



Universidad Nacional del Sur
Tesis
Doctor en Bioquímica

**“Propiedades biofísicas de
Esfingomielinas y Ceramidas con ácidos
grasos poliinsaturados de muy larga
cadena”**

Daniel Alejandro Peñalva

Bahía Blanca

Argentina

2014



Universidad Nacional del Sur

Tesis

Doctor en Bioquímica

**“Propiedades biofísicas de
Esfingomielinas y Ceramidas con ácidos
grasos poliinsaturados de muy larga
cadena”**

Daniel Alejandro Peñalva

Bahía Blanca

Argentina

2014

Directora de Tesis

Dra. Marta Isabel Aveldaño

Co-directora de Tesis

Dra. Silvia Susana Antollini

PREFACIO

Esta tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Bioquímica de la Universidad Nacional del Sur (UNS) y no ha sido anteriormente presentada para la obtención de otro título en esta universidad u otra. Contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo durante el período comprendido entre el 1^{ro} de Abril de 2010 y el 28 de noviembre de 2014 en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB), perteneciente a la UNS y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), con la dirección de las Dras. Marta Isabel Aveldaño y Silvia Susana Antollini.

Los estudios realizados en esta tesis fueron financiados con subsidios otorgados por la Secretaría General de Ciencia y Tecnología de la UNS, la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y el CONICET.

Bahía Blanca, 28 de Noviembre de 2014

Daniel Alejandro Peñalva

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia

Universidad Nacional del Sur



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el/..../..... , mereciendo
la calificación de(.....)

Considero que la culminación de una tesis doctoral no es sólo un logro personal, sino que es el resultado del esfuerzo de muchas personas. Por esta razón, quiero agradecer:

A la Dra. Marta Aveldaño, por confiar en mí y darme la oportunidad de iniciarme en este camino científico, por guiarme en él, por dedicar gran parte de su tiempo a mi formación a pesar de su múltiples ocupaciones, por su contagioso espíritu de trabajo y por su compromiso innegable con esta tesis.

A la Dra. Silvia Antollini por todos sus consejos, tanto académicos como personales, por su calidad humana y por todos estos años de docencia, los cuales fueron fundamentales para culminar con éxito esta etapa.

Al Dr. Bruno Maggio y a la Dra. Laura Fanani, por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio en la Universidad Nacional de Córdoba, por su generosidad y por realizar tan valiosos aportes a esta tesis.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), haber hecho económicamente posibles mis estudios de postgrado.

A la Secretaría General de Ciencia y Tecnología de la UNS por haberme otorgado una beca destinada a jóvenes docentes, con la cual pude financiar gran parte de mi estadía en Córdoba.

A mis compañeros de laboratorio: Dras. Natalia Furland y Sofia Vallés, Dr. Martín Oresti, Jessica Luquez, Florencia Santiago Valtierra, Vanesa Perillo, por su apoyo en todas las situaciones, por el tiempo compartido, por las charlas, por los consejos, por hacer tan ameno el trabajo diario.

A los demás integrantes del INIBIBB, incluyendo a los agentes que revistan en la Carrera del Personal de Apoyo, por su colaboración cada vez que fue requerida.

A mi familia...

A mis padres, Enrique y Magdalena por su amor incondicional, por haberme criado y guiado en el camino de la honestidad, de los buenos modales, de los valores, por ser ejemplo del sacrificio necesario para cumplir una meta.

A mis hermanos Lidia, Victorio y Tato, porque con paciencia siempre me han enseñado como salir adelante, gracias por su continua preocupación por su hermano menor.

A mis cuñados, Mariela, Verónica y Jorge, porque con el pasar de los años se han transformado en mis amigos, gracias por tenerme en cuenta en cada situación.

A mis sobrinos, Nahuel, Emilio, Valentina, Camila, Delfina, Jeremías, Victoria y Ramiro, a quienes quiero mucho por transformar cualquier momento en un momento agradable.

A *Guadalupe*, por su amor, por su apoyo incondicional, por sus consejos sabios y oportunos y por el ánimo que me brinda día a día para alcanzar nuevas metas, tanto profesionales como personales.

A *Mia*, por ser la testigo silenciosa de mis luchas cotidianas en busca de un mejor futuro, a ella, mi esperanza, mi alegría, le dedico la culminación de este trabajo y todo lo que representa.

ABREVIATURAS	- 1 -
RESUMEN	- 4 -
ABSTRACT	- 8 -
INTRODUCCIÓN	- 12 -
1. ESFINGOMIELINAS Y CERAMIDAS EN LAS MEMBRANAS BIOLÓGICAS	- 14 -
2. ESPECIES MOLECULARES DE ESFINGOMIELINA Y CERAMIDA CON ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS DE MUY LARGA CADENA	- 16 -
MATERIALES Y MÉTODOS	- 21 -
1. PROCEDIMIENTOS PREPARATIVOS Y ANALÍTICOS PARA EL ESTUDIO DE LOS LÍPIDOS	- 22 -
1.1. Extracción de los lípidos	- 22 -
1.2. Aislamiento de esfingomielinas con VLCPUFA.....	- 22 -
1.3. Separación de especies de n-V SM y h-V SM	- 24 -
1.4. Aislamiento de ceramidas con VLCPUFA.....	- 25 -
1.5. Análisis de ácidos grasos normales e hidroxilados	- 27 -
1.6. Cuantificación de esfingomielinas.....	- 29 -
2. ESTUDIOS EN BICAPA MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA	- 29 -
2.1. Preparación de liposomas	- 29 -
2.2. Cálculo de la Polarización Generalizada (GP)	- 30 -
2.3. Medida de la anisotropía (r)	- 31 -
2.4. Cálculo de temperaturas de transición.....	- 32 -
2.5. Extinción de la fluorescencia de la sonda DPH.....	- 32 -
3. OBSERVACIÓN DE DOMINIOS LIPÍDICOS MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL	- 33 -
4. ESTUDIOS EN MONOCAPAS DE LANGMUIR	- 34 -
4.1. Isotermas de compresión	- 34 -
4.2. Microscopia de ángulo de Brewster	- 39 -
4.3. Estudio termodinámico de monocapas de compresión	- 40 -
4.4. Efectos de la conversión esfingomielina → ceramida	- 42 -
4.5. Seguimiento de partícula única en monocapas.....	- 43 -
4.6. Estimación del área de la fase LC en sistemas conteniendo mezclas de esfingomielinas y ceramidas	- 44 -
RESULTADOS I	- 45 -
CARACTERIZACIÓN BIOFÍSICA DE ESFINGOMIELINAS CON VLCPUFA.....	- 45 -
1. Estudios en sistemas modelo de bicapa	- 45 -
1.1. Bicapas conteniendo esfingomielinas puras.....	- 45 -

1.2. Sistemas binarios fosfatidilcolina - esfingomielina.....	- 51 -
1.3. Sistemas ternarios fosfatidilcolina-colesterol-esfingomielina	- 52 -
2. Estudios en monocapas de Langmuir	- 54 -
Tablas y Figuras - Resultados I.....	- 59 -
RESULTADOS II.....	- 72 -
CARACTERIZACIÓN BIOFÍSICA DE CERAMIDAS CON VLCPUFA	- 72 -
1. Obtención de ceramidas con VLCPUFA hidroxilados y no hidroxilados	- 72 -
2. Propiedades de ceramidas con VLCPUFA en monocapas de Langmuir	- 73 -
3. Visualización por microscopia de ángulo de Brewster	- 76 -
4. Organización molecular en los films	- 77 -
5. Aspectos termodinámicos	- 79 -
TABLAS Y FIGURAS - RESULTADOS II	- 82 -
RESULTADOS III.....	- 89 -
INTERACCIONES ENTRE ESFINGOMIELINAS Y CERAMIDAS CON VLCPUFA EN MONOCAPA	- 89 -
1. Comparación entre esfingomielinas y ceramidas puras	- 89 -
2. Propiedades de films conteniendo esfingomielinas y ceramidas premezcladas	- 92 -
3. Propiedades de films de mezclas de esfingomielinas y ceramidas generados enzimáticamente	- 94 -
TABLAS Y FIGURAS – RESULTADOS III.....	- 96 -
DISCUSIÓN.....	- 102 -
1. ESFINGOMIELINAS CON VLCPUFA EN SISTEMAS MODELO DE BICAPA	- 102 -
1.1. Comportamiento de sistemas puros	- 102 -
1.2. Interacciones de n-V SM y h-V SM con otros lípidos	- 105 -
3. ESFINGOMIELINAS CON VLCPUFA EN SISTEMAS MODELO DE MONOCAPA	- 107 -
4. CERAMIDAS CON VLCPUFA EN SISTEMAS MODELO DE MONOCAPA	- 109 -
5. PROPIEDADES DE FILMS CONTENIENDO MEZCLAS DE ESFINGOMIELINA Y CERAMIDA	- 117 -
CONCLUSIONES	- 121 -
REFERENCIAS	- 124 -
PRODUCCIÓN ORIGINADA DE ESTA TESIS	- 130 -
1. ARTÍCULOS PUBLICADOS EN REVISTAS INTERNACIONALES CON REFERATO	- 130 -
2. ARTÍCULO EN PREPARACIÓN	- 130 -
3. TRABAJOS PRESENTADOS EN REUNIONES CIENTIFICAS	- 130 -

ABREVIATURAS

10-SLPC	1-palmitoil-2-(10-doxil) estearoilfosfatidilcolina
Ag-TLC	cromatografía de impregnación argéntica
Cer	ceramida o Ceramidas
Col	colesterol
DMPC	dimiristoilfosfatidilcolina
DOPC	dioleilfosfatidilcolina
GC	cromatografía gaseosa
HPLC	cromatografía líquida de alta presión
h-V Cer	Cer con VLCPUFA 2-hidroxiados
h-V SM	SM con VLCPUFA hidroxiados
n-V, h-V	VLCPUFA no hidroxiados y 2-hidroxiados, respectivamente
PC	fosfatidilcolina
S+M SM	SM con ácidos grasos saturados (S) y monoenoicos (M)
SM	esfingomielina
SMasa	esfingomielinasa
TLC	cromatografía en capa fina
VLCPUFA	ácidos grasos poliinsaturados de muy larga cadena

En este trabajo los ácidos grasos se abrevian mediante la convención, número de átomos de carbono : número de dobles ligaduras. La notación n-3, n-6 y n-9 se refiere a la posición de la primera doble ligadura de la serie contando a partir del metilo terminal. Las letras n- o h- que se anteponen a los VLCPUFA se emplean para distinguir los no hidroxiados de los hidroxiados.

ΔG_c	energía libre de compresión
ΔH_c	cambio de entalpía
ΔS_c	cambio de entropía
ΔS_{ec}	cambio en la entropía configuracional
ΔV	potencial de superficie
ΔG_{exc}	exceso de energía libre
ΔS_{ac}	entropía de compresión asociada a los <i>cambios</i> en el área
ΔV	potencial de superficie
BAM	microscopía de ángulo de Brewster
Cs^{-1}	módulo de compresibilidad
D	coeficiente de difusión
DPH	1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno
FE	factor de extinción
G, S	fase gaseosa y fase sólida respectivamente
GP	polarización generalizada
GPem, GPex	polarización generalizada de emisión y de excitación, respectivamente
LC, LE, LO	fases líquido-condensada, líquido- expandida y líquido-ordenada, respectivamente
lc, g, lo	fases líquido-cristalina, gel y líquido ordenada, respectivamente
GUVs, SUVs	vesículas unilamelares gigantes y pequeñas, respectivamente
mN	milinewtons
MMA	área molecular promedio
MSD	desplazamiento cuadrático medio
r	Anisotropía
Th	espesor semi-empírico de una monocapa

Abreviaturas

T_m	temperatura de <i>melting</i> (determinada por calorimetría diferencial de barrido)
T_t	temperatura de transición
μ_{\perp}	momento dipolar resultante perpendicular a la interfase
π	presión superficial
π_s	presión de interacción intermolecular
π_t	presión de transición

Otras abreviaturas se definen al presentar las ecuaciones específicas que aparecen en el texto.

RESUMEN

Los esfingolípidos de las células germinales y espermatozoides de mamífero son inusuales por contener una alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados de muy larga cadena (VLCPUFA). En las gametas de rata, la esfingomielina (SM) y la ceramida (Cer) contienen especies con ácidos tetraenoicos y pentaenoicos de la serie n-6 de hasta 32 carbonos, en versiones no hidroxiladas (n-V) y 2-hidroxiladas (h-V). Estudios previos habían mostrado que las SM con VLCPUFA se forman en las células espermatogénicas, que la relación entre h-V SM y n-V SM aumenta con la diferenciación celular, y que ambas terminan localizadas específicamente en las cabezas espermáticas. Posteriormente se vio que estas SM disminuyen a medida que aumentan las Cer en las gametas de rata durante reacciones que ocurren en etapas claves de la fertilización, en especial durante la reacción acrosomal. El objetivo de este trabajo fue contribuir al conocimiento de las propiedades biofísicas de estos inusuales esfingolípidos y a determinar cómo estas propiedades cambian como resultado de dichos eventos bioquímicos.

Nuestro primer desafío fue obtener estas relativamente minoritarias especies moleculares en suficiente cantidad y aceptable pureza. Para ello tomamos ventaja de su estructura química. Así, fracciones conteniendo especies de n-V SM y h-V SM se separaron de las mayoritarias SM saturadas y monoenoicas teniendo en cuenta el alto número de dobles ligaduras de sus ácidos grasos. Luego, de la primera fracción se obtuvieron especies de SM con n-28:4, n-30:5 y n-32:5, y de la segunda especies con h-28:4, h-30:5 y h-32:5, aprovechando las diferencias de hidrofobicidad entre estos ácidos grasos. Estas fracciones y especies se incluyeron en sistemas modelo de bicapa y monocapa, y se estudiaron aplicando metodologías e instrumentación previamente validadas para especies de SM con 16:0, 18:1, o 24:1. Un enfoque similar se aplicó para estudiar las especies de las fracciones n-V Cer y h-V Cer.

Al estudiarlas por espectroscopía de fluorescencia, tanto la polarización generalizada (GP) del Laurdan como la anisotropía de fluorescencia (r) del DPH mostraron que la mayoría de las n-V SM y h-V SM compartieron la característica de tener temperaturas de transición (T_t) muy bajas, por debajo de 5 °C, salvo n-32:5 SM y h-32:5 SM, cuyas T_t fueron cercanas a los 22 °C. El aumento en la T_t que podría esperarse debido al inusual largo de la cadena acílica, es pues contrarrestado por la presencia de varias dobles ligaduras en estos ácidos grasos. Estos estudios indicaron que las cadenas acílicas de estas especies se encuentran en un estado desordenado a temperatura fisiológica. Las h-V SM exhibieron mayores valores de GP y de r que las correspondientes especies n-V SM, indicando que el grupo hidroxilo en las primeras tiende a promover las interacciones intermoleculares, probablemente a través de la formación de uniones tipo puente hidrógeno.

Las interacciones entre las SM con VLCPUFA y otros lípidos se investigaron empleando sistemas modelo multicomponente en forma de bicapa. En bicapas formadas por dimiristoíl-PC y estas SM, se concluyó que éstas últimas jugarían el rol de lípidos “fluidificantes”, en discrepancia con la noción generalmente aceptada de que en las membranas celulares las SM son las que restringen la movilidad de otros lípidos. En sistemas conteniendo dioleoil-PC, colesterol y n-V o h-V SM, ninguna de éstas tendió a segregarse en dominios condensados enriquecidos en SM/colesterol a temperatura ambiente, tal como sí lo hizo claramente la 16:0 SM. Las dos estrategias experimentales sugirieron que a temperatura fisiológica y en membranas naturales donde las SM con VLCPUFA coexisten con otros lípidos, como es el caso de la membrana plasmática de la cabeza espermática, estas especies no se concentrarían en áreas de la membrana ricas en colesterol, sino en áreas ricas en glicerofolípidos poliinsaturados, esto es, en dominios más “desordenados” de la membrana.

Una valiosa información acerca de las propiedades de superficie de las SM en estudio se obtuvo de los experimentos realizados en monocapas de Langmuir. Analizando los valores de la presión de superficie (π) y el potencial de superficie (ΔV),

así como los datos de la microscopía de ángulo de Brewster (BAM) en función de la compresión aplicada, se caracterizaron las interacciones intermoleculares durante el empaquetamiento de los lípidos y los cambios termodinámicos implicados en ellas. Las SM con VLCPUFA formaron films con un espesor considerablemente menor al esperado, encontrándose en un régimen líquido-expandido (LE) con una alta libertad conformacional. Sus valores de área molecular media (MMA) fueron llamativamente grandes con respecto a la de las SM conocidas, lo cual indica que un mismo número de moléculas ocupa un área significativamente mayor en la membrana. Las h-V SM mostraron menores MMA que las equivalentes n-V SM, confirmando que el grupo hidroxilo en las primeras favorece las interacciones intermoleculares, permitiendo así un mayor grado de empaquetamiento durante el proceso de compresión, lo que explica que ocupen una menor área en el plano de la membrana. Cuando se obtuvieron las isothermas a 7 °C de las seis especies de SM en estudio, sólo n-32:5 SM y h-32:5 SM mostraron transiciones de fase LE → LC (líquido condensado) de primer orden, otro hallazgo consistente con el comportamiento previamente observado en bicapa.

Las seis especies moleculares mayoritarias de Cer con VLCPUFA también fueron separadas y estudiadas en monocapas de Langmuir. Las isothermas de compresión presentaron una transición de fase LE → LC de primer orden a temperatura ambiente, con segregación de dominios durante esta transición que pudo ser seguida mediante BAM. En ambos estados de fase, todas ellas mostraron valores mucho más altos de MMA y ΔV que las especies conocidas usadas como referencia.

El empaquetamiento molecular y el grado de ordenamiento de las cadenas fue relativamente menor para las n-V Cer que para las h-V Cer. Estas últimas formaron membranas de mayor espesor, ocuparon una menor área de superficie, y presentaron transiciones de fase LE → LC más pronunciadas y cooperativas que las n-V Cer. Tomados en conjunto, los parámetros termodinámicos y de superficie permiten concluir que estas Cer se organizan con sus ácidos grasos en una conformación

curvada, formando monocapas con un espesor menor al esperado, siendo esta característica aún más marcada en las n-V Cer que en las h-V Cer.

Mientras las propiedades reológicas de la h-28:4 SM fueron similares a las de otras especies de SM, las de la h-28:4 Cer fueron atípicas. Así, la fase LC de ésta fue altamente compresible, lo que es consistente con una gran libertad conformacional de sus cadenas hidrofóbicas, pero la difusión en ella, estuvo muy restringida, presentando un coeficiente de difusión (D) 100 veces más bajo que su contraparte h-28:4 SM.

Las propiedades de mezclas en que coexisten h-28:4 SM y h-28:4 Cer fueron estudiadas mediante la pre-mezcla de distintas proporciones de ambas y mediante la generación de la última por acción de una esfingomielinasa colocada en la subfase de un film de h-28:4 SM. Ambos enfoques evidenciaron que la Cer tiende a separarse de la fase fluida en que se encuentra la SM, formando dominios ricos en Cer a medida que aumenta la relación molar Cer/SM. A temperatura fisiológica, estos dominios mostraron una morfología y una organización estructural sobre la superficie del film que difirieron marcadamente de los que exhibió la 16:0 Cer. Tomadas en conjunto, las presentes observaciones podrían ser relevantes para la reorganización estructural que se sabe ocurre sobre la cabeza espermática durante la reacción acrosomal, al completarse la cual la mayor parte de las SM con VLCPUFA preexistentes se convierten en las correspondientes Cer.

ABSTRACT

The sphingolipids of mammalian germ cells and spermatozoa are unique in that they are made up by a high proportion of very long chain polyunsaturated fatty acids (VLCPUFA). In the rat gametes, sphingomyelin (SM) and ceramide (Cer) contain species with tetraenoic and pentaenoic fatty acids of the n-6 series with up to 32 carbon atoms, in non-hydroxylated (n-V) and 2-hydroxylated (h-V) forms. Previous studies had shown that the SM with VLCPUFA are formed in spermatogenic cells, that the ratio between h-V SM and n-V SM increases with germ cell differentiation, and that both are localized specifically on the sperm heads. Then it was seen that these SM decrease as Cer increase in rat gametes during reactions that take place in key stages of fertilization, especially during the acrosomal reaction. The aim of this work was to contribute to the knowledge of the biophysical properties of these unusual sphingolipids and to determine how such properties change as a result of these biochemical events.

Our first challenge was to obtain these relatively minor molecular species in sufficient amounts and with acceptable purity. To this aim we took advantage of their chemical structure. Thus, fractions containing n-V SM and h-V SM species were separated from the major saturated and monoenoic SM taking into account the high number of double bonds of their fatty acids. Then, SM species containing n-28:4, n-30:5 and n-32:5 from the first fraction, and SM species with h-28:4, h-30:5 and h-32:5 from the second one, were obtained by making use of the differences in hydrophobicity among their fatty acids. These fractions and species were included in bilayer and monolayer model systems and studied by applying methodologies and instrumentation previously validated for SM species with 16:0, 18:1 and 24:1. A similar approach was applied to study the species in the n-V Cer and h-V Cer fractions.

When studied by fluorescence spectroscopy, both the generalized polarization (GP) of Laurdan and the fluorescence anisotropy (r) of DPH showed that most of the n-V SM and h-V SM shared the characteristic of having very low transition temperatures

(T_t), both below 5 °C, except n-32:5 SM and h-32:5 SM, whose T_t values were around 22 °C . The increase in T_t that could have been expected to result from the unusual length of the acyl chains is thus counteracted by the presence of several double bonds in these fatty acids. These studies indicated that the acyl chains of these species are in a disordered state at physiological temperature. The h-V SM exhibited higher GP and *r* values than the corresponding n-V SM species, indicating that the hydroxyl group in the former tends to promote intermolecular interactions, probably through the formation of hydrogen-bond type of unions.

