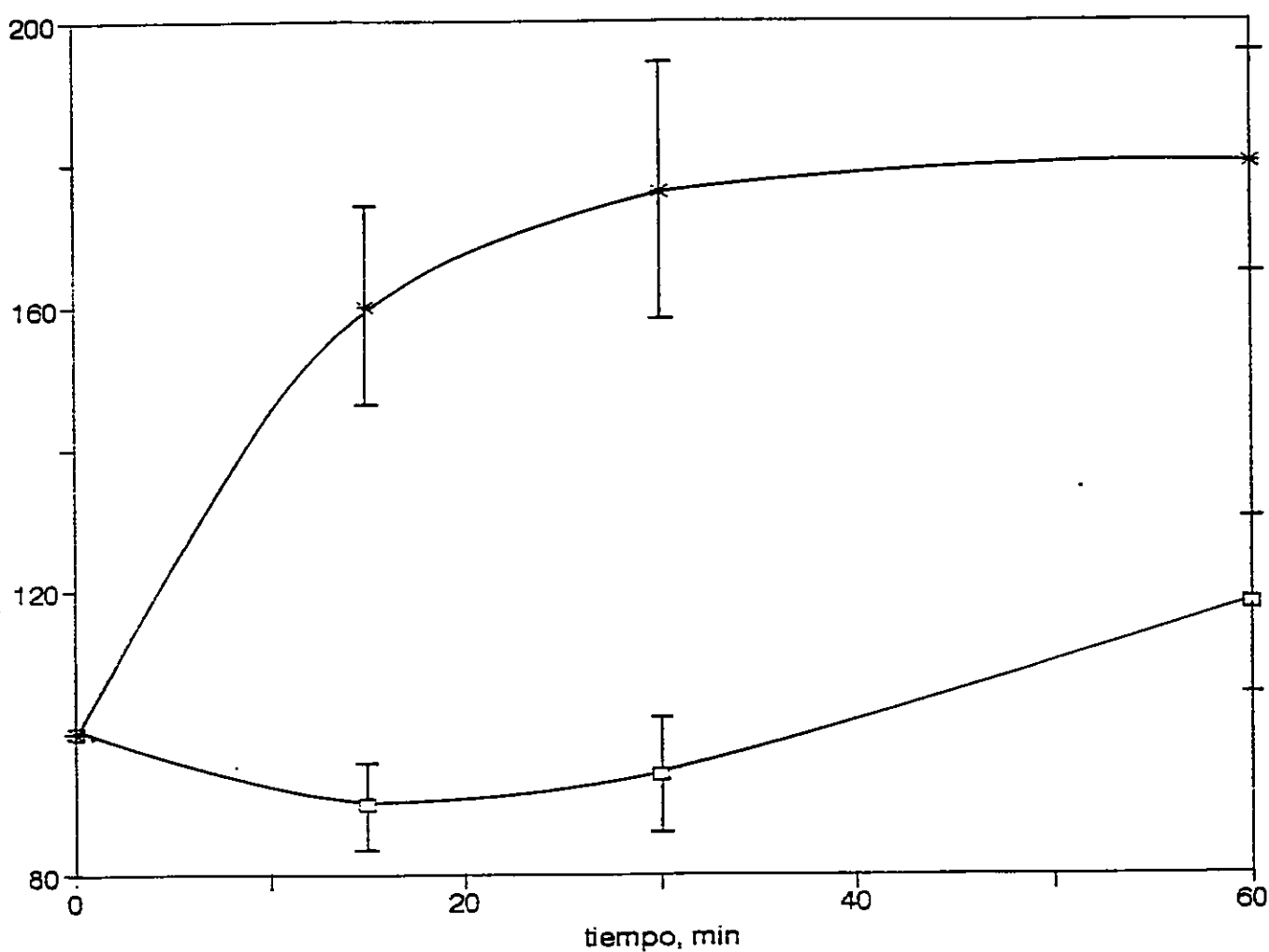


Figura 11 A

Efecto de la Lipoperoxidación sobre la Actividad de la UDPG-T Microsomal.

Los microsomas fueron incubados a 37 °C en presencia (*) y en ausencia (□) de lipoperoxidación.

Las actividades se expresan como porcentaje del control y representan el promedio \pm S.D. de 3-5 experimentos.

