

EFFECTO DEL COLESTEROL SOBRE ESTRUCTURAS SUPRAMOLECULARES DE GLICOLÍPIDOS. ESTUDIOS POR RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA

A.M. Gennaro*, M.M. Pincelli# y P.R. Levstein#†

*INTEC (CONICET-UNL) y Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral
Güemes 3450, 3000 Santa Fe

#LANAIS de RMN - FaMAF - Universidad Nacional de Córdoba
Ciudad Universitaria, 5000 Córdoba
e-mail: agennaro@intec.unl.edu.ar

Utilizamos la espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (RPE) para estudiar estructuras formadas por moléculas anfifílicas en solución acuosa. Analizamos el efecto del colesterol en estructuras constituidas por dos variedades de glicolípidos: los monosialogangliósidos y una mezcla natural de gangliósidos totales. En solución acuosa, ambas especies puras se agregan formando micelas. A partir de los valores de microviscosidad y micropolaridad obtenidos con un marcador de espín hidrosoluble, se pudo concluir que las mezclas monosialogangliósido/colesterol forman estructuras de vesícula y que las mezclas de gangliósidos totales/colesterol, continúan formando micelas. Con el empleo de marcadores de espín que se ubican en la región hidrofóbica de los agregados se encontró que el colesterol "endereza" las cadenas hidrocarbonadas de los glicolípidos, este efecto se correlaciona con un cambio en la curvatura de la superficie de los agregados.

Supra-molecular structures formed by biological amphiphiles have been studied by using the spin-label electron paramagnetic resonance technique (EPR). In particular, the effect of cholesterol has been analyzed on two kinds of glycolipid assemblies: one composed of monosialogangliosides and the other formed by a natural mixture of bovine brain gangliosides. In absence of cholesterol, at the water/lipid ratio used in this work, both species aggregate in micellar structures. From the microviscosity and micropolarity values obtained using a hydrophilic spin-label it was possible to determine that the monosialoganglioside/cholesterol mixtures give rise to vesicles while the total ganglioside/cholesterol ones remain as micelles. By using hydrophobic spin labels, it was observed that cholesterol produces a straightening of the glycolipid hydrocarbon chains. This effect correlates with a change in the curvature of the aggregate surfaces.

I. INTRODUCCIÓN

Las membranas biológicas están constituidas principalmente por lípidos y proteínas que permanecen juntos mediante interacciones no covalentes. Su función es separar medios acuosos distintos y permitir el paso selectivo de diversos compuestos.

Existe gran variedad de lípidos, entre ellos, los fosfolípidos, los glicolípidos y el colesterol. Los dos primeros grupos tienen características anfifílicas: están formados por una cabeza *hidrofílica* (o *polar*) y por una región *hidrofóbica* constituida por cadenas hidrocarbonadas. En soluciones acuosas, surgen entonces dos interacciones opuestas: la atracción hidrofóbica en la interfase cadena hidrocarbonada-agua, que induce la asociación de las moléculas, y la repulsión hidrofílica, iónica o estérica de las cabezas de grupo, que tienden a rodearse de agua promoviendo la separación de las moléculas. Estas dos fuerzas gobiernan el auto-ensamblaje de los anfífilos en estructuras supramoleculares tales como micelas y vesículas⁽¹⁾.

En las *micelas* las moléculas se acomodan de tal forma que las cabezas polares quedan expuestas al medio acuoso y las cadenas hidrocarbonadas permanecen aisladas del agua en una región *interior hidrofóbica*. En

las *vesículas*, los lípidos se ensamblan formando superficies cerradas que *separan un medio acuoso interno* del medio externo. En dichas superficies las moléculas se distribuyen en dos lamelas enfrentadas (bicapa lipídica), de tal forma que las cabezas polares quedan expuestas a los medios acuosos interno y externo, resguardando las colas hidrofóbicas en el espacio intermedio (ver figura 1).

En los lípidos utilizados en este trabajo, la mayoría de los carbonos de las cadenas hidrocarbonadas presenta

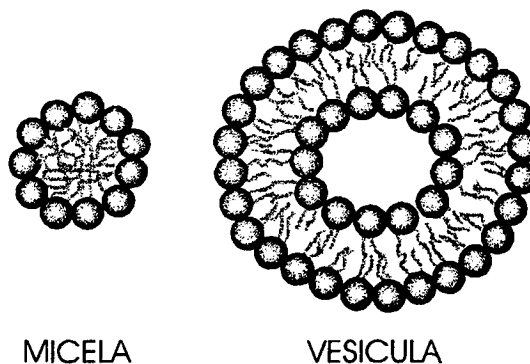


Figura 1: Representación esquemática de las dos estructuras supramoleculares encontradas en este trabajo.