The interactions between SM with VLCPUFA and other lipids were investigated by employing multicomponent lipid systems in bilayer form. In bilayers formed by dimiristoyl-PC and these SM, it was concluded that the latter played the role of “fluidifying” lipids, in discrepancy to the generally accepted notion that in cell membranes the SMs are lipids that restrict the mobility of other lipids. In systems containing dioleoyl-PC, cholesterol and n-V SM or h-V SM, neither of these tended to segregate in SM/cholesterol-rich domains at room temperature, as clearly did 16:0 SM. Both experimental strategies suggested that at physiological temperature and in natural membranes were VLCPUFA-containing SM coexist with other lipids, as is the case of the plasma membrane of the sperm head, these species would not concentrate in cholesterol-rich membrane areas, but in areas rich in polyunsaturated fatty acids, namely in more “disordered” domains of the membrane.

Valuable information about the surface properties of the SM under study was obtained from the experiments performed in Langmuir monolayers. By analyzing the values of surface pressure (π) and surface potential (ΔV), and the data from Brewster angle microscopy (BAM) as a function of the compression applied, the intermolecular interactions during the lipid packing and the thermodynamic changes implied in these interactions were characterized. The VLCPUFA-containing SM formed films with a considerably smaller thickness than that expected, and they were found in a liquid-expanded (LE) state with a high conformational freedom. The values of their mean

molecular areas (MMA) were markedly high compared with those of best-known SM species, indicating that the same number of molecules occupies an area significantly larger in the membrane. The h-V SM species displayed lower MMA values than the equivalent n-V SM, confirming that the hydroxyl group in the former facilitates intermolecular interactions, thereby allowing a higher degree of packing during the compression process, and explaining that they occupy a smaller area in the plane of the membrane. When the isotherms of the six SM under study were obtained at 7 °C, only n-32:5 SM and h-32:5 SM exhibited first order LE → LC phase transitions, another finding consistent with the behavior previously observed in bilayer.

The six major molecular species of Cer with VLCPUFA were also separated and studied in Langmuir monolayers. The compression isotherms showed that they underwent a first-order LE → LC (liquid condensed) phase transition at room temperature, the segregation of domains during that transition being clearly followed by means of BAM. In both phase states, all of them had MMA and ΔV values far higher than the Cer species used as reference.

The molecular packing and degree of ordering of the chains were relatively lower for the n-V Cer than for the h-V Cer. The latter formed thicker films, occupied lower surface areas, and presented more pronounced and cooperative LE → LC phase transitions than the n-V Cer. Taken together, the thermodynamic and surface behavior parameters allow to conclude that these Cer species organize with their fatty acids in a curved conformation, forming monolayers with a lower than expected thickness, this feature being more marked for the n-V Cer than for the h-V Cer.

Whereas the rheological properties of h-28:4 SM were similar to those of other SM species, those of h-28:4 Cer were atypical. Thus, the LC phase of the latter was highly compressible, in agreement with a high conformational freedom of their hydrophobic chains, but the diffusion in such phase was highly restricted, showing a diffusion coefficient (D) 100-fold lower than that of h-28:4 SM.

The properties of mixtures in which h-28:4 SM and h-28:4 Cer coexist were studied by mixing them in different proportions and by generating the latter by the action of a sphingomyelinase placed in the subphase of an h-28:4 SM film. Both approaches evidenced that Cer tends to separate from the fluid phase of SM, forming Cer-rich domains as the molar Cer/SM ratio increases. At physiological temperature, these domains had a morphology and structural organization on the film surface that markedly differed from those displayed by 16:0 Cer. Taken together, the present observations could be relevant to the structural reorganization of the membrane that is known to take place on the sperm head during the acrosomal reaction, after the completion of which a major part of the preexisting VLCPUFA-rich SM are converted into the corresponding Cer.

INTRODUCCIÓN

La membrana plasmática celular, además de delimitar el espacio intracelular del extracelular, controla toda la comunicación entre esos dos compartimientos. Permite la transmisión de información por medio de cambios conformacionales de sus moléculas componentes y por interacciones entre ellas, regula el pasaje a través de ella de iones o de diferentes moléculas, y ejerce una influencia decisiva sobre reacciones enzimáticas que se disparan en la célula como consecuencia de dichas interacciones. En 1972, Singer y Nicolson proponen el modelo de mosaico fluido para las membranas celulares (Singer & Nicolson, 1972), en el que se las plantea como una matriz fluida de fosfolípidos en la cual están inmersas las proteínas integrales y a la cual están asociadas las proteínas periféricas. En este fluido bidimensional, proteínas y lípidos pueden rotar y difundir lateralmente, condicionados sólo por sus concentraciones relativas y por las restricciones impuestas desde el interior celular por el citoesqueleto. Luego de 40 años de investigación en el área, esta concepción se ha ido modificando. En la actualidad está demostrada la presencia en la membrana de diferentes “dominios”, que consisten en regiones que difieren en su composición (lipídica y proteica) y en sus propiedades fisicoquímicas. Ello permite concebirlas como estructuras muy dinámicas, alejadas del equilibrio, en las cuales es posible la emergencia de diferentes dominios que persistirán sólo temporalmente. Además, está demostrado que la difusión de los lípidos se encuentra restringida a temperaturas fisiológicas, tanto lateral como rotacionalmente, debido a múltiples interacciones lípido-lípido y lípido-proteína, y tampoco las proteínas pueden difundir libremente en todas direcciones en el plano lateral de la bicapa lipídica (Vereb *et al.*, 2003).

Si bien las membranas de los distintos tipos celulares comparten características comunes, cada membrana tiene propiedades particulares de acuerdo con su función. Con respecto a los lípidos, su composición cualitativa y cuantitativa varía no sólo entre células, sino entre membranas de una misma célula. Así, la proporción de colesterol

respecto a la de fosfolípidos, la naturaleza de la cabeza polar de la clase de fosfolípido que predomine, la longitud y el número de dobles enlaces de sus ácidos grasos, o la posibilidad de ser parcialmente degradados in situ por fosfolipasas específicas localizadas en la membrana misma o en sus adyacencias, son factores que influyen sobre las propiedades fisicoquímicas de la membrana, entre ellas su fluidez. El aumento o la disminución de ésta pueden influir positiva o negativamente sobre procesos enzimáticos y de transporte, o sobre los cambios conformacionales que normalmente pueden sufrir las proteínas incluidas en, o asociadas a, las membranas, modificando su funcionalidad.

Para el estudio de los diferentes estados de fase que pueden adoptar los lípidos en una membrana se han utilizado diversos sistemas modelo de bicapa y monocapa. En bicapas, los lípidos pueden encontrarse en tres estados de fase (Fig.1). En los extremos se encuentran la fase gel (g), en la que sus cadenas acílicas están en una conformación totalmente ordenada y la fase líquido-cristalina (lc), en la que pueden tener una difusión rotacional y lateral relativamente más libre y sus cadenas acílicas se encuentran desordenadas. Con propiedades intermedias entre estos dos estados se encuentra la fase líquido-ordenada (lo), la cual tiene una viscosidad muy baja y en la que, si bien la difusión es similar a la de la fase lc, las cadenas acílicas se encuentran ya en una conformación relativamente ordenada, acercándose por lo tanto a la fase gel.

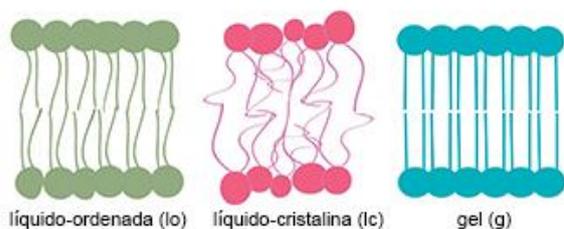


Figura 1. Representación esquemática de los tres tipos de estados de fase que pueden adoptar los lípidos en bicapa: fase líquido-ordenada (lo), fase líquido-cristalina (lc) y fase gel (g).

Cuando los lípidos se organizan en forma de monocapas, se describen las fases en las que pueden estar los lípidos como LC (líquido-condensado) o S (sólida) para las fases más compactas, LE (líquido-expandida) para la forma más expandida y

desordenada, y LO (líquido-ordenada) para la forma intermedia. Estas tres fases por lo tanto equivaldrían en su estado físico a las fases g, lc, y lo, respectivamente, observables en bicapas.

1. Esfingomielinas y ceramidas en las membranas biológicas

La esfingomielina (SM) es uno de los fosfolípidos más ubicuos en las membranas de muchas células eucariotas. La SM se parece a la fosfatidilcolina (PC) en que ambas están constituidas por una fosforil-colina como cabeza polar, pero difiere en la naturaleza de ésta, que consiste en una molécula de ceramida (Cer) en el caso de la SM y en una molécula de diglicérido en el caso de la PC. La unión de la fosforil-colina a estas porciones hidrofóbicas se establece a través de un enlace amida y éster respectivamente. La porción Cer de la SM consiste en una molécula de esfingosina (un amino-di-alcohol graso con 18 átomos de carbono y una doble ligadura trans en el carbono 4) unida a un ácido graso de cadena larga. La SM es relativamente más polar que la PC porque en el carbono 3 de la porción Cer tiene un hidroxilo libre. Los ácidos grasos de las especies moleculares de SM que se encuentran en las membranas biológicas de la mayoría de los mamíferos son saturados (16:0, 18:0, 24:0) o monoinsaturados (18:1, 22:1, 24:1) (Barenholz & Thompson, 1980).

Las cadenas hidrocarbonadas de la SM son en general más largas y más saturadas que las de las especies moleculares de PC. Aún en las especies monoinsaturadas de SM, el único doble enlace del ácido graso está ubicado lejos de la interfase lípido/agua. Debido a estas características la SM es considerada un importante componente estructural, confiriendo un alto grado de orden a la región hidrofóbica de la membrana (Niemela *et al.*, 2004).

La SM es conocida por tener una gran influencia sobre las propiedades biofísicas de las membranas (Ramstedt & Slotte, 2002; Slotte, 1997). Una de las propiedades más conocidas de la SM es su capacidad de segregar lateralmente con el colesterol (Col) formando dominios ordenados, a los cuales se les ha asignado el término de

“*lipid raft*” o “balsas lipídicas” (Mayor & Rao, 2004; Pike, 2004; Simons & Ikonen, 1997). Estos dominios, caracterizados por ser dinámicos y transitorios en el tiempo, han adquirido una gran popularidad, debido a que han sido involucrados en procesos celulares tan diversos y significativos como el tráfico de membranas o el ordenamiento (*sorting*) de proteínas. Sin embargo, las características más profundas de estos dominios aún permanecen sin conocerse o están bajo controversia; incluso se ha llegado a cuestionar su existencia (Lai, 2003; Munro, 2003). Esta incertidumbre se debe en parte a las limitaciones asociadas a las técnicas experimentales utilizadas para su estudio. Uno de los puntos que todavía permanece sin esclarecer es la naturaleza de las interacciones moleculares entre los principales componentes. Los estudios se han centrado fundamentalmente sobre la interacción SM-Col, la cual es usualmente explicada en términos de una asociación “específica” que podría estar relacionada con la capacidad de la SM y el Col de formar interacciones a través de puentes hidrógeno. Por otra parte se ha propuesto que la interacción entre la SM y otros componentes de la membrana, como por ejemplo el Col y las proteínas, también puede estar condicionada por la longitud y el número de insaturaciones de sus cadenas hidrocarbonadas (Brown, 1998; Holopainen *et al.*, 2004).

En numerosos trabajos se han descrito las propiedades biofísicas de las especies moleculares de SM y Cer con ácidos grasos saturados y monoenoicos (Bjorkqvist *et al.*, 2009; Dupuy *et al.*, 2011; Dupuy & Maggio, 2012; Goni & Alonso, 2009), así como también los efectos originados por la conversión enzimática SM → Cer. Estos dos esfingolípidos se caracterizan por tener una geometría muy diferente entre sí; la SM es una molécula cilíndrica (parámetro de empaquetamiento ~ 1), que tiende a formar bicapas (fase lamelar) cuando se encuentra en dispersión acuosa (Barenholz & Thompson, 1999). Por el contrario, la Cer tiene un parámetro de empaquetamiento >1 y tiende a formar estructuras invertidas (fase HII) en un medio acuoso (Israelachvili, 1991), favoreciendo de esta manera la formación de estructuras lipídicas no lamelares con alta curvatura (Goni *et al.*, 2005; Holopainen *et al.*, 2000).

Utilizando espectroscopía de fluorescencia en LUVs (*large unilamellar vesicles*) se observó que la generación de Cer por acción de una esfingomielinasa (SMasa) induce la agregación de los mismos (Ruiz-Arguello *et al.*, 2002) y la liberación del contenido vesicular, lo que resulta de cambios en la permeabilidad de la bicapa (Montes *et al.*, 2002; Ruiz-Arguello *et al.*, 1996). Además, cuando vesículas unilamelares gigantes (conocidas como GUVs por su abreviatura en inglés, *giant unilamellar vesicles*) formadas por SM, PC y Col son sometidos a la acción de esta enzima, resultan destruidas como consecuencia de la generación enzimática de Cer (Lopez-Montero *et al.*, 2007).

En monocapas, el seguimiento en tiempo real de la conversión de SM en Cer por acción de la SMasa permitió evidenciar cambios topográficos específicos, como la formación de dominios líquido-condensados (LC) ricos en Cer, que varían en su tamaño desde pocas micras hasta cientos de micras, dependiendo de la velocidad de hidrólisis (De Tullio *et al.*, 2008). Estos dominios LC se segregan de la fase rica en SM, que se encuentra en fase LE. La razón por la cual se produce esta segregación es la fuerte interacción que se genera entre las moléculas de Cer entre sí, y de la baja solubilidad de los dominios de Cer resultantes en la fase LE. Ello se refleja en la alta temperatura de *melting* (T_m) de la Cer (la cual es ~ 90 °C) en comparación con la T_m de la mayoría de los fosfolípidos y aún de la propia SM con los mismos ácidos grasos (~ 37 - 40 °C). Claramente la hidrólisis de SM por la SMasa no sólo afecta radicalmente la composición de la membrana, sino también su estructura.

2. Especies moleculares de esfingomielina y ceramida con ácidos grasos poliinsaturados de muy larga cadena

El tejido testicular y los espermatozoides de varias especies de mamífero, incluido el hombre, se caracterizan por contener especies de SM con una infrecuente serie de ácidos grasos poliinsaturados de muy larga cadena (VLCPUFA) (Poulos *et al.*, 1987). Estos ácidos grasos son versiones elongadas de ácidos grasos poliinsaturados

corrientes de 20 o 22 átomos de carbono, tales como araquidónico (20:4n-6), eicosapentaenoico (20:5n-3), docosapentaenoico (22:5n-6), o docosahexaenoico (22:6n-3). Casi contemporáneamente a este estudio, el mismo tipo de ácidos grasos se describió en la PC de las células fotorreceptoras de la retina de varios vertebrados, incluyendo mamíferos, aves y peces (Avelano, 1987). Tanto en las PC retinales como en las SM testiculares, los VLCPUFA caracterizados tienen hasta 34 átomos de carbono y pertenecen a las series n-6 o n-3, esto es, derivan del 18:2 n-6 o del 18:3 n-3 respectivamente, dependiendo de la especie de mamífero.

En los espermatozoides ovinos y bovinos, las SM son ricas en VLCPUFA pentaenoicos y hexaenoicos de la serie n-3 con hasta 34 átomos de carbono (Poulos *et al.*, 1987), mientras que los de rata contienen principalmente ácidos grasos tetraenoicos y pentaenoicos de la serie n-6 con 28 a 32 átomos de carbono (Robinson *et al.*, 1992). Además de este tipo de VLCPUFA, en testículo y espermatozoides de algunos mamíferos, como el cerdo y la rata, la SM demostró una nueva peculiaridad en sus ácidos grasos, al demostrarse que parte de los VLCPUFA están 2-hidroxilados (Robinson *et al.*, 1992) (h-VLCPUFA, que aquí abreviaremos como h-V para distinguirlos de los VLCPUFA no hidroxilados, que en adelante abreviaremos n-V).

Muchos años pasaron sin que aparecieran en la literatura trabajos sobre los lípidos con VLCPUFA, hasta que la característica de las SM de contener los mismos ácidos grasos se vio reflejada en las Cer testiculares y de espermatozoides de varios mamíferos, en las cuales los porcentajes de VLCPUFA son aún mayores que en la SM (Furland *et al.*, 2007b). Posteriormente, las Cer de testículo y de espermatozoide de rata demostraron contener ambos tipos de VLCPUFA, esto es, n-V y h-V, con predominio de estos últimos (Oresti *et al.*, 2010b; Zanetti *et al.*, 2010a)

En trabajos previos de nuestro laboratorio se demostró que ambos tipos de VLCPUFA están totalmente ausentes del tejido testicular de animales prepúberes, que aparecen en el mismo a partir del momento del desarrollo postnatal en que comienza la espermatogénesis, y que perduran durante toda la vida adulta. También se observó

que ambos tipos de ácidos grasos se pierden, no encontrándose en las Cer y SM que quedan en el tejido testicular de animales adultos, tiempo después de provocar la desaparición selectiva de las células de la línea germinal por tratamiento con el antineoplásico doxorubicina (Zanetti *et al.*, 2007) o con una única dosis de rayos X (Oresti *et al.*, 2010a).

Durante el desarrollo postnatal, las n-V SM y n-V Cer aparecen antes que las correspondientes h-V SM y h-V Cer (Zanetti *et al.*, 2010a). A la inversa, en ratas adultas fértiles que son gradualmente privadas de sus células germinales *in vivo* luego del tratamiento con doxorubicina (Zanetti *et al.*, 2010a) o con una única dosis de rayos X (Oresti *et al.*, 2010a), desaparecen primero las n-V SM y n-V Cer y sólo dos semanas después lo hacen las h-V SM y h-V Cer. Estos estudios *in vivo* no sólo confirmaron que estas especies de lípidos pertenecen a las células germinales, sino que indicaron que debe haber una relación entre el grado de diferenciación de las mismas y el tipo de VLCPUFA predominante.

Trabajos realizados en células germinales aisladas a partir de túbulos seminíferos de rata demostraron que efectivamente éste es el caso (Oresti *et al.*, 2010b), ya que los espermatoцитos contienen casi exclusivamente n-V SM y n-V Cer, mientras que las espermátidas redondas contienen abundante cantidad de h-V SM y h-V Cer. En los espermatozoides extraídos del epidídimo de la rata se encontraron especies de SM con ambos tipos de VLCPUFA, lo que permitió pensar que la función fisiológica final de estas especies se cumple, no en el testículo mismo, sino en las gametas.

Estudios sobre la distribución topológica de la SM espermática (Furland *et al.*, 2007a; Oresti *et al.*, 2011) demostraron que la casi totalidad de la SM con VLCPUFA se localiza en la cabeza de la gameta. Esta topología sugiere claramente una relación lípido-localización-función, ya que es en la cabeza del espermatozoide donde se encuentra el acrosoma, sitio de la gameta en el que se cumple un paso fundamental para la fertilización, la reacción acrosomal. En el último de estos estudios se vio

también que en la rata la SM de la cola espermática contiene ácidos grasos saturados, con predominio de 16:0. Dado que la cola contiene la pieza media, en la que se encuentran las mitocondrias espermáticas, una buena proporción de esta SM debería corresponder a ellas.

En otros estudios se abordó la cuestión del rol que cumplirían las n-V SM y las h-V SM en las reacciones fisiológicas del espermatozoide, como son la capacitación y la reacción acrosomal, que pueden provocarse *in vitro*. La reacción acrosomal, inducida en gametas previamente capacitadas por el agregado del ionóforo A23187, resultó en una casi completa hidrólisis de las SM con VLCPUFA, tanto n-V como h-V, para dar las correspondientes Cer (Zanetti *et al.*, 2010b). Un resultado de la reacción acrosomal es pues que se produce la reacción irreversible $SM \rightarrow Cer$, y como consecuencia de ello la cabeza espermática se vuelve rica en Cer.

En resumen, los resultados de trabajos previos al inicio de esta tesis permitieron concluir que las SM con VLCPUFA no hidroxilados son producidas en las células germinales más inmaduras de los túbulos seminíferos, y que estas especies sufren cambios, incluida la hidroxilación de parte de estos ácidos grasos, a medida que progresa la diferenciación, en la cual las células se elongan y reducen su tamaño. Parte de las n-V SM se transforman en h-V SM en las espermátidas, y eventualmente ambas SM se concentran en la cabeza espermática. Dicha transformación, cuyo objetivo biológico es que estas especies formen parte de las gametas masculinas maduras, pone el foco en la cabeza espermática, donde normalmente no hay ceramidas (Oresti *et al.*, 2011), pero que pueden producirse a partir de estas SM (Zanetti *et al.*, 2010b). Así, las SM y Cer con VLCPUFA se ubican en el “centro de la escena” de un proceso trascendente para la vida: la fertilización.

Luego de varios años desde su descubrimiento, el interés por los lípidos de membrana con VLCPUFA, tanto en la retina como en las células germinales, ha cobrado nueva relevancia, debido a hallazgos que relacionan ciertas enfermedades o trastornos con una deficiente producción de estos lípidos. Por ejemplo, se ha

demostrado que ratones manipulados genéticamente para que carezcan del gen que codifica una proteína o una enzima necesaria para que se formen los VLCPUFA sufren de una forma de ceguera (Agbaga *et al.*, 2008) o son infértiles (Huyghe *et al.*, 2006).

A pesar de los avances hasta aquí descritos sobre las SM y Cer con VLCPUFA, a comienzos de esta tesis se desconocían por completo las propiedades biofísicas que estas especies proporcionan a las membranas en las que ocurren. Es por esto que nuestro objetivo general en este estudio fue contribuir al conocimiento de dichas propiedades. Para ello nos propusimos utilizar distintos sistemas modelo, poniendo a estos inusuales lípidos en bicapas y en monocapas, y aplicando metodologías e instrumentación aceptadas para indagar sobre estas propiedades en otros lípidos. Una estrategia frecuente que se utilizó fue compararlas en las mismas condiciones experimentales con especies de SM y Cer cuyas propiedades se conocen, como es el caso de las que contienen ácidos grasos saturados y monoinsaturados de distinto largo de cadena, como el 16:0, el 18:1, o el 24:1. Un desafío importante que afrontamos inicialmente fue el de poder obtener cantidades suficientes de las especies moleculares de estas peculiares SM y Cer con VLCPUFA, tanto n-V como h-V, a partir de sus fuentes naturales. Una vez superado este obstáculo, logramos realizar un estudio pormenorizado de estas fracciones, así como de las especies moleculares individuales de SM y Cer presentes en cada una de ellas, lo que nos permitió contestar muchos de los interrogantes planteados al iniciar esta tesis, hallando que poseen una serie de propiedades que las distinguen ampliamente de las especies de SM y Cer más conocidas, ubicuas en casi todos los tejidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Como fuente de las esfingomielinas y ceramidas estudiadas en esta tesis se emplearon ratas macho, cepa Wistar, de 3 a 4 meses de edad (300 a 400 g de peso corporal). Los animales fueron mantenidos en condiciones estándar en el bioterio del INIBIBB, con alimento y agua *ad libitum*. Inmediatamente luego del sacrificio, realizado de acuerdo con procedimientos aceptados por las normas actuales de manejo de animales de laboratorio, los testículos fueron removidos, decapsulados, desprovistos de vasos sanguíneos visibles, y homogeneizados en solventes para extraer sus lípidos.