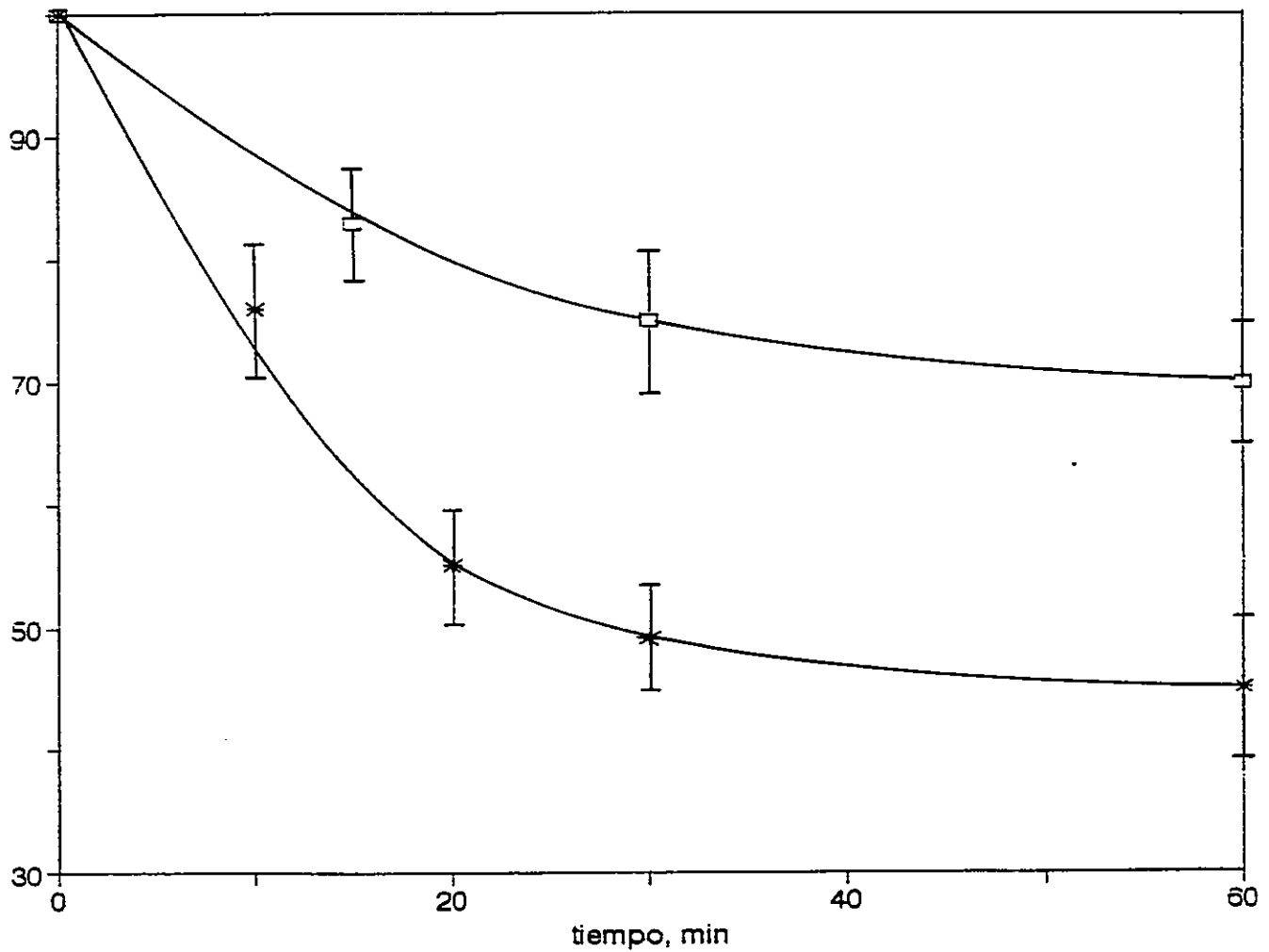


Figura 11 B

Efecto del Tiempo de Lipoperoxidación sobre la Actividad de la N-Demetilasa Microsomal. Los microsomas se incuban a 37 °C en presencia (*) y ausencia de(□) lipoperoxidación. Las actividades se expresan como el promedio \pm S.D. de 3-5 experimentos .

TABLA 1

Tiempos de Vida de Derivados del Pireno bajo Distintas Concentraciones de Oxígeno a 37 °C en una Suspensión Microsomal.

Sonda	τ , ns		
	Nitrógeno	Aire	Oxígeno
PMTMA	68±2	55±1	35±1
PBTMA	145±6	93±2	46±2
PUTMA	156±8	92±3	40±1
BP	29±2	26±1	18±1
MP	89±5	67,5±2	-

Los valores representan el promedio ± D.E de 5 experimentos.

TABLA 2

Tiempos de Vida (τ ns) de Derivados del Pireno bajo Nitrógeno y Aire a 37 °C en Diferentes Medios.