† Autor a quien debe dirigirse la correspondencia.

hibridización sp^3 y las uniones C-C son enlaces simples. Consecuentemente, tienen tres grados de libertad en su orientación relativa al enlace anterior en la cadena (posiciones *trans*, *gauche(+)* y *gauche(-)*). El intercambio entre las diferentes posibilidades de orientación da lugar a las llamadas "isomerizaciones *trans-gauche*", que tienen una frecuencia del orden de 10^{10} - 10^9 Hz⁽²⁾. Estos movimientos proporcionan flexibilidad a las cadenas, cuyo efecto es acumulativo cadena abajo y da lugar a una mayor amplitud de movimiento hacia el centro de las membranas ("wobbling"), confiriéndole características fluidas a la región hidrofóbica de los agregados. Esto se describe en términos de un "gradiente de flexibilidad". La fluidez de la región hidrofóbica de las membranas, que depende de la temperatura y la composición lipídica, condiciona fuertemente su actividad biológica.

Los gangliósidos (GAN) son una variedad de glicolípidos que poseen una gran cabeza polar constituida por azúcares y ácidos siálicos. En solución acuosa se autoensamblan formando micelas^(3,4). Su estudio es de gran interés ya que son abundantes en células nerviosas, a las que confieren propiedades superficiales especiales.

En trabajos previos, mediante la utilización de Resonancia Magnética Nuclear de Fósforo-31, determinamos que la adición de gangliósidos a estructuras de bicapa formadas por fosfatidilcolina (PC), promueve la formación de micelas cilíndricas dispuestas en manojos. Asimismo encontramos que el colesterol (COL) revierte dicha tendencia estabilizando la estructura de membrana (bicapa) en mezclas PC/GAN/COL⁽⁵⁾. Surgió entonces la necesidad de conocer más profundamente las interacciones binarias GAN/COL. Primeramente se obtuvieron isotermas de compresión en *interfases planas* (capas monomoleculares de lípidos) con distintas relaciones molares GAN/COL. De estas medidas concluimos que en la interfase lípido/agua las mezclas presentan un área molecular promedio a_0 inferior a la correspondiente a la situación ideal en la que los lípidos no interactúan entre sí. Dichos resultados sugieren que en solución acuosa las mezclas GAN/COL podrían formar estructuras de mayor radio de curvatura al aumentar la concentración de COL. Esto sería compatible con la estabilización de la estructura de bicapa encontrada para las mezclas PC/GAN/COL.

Con respecto a lo que ocurre en la región hidrofóbica, se ha reportado que el COL⁽⁶⁾ y los GAN⁽⁷⁾, por separado, restringen el movimiento de las cadenas hidrocarbonadas en vesículas de fosfolípidos. Sin embargo, no se ha analizado aún cómo son las interacciones entre GAN y COL.

En este trabajo, pretendemos responder dos preguntas acerca de los sistemas GAN/COL: 1) qué tipo de estructuras forman en solución acuosa y 2) cómo es el gradiente de flexibilidad a lo largo de la cadena hidrocarbonada

Para ello, hemos analizado mezclas GAN/COL en solución acuosa utilizando la Resonancia Paramagnética Electrónica (RPE) de un marcador de espín (radical

nitróxido) unido a distintas moléculas, según la zona a sensar. Para distinguir entre agregados que encierran agua (vesículas) y aquellos que no (micelas), utilizamos un marcador de espín soluble en agua. El mismo permite obtener información sobre la microviscosidad y la polaridad del entorno inmediato del radical. Además, es posible suprimir su señal con un agente químico que no traspasa membranas, quedando solamente señal si es que hay un medio acuoso encerrado (ver figura 1). Por otro lado, para estudiar el interior de la región hidrofóbica empleamos marcadores de espín que sustituyen a los carbonos 5, 12 o 16 de la cadena hidrocarbonada del ácido esteárico (18 carbonos). Esto permite calcular valores de polaridad y parámetro de orden a distintas profundidades de la membrana.

II. SECCIÓN EXPERIMENTAL

Materiales

Se utilizaron monosialogangliósidos puros (G_{m1}) y una mezcla natural de mono, di y tri-sialogangliósidos de cerebro bovino (GT)[‡]. Los GT están compuestos por un 21% de monosialogangliósidos, un 60% de disialogangliósidos y un 19% de trisialogangliósidos. El marcador de espín hidrosoluble es el 4-amino-tempo (4AT) y los marcadores de espín hidrofóbicos son el 5-, 12- y 16-doxil ácido esteárico (n-SASL). El agente supresor de la señal de EPR es el ferricianuro de potasio $K_3Fe(CN)_6$. Las drogas comerciales son de Sigma.