El equipamiento utilizado en este estudio consistió en homogeneizadores, disruptores de tejidos, centrifugas y ultracentrifugas, microscopios de fluorescencia y confocal, sistema de evaporación de solventes bajo nitrógeno, lámpara de luz UV, estufas, cromatógrafo de gases y cromatógrafo líquido de alta presión (HPLC) (ambos de Varian-Agilent, USA), espectrofluorímetro modelo 4800 (SLM Instruments, Urbana, IL), balanza de Langmuir Monofilmeter (Mayer Feinttechnik, Gottingen, Alemania), elipsómetro (Accurion GmbH, Germany).

Los reactivos químicos y enzimas utilizados en los experimentos que se describen se adquirieron en Sigma Aldrich Co. Los solventes empleados para la cromatografía en capa fina y HPLC fueron de laboratorios J.T. Baker, Merck, Dorwill y UVE. La sílica gel G y H para la cromatografía en capa fina (TLC), así como las placas de capa fina de alta resolución, provinieron de laboratorios Merck. Las sondas fluorescentes de Molecular Probes (Eugene, OR, USA) y los fosfolípidos de Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) fueron utilizados sin previa purificación adicional.

1. Procedimientos preparativos y analíticos para el estudio de los lípidos

1.1. Extracción de los lípidos

Para extraer los lípidos del tejido testicular, éste se colocó en un homogenizador de vidrio y se trató exhaustivamente con mezclas de cloroformo y metanol (Bligh & Dyer, 1959), recogiendo los homogenados en tubos de vidrio y conservándolos a 4 °C bajo atmósfera de N₂. Posteriormente se realizaron las particiones, centrifugaciones para separar la fase orgánica de la acuosa, y lavados de la fase orgánica según lo indicado en dicho método.

1.2. Aislamiento de esfingomielinas con VLCPUFA

La SM testicular de rata fue separada de otros lípidos por TLC. El extracto lipídico se sembró bajo una corriente de N₂ en forma de banda estrecha, en una cantidad equivalente a 1 mg de de fósforo lipídico total por placa, sobre placas de 20x20 cm y 500 µm de espesor previamente preparadas con sílica gel H y una solución de acetato de magnesio al 3 %, secas y activadas durante media hora a 110 °C. Se empleó una mezcla de cloroformo:metanol:agua (65:25:5, en vol.) como sistema de solventes. Luego de su resolución, las placas se rociaron con 2,7-diclorofluoresceína y los lípidos fueron localizados bajo luz UV. Las bandas conteniendo SM se rasparon, se colectaron en tubos y se recuperaron desde la sílica mediante al menos tres extracciones sucesivas de ésta con una mezcla de cloroformo:metanol:agua (5:5:1, en vol.). A los eluidos colectados se les adicionó 4.5 volúmenes de agua para realizar una partición en la que los lípidos neutros y polares mayoritarios quedan en la fase orgánica. Las SM así obtenidas fueron rutinariamente llevadas a sequedad bajo atmósfera de N₂ y expuestas a un tratamiento alcalino suave mediante el agregado de una solución de NaOH 0.5 N en metanol, 10 minutos a 50 °C bajo N₂ (Kates, 1972). Este procedimiento no afecta la unión amida de la SM pero sí las uniones éster de lípidos que potencialmente pudieran haber co-migrado con ella, lo

que permite asegurar, al realizar el siguiente paso cromatográfico, que las muestras contienen sólo SM.

La SM total así tratada se sometió a TLC sobre placas preparadas con sílica gel G, empleando como sistema de solventes cloroformo:metanol:ácido acético:NaCl 0.15 M (50:25:8:2.5, en vol.). Las SM tendieron a resolverse en 2 bandas. La banda de menor valor de R_f contenía las especies de SM con VLCPUFA hidroxilados (h-V SM) y la fracción con un R_f levemente mayor contenía las especies de SM con ácidos grasos no hidroxilados, entre ellos los VLCPUFA no hidroxilados (n-V SM) de nuestro interés. Sin embargo, estas bandas estaban sólo parcialmente separadas entre sí, por una parte, debido a la alta polaridad del grupo fosforilcolina, y por otra, debido a la gran abundancia en el tejido testicular de especies de SM con ácidos grasos “comunes”, mayoritariamente saturados (como 16:0 y 18:0), y en menor cantidad saturados más largos (24:0) y monoenoicos (18:1, 24:1), que se superponían sobre las SM de nuestro interés. Separar estas especies representó un desafío para nuestro propósito de obtener las especies moleculares de SM con ambos tipos de VLCPUFA.

Inicialmente se trató de separarlas directamente por HPLC, lo que parecía promisorio dado que las abundantes SMs con 16:0 y 18:0 emergían mucho antes que las que tenían VLCPUFA cuando se utilizaban columnas de fase reversa. Sin embargo, dado que las especies con VLCPUFA representan sólo un 10-15 % de la SM total en el testículo de rata, la cantidad de SM que se necesitaba inyectar para poder detectarlas era muy alta. Eso sobrepasó la capacidad de las columnas para retener las especies con 16:0 y 18:0, lo que resultó en una contaminación de los picos de VLCPUFA con estas especies. Otro problema con que nos encontramos fue que las especies 24:0 SM y 24:1 SM tendían a co-migrar en parte con los picos de nuestro interés, 28:4 SM y 30:5 SM.

Este problema, que nos llevó bastante tiempo resolver, fue sorteado cuando pensamos en tomar ventaja del alto grado de insaturación de las especies de SM con VLCPUFA. Pensamos que utilizando cromatografía de impregnación argéntica (Ag-

TLC), estas SM, por ser tan insaturadas, debían ser más fuertemente retenidas por la fase estacionaria que las más abundantes saturadas y monoenoicas. Preparamos placas conteniendo 10 g sílica gel G y 2 g AgNO₃ en agua, empleamos como solvente cloroformo:metanol:agua (65:25:4, en vol.), y observamos que, efectivamente, este fue el caso. Las especies de SM con ácidos grasos saturados (S) y monoenoicos (M) (que colectamos juntas y que en adelante denominamos S+M SM) migraron mucho más que las SM con ambos tipos de VLCPUFA, que quedaron juntas, cerca del origen de las placas. Estas últimas fueron recuperadas y sometidas nuevamente a una última TLC sobre sílica gel H, como se describió anteriormente, tomando la precaución de sembrar una cantidad de SM relativamente baja por centímetro en las placas. Estos pasos permitieron obtener no sólo SM con VLCPUFA puras, sino separadas entre sí en dos subfracciones, una rica en n-V SM y otra rica en h-V SM.

Inicialmente estas dos subfracciones se emplearon directamente, en estudios en que se compararon las n-V SM y h-V SM entre sí y con la fracción S+M SM. Más adelante ambas subfracciones con VLCPUFA se sometieron a HPLC de fase reversa por separado para obtener preparativamente sus principales especies componentes.

1.3. Separación de especies de n-V SM y h-V SM

La cromatografía líquida de alta presión (HPLC) fue llevada a cabo a 40 °C utilizando una columna (250 x 4.6 mm) empaquetada con partículas esféricas de 5 µm de diámetro, recubiertas con octilsilano (C8) (Microsorb-MV, Rainin LC). El solvente empleado como fase móvil fue metanol:buffer fosfato 3 mM (pH 7.4) (96:4 en vol.), bombeado isocráticamente a un flujo de 1 mL/min. Las subfracciones de SM obtenidas como se describió anteriormente fueron filtradas para remover trazas de material particulado, llevadas a sequedad y redisueltas en un pequeño volumen del solvente componente de la fase móvil. Alícuotas apropiadas de estas SM (no más de 5 µg de fósforo lipídico por inyección), fueron inyectadas secuencialmente hasta obtener la cantidad requerida para los estudios.

Los picos del HPLC fueron detectados con un espectrofotómetro UV de longitud de onda variable, fijado en 205 nm. Después de ser colectadas, las especies moleculares de SM fueron recuperadas por partición del eluido metanólico con cloroformo y agua (Bligh & Dyer, 1959), seguida de evaporación del solvente de la fase inferior. Alícuotas de cada una de las fracciones colectadas fueron reinyectadas en el HPLC en las mismas condiciones, con el fin de chequear su pureza, la cual en todos los casos fue mayor al 95 %. La identificación de las especies colectadas en cada pico fue confirmada por análisis de sus ácidos grasos por cromatografía gaseosa (GC) y su cuantificación se realizó sobre la base de su contenido de fósforo.

1.4. Aislamiento de ceramidas con VLCPUFA

Para obtener las ceramidas, el extracto lipídico total de testículo de rata se sembró en forma de banda bajo atmósfera de N₂ sobre placas de 20x20 cm y 500 µm de espesor previamente preparadas con sílica gel G. Empleando una mezcla de cloroformo:metanol:amoníaco (90:10:2, en vol.), la Cer se separó en dos bandas bien definidas. La banda inferior, con menor valor de R_f, contenía exclusivamente especies de Cer con VLCPUFA hidroxilados (h-V Cer), mientras que la superior contenía las especies con ácidos grasos no hidroxilados, incluyendo las Cer “comunes”, con ácidos grasos como 16:0 o 18:0, más las especies con VLCPUFA no hidroxilados de nuestro interés (n-V Cer). Las dos fracciones fueron recuperadas y sometidas a tratamiento alcalino suave, empleando el mismo protocolo que para las SM, solo que en este caso, en la segunda cromatografía se empleó como sistema de solventes cloroformo:metanol:amoníaco:agua (90:10:0.5:0.5, en vol.). Esto permitió observar que las h-V Cer migraban en una sola banda, mientras que el conjunto de las Cer con ácidos grasos no hidroxilados se separaba parcialmente en bandas, de acuerdo con la longitud de sus ácidos grasos. Si bien la banda que migraba más adelante estaba enriquecida en n-V Cer, ésta se encontraba parcialmente “contaminada” con proporciones pequeñas pero variables de especies de Cer con ácidos grasos más

cortos. Aplicando el mismo criterio que para las SM, realizamos una cromatografía de impregnación argéntica con el objeto de librar a las fracciones h-V Cer y n-V Cer de potencial contaminación con especies con ácidos grasos distintos de los VLCPUFA.

Para ello empleamos sílica gel G impregnada con 10 % AgNO_3 y cloroformo:metanol (80:20, en vol.) como solvente. Como se esperaba, las Cer con ácidos grasos saturados y monoenoicos de C_{16} a C_{26} se separaron de las especies con VLCPUFA. Sin embargo, a diferencia de las SM con VLCPUFA, que como se describió antes permanecían juntas en este paso, las Cer con VLCPUFA se separaron parcialmente en dos bandas. La superior contenía principalmente las especies con ácidos grasos tetraenoicos (n-28:4 Cer) y la inferior estaba enriquecida en las especies con ácidos grasos pentaenoicos (n-30:5 Cer y n-32:5 Cer). Decidimos recoger las dos bandas por separado para facilitar la separación ulterior por HPLC.

Las h-V Cer se comportaron en forma similar a las n-V Cer al ser sometidas al mismo procedimiento de Ag-TLC, con la única diferencia de que migraron menos, debido a la presencia del grupo hidroxilo.

Después de la pre separación, cada una de las fracciones fue eluida como se detalló antes para otros lípidos, y, como en el caso de las SM, luego de la partición se incluyó un lavado de la fase clorofórmica con metanol:NaCl 1 M (1:1 en vol.) para remover posibles restos de iones Ag^+ . Las fases orgánicas fueron filtradas para remover trazas de material particulado, secadas bajo N_2 y resuspendidas en metanol, para ser finalmente sometidas a HPLC en fase reversa, empleando la misma columna y los mismos solventes que habíamos usado para las SM con VLCPUFA.

A medida que aparecían, los picos de Cer se colectaron manualmente. El solvente colectado luego de varias repeticiones del proceso se sometió a partición, agregando agua y cloroformo, recuperando las Cer separadas en las fases clorofórmicas. Se tomaron alícuotas para identificar y cuantificar las n-V Cer y h-V Cer por GC de sus ácidos grasos. Para cuantificar, previo a la metanólisis, se agregaron a las muestras cantidades apropiadas de 16:0 Cer y h-24:0 (2S-OH) Cer, respectivamente.

1.5. Análisis de ácidos grasos normales e hidroxilados

Para estudiar su composición en ácidos grasos, así como para cuantificarlas, tanto las fracciones como las especies moleculares separadas de SM y de Cer se analizaron por GC, previa conversión de sus ácidos grasos en metil ésteres. Alícuotas conteniendo el lípido a analizar se transfirieron a tubos con tapa a rosca con cubierta interna de Teflon, se secaron y se les agregó una solución de metanol conteniendo H_2SO_4 2 % en presencia de Na_2SO_4) anhidro. Luego de agregar una atmósfera de nitrógeno, los tubos se cerraron herméticamente y se mantuvieron a 45 °C en una estufa durante toda la noche (Christie, 1982). Los metil ésteres así obtenidos, en solución metanólica, se extrajeron en la fase clorofórmica luego de agregar 1 volumen de cloroformo y 1 volumen de agua, agitar y centrifugar. Esta fase se secó bajo N_2 y los metil ésteres se purificaron por TLC sobre placas de sílica gel G previamente lavadas con metanol:éter (75:25 en vol.).

Los metil ésteres de ácidos grasos normales (no hidroxilados) se separaron utilizando hexano:éter (95:5, en vol.) como solvente (R_f aprox. 0.5), se localizaron bajo luz ultravioleta luego de rociar las placas con 2,7-diclorofluoresceína, y se eluyeron de la sílica por partición, agregando secuencialmente igual volumen de agua, metanol y hexano, agitando exhaustivamente la mezcla, centrifugando y recogiendo la fase hexánica. Se realizaron en total 3 extracciones con hexano.

Para la purificación de los metil ésteres de ácidos grasos 2-hidroxilados, se utilizó también TLC sobre placas pre-lavadas, sólo que el solvente fue hexano:éter (80:20 en vol.) (R_f aprox. 0.5). Debido a su mayor polaridad con respecto a los metil ésteres no hidroxilados, los h-metil ésteres se eluyeron con una mezcla más fuerte de solventes, cloroformo:metanol:agua (5:5:1 en vol.), y sobre el volumen de los eluidos se realizó una partición con 4 volúmenes de agua recogéndolos en fase clorofórmica. Para incrementar su volatilidad en fase gaseosa, se redujo la polaridad del grupo hidroxilo de los h-metil ésteres mediante su conversión en un grupo O-trimetil-sililo (O-

TMS). Para esta derivatización, se adaptó un protocolo utilizado por Ramstedt *et al* (1999) para el análisis de bases esfingoideas. Los hidroximetilésteres se llevaron a sequedad y se solubilizaron en 50 µl de hexano, se agregaron 100 µl de una mezcla de bis-trimetilsilil-trifluoroacetamida (BSTFA) + 5 % de trimetilclorosilano (TMCS), se introdujo N₂ y los tubos se cerraron herméticamente, dejándolos durante la noche a 45 °C. Los O-TMS derivados de los hidroximetilésteres así obtenidos se inyectaron directamente en el GC luego de evaporar los reactantes bajo nitrógeno y resuspenderlos en hexano.

Para la fase gaseosa se utilizó un cromatógrafo Varian 3700 provisto de 2 columnas de vidrio (2 m de longitud x 2 mm de diámetro) empaquetadas con una fase estacionaria polar, 10 % SP2330 (Supelco, CA, USA), empleando N₂ como gas portador (30 ml/min). El cromatógrafo está equipado con dos detectores de ionización de llama operados en el modo dual-diferencial desde el electrómetro. Las temperaturas del inyector y del detector fueron 220 °C y 230 °C, respectivamente. Las separaciones de los O-TMS derivados se realizaron sometiendo el horno de las columnas a gradientes de temperatura, con incrementos lineales de 5 °C por minuto. La temperatura final se mantuvo constante durante el tiempo necesario para permitir la elución completa desde la columna de los VLCPUFA de interés en cada caso.

La principal diferencia entre el análisis de ácidos grasos no hidroxilados y 2-hidroxilados radicó en la temperatura del horno de la columna, que fue mayor para los últimos. Utilizando el mismo gradiente de temperatura (5 °C/min), las temperaturas inicial y final fueron respectivamente 150 °C y 230 °C para los primeros, y 193 °C y 240 °C para los segundos. Los metil ésteres se identificaron sobre la base de sus tiempos de retención y la cuantificación se realizó por integración electrónica (Varian Workstation).

1.6. Cuantificación de esfingomielinas

Los extractos conteniendo SM total, sus fracciones y sus especies moleculares fueron llevados a sequedad bajo N_2 y resuspendidos en cloroformo:metanol (2:1). Se tomaron alícuotas, y luego de secarlas se determinó su contenido de fósforo (Rouser et al., 1970). Brevemente, el fósforo de los lípidos se libera en forma de fosfato inorgánico por digestión con ácido perclórico concentrado. Tras la adición de molibdato de amonio, el fosfato forma fosfomolibdato de amonio, y éste se reduce tras el agregado de ácido ascórbico y calentamiento a 100 °C para dar un complejo estable con un máximo de absorción a 800 nm.

2. Estudios en bicapa mediante espectroscopia de fluorescencia

2.1. Preparación de liposomas

Las mediciones de fluorescencia se realizaron en vesículas unilamelares pequeñas (SUVs, abreviatura que proviene del inglés *small unilamellar vesicles*) conteniendo los lípidos en estudio y marcadores fluorescentes. Para preparar los SUVs se tomaron alícuotas con cantidades conocidas de los lípidos y se agregaron las sondas, Laurdan o 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) (Fig. 2). Estas sondas estaban disueltas en etanol o dimetil sulfoxido, respectivamente, y se agregaron para obtener una relación molar lípido:sonda fluorescente de 100:1.

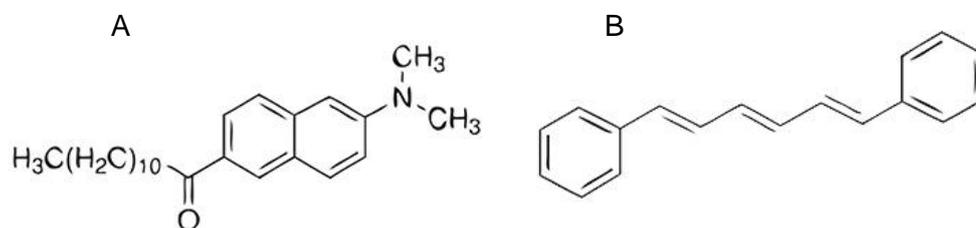


Figura 2. Estructura química de las sondas fluorescentes Laurdan (A) y 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) (B).

Las mezclas se colocaron durante una hora bajo un flujo constante de N_2 en oscuridad, luego de lo cual la película lipídica formada se hidrató mediante la adición

de buffer A (20 mM HEPES buffer, 150 mM NaCl y 0.25 mM MgCl₂, pH 7.4) e incubación en un baño a una temperatura superior a la de transición de fase gel-líquido cristalino (I_c) de los lípidos contenidos en las distintas muestras. Cada suspensión se agitó en un vortex durante 1 min., se sumergió en un baño ultrasónico durante 30 min y finalmente se diluyó con buffer A para alcanzar una concentración final del lípido de 100 μM.

Todas las mediciones de fluorescencia se realizaron utilizando un espectrofluorímetro SLM modelo 4800, formato T, utilizando el haz de luz polarizado verticalmente de una lámpara Hannovia 200 W Hg/Xe común, polarizadores Glan-Thompson (4 nm) y cubetas de cuarzo de 5x5 mm. La temperatura de las muestras fue controlada mediante un baño de agua circulante con termostato (Haake, Darmstadt, Alemania).

2.2. Cálculo de la Polarización Generalizada (GP)

La polarización generalizada explota la capacidad de la sonda Laurdan de sensar la polaridad del ambiente en que se encuentra. El valor de GP es dependiente de la cantidad de agua en la membrana, la cual está relacionada directamente con la polaridad de la membrana e indirectamente con el orden de los lípidos en ella, por lo que valores altos de GP denotan un mayor orden estructural de los mismos. Los valores de polarización generalizada de excitación (GP_{ex}) se calcularon a partir de espectros de emisión de fluorescencia, utilizando una longitud de onda de excitación de 360 nm mediante la siguiente fórmula:

$$GP_{ex} = \frac{I_{434} - I_{490}}{I_{434} + I_{490}} \quad (\text{Ecuación 1})$$

siendo I₄₃₄ e I₄₉₀ las intensidades de emisión de fluorescencia a las longitudes de onda características de las fases gel (434 nm) y líquido-cristalina (490 nm), respectivamente.

Los valores de polarización generalizada de emisión (GPem) se obtuvieron a partir del espectro de excitación de la sonda Laurdan, obtenido variando la longitud de onda de excitación (320-420 nm) en función de la intensidad de fluorescencia a una longitud de onda de emisión fija (434 nm), utilizando la siguiente fórmula:

$$GPem = \frac{I_{410} - I_{340}}{I_{410} + I_{340}} \quad (\text{Ecuación 2})$$

donde I_{410} y I_{340} son las intensidades de emisión de fluorescencia a las longitudes de excitación características de las fases gel (410 nm) y líquida-cristalina (340 nm), respectivamente (Parasassi *et al.*, 1993).