Sonda	Etanol:Agua (1:1)		Etanol		Etanol:Heptanol (1:1)	
	τ_N	τ_A	τ_N	τ_A	τ_N	τ_A
PMTMA	47	31,7	44	17,1	49	15,7
PBTMA	204	80,0	232	25,0	221	17,4
PUTMA	181	81,0	181	27,5	218	14,6
BP	47	33,0	51	20,2	49	12,1

TABLA 3

Tiempos de Vida bajo Nitrógeno τ_{Nit} de Derivados del Pireno a 37 °C en Distintos Medios.

Sonda	τ_{Nit} (ns)			
	Agua	Etanol	Microsomas	Fantasma ^a
PMTMA	50	44	68±7	76±1
PBTMA	97	232	145±6	205±2
PUTMA	-	181	156±8	206±2
MP	-	190	129±10	-
BP	-	51	29±2	-

a- Ref. [14]

TABLA 4

Constantes de Desactivación de Derivados del Pireno por Ioduro en Diferentes Medios a 37 °C

Sonda	Etanol:Agua	Etanol	Etanol:Heptanol	Microsomas
	(1:1)		(1:1)	
PMTMA	27,0	75,0	200,4	6,0
PBTMA	2,0	12,0	100,8	0,4
PUTMA	0,7	3,4	17,0	<0,4
BP	1,3	2,0	1,7	N.Q.

$k_q(I^-)$: en $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

N.Q. significa que no se alcanza a detectar ningún efecto sobre la intensidad de fluorescencia

TABLA 5

Constantes de Desactivación de Derivados del Pireno por Acrilamida en Diferentes Medios a 37 °C

$$k_q (10^9 M^{-1} s^{-1})$$

Sonda	Agua	Etanol:Agua	Etanol	Microsomas
PMTMA	0,6	N.Q.	N.Q.	N.Q.
PBTMA	5,0	0,12	N.Q.	N.Q.
PUTMA		0,092	N.Q.	N.Q.
BP		0,044	N.Q.	N.Q.

k_q (Acrilamida) : en $10^8 M^{-1}s^{-1}$

N.Q. significa que no se alcanza a detectar ningún efecto sobre la intensidad de fluorescencia

TABLA 6

Constantes de Desactivación por Oxígeno, k_{ox}^a , para Derivados del Pireno a 37 °C

Sonda	Agua	Etanol	Microsomas	Fantasmas
PMTMA	18	180	14±1,2	9±1
PBTMA	16	180	15±1,3	16±1
PUTMA	-	155	19±0,8	20,5±1,5
MP	-	150	16±1	-
BP	-	-	21±2	-

a- k_{ox} en $10^6 s^{-1}$. Los valores representan el promedio ± la desviación estándar de 5 experimentos diferentes.

Tabla 7

Parámetros de Anisotropía de los Derivados del Antraceno y del Difenilhexatrieno en una Suspensión Microsomal (0,25 mg proteína/ml) a 37 °C.

Sonda	τ (ns)	r_s	R (1/ns)	Φ (ns)
2-AS	5,52±0,2	0,106±0,003	0,035	4,76
7-AS	6,49±0,17	0,079±0,005	0,050	3,30
12-AS	8,22±0,1	0,061±0,004	0,056	2,98
DPH	5,40±0,06	0,123±0,002	0,068	2,44

Φ representa el tiempo de correlación rotacional; y R representa el coeficiente de difusión rotacional.

Tabla 8

Constantes de Desactivación por Tetracloruro de Carbono de Derivados del Pireno en Varios Medios a 37 °C.

Sonda	k_0 ($10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)		
	Etanol/Heptanol (1:1)	Etanol/Agua (1:1)	Microsomas
PMTMA	0,02	0,29	2,5±0,3
PBTMA	0,4	2,20	8,0±1,6
PUTMA	0,4	2,30	7,5±1,7
MP	0,4	3,10	28,0±2,0
BP	0,13	0,70	11,0±1,1

Las constantes de desactivación se midieron bajo nitrógeno. Se utilizó una suspensión microsomal de 0,9 mg de proteína/ml. Los valores representan el promedio ± la desviación estándar de 5 muestras de microsomas.

Tabla 8A

Constantes Normalizadas de Desactivación por Tetracloruro de Carbono en Microsomas.

Sonda	k_q/k_{EH}	k_q/k_{EA}
PMTMA	125	8,6
PBTMA	20	3,6
PUTMA	19	3,2
MP	70	9,0
BP	85	16,0

k_q/k_{EH} : Razón de constantes de desactivación en microsomas y mezcla etanol:heptanol 1:1

k_q/k_{EA} : Razón de constantes de desactivación en microsomas y mezcla etanol:agua 1:1

TABLA 9

Estimación del Efecto del Tetracloruro de Carbono sobre la Constante de Desactivación de Derivados del Pireno por Oxígeno (k_{ox}), a 37 ° C.