Preparación de las muestras

Los lípidos disueltos en cloroformo/metanol (2:1) se mezclaron en las fracciones molares deseadas, se secaron con N_2 y se dejaron durante la noche en un desecador a fin de eliminar trazas de solventes. Posteriormente se los resuspendió en una solución acuosa tamponada a pH 7.2 (buffer Tris) hasta llegar a una concentración 100 mM (100mmoles de lípidos por litro de buffer) y se aseguró su completa hidratación manteniendo la suspensión en un baño térmico a 60 °C durante 60 min. En el caso de las muestras con n-SASL, el marcador disuelto en etanol fue agregado junto con los lípidos (relación molar lípido/marcador 100:1) antes de ser secados con N_2 y en el caso de las muestras con 4AT el marcador fue diluido en el buffer (concentración final 1mM). En ambas situaciones se comprobó que el proceso de hidratación no degrada al marcador de espín.

Experimentos de RPE

Los experimentos se realizaron a la frecuencia de 9.7 GHz (banda X) en un espectrómetro Bruker ER 200. Las muestras fueron colocadas en capilares de paredes finas, que a su vez se introdujeron en un tubo de cuarzo de 4 mm de diámetro exterior conteniendo aceite de siliconas para asegurar la estabilidad térmica durante la medición. La temperatura se mantuvo en $(25 \pm 1)^\circ C$.

[‡] Purificados en el laboratorio del Dr. Fidelio, Laboratorio de Química Biológica, Fac. de Ciencias Químicas-Univ. Nac. de Córdoba.

Se trabajo con una modulación de 100 KHz de frecuencia y 0.5 G de amplitud. La potencia de microondas fue de 2 mW.

Análisis de los espectros

Estudio de la región hidrofílica (movimientos isotrópicos rápidos). En los radicales nitróxido, el electrón desapareado presenta fuertes anisotropías en la interacción hiperfina (con el núcleo ^{14}N , $I=1$) y en el factor g . Estas anisotropías pueden promediarse en caso de movimientos suficientemente rápidos en la escala de tiempos de RPE. El marcador 4AT hidrosoluble y presenta movimientos isotrópicos rápidos (tiempo de correlación rotacional $\tau_c < 1\text{ns}$). En estas condiciones, las componentes anisotrópicas del tensor hiperfino se promedian a cero y la separación de las líneas del espectro da directamente la parte isotrópica A_0 de dicho tensor. El τ_c (en seg) se calcula según la fórmula

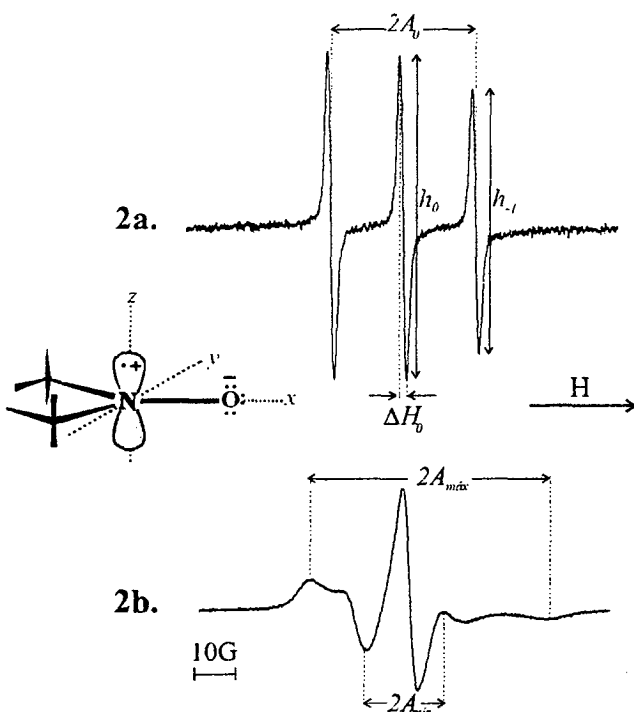


Figura 2. El espectro de un grupo nitróxido se caracteriza por tener tres líneas originadas por la interacción hiperfina entre el electrón desapareado localizado en el orbital $2p\pi$ del enlace N-O y el núcleo de ^{14}N . Espectros típicos de RPE para movimientos isotrópicos rápidos (2a) y movimientos anisotrópicos lentos (2b).

standard para movimientos isotrópicos en el régimen de alta movilidad en banda X^(8,9).

$$\tau_c = 6.5 \times 10^{-10} \Delta H_0 \left[\left(\frac{h_0}{h_{-1}} \right)^{1/2} - 1 \right]$$

donde ΔH_0 es el ancho pico a pico (en Gauss) de la línea central, y h_0 y h_{-1} las amplitudes de los picos de las líneas

central y de campo alto respectivamente. La intensidad de la señal se estima como $I \propto h_0 \Delta H_0^2$ (ver figura 2a).

Estudio de la región hidrofóbica (movimientos anisotrópicos lentos). Cuando los marcadores unidos al ácido esteárico (n-SASL) son incorporados a las estructuras lipídicas, se les impone una restricción en los movimientos que da como resultado un tensor de interacción hiperfina con simetría axial en torno a la dirección normal a las capas lipídicas.