2.3. Medida de la anisotropía (r)

La anisotropía de la sonda DPH es un parámetro que mide el movimiento rotacional de la misma en el entorno hidrofóbico de las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos de membrana, reflejando de esta manera el estado de orden de las mismas. Las longitudes de onda de excitación y de emisión empleadas fueron 365 nm y 425 nm, respectivamente. Las medidas se realizaron con el espectrofluorímetro en formato T, colocando filtros Schott KV418 en ambos canales de emisión, y fueron corregidas por el error óptico y por las señales de fondo. Los valores de anisotropía (r) fueron obtenidos a partir de la siguiente fórmula: (Grunberger *et al.*, 1982)

$$r = \frac{\left(\frac{I_v}{I_h}\right)_v - \left(\frac{I_v}{I_h}\right)_h}{\left(\frac{I_v}{I_h}\right)_v + 2\left(\frac{I_v}{I_h}\right)_h} \quad (\text{Ecuación 3})$$

donde $(I_v/I_h)_v$ y $(I_v/I_h)_h$ son las relaciones entre la luz emitida polarizada vertical u horizontalmente, con respecto a la luz de excitación polarizada vertical u horizontalmente, respectivamente (Lakowicz *et al.*, 1999).

2.4. Cálculo de temperaturas de transición

La temperatura de transición (T_t) de los lípidos se obtuvo a partir de los valores experimentales de GP o de r expresados en función de la temperatura. En el presente estudio la temperatura se varió entre 5 y 45 °C. El punto de inflexión de la curva corresponde a la T_t , el cual se determinó calculando el cero de la segunda derivada.

2.5. Extinción de la fluorescencia de la sonda DPH

Con el fin de determinar si las SM con VLCPUFA son o no capaces de segregarse lateralmente en dominios ordenados cuando se encuentran en mezclas con glicerofosfolípidos (GPL) y colesterol (Col), tal como lo hace la 16:0 SM, se utilizó el protocolo descrito por Xu y London (Xu & London, 2000) (Fig. 3). Se prepararon SUVs con una concentración de lípidos de 100 μ M conteniendo 1 mol % de DPH como sonda fluorescente. La mezcla de lípidos consistió de dioleilfosfatidilcolina (DOPC), Col y una de las tres SMs en estudio, en presencia o en ausencia de un fosfolípido extintor de fluorescencia, el 1-palmitoil-2-(10-doxil) estearoilfosfatidilcolina (10-SLPC) en las siguientes proporciones:

	DOPC	10-SLPC	Col	SM
$(F_0)_{DOPC}$	85.0	-	15	-
$(F)_{DOPC}$	42.5	42.5	15	-
$(F_0)_{SM}$	42.5	-	15	42.5
$(F)_{SM}$	-	42.5	15	42.5

Se obtuvieron los espectros de emisión de fluorescencia del DPH a distintas temperaturas con estas mezclas, utilizando una longitud de excitación de 350 nm. Para evaluar la magnitud de la extinción de la fluorescencia se calculó un factor de extinción (FE) de acuerdo a la siguiente expresión,

$$FE = (F/F_0)_{SM} - (F/F_0)_{DOPC} \quad (\text{Ecuación 4})$$

que relaciona las intensidades de emisión de fluorescencia (427 nm) obtenidas a cada temperatura en los liposomas preparados con SM (o con DOPC) en presencia (F) y en ausencia (F_0) de 10-SLPC. Como blancos de fluorescencia, se prepararon liposomas similares pero sin DPH. Dado que las moléculas de DPH se localizan tanto en dominios ordenados como desordenados y que las moléculas de 10-SLPC se localizan principalmente en dominios desordenados, empleando esta combinación de sondas, es posible esperar que la extinción de la fluorescencia sea alta en el caso de que no haya segregación de dominios en la membrana. En cambio, si hubiera coexistencia de dominios ordenados y desordenados en ella, la fluorescencia debiera ser menor porque en ese caso sólo tendría lugar la extinción de la fluorescencia de las moléculas de DPH que estén localizadas en los dominios desordenados.

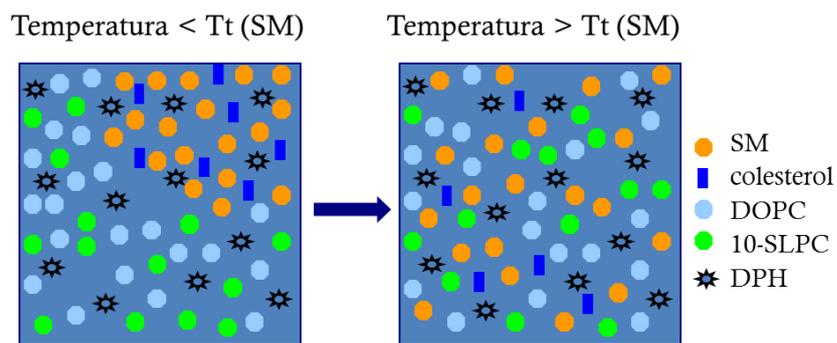


Figura 3. Modelo esquemático de la estrategia experimental utilizada para la evaluación de la existencia de dominios en liposomas de DOPC:SM:colesterol. A la izquierda de la figura se muestra el sistema a una temperatura en que existen dominios SM/Col; el 10 SLPC se encuentra excluido de dichos dominios mientras que el DPH está uniformemente distribuido. Como se ilustra en la parte derecha de la figura, cuando se incrementa la temperatura a valores que superan la T_t de la SM se desarman dichos dominios, aumenta el desorden del sistema y eso permite que la 10-SLPC tenga acceso a todo el DPH existente y que extinga su fluorescencia.

3. Observación de dominios lipídicos mediante microscopía confocal

Para la obtención de GUVs se utilizó el equipo Vesicle Prep Pro (Nanion Technologies GMBH), el cual utiliza el principio de electro-inducción (Angelova & Dimitrov, 1986; Angelova *et al.*, 1992). El mismo está equipado con dos sustratos de vidrio recubiertos con *indium tin oxide* (ITO), ópticamente transparente y eléctricamente conductor. Sobre uno de estos sustratos se depositaron 5 μ l de la

mezcla de DOPC, SM y colesterol (1:1:1 relación molar, 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y la sonda fluorescente Dil (marcadora de dominios fluidos) en una relación 1:1000 (sonda:lípido). Se dejó evaporar el solvente y a la fina capa de lípidos resultante se le agregaron 250 μl de una solución de sorbitol 500 mM. Se aplicó un voltaje creciente en forma progresiva de 0 V a 1.2 V, mientras la frecuencia se incrementó de 0 a 10 Hz dentro de los primeros 4 minutos y luego se mantuvo constante durante 4 horas. Para completar el procedimiento, el voltaje se incrementó a 1.4 V y la frecuencia se disminuyó a 4 HZ por 5 minutos. La formación de los GUVs se realizó a 45 °C, después de lo cual la cámara de electro-inducción conteniendo a los GUVs fue colocada a temperatura ambiente.

Los GUVs se visualizaron por microscopía confocal usando un microscopio invertido Leica TCS SP2 (Leica Microsystems CMS GmbH, Mannheim, Germany) con un objetivo apocromático 63X (con apertura numérica de 1.2). El Dil se excitó usando la línea 514 nm del láser Ar^{++} y la emisión se colectó desde 550 a 680 nm.

4. Estudios en monocapas de Langmuir

4.1. Isotermas de compresión

La monocapa de Langmuir es un sistema modelo muy útil para estudiar las interacciones de empaquetamiento lateral de los lípidos. Dichos estudios se llevaron a cabo empleando una balanza de Langmuir (Fig. 4 A). Cuando lípidos anfipáticos son disueltos en un solvente volátil insoluble en agua y depositados sobre una superficie acuosa con ayuda de una microjeringa, la solución se esparce hasta ocupar toda el área disponible. Una vez que el solvente se evapora, los lípidos se orientan de manera de minimizar el contacto de sus cadenas hidrocarbonadas con el agua y al mismo tiempo maximizar la solvatación de sus cabezas polares (Fig. 4 B). Ubicados así en la interfase, los lípidos se comportan como surfactantes, ya que producen una

disminución de la energía libre de superficie. Esta energía libre de interfase puede cuantificarse mediante medidas de la tensión superficial.

La tensión superficial del agua se encuentra alrededor de los 73 mN/m a 20 °C, el cual es un valor excepcionalmente alto comparado con el de otros fluidos, y hace al agua una excelente subfase para estudios de monocapas. Cuando el área disponible para la monocapa es grande, las interacciones entre las moléculas de lípidos son débiles debido a la gran distancia existente entre ellas. En estas condiciones, la monocapa puede ser considerada como un gas en dos dimensiones, y su efecto sobre la tensión superficial del agua es pequeño. Ahora bien, si se reduce el área superficial disponible para la monocapa, las moléculas comienzan a repelerse entre sí. Este análogo en dos dimensiones de la presión se denomina *presión superficial* (π), y está dado por la siguiente expresión:

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \text{ (Ecuación 5)}$$

donde γ_0 y γ son las tensiones superficiales en ausencia y en presencia de monocapa, respectivamente. Las unidades usualmente empleadas para expresar la presión superficial son milinewtons por metro (mN/m).

El área superficial de la monocapa fue controlada mediante la utilización de un sistema de barreras como se muestra en la Figura 4 A. La medición se realizó a una determinada temperatura, controlada por circulación de agua termostatzada en canales colocados debajo de la cuba. La variación de la presión superficial durante el proceso de compresión se midió mediante el método de placa de Wilhelmy (Brown & Brockman, 2007). En este trabajo de tesis se realizaron mediciones de presión superficial en función del área de superficie que está disponible sobre la subfase para una cantidad conocida de moléculas de lípidos anfipáticos, obteniéndose un gráfico denominado *isoterma de presión superficial-área*.

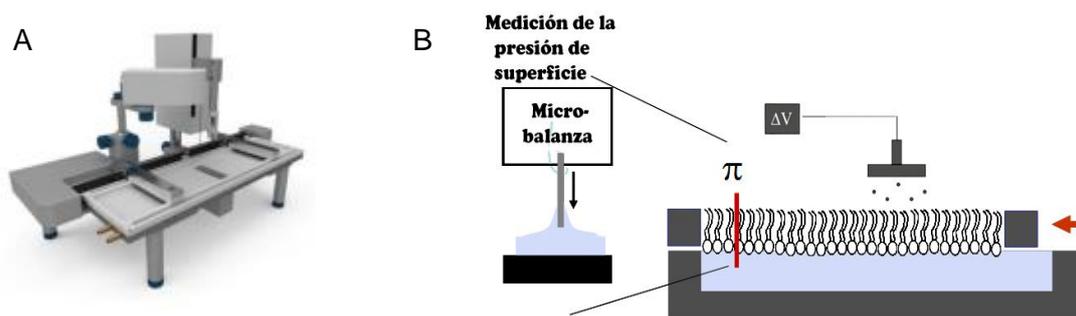


Figura 4. A) Fotografía de una balanza de Langmuir, empleada para realizar las mediciones de presión superficial (π) y diferencia de potencial (ΔV). B) Esquema simplificado de la balanza de Langmuir mostrando la distribución de los lípidos en la interfase agua-aire.

Usualmente las isotermas se obtienen por compresión de la monocapa (esto es, reduciendo el área que ésta ocupa mediante las barreras) a velocidad constante, mientras se monitorea la presión superficial. Durante la compresión, la presión lateral o de superficie aumenta y la monocapa puede o no sufrir cambios de estado inducidos por la presión, dependiendo del lípido de que se trate. Esto se evidencia por discontinuidades en la isoterma, como se ejemplifica en la Figura 5.

Como se explicó en la sección introducción, en monocapa las moléculas pueden estar en cuatro estados de fase diferentes: gaseoso, líquido-expandido, y dos estados condensados de distinta compresibilidad, el líquido-condensado y el sólido (G, LE, LC y S, respectivamente). Los dos estados más frecuentemente observados en monocapas son LE y LC.

El comienzo de las transiciones de fase es dependiente de la temperatura; a mayores temperaturas, la transición entre estados se produce a valores de π más altos, y viceversa. Eventualmente un incremento adicional de la compresión hace que la monocapa alcance un punto de colapso, en el que se forman estructuras tridimensionales, caracterizado por una rápida disminución de la presión superficial, y por un quiebre horizontal de la isoterma.

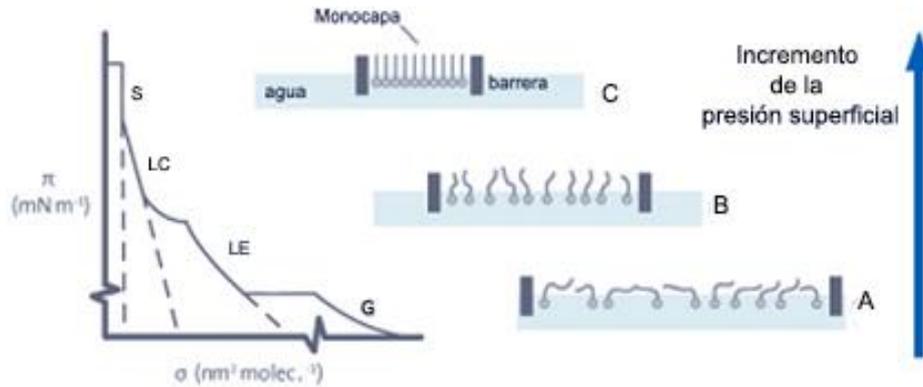


Figura 5. Isoterma de la presión superficial-área. Se muestran los distintos estados de fase conforme π aumenta: A) gas, B) líquido-expandido, C) líquido-condensado.

Los estudios de lípidos en monocapa presentados en esta tesis se hicieron empleando un equipo Monofilmeter (Mayer Feintechnik, Gottingen, Alemania). El mismo está incluido en una Jaula de Faraday con el fin de disminuir las interferencias en las mediciones del potencial de superficie. El instrumento permite medir simultáneamente la **presión de superficie (π)** y el **potencial de superficie (ΔV)** a diferentes grados de empaquetamiento molecular. La determinación de π se realizó por medio de una balanza Wilhelmy con elemento sensor de platino. Las medidas de π tienen una precisión de ± 0.5 mN/m. La medición del ΔV se realizó con el método del electrodo ionizante, utilizando un milivoltímetro y una cupla de electrodos: una placa ionizante de ^{241}Am que se colocó a aproximadamente 5 mm sobre la interfase y un electrodo de referencia Ag/AgCl que se colocó en la subfase. Las medidas tienen una precisión de ± 30 mV. Los resultados se adquirieron mediante un sistema de digitalización de datos Lab-Trax-4 (World Precision Instruments).

Para obtener las isothermas de compresión de los lípidos en estudio (SM, Cer o mezclas de los mismos), soluciones previamente preparadas en cloroformo:metanol (2:1, en vol.) se sembraron, haciendo uso de una microjeringa, sobre la interfase aire-agua (en nuestro caso conteniendo NaCl 145 mM). Se esperaron 5 minutos para la evaporación del solvente y se comenzó a comprimir lentamente el film a una velocidad

de $2 \text{ \AA}^2 \times \text{molécula}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ registrando de manera continua el área de la monocapa, la π y el ΔV .

Las mediciones se realizaron a dos temperaturas, que se mantuvieron constantes durante la compresión, $21 \text{ }^\circ\text{C}$ y $8 \text{ }^\circ\text{C}$ ($\pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$), mediante el uso de un baño de agua circulante con termostato Haake F3E. Antes de realizar cada ensayo se controló la ausencia de posibles impurezas tensoactivas provenientes de la subfase. Para ello rutinariamente se comprime la monocapa hasta reducir el área disponible a un valor menor al 10 % de la inicial y se utiliza esa subfase sólo cuando la π de la monocapa comprimida es menor que 0.5 mN/m . La presión de colapso del film y el área límite del mismo se estimaron mediante el método de la tercera derivada (Brockman *et al.*, 1980).

El parámetro **módulo de compresibilidad (C_s^{-1})** brinda información acerca de la elasticidad del film, y es muy útil para caracterizar un estado de fase (Gaines, 1966). En este trabajo se calculó a partir de los datos de la isoterma, aplicando la siguiente relación:

$$C_s^{-1} = -MMA \times (\partial\pi/\partial MMA)_T \quad (\text{Ecuación 6})$$

donde MMA es el área molecular promedio a un dado valor de π .

El **momento dipolar resultante perpendicular a la interfase (μ_\perp)** es un parámetro independiente de π , por lo cual brinda información complementaria acerca de la disposición de las moléculas del lípido en la interfase a cada área molecular (Lheveder *et al.*, 2000). El valor de μ_\perp se calculó a partir de los datos de la isoterma como:

$$\mu_\perp = \frac{1}{12\pi} \times MMA \times \Delta V \quad (\text{Ecuación 7})$$

donde ΔV es el potencial de superficie de la monocapa a la MMA correspondiente, y π en este caso es la constante matemática euclidiana, tomada como 3.14159.

La **interacción entre las moléculas** lipídicas en la fase LE se evaluó empleando la siguiente ecuación:

$$(\pi - \pi_s) \times (MMA - A_0) = k \times T \quad (\text{Ecuación 8})$$

donde π_s es la presión de interacción, A_0 es el área molecular límite (Davies & Rideal, 1963) y k es la constante de Boltzmann. Este modelo describe el comportamiento de la fase LE asumiendo una cohesión constante entre las moléculas lipídicas durante la compresión, y fue aplicado satisfactoriamente a curvas de compresión menores a 20 mN/m (coeficiente de correlación $R^2 > 0.94$).

4.2. Microscopia de ángulo de Brewster

Esta técnica permite tomar imágenes de films muy delgados, como son las monocapas lipídicas, discriminando las fases de una monocapa por diferencia de espesor sin necesidad de emplear sondas fluorescentes. Su fundamento radica en el hecho de que si un haz de luz incide con un ángulo $\theta = 53^\circ$ sobre agua pura, no se produce reflexión del haz y la imagen superficial que se observa es negra. En cambio, si existe una monocapa en la interfase, el índice de refracción local se modifica, y una parte del haz es reflejada, dando lugar a una imagen que contendrá áreas con distintos brillos, dependiendo de las moléculas presentes y de su densidad de empaquetamiento.

Las monocapas se prepararon como se describió previamente y fueron controladas mediante un equipo NIMA Modelo 102 M (NIMA Technology Ltd, 14 Coventry, England). El equipo de Langmuir fue montado en la plataforma del Nanofilm EP3 Imaging Elipsometer (Accurion, Goettingen, Germany) usado en el modo microscopía de ángulo de Brewster (BAM). Un láser polarizado de 532 nm se hizo incidir sobre la interfase agua-aire, determinando con la misma el ángulo de Brewster ($53,1^\circ$) y resultando en una reflexión de cero. Después de la formación y compresión de la monocapa, la luz reflejada en la interfase fue colectada mediante un objetivo de

20X y una cámara CCD, la cual permite observar una micrografía con una resolución de 1 μm (Fig. 6). El nivel de gris de cada sección de esta micrografía es proporcional a la luz reflejada, la cual es función del espesor y del índice de refracción del film (Lheveder *et al.*, 2000).

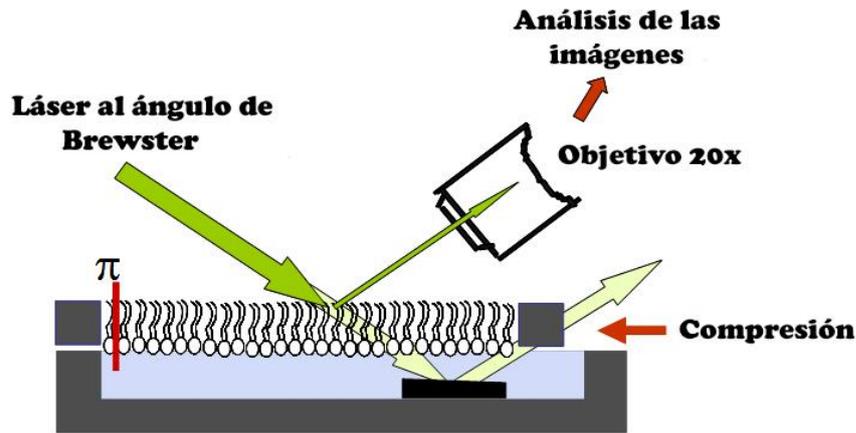


Figura 6. Esquema simplificado de la técnica de Microscopía de ángulo de Brewster. Cuando la luz incide con $\theta=53^\circ$ sobre agua pura, no se produce reflexión del haz y la imagen superficial que se observa es negra. Si existe una monocapa en la interfase, el índice de refracción local se modifica, y una parte del haz es reflejada dando lugar a una imagen que contendrá áreas con distintos brillos dependiendo de las moléculas presentes y su densidad de empaquetamiento.

4.3. Estudio termodinámico de monocapas de compresión

La **energía libre de compresión** (ΔG_c) operacionalmente representa el trabajo bidimensional involucrado en el proceso de compresión de las moléculas, para llevarlas desde un estado gaseoso ($\pi \sim 1$ mN/m) hasta un cierto grado de empaquetamiento intermolecular (Fidelio *et al.*, 1986). Entonces, para una isoterma reversible, el ΔG_c puede ser calculado como:

$$\Delta G_c = - \int_{A_0}^{A_i} \pi \partial A \quad (\text{Ecuación 9})$$

El valor del área (A) puede ser tomado como equivalente al valor de MMA, por lo que el ΔG_c puede ser calculado como el área bajo la curva de compresión entre ciertos límites de presión. En esta tesis tomamos A_0 y A_i como el MMA a 1 mN/m y a 35 mN/m, respectivamente.

También podemos considerar al ΔG_c como la resultante de las contribuciones de los cambios de entalpía y de entropía, quedando definido como sigue:

$$\Delta G_c = \Delta H_c - T \times \Delta S_c \text{ (Ecuación 10)}$$

donde el ΔH_c y el ΔS_c son los cambios de entalpía y de entropía, respectivamente, involucrados en el proceso de compresión. Así, asumiendo al ΔH_c independiente de la temperatura, ΔG_c puede aumentar o disminuir con la temperatura dependiendo del signo del factor entrópico (Fidelio *et al.*, 1986).

$$\frac{\Delta G_c}{\Delta T} = -\Delta S_c \text{ (Ecuación 11)}$$

En analogía con la termodinámica clásica para una expansión 3D de un gas, la entropía en un sistema 2D está relacionada con el cambio en el volumen ocupado por las moléculas de la siguiente manera:

$$\Delta S = R \times \ln \frac{V}{V_0} \text{ (Ecuación 12)}$$

donde R es la constante de los gases y V_0 y V representan el volumen inicial y final, respectivamente.