Sonda	α ($10^9 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$)	$[\text{CCl}_4]^b$ mmoles/g prot
PMTMA	13±4.0	0.67±0.20
PBTMA	100±12.0	0.09±0,01
PUTMA	80±15.0	0.15±0.03
MP	70±20.0	0.14±0,04
BP	45±15.0	0.29±0.03

^bConcentración intramicrosomal necesaria para aumentar la k_{ox} al doble.

TABLA 10

Efecto del Tetracloruro de Carbono sobre las Parámetros de Anisotropía del 2-AS, 7-AS, 12-AS y DPH en una Suspensión Microsomal (0.25 mg de proteína por ml) a 37 °C.

Sonda	CCl ₄ ^b m moles/g prot	(Φ°/Φ) ^c
2-AS	0.17	1.15
7-AS	0.47	1.07
12-AS	0.47	1.04
DPH	1.72	1.15

^bConcentración intramicrosomal.

^cRelación entre los tiempos de correlación rotacional en ausencia (Φ°) y presencia (Φ) de tetracloruro de carbono.

TABLA 11

Efecto del n-heptanol sobre los Parámetros de Anisotropía (r) y de Polarización (P) de la Fluorescencia de DPH y TMA-DPH en Microsomas a 37° C.

Heptanol ^b	DPH		TMA-DPH	
	P	r _s	P	r _s
0.00	0.187±0.005	0.128±0.004	0.318±0.006	0.233±0.003
0.17	0.148±0.004	0.111±0.003	0.306±0.005	0.226±0.005
0.33	0.146±0.005	0.099±0.008	0.295±0.004	0.222±0.004
0.52	0.140±0.003	0.090±0.005	0.294±0.005	0.216±0.006
0.68	0.120±0.004	0.079±0.005	0.297±0.006	0.210±0.005

^bRepresenta la concentración intramicrosomal de n-heptanol expresado en m moles /g prot.

Los valores se expresan como el promedio ± D.E de 3-5 experimentos.

TABLA 12

Efecto del 2,6-dimetil-4-heptanol sobre P y r del TMA-DPH y del DPH en Microsomas a 37° C

2,6-dimetil 4-Heptanol ^b	DPH		TMA-DPH	
	P	r	P	r
0,00	0.187±0.005	0.128±0.005	0.318±0.004	0.233±0.005
0.18	0.148±0.006	0.112±0.004	0.292±0.004	0.226±0.005
0.38	0.146±0.004	0.097±0.005	0.290±0.006	0.215±0.004
0,54	0.139±0,005	0.088±0.004	0.308±0.005	0.216±0.006
0.77	0.120±0.004	0.088±0.004	0.286±0.004	0.210±0,007

^bRepresenta la concentración intramicrosomal expresada en m moles/g prot .

Los valores son el promedio ± D.E de 5 experimentos.

TABLA 13

Efecto del n-heptanol y del 2,6-dimetil-4-heptanol sobre los Parámetros de Viscosidad (η) y de Orden (S).

Alcohol	DPH		TMA-DPH	
Heptanol m moles/g prot	η/η^0	S/S ⁰	η/η^0	S/S ⁰
0.00	1.00	1.00	1.00	1.00
0.17	0.93	0.83	0.94	0.97
0.33	0.69	0.66	0.90	0.96
0,52	0.62	0.52	0.84	0.92
0.68	0.52	0.30	0.80	0.92
2,6-dimetil 4-heptanol m moles/g prot	η/η^0	S/S ⁰	η/η^0	S/S ⁰
0.00	1.00	1.00	1.00	1.00
0.18	0.32	0.83	0.94	0.97
0.38	0.68	0.64	0.84	0.95
0.54	0.60	0.50	0.85	0.95
0.77	0.60	0.50	0.80	0.92

η/η^0 representa la razón de las viscosidades en presencia (η) y en ausencia (η^0) de alcohol.

S/S⁰ representa la razón entre los parámetros de orden en presencia (S) y ausencia (S⁰) de alcohol.

TABLA 14

Efecto del n-heptanol sobre las Constantes de Apagamiento por Oxígeno, k_{ox} , y de Desactivación por CCl_4 , k_q , de Derivados del Pireno.

Sonda	$(k_{ox}/k_{ox}^0)^b$	$(k_q/k_q^0)^c$
PMTMA	1,33±0,08	1,40±0,10
PBTMA	1,18±0,05	1,39±0,10
PUTMA	1,11±0,05	1,07±0,05

^bConcentración intramicrosomal de n-heptanol es igual a 1,6 m moles por g de proteína.

^cConcentración intramicrosomal de n-heptanol es igual a 1,1 m moles por g de proteína.

Estos valores representan el promedio ± D.E de 3-5 experimentos realizados a 37 °C.