De los espectros puede calcularse un parámetro de orden S , que depende de la amplitud de esos movimientos e indirectamente da información sobre la dinámica molecular a diferentes profundidades de la región hidrofóbica. Siguiendo a Griffith⁽¹⁰⁾, S se calcula a partir de los valores de $2A_{\text{max}}$ y $2A_{\text{min}}$ tomados del espectro (ver figura 2b).

$$S = k (\bar{A}_{\parallel} - \bar{A}_{\perp}) / \left[A_{zz}^c - \frac{1}{2} (A_{xx}^c + A_{yy}^c) \right]$$

donde $\bar{A}_{\parallel} = A_{\text{max}}$, $\bar{A}_{\perp} = A_{\text{min}} + 1.4(1 - S^{\text{app}})$.

$S^{\text{app}} = A_{zz}^c - \frac{1}{2} (A_{xx}^c + A_{yy}^c)$, $A_0^c = \frac{1}{3} (A_{zz}^c + A_{xx}^c + A_{yy}^c)$.

$A_0 = \frac{1}{3} (\bar{A}_{\parallel} + 2\bar{A}_{\perp})$ y $k = A_0^c / A_0$.

A_{zz}^c , A_{xx}^c y A_{yy}^c son los valores principales del tensor hiperfino para un monocristal (los valores utilizados fueron los del 2-doxilpropano donde $A_{zz}^c = 32.9$ G, $A_{xx}^c = 5.9$ G y $A_{yy}^c = 5.4$ G)⁽¹⁰⁾.

III. RESULTADOS

Se analizaron dispersiones de GAN puros (G_{ml} y GT) y en mezcla con COL en fracciones molares distintas. Los G_{ml} son gangliósidos que poseen en su cabeza un sólo ácido siálico (una carga negativa) y la mezcla GT posee en promedio dos ácidos siálicos por cabeza de lípido (dos cargas negativas), consecuentemente la cabeza polar promedio de los GT es mayor que la perteneciente a los G_{ml} y la carga promedio de los GT es el doble que la de los G_{ml} .

Caracterización de los agregados

Para determinar si las estructuras que se forman encierran solución acuosa, utilizamos un marcador de espín hidrosoluble y un agente supresor de la señal de RPE que no atraviesa las bicapas lipídicas. El marcador de espín elegido es el 4AT que posee una carga positiva a $\text{pH} \leq 7$. Se lo incorpora a la solución acuosa ("buffer") donde se resuspenden los lípidos, y es de esperar que en la suspensión se ubique en el seno de la solución acuosa, en la solución atrapada en el interior de vesículas y/o cerca de las cabezas de los GAN, atraído electrostáticamente por la carga negativa de los ácidos siálicos.

El agente supresor utilizado es el ferricianuro $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^-$ (FCN). Cuando esta molécula está muy próxima al 4AT, la interacción magnética con el ion Fe^{3+}

hace que el espín desapareado relaje más rápidamente, ensanchando la señal de EPR y disminuyendo consecuentemente su amplitud hasta llevarla bajo el límite de detección.

Los parámetros obtenidos a partir de los espectros fueron: la constante de acoplamiento hiperfino A_0 , que está fuertemente vinculada a la polaridad del entorno del marcador, la intensidad de la señal I , que brinda información acerca de la cantidad de marcador no accesible al FCN y el tiempo de correlación τ_c , que refleja la microviscosidad del medio en el cual se encuentra el marcador.

Para cada muestra se tomaron espectros en tres etapas distintas: en el momento previo a la adición de FCN, después de la adición de FCN y finalmente luego de congelar y descongelar (C&D) las muestras repetidas veces.

En el momento previo a la adición de FCN, la señal proviene del 4AT disperso en toda la muestra. El espectro se caracteriza por tener valores de polaridad altos y tiempos de correlación cortos. Como referencia, indicamos que el 4AT disuelto en el buffer empleado en la preparación de las muestras presenta valores de $A_0=16.9\text{G}$ y de $\tau_c=0.036\text{ns}$.

Luego de la adición de FCN, la cantidad de espines que dan una señal de RPE detectable, caracterizada por I , se reduce marcadamente. La señal proviene del 4AT inaccesible al FCN, o sea, el presente en la solución acuosa interior en caso de haber vesículas y/o el que, por atracción electrostática, permanece muy cercano a las cabezas de los gangliósidos. En este último caso, de la señal se obtienen valores de $\tau_c > 0.6\text{ns}$, que indican movimientos más restringidos para el marcador y valores de polaridad $A_0 \approx 16.2\text{G}$ propios de un marcador cercano a la interfase lípido-agua.

Congelar y descongelar las muestras con FCN repetidas veces, provoca la ruptura y reensamblaje de los agregados, y consecuentemente una distribución homogénea del FCN en toda la solución acuosa, aun la encerrada en las vesículas. En este caso, la señal remanente proviene exclusivamente del 4AT que permanece en la zona próxima a las cabezas de los gangliósidos. Los tiempos de correlación son más largos y el valor de polaridad disminuye. Este último paso nos permite confirmar si el espectro obtenido después de la adición de FCN corresponde a agua encerrada por el agregado o no.