La compresión o expansión de un film bidimensional, como es una monocapa de lípidos, podría involucrar una pérdida de entropía a causa de la compresión, expresada de la siguiente manera:

$$\Delta S_{ec} = R \times \ln \left(\frac{MMA}{MMA_0} \right) \text{ (Ecuación 13)}$$

donde ΔS_{ec} (cambio en la entropía configuracional) es la entropía de compresión inducida por un cambio en el área de la monocapa que resulta de un cambio en la presión de superficie. En esta expresión, MMA_0 y MMA representan el área molecular media a 1 mN/m y 35 mN/m, respectivamente.

4.4. Efectos de la conversión esfingomielina → ceramida

Para realizar esta conversión se utilizó la enzima esfingomielinasa (SMasa) de *Bacillus cereus*. Las SM se sembraron en la superficie de la subfase acuosa (10 mM Tris-HCl, 125 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, pH 8) empleando una cuba de teflón de cero-orden como la esquematizada en la Figura 7. Luego de la evaporación del solvente, se realizó la compresión hasta alcanzar una $\pi = 10$ mN/m o 20 mN/m, dependiendo de la especie de SM empleada en el ensayo. Se inyectó la enzima en la subfase del compartimento de reacción, manteniendo una agitación constante, de modo que alcanzara una concentración final de 1.68 mU/ml.

En esta configuración, la enzima convierte la SM en Cer, la cual permanece en la interfase, y en fosforilcolina, que se desprende y se solubiliza en la subfase. Debido a la diferencia de área seccional transversal entre las moléculas de SM y Cer, el progreso de la reacción puede ser seguido en tiempo real, midiendo la reducción del área total que afecta a la monocapa durante la reacción cuando la presión se mantiene constante. En otras palabras, a medida que la reacción enzimática tiene lugar, es posible ir moviendo la barrera a fin de mantener la presión de superficie constante, lo cual se refleja en que el área total de la monocapa se reduce (Fig. 7). La presión debe mantenerse constante porque es un parámetro cuya variación tiene una importante influencia sobre la actividad de las enzimas interfaciales (Fanani *et al.*, 2010).

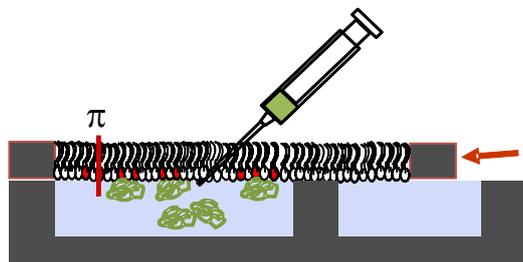


Figura 7. Esquema simplificado de la cuba utilizada para realizar los ensayos de actividad enzimática con esfingomielinasa. Cuando la enzima convierte la SM en Cer y fosforilcolina, esta última se solubiliza en la subfase, mientras que la Cer permanece en la interfase. Debido a la diferencia en área seccional transversal entre SM y Cer, el área total de la monocapa disminuye. Con el fin de mantener la presión de superficie constante, esta disminución de área es automáticamente compensada mediante el movimiento de la barrera. Así, el progreso de la reacción puede ser seguido en tiempo real.

Como complemento de este estudio, el seguimiento de la actividad enzimática se realizó también mediante microscopía de ángulo de Brewster (BAM). En este caso la reacción se llevó a cabo en una cuba rectangular, en la cual el volumen de la subfase (200 ml) se restringió a 10 ml mediante el uso de un anillo cilíndrico de vidrio (Ale *et al.*, 2012). Este anillo dispone de una pequeña abertura en la superficie, la cual permite la conexión con el resto de la subfase. Se sembraron los lípidos como se explicó antes formando una monocapa, se comprimió ésta hasta alcanzar la presión adecuada, y se inyectó la enzima en la subfase delimitada por el anillo de vidrio. Acto seguido se colectó la luz reflejada en función del tiempo, hasta que se dejaron de observar cambios en la estructura de la monocapa (aproximadamente hasta los 30 min.).

El nivel de gris en las micrografías del BAM depende del espesor del film y de su índice de refracción. Los dominios LC usualmente aparecen como áreas grises brillantes rodeadas por la fase LE, que se observa de color gris oscuro. Ello se debe a que los dominios LC son más gruesos y tienen un mayor índice de refracción que los LE.

4.5. Seguimiento de partícula única en monocapas

La movilidad de una pequeña partícula colocada sobre una monocapa de lípidos (movimiento browniano) va a ser facilitada o dificultada en función de las características de viscosidad de la monocapa. En este trabajo se siguió el movimiento de esferas de látex de 3 μm de diámetro colocadas sobre monocapas de SM y Cer con distintos ácidos grasos (16:0, 18:1 y VLCPUFA). Previo a su uso, las partículas fueron centrifugadas y lavadas 6 veces con agua milliQ. Luego de su resuspensión en agua, se tomaron 5 μL de esa suspensión, se agregaron a 100 μL de la solución de los lípidos y la mezcla se sembró sobre la interfase aire-NaCl. Después de la compresión de la monocapa, el movimiento de las microesferas fue seguido por microscopía de contraste de fase a una velocidad de 14 campos por segundo. La posición de las

esferas en cada campo fue seguida utilizando el software “Tracker classof” asociado al programa ImageJ 1.43u (NIH, USA). Esto permite calcular el **desplazamiento cuadrático medio (MSD)** de una microesfera, relativo al de otra, en el mismo campo. La determinación de las posiciones *relativas* tiene la ventaja de que minimiza el efecto del movimiento por convección, de modo que el coeficiente de difusión puede calcularse como:

$$MSD = 8D \times \delta t \quad (\text{Ecuación 14})$$

donde D es el coeficiente de difusión y δt es el intervalo de tiempo analizado (Wilke & Maggio, 2009; Wilke *et al.*, 2010).

4.6. Estimación del área de la fase LC en sistemas conteniendo mezclas de esfingomielinas y ceramidas

El área cubierta por las fases LC y LE a medida que se modificaba la proporción SM/Cer en las mediciones por BAM se determinó usando el software ImageJ 1.43u (NIH, USA). La cobertura teórica de la fase LC relacionada con la fase LE a una presión lateral fija se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{A^{LE}}{A^{LC}} = \frac{MMA^{LE} \times (X_{Cer}^{LC} - X_{Cer})}{MMA^{LC} \times (X_{Cer} - X_{Cer}^{LE})} \quad (\text{Ecuación 15})$$

donde la relación de área ocupada por las fases LE y LC (A^{LE}/A^{LC}) es función de la relación molar (X) de Cer entre dos extremos de la línea de equilibrio. En nuestro caso tomamos los datos experimentales de las isotermas de compresión a 30 mN/m entre un valor de $X_{Cer}^{LC} = 1$ y uno de $X_{Cer}^{LE} = 0.25$ y el área molecular promedio a esas dos composiciones (MMA^{LC} y MMA^{LE}). Asumiendo que este sistema cumple la ley de la palanca, el área que debería ocupar la fase LC se calculó a partir de la siguiente expresión:

$$LC\text{area } \% = 100 \times (1 + A^{LE}/A^{LC})^{-1} \quad (\text{Ecuación 16})$$

RESULTADOS I

Caracterización biofísica de esfingomielinas con VLCPUFA

1. Estudios en sistemas modelo de bicapa

1.1. Bicapas conteniendo esfingomielinas puras

El primer obstáculo que debimos superar antes de comenzar el estudio de las propiedades de las SM con VLCPUFA fue el de poder obtenerlas en cantidad y grado de pureza suficientes a partir de su fuentes naturales. Una de las estrategias posibles era la de aislar primero las células espermatozógenas, donde estas SMs se encuentran concentradas, pero este procedimiento se descartó para este fin pues, además de su complejidad y alto costo, insumía demasiado tiempo. Otra posibilidad era aislarlas directamente del tejido testicular. La dificultad en este caso es que en el testículo de rata la SM total representa sólo un 10 % de los fosfolípidos. De ese 10 %, sólo un 10-15 % les cabe a las especies con VLCPUFA estando el 85-90 % restante representado por especies de SM que no contienen VLCPUFA, principalmente saturadas y monoenoicas. El hecho de que las SM de interés tienen un ácido graso poliinsaturado como característica química distintiva nos hizo pensar que podríamos separarlas de las mayoritarias basándonos en esta propiedad. Así fue como desarrollamos el protocolo cromatográfico descrito en Materiales y Métodos, que permitió la separación de la SM en tres fracciones. Una de ellas contenía VLCPUFA no hidroxilados (n-V SM), la otra VLCPUFA 2-hidroxilados (h-V SM) y la tercera ácidos grasos saturados y monoenoicos (S+M SM).

La composición en ácidos grasos de esas tres fracciones se determinó por GC (Tabla 1). En cada una ellas, la sumatoria de los ácidos grasos mostrados representó más del 85 % del total de las cadenas acílicas. Dos ácidos grasos fueron representativos de cada fracción: el n-28:4 seguido del n-30:5 en la fracción n-V SM, el

h-30:5 seguido del h-28:4 en la fracción h-V SM y el 16:0 seguido del 18:0 en S+M SM.

Con el fin de obtener información acerca del grado de orden de las cadenas acílicas de cada una de las subfracciones y comparar sus temperaturas de transición, se prepararon liposomas con cada una de ellas y se estudió su comportamiento termotrópico mediante la determinación de la GP del Laurdan y la anisotropía del DPH en función de la temperatura (Fig. 8). La subfracción S+M SM presentó un perfil termotrópico muy similar al observado para la SM total, mostrando ambas SMs altos valores de GP (esto es, alto grado de ordenamiento) a bajas temperaturas, como podía predecirse por el alto contenido de 16:0 SM en ambas. Dicho grado de orden lipídico fue disminuyendo al aumentar la temperatura (mostrado por la disminución de los valores de GP), con un abrupto cambio en los valores de GP entre ambos extremos del rango de temperaturas estudiado. Este cambio, que corresponde a una transición de fase entre los estados gel (g) y líquido cristalino (lc), permitió calcular la Tt a partir de las curvas, que correspondieron a 32.4 °C para la SM total y 36.6 °C para la fracción S+M SM.

El hecho de que para la fracción S+M SM la Tt fuera mayor y que la transición de fase fuera más brusca, que para la SM total (Fig. 8 A) es congruente con que esta última es más heterogénea en su composición de especies moleculares que la primera. Como resultado de la ausencia de las especies con VLCPUFA, la fracción S+M SM es relativamente más rica en 16:0 SM, especie que en estado puro se sabe que tiene una Tt de aproximadamente 42 °C.

Experimentos similares realizados con las subfracciones n-V SM y h-V SM mostraron que el sistema se encontraba por encima de la Tt aún a la más baja temperatura estudiada (5 °C). Si bien los valores de GP disminuyeron gradualmente a medida que aumentó la temperatura, no se evidenció ninguna transición de fase (Fig. 8 A). A todas las temperaturas examinadas se observaron valores de GP mayores para la fracción h-V SM que para la n-V SM.

Empleando DPH como sonda fluorescente (Fig. 8 B), la SM total y la subfracción S+M SM mostraron una transición de fase del estado gel al líquido-cristalino, dando valores de T_t muy similares a los obtenidos con Laurdan (32.6 °C y 37.0 °C, respectivamente). Nuevamente observamos que los valores de T_t de las subfracciones n-V SM y h-V SM se encontraban por debajo de los 5°C. Como había sido el caso de los valores de GP para el Laurdan, los valores de r para el DPH fueron más altos para las h-V SM que para las n-V SM en todo el rango de temperaturas estudiado.

De la comparación de la información revelada por ambas sondas surgió una diferencia interesante. A altas temperaturas (p. ej. 45 °C), todos los grupos de especies de SM mostraron valores muy similares de r , lo cual indica que todas ellas se encontraban en un estado de fase similar, mientras que los valores de GP del Laurdan fueron significativamente mayores para las especies de SM con VLCPUFA que para la SM total o para la subfracción S+M SM.

Monitoreando el entorno del Laurdan mediante el estudio de la dependencia de su espectro de GP con la longitud de onda a distintas temperaturas puede obtenerse información muy útil acerca del estado de fase de las membranas (Fig. 9). El estado de fase gel es conocido por exhibir un espectro de GP independiente de la longitud de onda, mientras en el estado de fase líquido-cristalino los valores de GP demuestran una dependencia de la longitud de onda que es consecuencia del proceso de relajación de las moléculas de Laurdan (Antollini & Avelano, 2002; Parasassi *et al.*, 1991; Parasassi *et al.*, 1995). La explicación de este comportamiento se basa en que las interacciones entre el fluoróforo y el solvente difieren según el Laurdan esté en estado excitado o basal, ya que su momento dipolar cambia entre ambos estados. Además, tiene en cuenta que la velocidad de reordenamiento de los dipolos del solvente, en este caso moléculas de agua, depende del estado de fase de la membrana en que se encuentren (lenta en fase gel y rápida en fase líquido-cristalina). De esta manera, en una fase líquido-cristalina, la velocidad de reorientación de las moléculas de agua ocurre en una misma escala temporal que el tiempo de vida en

estado excitado de la sonda Laurdan, y por tanto los dipolos excitados de Laurdan gastan parte de su energía en reordenar dipolos de solventes, disminuyendo los valores de GP_{ex} y aumentando los de GP_{em}. En el caso de la fase gel, la velocidad de reorientación de las moléculas de agua es muy inferior al tiempo de vida en estado excitado de la sonda Laurdan, y por tanto las moléculas de Laurdan no pueden reordenar dipolos de solvente durante su excitación, manteniendo constantes los valores de GP_{ex} y GP_{em}.

En la Figura 9 se compara la dependencia del valor de GP del Laurdan con la longitud de onda en las tres subfracciones de SM en estudio, S+M SM, n-V SM y h-V SM, a distintas temperaturas (3–38 °C). La subfracción S+M SM mostró dos tipos de curvas en función de la temperatura (Fig. 9 A). A bajas temperaturas, las curvas de GP_{ex} y GP_{em} se mostraron prácticamente independientes de la longitud de onda. A medida que la temperatura aumentó, comenzaron a mostrar una dependencia de dicho parámetro, típico de las fases líquido-cristalinas, acompañada por bajos valores de GP. En el caso de las fracciones n-V SM (Fig. 9 B) y h-V SM (Fig. 9 C), las curvas mostraron un comportamiento altamente dependiente de la longitud de onda a *todas* las temperaturas ensayadas, similar al observado con S+M SM a altas temperaturas.

Debido a que las subfracciones n-V SM y h-V SM estaban compuestas por diferentes proporciones de especies moleculares de SM, siendo n-28:4 SM la especie mayoritaria en la primera y h-30:5 SM la mayoritaria en la segunda (Tabla 1), el hecho que las primeras presentaron valores de GP mayores podría deberse tanto a la presencia del grupo hidroxilo como a la mayor longitud promedio de la cadena en los ácidos grasos, por lo cual nos planteamos la pregunta de cuánto contribuirían estas características de las moléculas a las diferencias observadas entre las dos subfracciones con VLCPUFA.

Para obtener información acerca de los efectos del grupo hidroxilo, de la longitud de la cadena acílica y del número de dobles ligaduras sobre el comportamiento termotrópico de las principales especies moleculares de SM con VLCPUFA era

necesario contar con las especies moleculares individuales. Para tal fin, sometimos las subfracciones n-V SM y h-V SM al protocolo de HPLC descrito en Materiales y Métodos, el cual nos permitió obtener especies moleculares individuales (Fig. 10). De la fracción n-V SM colectamos n-28:4 SM, n-30:5 SM y n-32:5 SM, y de la fracción h-V SM las correspondientes h-28:4 SM, h-30:5 SM y h-32:5 SM, cuyas estructuras moleculares se esquematizan en la Figura 11

El comportamiento termotrópico de estas seis especies moleculares se estudió por separado empleando Laurdan y DPH como sondas fluorescentes (Fig. 12). Como ocurrió con las subfracciones n-V SM o h-V SM, las cuatro especies moleculares mayoritarias, n-28:4 SM y h-28:4 SM, n-30:5 SM y h-30:5 SM, mostraron una gradual disminución de sus valores de GP en función de la temperatura, sin observarse ninguna inflexión con la temperatura (Fig. 12 A), lo cual indica que sus valores de Tt se encuentran a temperaturas inferiores a la menor de las posibles de estudiar con la presente metodología (5 °C). En todo el rango de temperaturas evaluado, los valores de GP fueron mayores para las especies moleculares hidroxiladas que para sus equivalentes no hidroxiladas.

Con el fin de determinar si las diferencias debidas a la presencia del grupo hidroxilo eran estadísticamente significativas, realizamos un análisis de covarianza (ANCOVA). Dicho análisis requiere que cada set de datos que conforma la curva pueda ser ajustado mediante una línea recta. Se aplicó a cada grupo de datos el test de transformación lineal Box Cox, el cual indicó que ellos podían ser bien ajustados a una regresión lineal. Tanto en el caso de n-30:5 SM vs h-30:5 SM como de n-28:4 SM vs h-28:4 SM, ANCOVA indicó que las dos rectas de GP en función de la temperatura no fueron las mismas. De esta manera, el hecho de que los valores de GP sean mayores en las tres especies moleculares de h-V SM comparadas con las respectivas tres especies de n-V SM puede ser atribuido al grupo hidroxilo en posición 2 de la cadena hidrocarbonada en las primeras.

Sorprendentemente, en el caso de las especies n-32:5 y h-32:5 SM, las curvas de GP del Laurdan (Fig. 12 B) mostraron una inflexión, al pasar de altos a bajos valores de GP en función de la temperatura, lo que permitió calcular un valor de Tt para estas dos especies moleculares (21.7 y 22.8 °C, respectivamente).

Cuando se compararon individualmente las curvas de GP de las especies moleculares estudiadas con el fin de evaluar la influencia del número de átomos de carbono (comparando las líneas de n-28:4 SM vs n-30:5 SM por un lado y h-28:4 SM vs h-30:5 SM por otro), a pesar de la diferencia en dos átomos de carbono en cada par, los resultados de ANCOVA indicaron que dichas diferencias no fueron estadísticamente significativas (dieron la misma intersección con el eje de las Y y la misma pendiente; $p > 0.4$ en los cuatro casos). Frente a este resultado, existían dos explicaciones alternativas. Por un lado, que la similitud podría deberse a que el efecto del incremento en dos átomos de carbono fuera compensado por la presencia de la doble ligadura adicional. Por otro, que el Laurdan no estuviera sensando la diferencia entre estas especies moleculares de SM debido a su localización superficial en la membrana.

Para discernir entre estas dos posibilidades, realizamos experimentos adicionales comparando h-V 28:4 SM y h-30:5 SM utilizando DPH (Fig. 12 C), sonda fluorescente que se localiza a mayor profundidad en la membrana. Las curvas obtenidas en función de la temperatura con DPH mostraron una tendencia similar a las obtenidas con Laurdan para estas dos especies en el sentido de que los valores de anisotropía de fluorescencia (r) decrecieron progresivamente con el incremento de la temperatura sin mostrar inflexión. Sin embargo, el uso de DPH permitió observar una diferencia entre ellas: la curva de h-30:5 SM mostró valores de r significativamente menores que la de h-28:4, aunque la primera posee dos átomos de carbonos más. Esta observación fue confirmada nuevamente mediante ANCOVA. El test Box Cox sugirió una transformación recíproca de los datos en el eje Y ($1/r$) con el fin de conseguir la linealidad de los datos (inserto Fig. 12 C). Las diferencias entre las

pendientes de las rectas de h-28:4 SM y h-30:5 SM fueron estadísticamente diferentes. De esta manera, para este par, pudimos determinar que el efecto del incremento en una doble ligadura prevalece por sobre el efecto del incremento en dos átomos de carbono, lo que da como resultado valores de r menores y por lo tanto, un menor grado de orden de los lípidos en la membrana en el caso de una SM con 30:5 que de una con 28:4.

Estos resultados indicaron, por un lado, que el DPH fue mejor sonda que el Laurdan para sensar las perturbaciones inducidas por el número de átomos de carbono y el número de dobles enlaces en el *core* hidrofóbico de la bicapa. Por otro, el Laurdan mostró una alta sensibilidad para distinguir las diferencias entre las n-V SM y h-V SM, en consistencia con el hecho de que el grupo hidroxilo en posición 2 de la cadena del ácido graso en las moléculas de SM tiene una localización superficial en la bicapa.

Comparando el efecto de las tres características principales que condicionan el comportamiento biofísico global de estas especies moleculares de SM, esto es, el largo de la cadena acílica, el número de doble ligaduras y la presencia del grupo 2-hidroxilo, éste último fue en todos los casos el que mostró el efecto predominante. Por lo tanto, las diferencias entre las curvas de las subfracciones n-V SM y h-SM (Fig. 8 y 9) pueden ser adjudicadas a la presencia del grupo 2-hidroxilo en la segunda.

Al no haber diferencias muy marcadas entre las especies individuales dentro de cada fracción, es que decidimos seguir usando directamente las subfracciones n-V SM y h-V SM para los estudios que se describen a continuación.

1.2. Sistemas binarios fosfatidilcolina - esfingomielina

Con el fin de evaluar el efecto de las SM con VLCPUFA sobre el comportamiento térmico de una membrana modelo conteniendo un glicerofosfolípido conocido en sus propiedades termotrópicas, se prepararon liposomas con distintas proporciones de dimiristoil-fosfatidilcolina (DMPC) y de las especies de SM en estudio. Se observó el

efecto de agregar cantidades crecientes de cada una de las tres subfracciones, S+M SM, n-V SM o h-V SM, sobre la Tt de la DMPC (Fig. 13). Cuando se aumentó la proporción de la primera, la Tt de DMPC (de ~ 24 °C) se incrementó. A la inversa, la Tt de la DMPC disminuyó a medida que se incrementaron las proporciones tanto de n-V SM como de h-V SM. Incluso una proporción relativamente pequeña (15 %) de estas SMs fue suficiente para disminuir significativamente la Tt de DMPC. En el caso de n-V SM o h-V SM, una proporción del 70 % fue suficiente para disminuir dicha Tt a valores por debajo de 5 °C, la temperatura más baja empleada en este estudio. Estas diferencias permiten inferir que, a temperatura fisiológica, la presencia de SM con ácidos grasos saturados incrementa el orden de los lípidos en una membrana, mientras que, por el contrario, las n-V SM y las h-V SM lo disminuyen.

Aunque las dos fracciones de SM con VLCPUFA disminuyeron la Tt de DMPC en una manera dependiente de la concentración, a altas concentraciones se observó que las n-V SM la disminuyeron en una medida significativamente mayor que las h-V SM (Fig. 13).

1.3. Sistemas ternarios fosfatidilcolina-colesterol-esfingomielina

Teniendo en cuenta que las especies moleculares de n-V SM y h-V SM presentan una marcada diferencia estructural con las especies saturadas de SM compuestas por una cadena acílica más “frecuente”, como son las que contienen entre 16 y 24 átomos de carbono en sus ácidos grasos, decidimos estudiar el efecto global que tiene el largo de la cadena hidrocarbonada, el grado de insaturación y el *mismatch* entre las cadenas sobre la capacidad de estas especies moleculares de SM para segregar lateralmente con el colesterol formando dominios ordenados, considerando que ésta es una de las propiedades más conocidas asignadas a la SM en las membranas biológicas de muchos tipos celulares (Mayor & Rao, 2004; Pike, 2004; Simons & Ikonen, 1997).

Esta propiedad se evaluó empleando el protocolo descrito por Xu y London (Xu & London, 2000). Para ello, se prepararon liposomas compuestos por DOPC, colesterol y las distintas SM, en presencia de DPH y del extinguidor de la fluorescencia 10-SLPC, en las proporciones indicadas en la sección de Materiales y Métodos. En las muestras y en sus correspondientes controles se midió la emisión de fluorescencia de DPH en función de la temperatura y se calculó el valor del factor de emisión (FE).

La metodología utilizada para el estudio de dominios de membrana se basa en ciertas consideraciones. Por un lado, el DPH no tiene preferencia de fases, por lo cual se localiza tanto en fases desordenadas enriquecidas en DOPC como en dominios ordenados de SM/Col. Por otro, la 10-SLPC se distribuye en la membrana de modo similar a como lo hace la DOPC, porque el grupo nitróxido que contiene interfiere con el empaquetamiento de los lípidos de la membrana, esto es, la 10-SLPC se comporta de manera similar a como lo haría un lípido insaturado. Cuando la preparación de liposomas se encuentra en un estado desordenado, sin segregación de fases, la 10-SLPC se encuentra distribuida en forma homogénea en toda la membrana, por lo cual *apaga* la fluorescencia del DPH, dando así valores bajos de *FE*. Cuando se forman dominios enriquecidos en SM y Col, el 10-SLPC es excluido de ellos, distribuyéndose preferencialmente en la fase fluida, mientras que una parte del DPH queda contenido en ellos. Esto da como resultado valores altos de emisión de fluorescencia del DPH, lo que se traduce en valores altos de *FE*. Cuando en un sistema que contiene dominios SM/Col se incrementa la temperatura a valores que superan la *Tt* de la SM, se desarman los dominios SM/Col y aumenta el desorden del sistema, permitiendo así que la 10-SLPC tenga acceso a todo el DPH, lo que extingue mayoritariamente su fluorescencia y por lo tanto disminuye el valor de *FE* (Fig. 3).

Inicialmente, y como control de la metodología, se obtuvieron los valores de *FE* para el sistema conteniendo 16:0 SM a distintas temperaturas (Fig. 14). Como era de esperar, este sistema mostró valores altos y constantes del *FE* con el aumento de la temperatura, hasta alcanzar la *Tt* de la SM (42 °C), a partir de la cual se observó una

brusca disminución de los valores de FE. En las mismas condiciones y rango de temperaturas, tanto la fracción n-V SM como la h-V SM exhibieron valores constantes, y considerablemente más bajos de FE. Esto indica que las SM con VLCPUFA no favorecen la formación de dominios lipídicos SM/Col discretos en presencia de colesterol.

Para confirmar esta afirmación, preparamos GUVs conteniendo 16:0 SM, n-V SM y h-V SM y comparamos su comportamiento empleando microscopía confocal. Dichas vesículas contenían DOPC, Col y la correspondiente SM, en una relación molar 1:1:1, y la sonda fluorescente Dil. Esta sonda particiona con alta preferencia en dominios lipídicos *desordenados*. La proporción de lípidos se eligió de acuerdo con un trabajo previo (McIntosh *et al.*, 2003) en el que se muestra la coexistencia de dominios tipo *raft* cuando se utiliza DOPC, Col y SM de cerebro. En nuestro caso a temperatura ambiente, únicamente en el caso de 16:0 SM se formaron dominios separados del resto de la membrana (observados como zonas oscuras debido a la exclusión del Dil) (Fig. 15 A). En contraste, los GUVs que contenían n-V SM y h-V SM permanecieron homogéneamente fluorescentes a la misma temperatura (Fig. 15 B y C). Esto permite concluir que a temperaturas fisiológicas, a diferencia de las SM saturadas, tanto las n-V SM como las h-V SM no tienen tendencia a interactuar con el colesterol y segregarse en dominios ordenados.

2. Estudios en monocapas de Langmuir

Con el fin de profundizar en el conocimiento de las características distintivas que las especies moleculares de SM con VLCPUFA confieren a las membranas, decidimos estudiar distintos parámetros de empaquetamiento lateral empleando monocapas de Langmuir como sistema modelo de membrana.

Inicialmente se obtuvieron las *isotermas de compresión* (Fig. 16) incrementando la presión lateral de monocapas formadas por cada una de las seis especies moleculares de SM con VLCPUFA estudiadas (Fig. 11) a una temperatura constante

de 22 °C. La isoterma obtenida con 16:0 SM, utilizada como comparación, mostró una transición de fase LE a LC a ~ 22 mN/m, evidenciado como un *plateau* en el gráfico de MMA en función de π (Fig. 16). Para cada una de las seis SM con VLCPUFA, por el contrario, se observó un comportamiento suave, compatible con un régimen LE y con presiones de colapso de la monocapa a presiones menores (en el rango de 40 a 47 mN/m), sin detectarse quiebres que indiquen una transición de fase (Fig. 16). Un comportamiento similar fue observado con la oleoil SM (18:1 SM).

La característica más notable de las seis SM con VLCPUFA fue que presentaron valores de MMA significativamente mayores que las dos SM más conocidas recién mencionadas. Así, la n-32:5 SM fue la que mostró el mayor área molecular, ocupando el doble de área que la 16:0 SM (Fig. 16 y Tabla 2). Comparando los valores de MMA entre las seis SM con VLCPUFA, se evidenció que las tres h-V SM mostraron áreas moleculares menores que las equivalentes n-V SM (Fig. 16 y Tabla 2). Esto indica que la presencia del grupo hidroxilo en posición 2 de la cadena hidrocarbonada favorece las interacciones intermoleculares, permitiendo un mayor empaquetamiento de las moléculas durante el proceso de compresión, lo que las lleva a ocupar un área menor.

El **módulo de compresibilidad (C_s^{-1})**, parámetro que brinda información acerca de la elasticidad del film y que se correlaciona con el estado de fase de la monocapa. Cuando se calculó para cada una de las seis especies moleculares de SM con VLCPUFA a partir de los datos de sus isothermas (empleando la ecuación 6), se obtuvieron valores menores a 100 mN/m para todas ellas (Tabla 2). Estos valores estuvieron en el mismo orden de magnitud que los obtenidos para la 18:1 SM en estado LE, pero fueron menores que los de la monocapa de 16:0 SM en un estado LC, la cual mostró valores de C_s^{-1} mayores a 150 mN/m (Li *et al.*, 2000). Llamativamente, las especies con la cadena acílica más larga, n-32:5 y h-32:5 SMs, mostraron los *menores* valores de C_s^{-1} , lo cual reflejaría una aparentemente mayor libertad conformacional.

Con el fin de obtener información acerca de los cambios termodinámicos que ocurren durante el proceso de compresión de las especies moleculares en estudio, se evaluaron los valores del **cambio de la energía libre de compresión (ΔG_c)** que refleja el cambio energético global del proceso de compresión. Todas las SM con VLCPUFA presentaron valores de ΔG_c *mayores* que las SM de cadena más corta evaluadas (Tabla 2).

Una posibilidad que consideramos fue que una importante contribución al valor de ΔG_c estuviera dada por la pérdida de entropía durante la compresión, debido al esperable ordenamiento de las largas cadenas acíclicas durante la misma. A fin de evaluarla se estimó la entropía de compresión asociada a los *cambios* en el área (ΔS_{ec}) de films lipídicos para las especies de SM en estudio, entre 1 y 35 mN/m (empleando la ecuación 13). Calculamos que a 22 °C este término entrópico (calculado como $-T \cdot \Delta S_{ec}$) podía contribuir con 0.27-0.42 kcal/mol al ΔG_c debido al cambio de área. Llamativamente, cuando se realizó la compresión de las mismas monocapas a 7 °C, el ΔG_c permaneció prácticamente invariable respecto al calculado a 22 °C. De acuerdo con este resultado el factor entrópico no sería un importante contribuyente al ΔG_c en la compresión de las especies moleculares de SM con VLCPUFA. Este comentario será ampliado en las próximas secciones.

Otra pregunta a contestar fue si el espesor de las monocapas que contienen las SM con ácidos grasos tan largos y tan poliinsaturados como los VLCPUFA es mucho *mayor* que el espesor promedio de los demás lípidos, o si estas SM se reorganizan y acomodan sus cadenas de modo de mantener dicho espesor. Tanto en films de glicerofosfolípidos como de esfingolípidos, el volumen promedio de una cadena acíclica ha sido empíricamente evaluado en trabajos previos (Israelachvili *et al.*, 1980; Maggio, 1985). El mismo está adecuadamente representado por la siguiente ley semiempírica:

$$V = 2 \times 27.4 + 26.9 \times (n_{ch1} + n_{ch2}) \quad (\text{Ecuación 17})$$

donde V es el volumen promedio de la cadena hidrocarbonada y n_{ch1} y n_{ch2} representan el número de átomos de carbono en cada cadena hidrocarbonada (la esfingosina y el ácido graso, respectivamente). Cuando se aplicó este criterio a las especies moleculares de SM en estudio, asumiendo la conservación del volumen total de la cadena hidrocarbonada, calculamos el espesor de las monocapas en forma semi-empírica (Th) como V/MMA . Este análisis resultó en un valor de $16.2 \pm 0.3 \text{ \AA}$ para 18:1 SM a 30 mN/m.

Sorprendentemente, todas las especies de SM con VLCPUFA, excepto h-30:5 SM, mostraron un valor de Th menor que el obtenido para 18:1 SM (Tabla 2). Más aún, el incremento en longitud de dos carbonos, dada por la presencia de dos metilenos adicionales entre (n- o h-) 30:5 SM y sus correspondientes homólogas, (n- o h-) 32:5 SM, llevó a valores aún *menores* de Th para estos últimos, sugiriendo un adelgazamiento en lugar de un engrosamiento del film. Por lo tanto, puede concluirse de estos resultados que una cadena acílica más larga no necesariamente implica una monocapa de mayor espesor.

Por otra parte, comparando cada una de las n-V SM con sus correspondientes h-V SM, observamos que la presencia del grupo hidroxilo en las segundas tendió a incrementar levemente en todos los casos, el espesor semi-empírico del film (Tabla 2).

Para obtener información adicional acerca de las posibles interacciones entre las moléculas de SM con VLCPUFA, se evaluó el comportamiento de los films en fase LE aplicando la ecuación 8 a los datos de las isotermas de compresión. A diferencia del estado gaseoso, las moléculas en el estado LE en monocapas se encuentran lo suficientemente cerca como para que pueda existir cohesión intermolecular, la cual resulta en valores negativos de la **presión de interacción (π_s)** (Davies & Rideal, 1963). Comparando nuevamente con 18:1 SM, todas las SM con VLCPUFA mostraron valores de π_s menos negativos (Tabla 2), mostrando una menor interacción molecular entre ellas, lo que coincidió con la tendencia observada al evaluar los valores de Th , ya que una mayor interacción entre las moléculas lleva a un mayor grado de

empaquetamiento molecular generando films de mayor espesor (mayores valores de Th).

Además, comparando las tres n-V SM con sus correspondientes h-V SM, estas últimas presentaron valores relativamente más altos de presión de interacción (en valor absoluto) que las primeras (Tabla 2). Esto nuevamente pone en evidencia la mayor interacción intermolecular en las especies h-V SM.

Con el objetivo de evaluar si al disminuir la temperatura se podían observar *transiciones de fase* inducidas por la presión de superficie, se obtuvieron las isothermas de compresión enfriando a 7 °C las monocapas formadas con cada una de las especies moleculares de SM con VLCPUFA. Esto nos permitió observar que *sólo* la n-32:5 SM y la h-32:5 SM mostraron una transición de fase LE \rightarrow LC. Ésta ocurrió en el rango de áreas de entre 80 y 130 Å²/molécula, como se evidenció por un *quasi-plateau* en el gráfico de π en función de MMA y por un valle en el gráfico de Cs^{-1} en función de MMA (Fig. 17). De esas dos especies, dicha transición fue más cooperativa para la h-32:5 SM que para la n-32:5 SM, lo que es consistente con una mayor interacción molecular entre las especies que contienen la cadena acílica 2-hidroxilada.

Finalmente utilizamos BAM para obtener microfotografías de los films moleculares en la interfase aire/agua. En esas microfotografías, el nivel de grises de cada región es dependiente del espesor del film y del índice de refracción (Dupuy *et al.*, 2011), por lo que diferentes estados de fase de las moléculas presentes en la superficie se observan diferencialmente de acuerdo con sus propiedades físicas, sin la necesidad de emplear sondas fluorescentes. Cuando las compresiones de las SM en estudio fueron seguidas empleando esta técnica a 7 °C, pudimos determinar que la transición de fase LE \rightarrow LC, tanto para n-32:5 SM como para h-32:5 SM, correspondía a un proceso de primer orden. Éste involucró una nucleación y crecimiento de la fase LC en formación, evidenciada por la formación de dominios condensados inmersos en una fase continua LE (Fig. 18).

Tablas y Figuras - Resultados I

Tabla 1. Composición en ácidos grasos (%) de las subfracciones de esfingomielina estudiadas en esta tesis¹

S+M SM		n-V SM		h-V SM	
16:0	46.0	n-28:4	52.8	h-28:4	37.8
18:0	31.3	n-28:5	2.7	h-28:5	2.1
24:0	5.2	n-30:5	25.5	h-30:5	44.7
24:1	6.2	n-32:5	5.5	h-32:5	5.4
Total	88.7		86.5		90.0

¹Las subfracciones de esfingomielina (SM) que contienen ácidos grasos de muy larga cadena no hidroxilados (n-V SM) e hidroxilados (h-V SM) fueron aisladas a partir del tejido testicular de rata y separadas de la fracción mayoritaria que contiene las SM con ácidos grasos saturados y monoenoicos (S+M SM) mediante la combinación de técnicas cromatográficas que se describe en Materiales y Métodos.

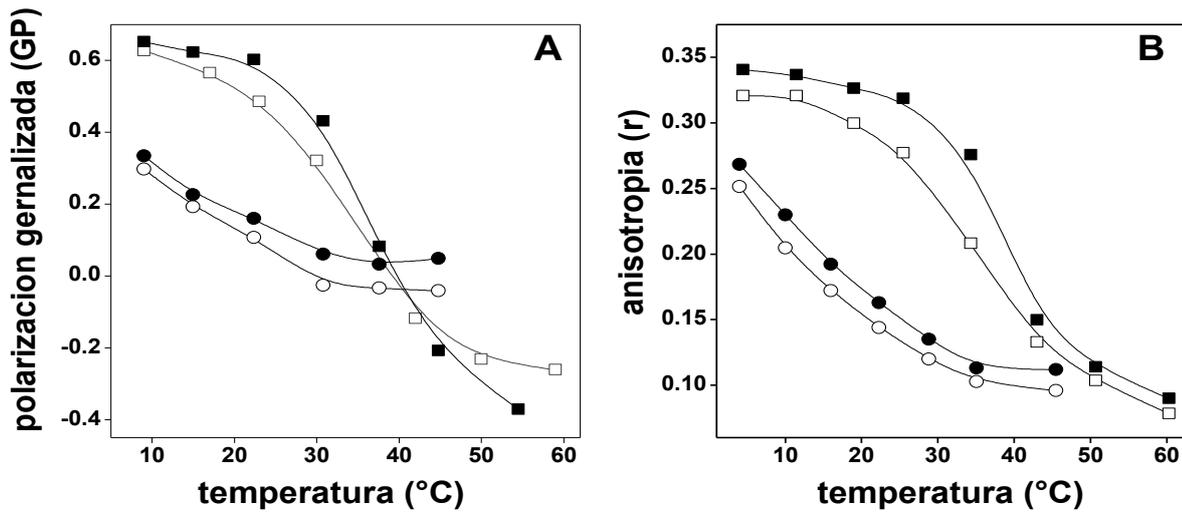


Figura 8. Comportamiento termotrópico de las subfracciones de esfingomiélinea que contienen ácidos grasos de muy larga cadena no hidroxilados (n-V SM) e hidroxilados (h-V SM). En el panel A) se muestra la Polarización Generalizada (GP) de la sonda Laurdan y en el B) la anisotropía de fluorescencia (r) de la sonda DPH en función de la temperatura en liposomas de n-V SM (○) y h-V SM (●), en ambos casos en comparación con la fracción S+M SM (■) y la SM total (□). Las curvas corresponden a un experimento representativo de tres o más mediciones independientes.

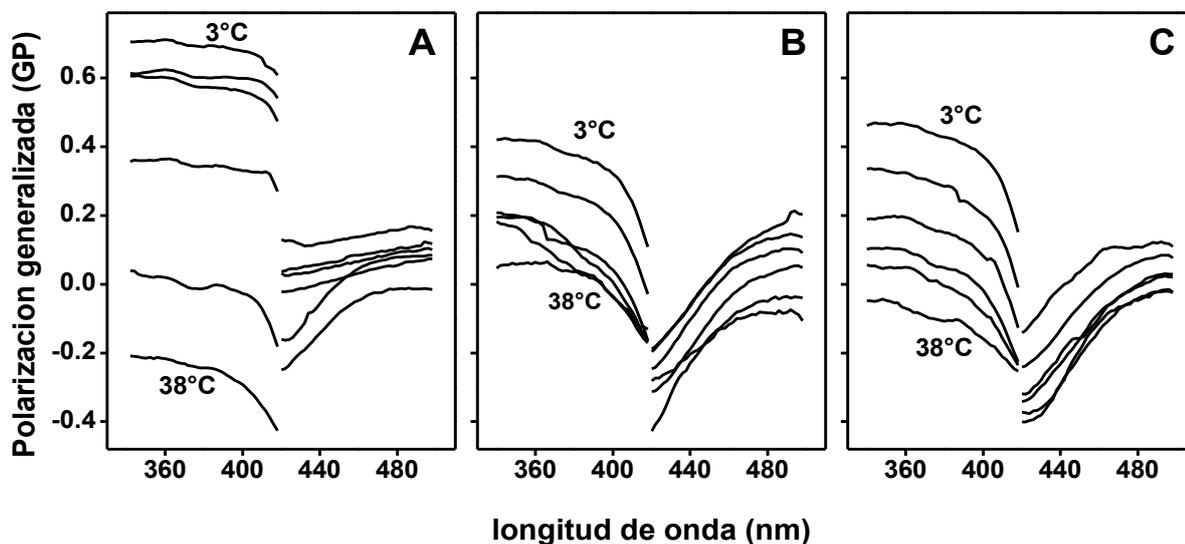


Figura 9. Dependencia de la longitud de onda de los valores de Polarización Generalizada (GP) de Laurdan cuando éste es incluido en liposomas formados con las tres subfracciones de esfingomielina (SM) mostradas en la Tabla 1: A) S+M SM, B) n-V SM y C) h-V SM. Los valores de GP se obtuvieron en función de las longitudes de onda de excitación (320–415 nm) y de emisión (420–500 nm). Dentro de cada gráfico, las curvas corresponden a mediciones llevadas a cabo a diferentes temperaturas: desde arriba hacia abajo, 3 °C, 9 °C, 15 °C, 22 °C, 31 °C y 38 °C.