En las dispersiones de GT y G_{m1} puros, la adición de FCN, provoca una considerable disminución de la señal, con un aumento en el valor de τ_c y un decrecimiento en el valor de A_0 (ver figura 3). La existencia de esta señal de intensidad no despreciable, puede racionalizarse considerando que el 4AT es atraído electrostáticamente por las cargas negativas de las cabezas polares y que esta zona es energéticamente desfavorable para el FCN. La intensidad se reduce a un 38% de la señal original para GT y a un 6% para G_{m1} , lo cual correlaciona con la proporción carga/lípido. Un posterior congelamiento y

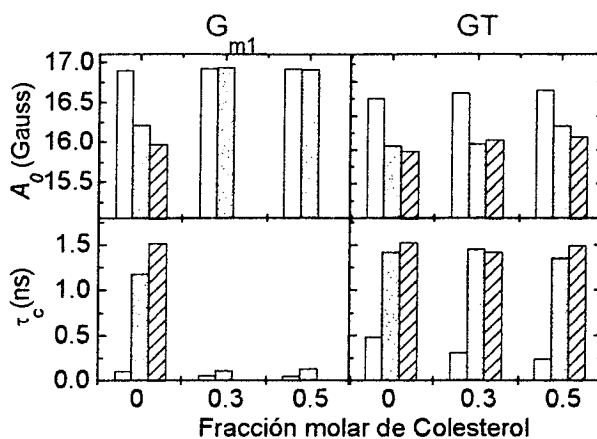


Figura 3. Valores de constante hiperfina y tiempos de correlación obtenidos para mezclas G_{m1}/COL y GT/COL con distintas fracciones molares de COL. Las barras blancas corresponden a muestras sin FCN, las grises a muestras con FCN y las rayadas a muestras luego de congelar y descongelar. Los datos para G_{m1}/COL con $X_{\text{COL}} = 0.3$ y 0.5 luego de congelar y descongelar no pudieron evaluarse debido a la baja intensidad de los espectros.

descongelamiento de las muestras con FCN no produce cambios significativos en el espectro. Esto indica que la señal proviene únicamente del marcador cercano a las cabezas polares de los gangliósidos, confirmando que no hay agua encerrada y que las estructuras formadas son micelas, hecho bien establecido mediante otras técnicas^(3,4).

En las mezclas gangliósido/colesterol (GAN/COL) estudiadas con el marcador hidrosoluble, el COL está en una fracción molar $X_{\text{COL}} = 0.3$ y 0.5 , donde $X_{\text{COL}} = n_{\text{COL}} / (n_{\text{COL}} + n_{\text{GAN}})$, siendo n_i el número de moles de cada lípido ($i = \text{COL}, \text{GAN}$). En las mezclas con G_{m1} , para ambas proporciones de COL, encontramos una disminución importante de la intensidad de la señal con la adición de FCN (figura 4b), pero con tiempos de correlación cortos y valores de polaridad altos (ver figura 3). Este comportamiento difiere del observado para las

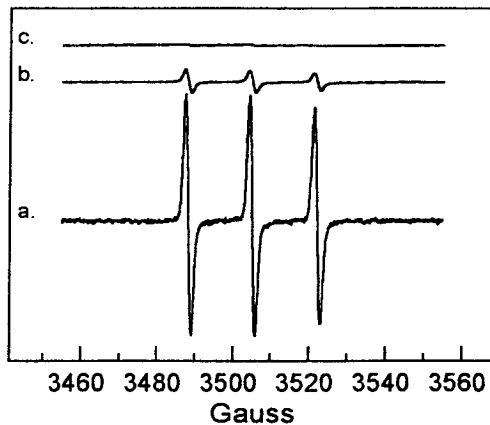


Figura 4. Espectros de RPE del marcador 4AT disuelto en dispersiones G_{m1}/COL con $X_{\text{COL}}=0.50$, en el momento previo a la adición de FCN (a), luego de la adición de FCN (b) y luego de congelar y descongelar la muestra (c).

muestras de G_{m1} puro, e indica que el 4AT está en un entorno acuoso, que debería corresponder al agua encerrada por vesículas. Esta hipótesis se confirma al congelar y descongelar la muestra y observar la desaparición casi completa de la señal (figura 4c).

Para las dispersiones de GT/COL con $X_{COL}=0.3$, luego de la adición de FCN, encontramos valores de τ_c y A_0 similares a los encontrados para GT puros ($X_{COL}=0$), indicando que la fase micelar no ha sido alterada por la incorporación de colesterol. Al congelar y descongelar tampoco se observan variaciones (figura 3). Para $X_{COL}=0.5$ la polaridad del entorno del marcador es mayor y τ_c ligeramente menor que para $X_{COL}=0.3$. Estos resultados podrían indicar la coexistencia de una pequeña proporción de vesículas con la estructura micelar. No se han podido registrar espectros con mayores porcentajes de COL, pues por encima de $X_{COL}=0.5$ el colesterol no se incorpora a los agregados de gangliósidos.

Debido a que la compleja red de puentes hidrógeno formada en torno a los azúcares "organiza" el agua circundante a distancias apreciables, la presencia de los gangliósidos modifica las propiedades dinámicas de todo el medio de suspensión^(11,12). Esto se manifiesta en que, a la relación molar agua/lípido empleada (555:1), los tiempos de correlación τ_c obtenidos para las dispersiones de G_{m1} y GT puros sin supresor de señal son superiores a los que se obtienen para la solución de referencia pura.

En las mezclas G_{m1}/COL , las muestras con FCN presentan un τ_c similar al de las muestras sin tratar. En el primer caso, la señal proviene del 4AT que está disuelto en el medio acuoso interno y externo, y en el segundo la señal proviene únicamente del medio acuoso interno. Por lo tanto, podemos decir que el medio acuoso encerrado por las vesículas G_{m1}/COL presenta una microviscosidad similar a la del seno de la solución. Luego de congelar y descongelar las muestras de G_{m1}/COL , disminuye notoriamente la intensidad de señal de RPE respecto de las de GT/COL y G_{m1} puro. Esto indica que la estructura de bicapa de G_{m1}/COL no es capaz de albergar moléculas de 4AT próximas a las cabezas de los gangliósidos tal como lo hacen los agregados micelares.

En las mezclas GT/COL, cuando están sin FCN, se observa una progresiva disminución de τ_c con el aumento en X_{COL} , es decir, con la disminución de la cantidad neta de GT en la solución. Estos valores se siguen manteniendo por encima del valor de referencia.

Estudio de la región hidrofóbica

Analizamos la porción hidrofóbica de mezclas G_{m1}/COL y GT/COL donde el COL está en una fracción molar $X_{COL}=0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4$ y 0.5 .

Trabajamos con los marcadores n-doxil ácido esteárico (n-SASL), con $n=5, 12$ y 16 . El ácido esteárico se incorpora a las estructuras lipídicas en forma paralela a las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos. Para n pequeño, el marcador sensa la región interior próxima a las cabezas polares. Al aumentar n , el marcador queda cada vez más sumergido en la región hidrofóbica del agregado. A pesar de que el anillo donde se ubica el

radical nitróxido es relativamente grande, suponemos que a la proporción de n-SASL utilizada (<1%) la estructura del agregado, no es afectada.

La figura 5 muestra los valores del parámetro de orden S a las distintas profundidades de la región hidrofóbica de los agregados para las mezclas GT/COL y G_{m1}/COL .

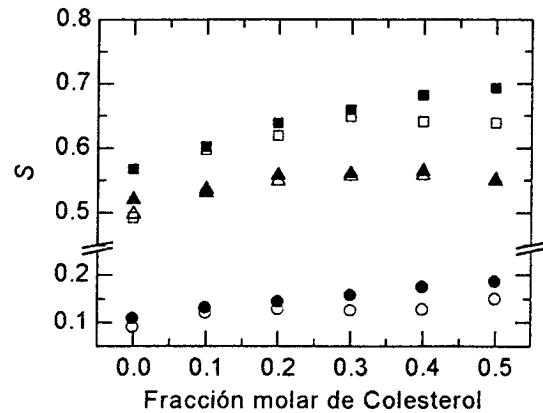


Figura 5. Valores del parámetro de orden S obtenidos a partir del espectro de RPE de los marcadores 5-SASL(■), 12-SASL(▲) y 16-SASL(●). Los símbolos llenos corresponden a dispersiones G_{m1}/COL y los vacíos a GT/COL.

Estrictamente hablando, el parámetro de orden ($0 \leq S \leq 1$) se refiere a un ordenamiento espacial respecto al eje director de un cristal líquido⁽¹³⁾. Si suponemos que el ácido graso marcado tiene un movimiento de rotación rápido (en la escala de tiempos de RPE) en torno a la normal a la interfase, el movimiento que podremos detectar con RPE es el de "wobbling" originado por la isomerización trans-gauche en la cadena hidrocarbonada. El parámetro de orden S , en este caso, caracteriza la fluidez o movilidad molecular del sistema (a mayor S , menor fluidez)⁽¹⁰⁾.

Para G_{m1} y GT puros (micelas), se observa que a nivel del C_5 (5-SASL) el parámetro de orden S es levemente superior que a nivel del C_{12} (figura 5, $X_{COL}=0$). Este gradiente de flexibilidad es distinto al que normalmente se presenta en bicapas de fosfolípidos, donde la diferencia de S entre $n=5$ y $n=12$ es mucho más pronunciada. Al incorporar colesterol se observa un incremento en el parámetro de orden para todos los n (figura 5), y en forma más pronunciada para el C_5 , es decir que se tiende a un gradiente de flexibilidad que se asemeja más al de las membranas fosfolipídicas.