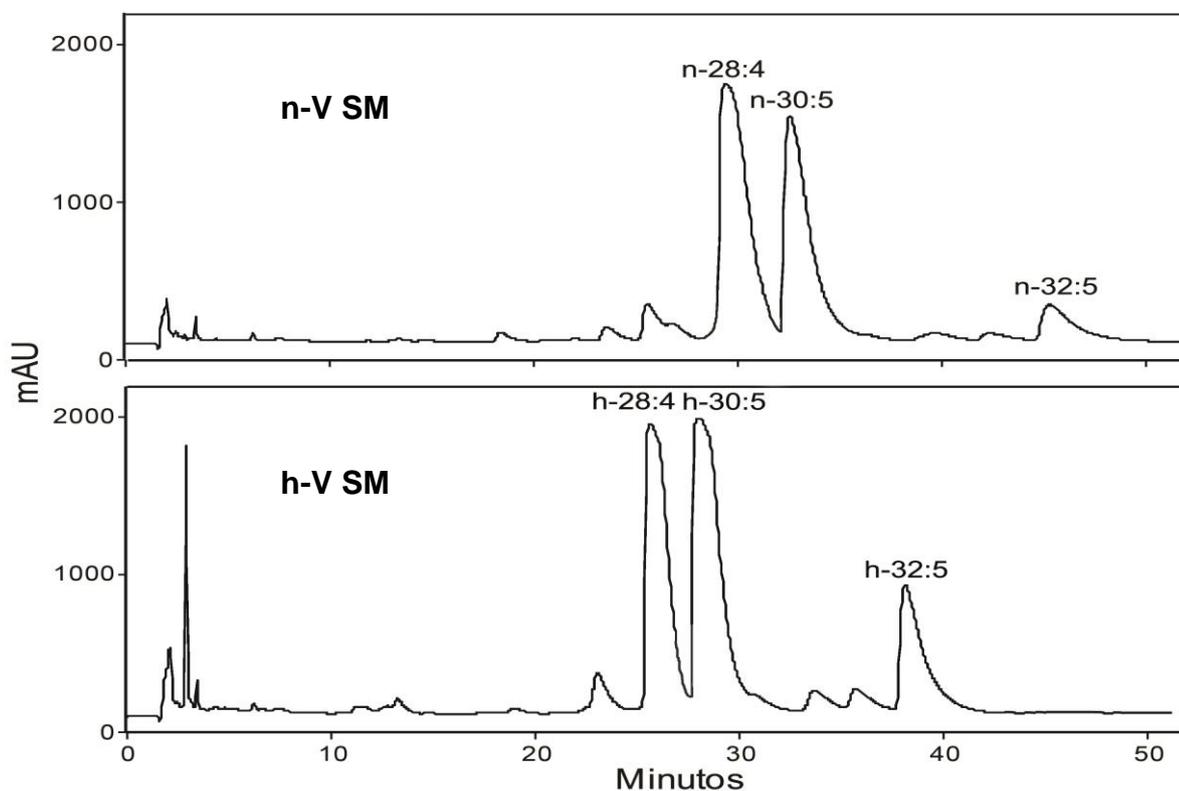


Figura 10. Separación por HPLC de las esfingomielinas con VLCPUFA no hidroxilados (n-V SM) e hidroxilados (h-V SM). Una vez separadas mediante la combinación de sucesivas corridas cromatográficas, descritas en Materiales y Métodos, y cuya composición se muestra en la Tabla 1, las fracciones n-V SM y h-V SM fueron sometidas a HPLC con el fin de separar y coleccionar individualmente las seis principales especies moleculares con VLCPUFA con las que se trabajó en este estudio. La cromatografía fue llevada a cabo empleando una columna de octilsilano (C8) y una fase móvil compuesta por metanol:buffer fosfato, fluyendo a 1 mL/min. El detector fue fijado a una longitud de onda de 205 nm.

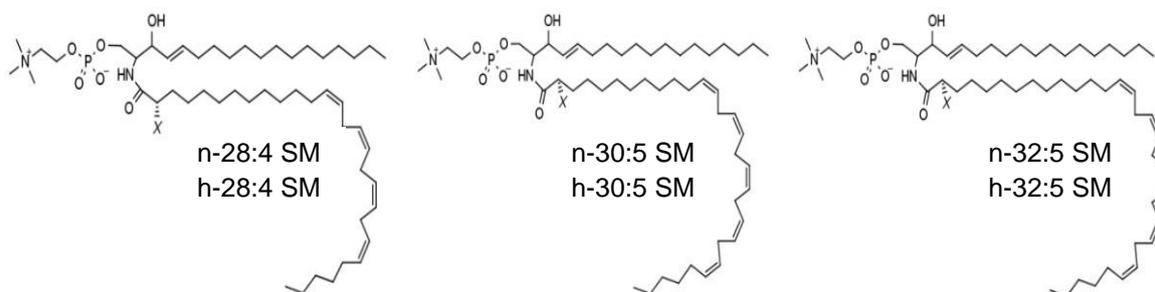


Figura 11. Estructuras esquemáticas de especies de esfingomielinas (SM) con ácidos grasos poliinsaturados de muy larga cadena (VLCPUFA) no hidroxilados e hidroxilados a las que se hace referencia en la Figura 10 y en el texto. La X representa la presencia de -H o -OH, respectivamente, en el segundo átomo de carbono del ácido graso, unido a la esfingosina mediante un enlace amida, en las n-V SM y las h-V SM respectivamente.

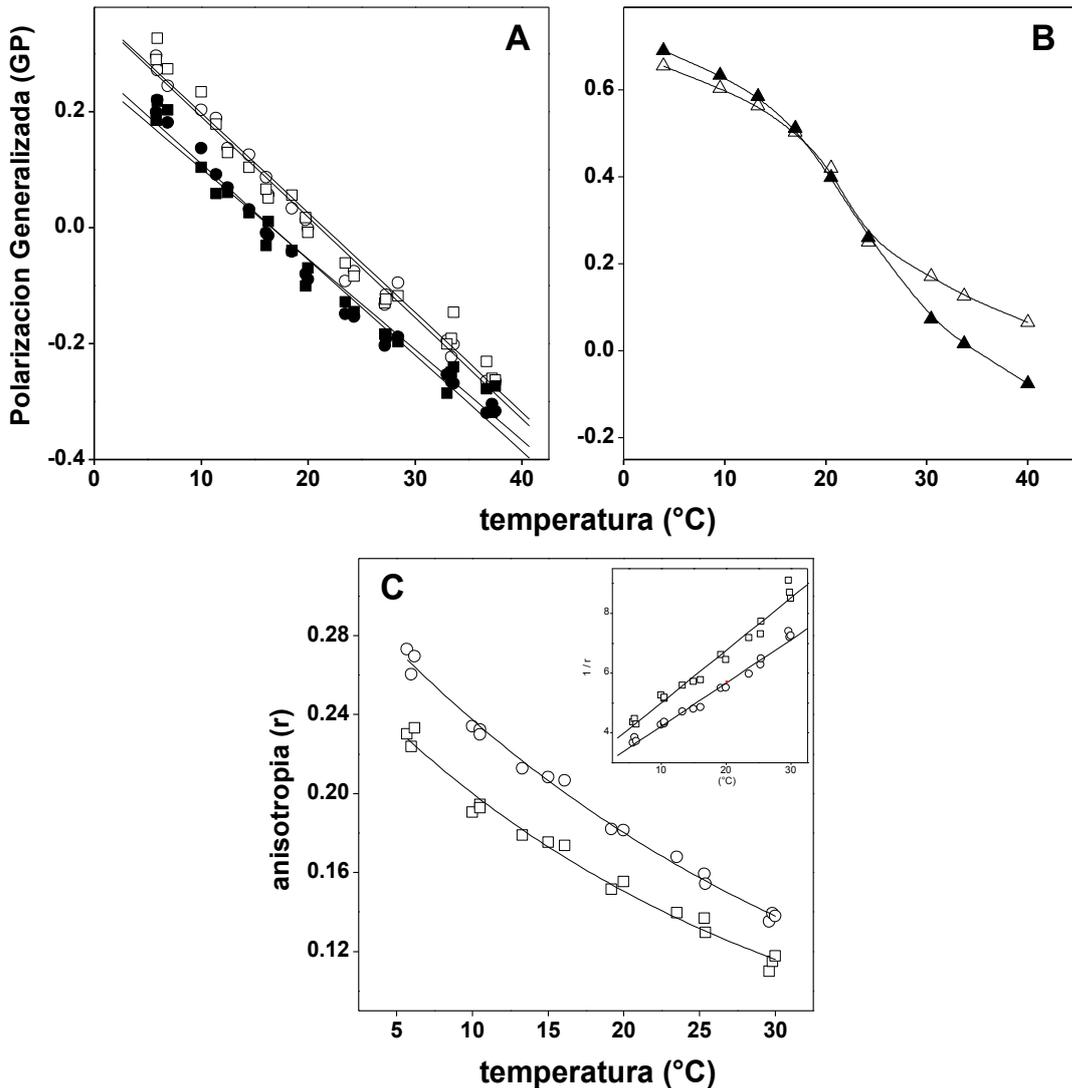


Figura 12. Comportamiento termotrópico de las esfingomielinas con VLCPUFA. Las distintas especies se colectaron de sucesivas corridas de HPLC, una de las cuales se ilustra en la Figura 10. A) y B) Polarización Generalizada (GP) de Laurdan en función de la temperatura en liposomas preparados con las seis principales especies moleculares con VLCPUFA: Tres con n-V SM (símbolos negros) y tres con h-V SM (símbolos blancos). En A) los símbolos representan: especies con 28:4 (●, n-28:4 SM y ○, h-28:4 SM); y especies con 30:5 (■, n-30:5 SM y □, h-30:5 SM). En B) se muestran separadamente las especies con 32:5 (▲, n-32:5 SM y △, h-32:5 SM). Notar la diferencia de escala entre A y B. C) Anisotropía del DPH (r) en función de la temperatura en liposomas formados con h-28:4 SM (○) y h-30:5 SM (□). El inserto muestra la inversa de los valores de r en función de la temperatura. Todos los gráficos muestran promedios entre valores de al menos 3 experimentos independientes.

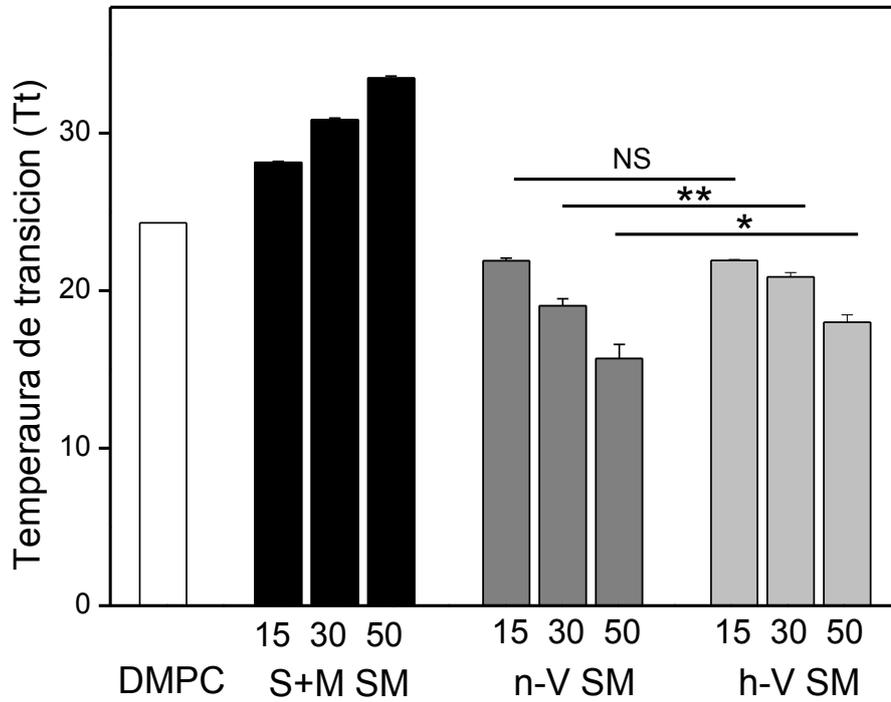


Figura 13. Modificación de la temperatura de transición de la dimiristoil-fosfatidilcolina (DMPC) por la presencia de proporciones crecientes de distintas SMs. Los liposomas se prepararon con DMPC pura (barra blanca) y con mezclas de DMPC con los porcentajes indicados de S+M SM (barras negras), n-V SM (gris oscuro) y h-V SM (gris claro). Los valores de Tt fueron obtenidos a partir de curvas de GP en función de la temperatura para cada uno de los sistemas lipídicos mixtos que se muestran. Cada barra corresponde a un promedio de tres o más experimentos independientes \pm su desviación estándar. Todas las SM adicionadas afectaron significativamente la Tt de DMPC. También se observaron diferencias entre n-V SM y h-V SM, salvo en el caso indicado como NS, diferencia no significativa; los asteriscos * y ** denotan diferencias significativas ($p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente).

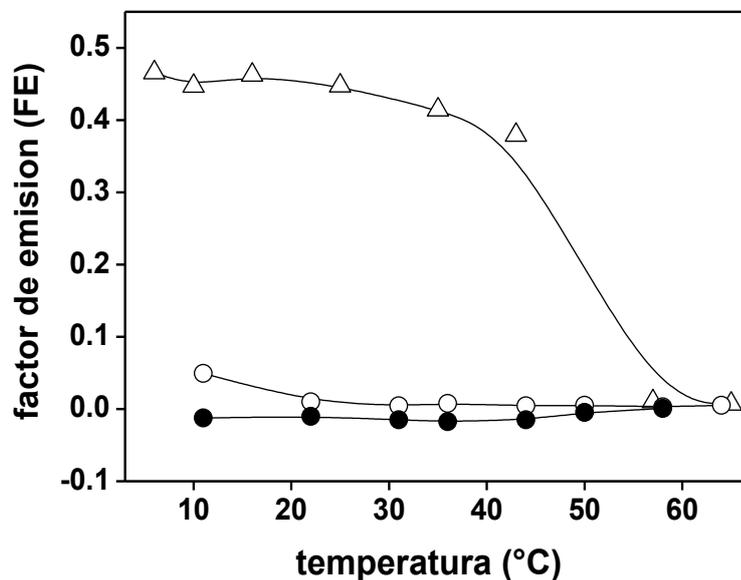


Figura 14. Efecto de la temperatura sobre el factor de emisión (FE) como una medida de la formación de dominios ordenados enriquecidos en esfingomielina y colesterol en un sistema ternario PC:Col:SM. Se tomó como criterio la extinción de la fluorescencia del DPH por 10-SLPC. Los valores de FE corresponden a la *diferencia* entre la fluorescencia del DPH en liposomas conteniendo SM/10-SLPC (F_{SM}) normalizada con respecto a liposomas en los que DOPC reemplaza a 10-SLPC (F_{0SM}) y en liposomas conteniendo DOPC/10-SLPC (F_{DOPC}) normalizada respecto a muestras donde el DOPC reemplaza a 10-SLPC (F_{0DOPC}). Las SM que se muestran en cada caso corresponden a n-V SM (○), h-V SM (●) y 16:0 SM (△). Los datos son representativos de al menos 3 experimentos independientes.

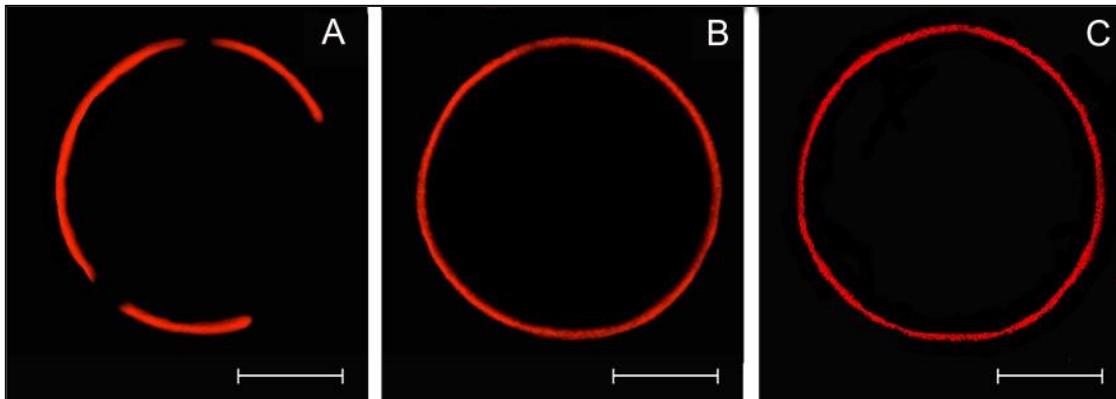


Figura 15. Imágenes de microscopía confocal de vesículas unilamelares gigantes (GUVs) conteniendo la misma proporción de DOPC, Col y cada una de las SM en estudio (A, 16:0 SM; B, n-V SM y C, h-V SM). Se utilizó la sonda fluorescente Dil, marcadora de dominios fluidos. El plano confocal de las imágenes se obtuvo de la región central de las vesículas. Los experimentos se llevaron a cabo a 20 °C. Las barras blancas corresponden a 5 μm .

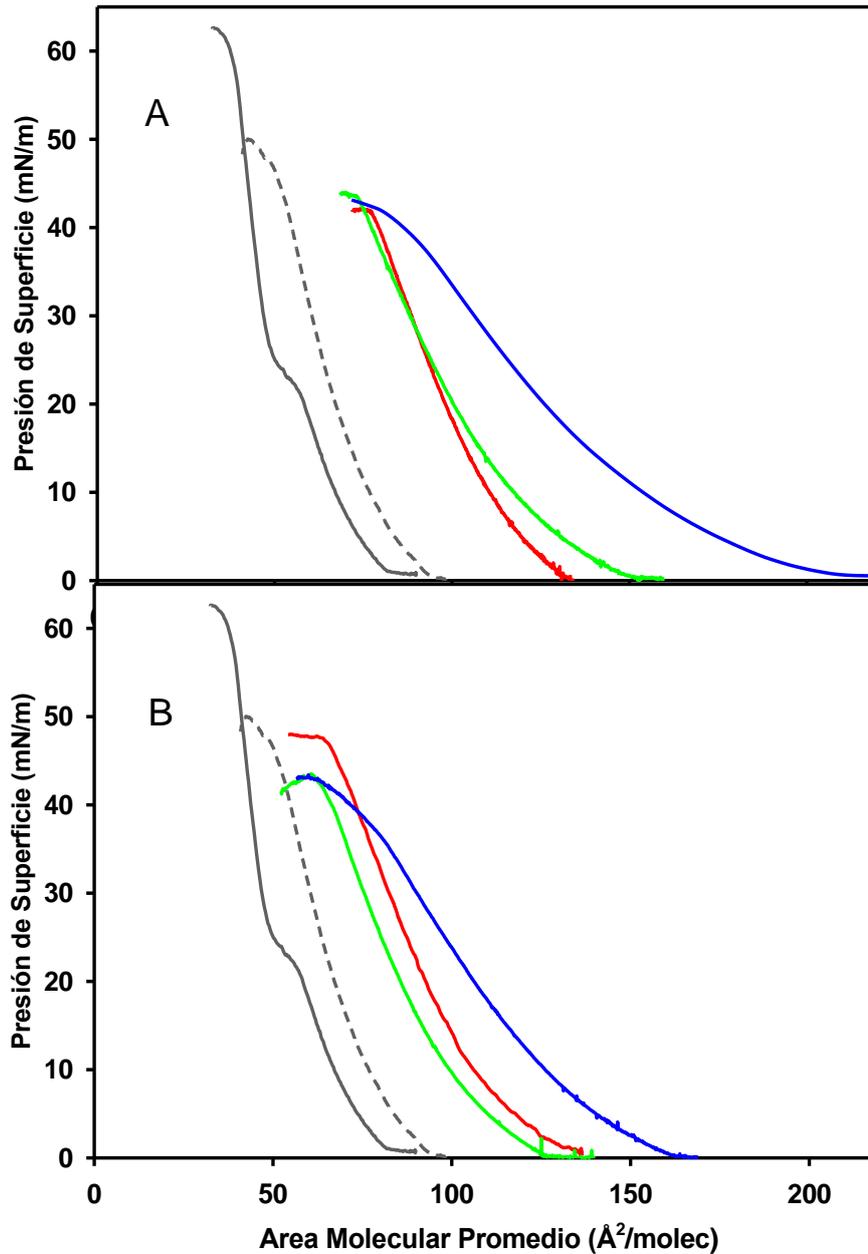


Figura 16. Isothermas de compresión de seis especies moleculares de esfingomiolina con VLCPUFA. En el panel A) se muestra el comportamiento de las tres n-V SM y en el B) el de las tres h-V SM. Las curvas de ambos paneles fueron graficadas utilizando el mismo color para el mismo ácido graso, a saber: n-28:4 SM y h-28:4 SM (líneas rojas), n-30:5 SM y h-30:5 SM (líneas verdes) y n-32:5 SM y h-32:5 SM (líneas azules). A modo comparativo, se incluyen las isothermas de n-16:0 SM (línea gris continua) y de n-18:1 SM (línea gris discontinua). Cada curva muestra una determinación representativa de 3 experimentos independientes, los cuales no variaron en más de 2 Å²/molécula y 2 mN/m.

TABLA 2. Parámetros característicos de esfingomielinas con VLCPUFA en monocapa y su comparación con esfingomielinas de cadena más corta

Esfingomielina	MMA^a (Å²/molec)	Cs^{-1a} (mN/m)	ΔG_c^b (kcal/mol)	Espesor del film^c Th (Å)	Presión de interacción^d, π_s(mN/m)
n-28:4 SM	88 ± 1	94 ± 5	0.51 ± 0.03	14.1 ± 0.2	- 6.1 ± 0.6
n-30:5 SM	88 ± 1	84 ± 6	0.61 ± 0.02	14.7 ± 0.2	- 4.3 ± 0.1
n-32:5 SM	106 ± 1	58 ± 2	1.03 ± 0.02	12.7 ± 0.1	- 1.4 ± 0.1
h-28:4 SM	83 ± 1	90 ± 9	0.57 ± 0.04	14.9 ± 0.2	- 4.8 ± 0.7
h-30:5 SM	75 ± 1	86 ± 5	0.49 ± 0.02	17.2 ± 0.2	- 6.0 ± 0.3
h-32:5 SM	92 ± 1	63 ± 1	0.79 ± 0.01	14.6 ± 0.2	- 3.4 ± 0.1
n-16:0 SM	47 ± 1 ^e	160 ± 3	0.35 ± 0.01	19.5 ± 0.4	-----
n-18:1 SM	60 ± 1 ^e	106 ± 3	0.36 ± 0.01	16.2 ± 0.3	-8.5 ± 0.4

^aTomado a 30 mN/m.

^bObtenido por integración de la isoterma de compresión desde 1 mN/m a 35 mN/m mediante la Ecuación 9.

^cEspesor semi-empírico del film: los valores fueron calculados como V/MMA a 30 mN/m.

^dCalculado mediante la Ecuación 8 con los datos de las isotermas experimentales por debajo de un valor de π de 20 mN/m.

^eTomado de la referencia 49.