El bajo valor del parámetro de orden S observado a la altura del C_5 en GT en ausencia de colesterol puede correlacionarse con la presencia de desorden estructural y composicional. El desorden estructural es inherente a la agregación en estructuras micelares y al gran tamaño de las cabezas polares, que aumentan la distancia entre las cadenas hidrocarbonadas a la altura de los primeros carbonos. Esto ocasiona un debilitamiento de las interacciones entre las cadenas hidrocarbonadas (fuerzas de Van der Waals) y en consecuencia una menor

restricción de las isomerizaciones trans-gauche. El desorden composicional se debe a que en los GT coexisten moléculas con 1, 2 y 3 ácidos siálicos dando lugar a micelas de superficie irregular⁽³⁾, lo que daría más libertad de movimientos a la cadena hidrocarbonada a la altura del C_5 . La incorporación de apenas un 10% de colesterol aumenta en un 20% el parámetro de orden, indicando que, aún en pequeñas proporciones, el plano rígido formado por el grupo esterol induce una rigidización de las cadenas. Este comportamiento se da en los GT para todos los n y aumenta con la proporción de COL hasta llegar a un valor constante cuando $X_{COL}=0.3$.

En el caso de los G_{m1} puros, el parámetro de orden es mayor que para los GT puros. Esto indica un mayor ordenamiento de las cadenas hidrocarbonadas originado en el menor tamaño de las cabezas polares y en la homogeneidad de las mismas. La incorporación de colesterol a dispersiones de G_{m1} también produce incrementos en los valores de S , en este caso más marcados que en las mezclas con GT. Sin embargo son mucho más graduales, hecho que también puede relacionarse con la homogeneidad del sistema. Para estas muestras, el valor de S no llega a saturar en las proporciones estudiadas.

El colesterol es una molécula casi enteramente hidrofóbica, se ubica entre las colas hidrocarbonadas de los lípidos y tiene una longitud equivalente a una cadena hidrocarbonada de 12 ó 14 carbonos. Si bien el aumento del parámetro de orden para los carbonos C_5 y C_{12} se puede atribuir a la restricción de las isomerizaciones trans-gauche que ocasiona la presencia del grupo esterol, el aumento en S para el C_{16} no se puede justificar de la misma manera. En bicapas de PC en fase fluida, el COL aumenta el S para el C_5 y C_{12} , y lo disminuye para el C_{16} ⁽²⁾. El aumento de S observado para el C_{16} , se puede atribuir a que la presencia de colesterol en la micela de GAN "enderez" las cadenas hidrocarbonadas. Esta afirmación está sustentada por los cambios producidos por la incorporación de colesterol en la variación de la constante de acoplamiento hiperfino A_0 , vinculada a la polaridad del entorno, entre el C_5 y el C_{16} .

A medida que el marcador está más sumergido en la zona hidrofóbica, el valor de A_0 disminuye. Para cada uno de las muestras se midió el valor de A_0 y luego se calculó $\Delta A_0 = A_{0(C5)} - A_{0(C16)}$, parámetro que relacionamos con el gradiente de polaridad entre los niveles del C_5 y el C_{16} (figura 6). Se observó que tanto en las micelas de GT como de G_{m1} puros, la polaridad para los distintos niveles, si bien disminuye hacia el centro del agregado, varía en un corto rango de valores. Se ha predicho que en estructuras micelares esféricas, no es posible que todas las cadenas hidrocarbonadas tengan su porción terminal en el centro de la zona hidrofóbica. En consecuencia, las cadenas hidrocarbonadas presentarían un estado *fluido* tal que todos los segmentos de las mismas estarían en promedio bastante tiempo cerca de la superficie de la micela. Por lo tanto, aunque no haya agua en el interior

de la zona hidrofóbica, los marcadores de espín en algún momento sentirán un entorno hidrofílico^(1,4). Este comportamiento se estaría reflejando en los pequeños valores de ΔA_0 encontrados para micelas de G_{m1} y GT puros.

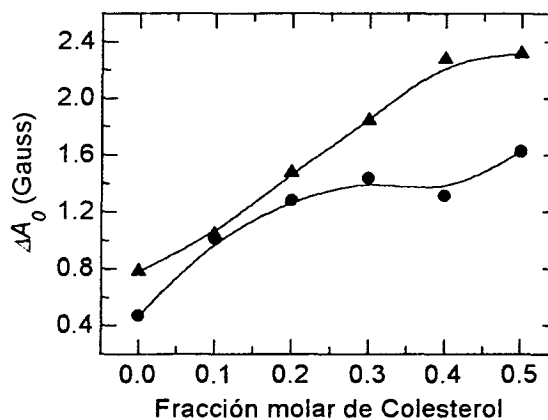


Figura 6. Gradiente de polaridad en la región hidrofóbica en función de X_{COL} en mezclas G_{m1} COL (▲) y GT COL (●).

En la figura 6 se puede observar que en las mezclas de G_{m1}/COL y GT/COL el aumento de X_{COL} incrementa las diferencias de polaridad ΔA_0 . Este efecto es mucho más pronunciado para mezclas con G_{m1} que con GT. El crecimiento del ΔA_0 y S está de acuerdo con un ordenamiento más radial de las cadenas hidrocarbonadas, que podría ser consecuencia de una deformación de los agregados micelares en estructuras de mayor radio de curvatura. En las mezclas G_{m1}/COL la formación de las estructuras vesiculares (bicapas) coincide con este efecto, y es consistente con la disminución del área molecular promedio a_0 observada en trabajos previos en capas monomoleculares. En las mezclas GT/COL los valores de S , ΔA_0 y a_0 también marcan una tendencia hacia la formación de estructuras de mayor radio de curvatura. Sin embargo, el mayor tamaño de las cabezas polares de los GT no permite que la adición de COL ocasione los cambios suficientes para formar estructuras de bicapa.

IV. CONCLUSIONES

El análisis de espectros de RPE con diversos marcadores de espín, permite establecer que la adición de colesterol a estructuras micelares de G_{m1} induce una transición a estructuras de vesículas. Este comportamiento depende de la porción hidrofílica de los lípidos, ya que para mezclas de colesterol con gangliósidos de mayor cabeza polar (GT) la transición no se produce. Estos resultados se correlacionan con la restricción de las isomerizaciones trans-gauche y ordenamiento más radial de las cadenas hidrocarbonadas, observados a través del parámetro de orden y gradiente de polaridad en la porción hidrofóbica de los agregados. Estas conclusiones están en completo acuerdo con la disminución de área molecular respecto a la ideal, observada en interfases planas de mezclas gangliósido/colesterol.

Como conclusión general, puede decirse que en moléculas anfífilas la alteración de las interacciones a nivel hidrofóbico (en este caso, adición de colesterol) es capaz de provocar importantes cambios en la topología de los agregados, dependiendo de las características de la porción hidrofílica.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por Fundación Antorchas, CONICOR, CONICET (PID 3761, PEI 230/97), Secyt- Univ. Nac. de Córdoba y Univ. Nac. del Litoral (CAI+D 53/96). Agradecemos la colaboración de los Dres. G.G. Montich y G.D. Fidelio por las fructíferas discusiones que contribuyeron a la realización de este trabajo.

Referencias

- 1- Israelachvili, J. N. "Intermolecular and Surface Forces". Academic Press. New York. 366-389. (1991).
- 2- Van der Meer, B.V in "Biomembranes. Physical Aspects". Shinitsky Ed., VCH Publishers Inc. New York, 98-161 (1993).
- 3- Cantú, L., M. Corti, E. Del Favero, and A. Raudino. J. Phys.: Condens. Matter, **9**, 5033-5055 (1997).
- 4- Maggio, B. Prog. Biophys. Molec. Biol., **62**, 55-117. (1994).
- 5- Pincelli, M.M., P.R. Levstein, C.A. Martín and G.D. Fidelio. Chem. Phys. Lipids **94**, 109-118 (1998).
- 6- Rice, D.M., M.D. Meadows, A.O. Sheinman, F.M. Goñi, J.C. Gómez-Fernández, M.A. Moscarello, D. Chapman and E. Oldfield, Biochem., **18**, 5893-5903 (1979).
- 7- Bertoli, E., M. Masserini, S. Sonino, R. Ghidoni, B. Cestaró and G. Tettamanti, Biochim. Biophys. Acta, **647**, 196-202 (1981).
- 8- Raison, J.K., J.M. Lyons, R.J. Mehlhorn and A.D. Keith J. Biol. Chem., **246**, 4036-4040 (1971).
- 9- Daveloose, D., G. Fabre, F. Berleur, G. Testylier and F. Leterrier, Biochim. Biophys. Acta. **763**, 41-49 (1983).
- 10- Griffith, O.H and P.C. Jost in "Spin Labeling: Theory and Applications", Berliner Ed., 454-523 (1976).
- 11- Bach, D. B. Sela and I.R. Miller Chem. Phys. Lip., **31**, 381-394 (1982).
- 12- Arnulphi, C., P.R. Levstein, M.E. Ramia, C.A. Martín and G.D. Fidelio. J. Lip. Res., **38**, 1412-1420 (1997).
- 13- Seelig, J. J. Amer. Chem. Soc., **92**, 3881-3387 (1970).
- 14- Gruen, D.W.R. J. Phys. Chem., **89**, 146-163 (1985)