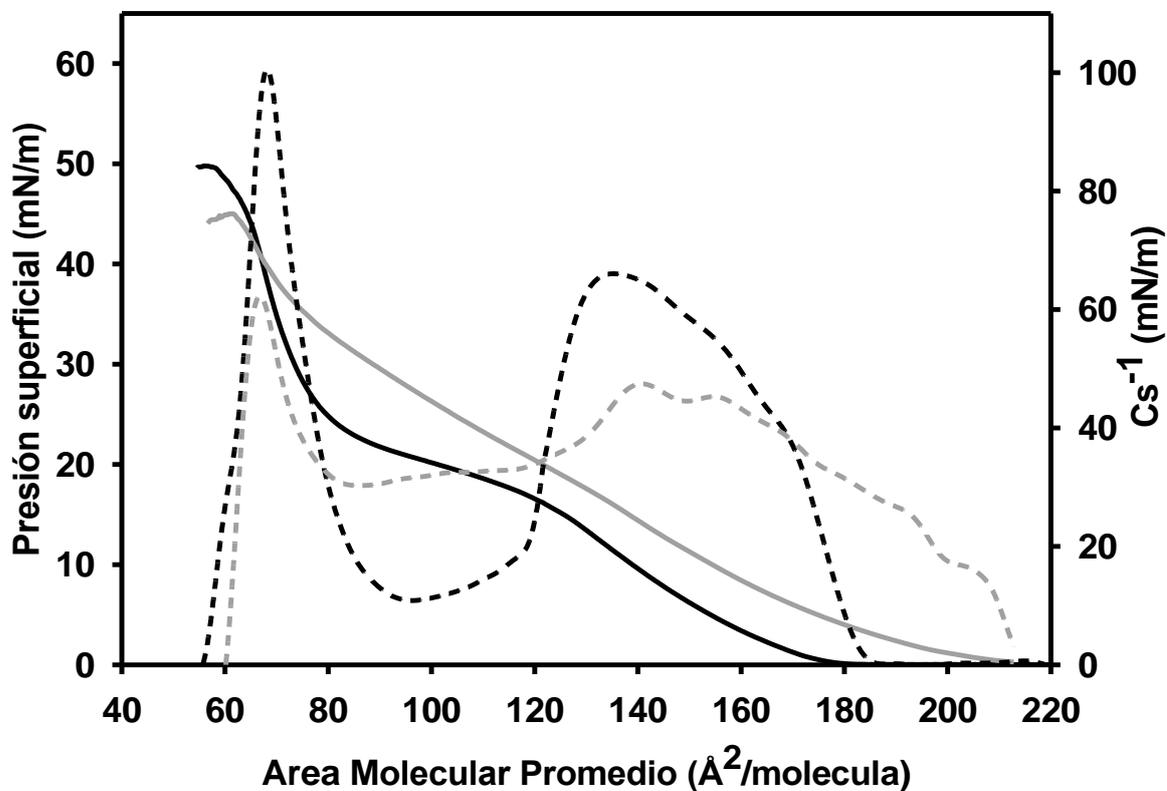


Figura 17. Curvas de compresión y módulo de compresibilidad (Cs⁻¹) para n-32:5 SM (gris) y para h-32:5 SM (negro), a 7 °C. Las curvas de compresión se representan con líneas llenas y el módulo Cs⁻¹ con líneas punteadas.

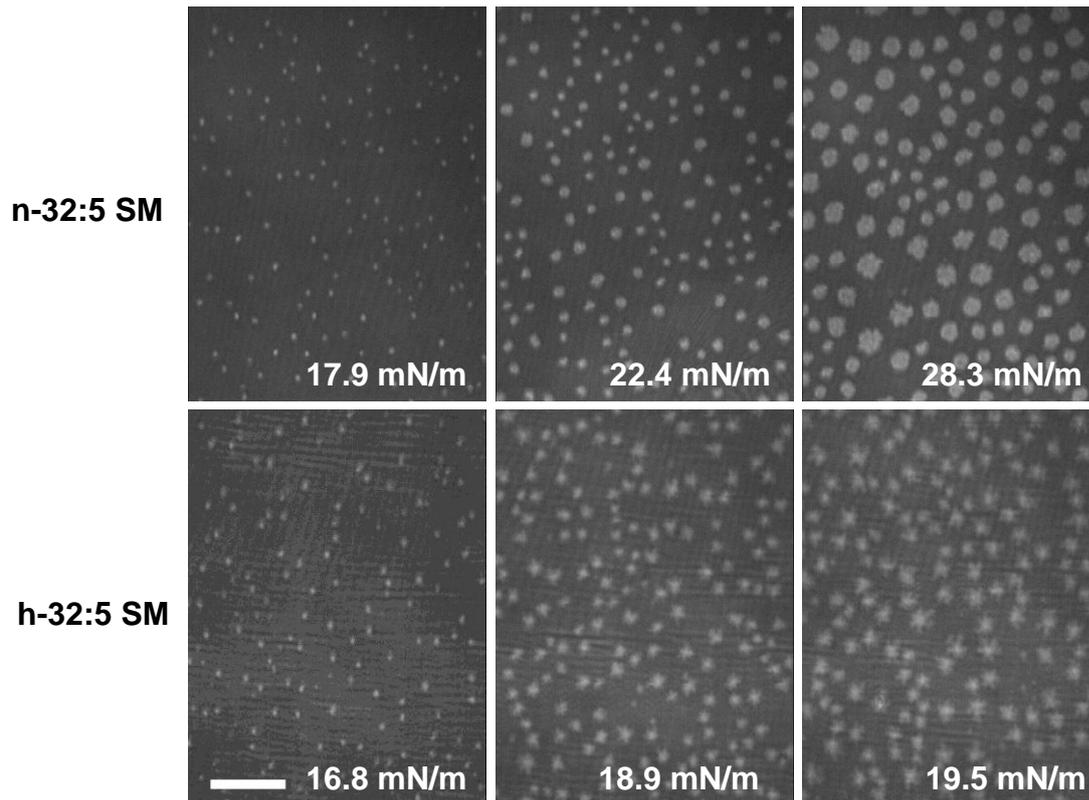


Figura 18. Imágenes obtenidas por microscopía de ángulo de Brewster (BAM) de films de n-32:5 SM y h-32:5 SM a tres presiones de compresión diferentes, correspondientes al rango de la transición LE-LC, a 7°C. El tamaño de la barra representa 50 μm.

RESULTADOS II

Caracterización biofísica de ceramidas con VLCPUFA

1. Obtención de ceramidas con VLCPUFA hidroxilados y no hidroxilados

Para obtener cantidades adecuadas de las fracciones de ceramida con VLCPUFA, tanto n-V Cer como h-V Cer, y a partir de ellas las especies moleculares individuales, nos enfrentamos a un problema similar al de las SM desde el punto de vista cuantitativo, aunque distinto en sus características. Mientras que en la SM la alta polaridad de la cabeza polar (fosforil-colina) impone una gran dificultad para la separación cromatográfica por capa fina de las especies moleculares con ácidos grasos no hidroxilados de sus análogas con ácidos grasos 2-hidroxilados, las especies de Cer que tienen estos mismos dos tipos de ácidos grasos se separan directamente en capa fina empleando sílica gel como soporte y un solvente apto para separar lípidos neutros.

Como se mostró en trabajos previos del grupo, las Cer de células germinales y espermatozoides de rata se separan muy bien en no hidroxiladas e hidroxiladas. El conjunto de las especies de Cer con ácidos grasos no hidroxilados (que incluye las especies n-V Cer entre otras) es la que migra más adelante, y tiende a separarse en tres bandas en la TLC, en función de la longitud de sus ácidos grasos. En este grupo, las Cer con ácidos grasos más cortos, saturados y monoenoicos, quedan retrasadas con respecto a las n-V Cer, que es la fracción que más migra. Los componentes más abundantes en ésta son n-28:4 Cer, n-30:5 Cer, y n-32:5 Cer.

El grupo de las Cer 2-hidroxiladas se separa bien de todas las Cer no hidroxiladas con los mismos solventes, formando una única banda compacta, que está compuesta casi exclusivamente por h-V Cer, predominando en ellas h-28:4 Cer, h-30:5 Cer y h-32:5 Cer. Un esquema de las Cer mencionadas se presenta en la Figura 19.

En separaciones preliminares por HPLC para separar y colectar las especies individuales de n-V Cer, al inyectar las n-V Cer, observamos que con algunas de ellas co-eluían 24:0 Cer y 24:1 Cer, pues co-migran con ellas durante la TLC. Por esta razón, como habíamos hecho con la SM, decidimos aprovechar el alto grado de insaturación que presentan las Cer con VLCPUFA para purificarlas, librándonos de las especies comunes (C₁₆-C₂₆). Para ello, antes de la HPLC, realizamos una Ag-TLC para obtener fracciones enriquecidas en n-V Cer y h-V Cer.

A diferencia del resultado obtenido con la muy polar SM, cuyas especies moleculares con VLCPUFA tetraenoicos y pentaenoicos de muy larga cadena no se separan entre sí por Ag-TLC, las especies de Cer con los mismos ácidos grasos tendieron a separarse de acuerdo con su grado de insaturación. Aunque esta pre-separación implicó un procedimiento más laborioso, debido al mayor número de muestras que debían ser eluidas e inyectadas, facilitó en gran medida el posterior aislamiento de especies individuales de Cer.

El procedimiento de HPLC, empleando las mismas columnas de fase reversa antes utilizadas para las SM, permitió la elución de las especies moleculares de Cer en el mismo orden que aquéllas, de acuerdo al ácido graso, es decir, 28:4 Cer, 30:5 Cer y 32:5 Cer (Fig. 20). En ambos casos, la elución de cada una de las especies moleculares hidroxiladas precedió en el tiempo de elución a la correspondiente análoga no hidroxilada (p. ej., la h-30:5 Cer eluyó antes que la n-30:5 Cer), debido a que la mayor polaridad que les otorga a las primeras el grupo hidroxilo favorece su interacción con la fase móvil (metanólica).

2. Propiedades de ceramidas con VLCPUFA en monocapas de Langmuir

Con las seis especies moleculares de Cer en estudio (Fig. 19) se formaron monocapas de Langmuir y se obtuvieron las **isotermas de compresión** a 22 °C, esencialmente como antes se señaló para las SM. En contraste con aquéllas, todas las especies de Cer con VLCPUFA mostraron una transición de fase en el rango de

presión de entre 5 y 20 mN/m, lo que se evidenció como un quiebre en los gráficos que relacionan el área molecular media (MMA) con la presión superficial (π) (Fig. 21) y que permitió conocer la presión de transición (π_t) para cada especie de Cer. En esta parte del estudio incluimos, a modo de referencia, a las especies de Cer más abundantes y ampliamente distribuidas en la naturaleza, como 16:0 Cer, 18:1 Cer y 24:1 Cer. Pudo observarse que tanto las n-V Cer como h-V Cer siguieron una misma tendencia en cuanto a sus valores de π_t , que ordenados de mayor a menor, fueron: 30:5 Cer > 28:4 Cer > 32:5 Cer (Fig. 21). En comparación, la isoterma de 16:0 Cer mostró un comportamiento diametralmente diferente al de las especies con VLCPUFA ya que, como se conoce (Fanani & Maggio, 2010), se organiza en una fase LC y muestra una transición LC \rightarrow S a \sim 16-18 mN/m y a una MMA de \sim 43 Å²/molécula (Fig. 21 B, inserto). Por su parte, la 24:1 Cer, que tiene un largo segmento saturado en la cadena de su ácido graso por tener su única doble ligadura localizada en la posición 15, exhibió una transición LC \rightarrow S similar a la de 16:0 Cer.

Recordemos que los valores del **módulo de compresibilidad** Cs^{-1} pueden brindar información acerca de la elasticidad de los films, lo que facilita la asignación de los distintos estados de fase. Las fases LE típicas muestran valores de Cs^{-1} menores a 130 mN/m. Cuando se alcanza el valor de π_t y se entra en zona de transición LE \rightarrow LC, los valores de Cs^{-1} típicamente disminuyen (20-30 mN/m). Finalmente, cuando queda establecida una fase LC, dichos valores aumentan nuevamente.

La Tabla 3 compara los valores de Cs^{-1} de las Cer en estudio a dos presiones: 10 y 30 mN/m. Un punto importante a destacar fue que los Cs^{-1} obtenidos en el estado LC para las seis especies moleculares de Cer con VLCPUFA analizadas fueron *menores* que los obtenidos para 16:0 Cer y para 24:1 Cer en su fase LC (Tabla 3). Los films de Cer con VLCPUFA mostraron un carácter LE sólo a 10 mN/m (Tabla 3) y aún a presiones menores en el caso de h-32:5 Cer. La 18:1 Cer se destacó por mostrar una fase LE a ambas presiones, sin evidenciar transición de fase.

Una característica notable de las especies de Cer con VLCPUFA fue su alto valor de MMA (Fig. 21). Las Cer ordinarias en fase LC o S (a valores altos de π), ocuparon típicamente un área de $\sim 40\text{-}42 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ (Tabla 3, 30 mN/m), que es aproximadamente el área mínima que ocupa la sección transversal de lípidos con dos cadenas acílicas saturadas cuando éstas están completamente extendidas. A la misma π (30 mN/m, Tabla 3), todas las Cer con VLCPUFA en el estado LC, tuvieron un MMA mayor. A 10 mN/m, en el estado LE, esta tendencia se mantuvo ya que las Cer con VLCPUFA ocuparon un área 1.5 a 3.4 veces más grande que el área ocupada por 18:1 Cer en ese mismo estado de fase (Tabla 3).

Comparando ahora las especies moleculares n-V Cer y h-V Cer entre sí, comprobamos que los valores de MMA se incrementaron con la longitud de la cadena del ácido graso en el siguiente orden: $28 < 30 < 32$. Para un mismo ácido graso, las MMA fueron, en los tres casos, menores cuando estaba presente que cuando estaba ausente el grupo hidroxilo (n-V Cer > h-V Cer) (Tabla 3). Es evidente, por lo tanto, que las h-V Cer se empaquetan ocupando áreas comparativamente *menores* que las n-V Cer, lo cual indica que en las mismas condiciones existe un mayor grado de ordenamiento de las cadenas acílicas en las primeras, impuesto por el hidroxilo.

La mayor capacidad de empaquetamiento molecular de las h-V Cer que de las n-V Cer se vio también reflejada en el hecho de que las h-V Cer presentaron transiciones de fase LE \rightarrow LC más pronunciadas y cooperativas que las correspondientes n-V Cer (Fig. 21). Esta propiedad puede ser atribuida a la capacidad del grupo hidroxilo en la posición 2 de la cadena del ácido graso (sitio cercano a la interfase aire-agua), de establecer uniones por puente hidrógeno entre ellos, funcionando así como un punto de contacto favorecedor o promotor del ordenamiento de las cadenas hidrocarbonadas.

Otro parámetro usualmente analizado en el estudio molecular empleando monocapas lipídicas es el **potencial de superficie (ΔV)**. El valor de ΔV es la

resultante de varios componentes. En las muestras analizadas, al ser eléctricamente neutras, la principal contribución al potencial de superficie es el potencial dipolar de la membrana. Este es el resultante de las propiedades dipolares de los distintos grupos químicos que componen la molécula lipídica y su posición anisotrópica en sentido perpendicular al plano de la membrana, y contempla la contribución de la esfera de hidratación asociada a los grupos funcionales presentes en las cabezas polares de los lípidos.

Como era predecible, los valores de ΔV de los films de las Cer con VLCPUFA se incrementaron, en función de 1) el largo de la cadena acílica (28 a 32 carbonos) y 2) los valores de π (comparar 10 con 30 mN/m para cada especie en la Tabla 3). Esto puede explicarse considerando que, durante el proceso de compresión, a medida que se va incrementando la densidad molecular, las cadenas acílicas de todas las Cer van adoptando una orientación más perpendicular a la interfase.

Las especies n-V Cer presentaron valores de ΔV en el mismo rango que el ΔV de 18:1 Cer en estado LE, mientras que en estado LC los valores de ΔV fueron más bajos que los de 16:0 Cer y 24:1 Cer (Tabla 3). Otro punto a destacar es que las especies n-V Cer mostraron valores mayores de ΔV que las especies h-V Cer, incluso a baja densidad molecular (10 mN/m). Este hecho, sumado a que el MMA de las especies n-V Cer, en todos los casos, fue mayor que la de las correspondientes especies h-V Cer, indica que hay una diferencia respecto a la organización conformacional de sus cadenas acílicas entre estos dos grupos.

3. Visualización por microscopia de ángulo de Brewster

Mediante BAM de films lipídicos formados por las seis Cer con VLCPUFA pudimos corroborar que las *transiciones de fase* observadas en las isothermas eran procesos de primer orden que involucraban la nucleación y el crecimiento de la fase LC en formación rodeada por la fase LE. En la región de coexistencia LE-LC las imágenes de BAM mostraron la generación de dominios LC en todas ellas salvo la n-

30:5 Cer, cuya transición de fase a 23 ± 2 mN/m fue muy difusa (Fig. 22). Este resultado podría deberse a una similitud óptica entre las fases, es decir, a que éstas no presentasen la suficiente diferencia de reflectividad como para ser visualizadas como fases distintas, o a que los dominios formados fueran demasiado pequeños como para ser resueltos por BAM. Con esta excepción, las especies de Cer con VLCPUFA comenzaron a mostrar la nucleación de pequeños dominios a pocos mN/m por encima de su π_i . Estas fueron creciendo en tamaño a medida que transcurría la compresión del film, dando lugar así a dominios brillantes, con bordes irregulares y de forma floreada, los que permanecieron sin percolar (separados entre sí) hasta que la mayor parte del film se encontró en la fase LC (Fig. 22).

4. Organización molecular en los films

En este punto, al igual que con las SM con VLCPUFA, nos preguntamos cómo se organizarían en el film estas moléculas con tan larga e insaturada cadena hidrocarbonada. Dada la relación directamente proporcional que existe entre la reflectividad observada por BAM y el espesor de las monocapas, generalmente es posible determinar dicho espesor. Sin embargo, el valor de este último también depende del índice de refracción del film, el cual en este caso no puede ser determinado con certeza. Por esta razón es que no empleamos este método para determinar el espesor de los films y recurrimos a una estrategia indirecta.

De manera semejante a lo realizado con las SM con VLCPUFA, calculamos en forma semiempírica el volumen promedio (V) de las Cer con VLCPUFA, empleando la ecuación 17 y la longitud promedio de las cadenas hidrocarbonadas (L) cuando se encuentran totalmente extendidas mediante el promedio del largo (l) de cada una de las dos cadenas hidrocarbonadas de la Cer (Tabla 4), calculado como:

$$l = 0.8 \times (1.5 + 1.265 \times n) - 0.9 \times n_{db} \quad (\text{Ecuación 18})$$

donde n corresponde al número de átomos de carbono en la cadena hidrocarbonada y n_{db} al número de dobles enlaces en cada una de las mismas cadenas. Luego, con el V calculado para cada una de las especies de Cer, y el MMA medido experimentalmente, se obtuvo el espesor semi-empírico, definido como: $Th = VMMA$

Tal como había ocurrido para las SM con VLCPUFA, los valores de Th obtenidos para las seis especies de Cer con VLCPUFA fueron *menores* que los obtenidos para 16:0 o 24:1 Cer. Además, también en concordancia con lo observado previamente en el caso de las SM, las especies n-V Cer formaron membranas de menor valor de Th , y por lo tanto de menor espesor, que las correspondientes h-V Cer (Tabla 4).

Analizar en forma simultánea los valores de Th y L permite hacer deducciones acerca de la organización molecular de las distintas Cer en los films. Así, si en la fase LC las moléculas muestran valores de L cercanos a los de Th , esto sugiere que se organizan con sus cadenas acílicas completamente extendidas, en tanto que si las moléculas presentan valores L más altos que los de Th (esto es, una relación L/Th alta) indica que adoptarían una disposición curvada de sus cadenas acílicas. Como se muestra en la Tabla 4 en su fase LC, las especies de 16:0 y 24:1 Cer mostraron el valor *más bajo* de la relación L/Th (~ 1) (Tabla 4). Los valores de L/Th fueron en todos los casos mayores a uno para las especies de Cer con VLCPUFA. Esta alta relación apoya la idea de que, en monocapa, las cadenas acílicas de las especies de Cer con VLCPUFA adoptarían una estructura curvada.

La Tabla 4 muestra, además, los valores del **momento dipolar resultante perpendicular a la interfase (μ_{\perp})**, calculados aplicando la ecuación 7 y los datos de ΔV y MMA. Dicho parámetro es independiente de π y permite obtener información complementaria acerca de la organización de las moléculas lipídicas en la interfase agua-aire a cada área molecular. Cuanto mayor es μ_{\perp} , indica mayor polaridad conferida a las moléculas por grupos químicos o segmentos relativamente más polares de las mismas que se hallan cercanos a la interfase.

Para nuestra sorpresa, las especies de n-V Cer mostraron valores de μ_{\perp} más altos, casi el doble, que las correspondientes h-V Cer. Particularmente dos de las especies de este último grupo, la h-28:4 Cer y la h-30:5 Cer, mostraron los valores de μ_{\perp} más bajos de la Tabla (~ 360-400 mD) (Tabla 4), dando valores aún menores que los exhibidos por 16:0 Cer y 24:1 Cer en fase LC. Esto llamó la atención porque, según lo sugerido por la relación L/Th , en fase LC estas Cer se encontrarían con sus cadenas hidrocarbonadas dispuestas en una conformación cercana a la extendida.

La ausencia del grupo hidroxilo en las n-V Cer llevaría a una interacción más laxa entre moléculas adyacentes y favorecería una mayor curvatura de las cadenas acílicas que la que permiten las h-V Cer, lo cual facilitaría que las dobles ligaduras se encontraran más cercanas a la interfase en las primeras, contribuyendo así a mayores valores de μ_{\perp} y de la relación L/Th . Tomados en conjunto, estos datos permiten sostener que las cadenas acílicas de las Cer con VLCPUFA en monocapa se encuentran en una conformación curvada, siendo esta característica más marcada en las n-V Cer .

5. Aspectos termodinámicos

Con el fin de indagar en la termodinámica del proceso de compresión, se obtuvieron las isothermas enfriando a 8 °C las monocapas formadas por cada una de las especies moleculares de Cer con VLCPUFA. Como era de esperar, al disminuir la temperatura se favoreció el régimen LC (el estado de mayor orden y menor entropía), por lo que se observó una disminución de la π_t de los films formados por estas Cer. En el caso de las dos especies con cadena acílica más larga, n-32:5 y h-32:5 Cer, la π_t disminuyó de tal forma que ambas especies se encontraron en un régimen LC desde el comienzo de la compresión (Tabla 5). La presión de colapso, que corresponde a la mayor presión lateral que puede soportar el film, no mostró grandes variaciones con la disminución de la temperatura, lo cual indica que la estabilidad de la monocapa no fue mayormente afectada.

El área integrada bajo la curva π -MMA determina el valor del cambio de la energía libre durante el proceso de compresión (ΔG_c). Considerando que durante la compresión ocurre una pérdida de entropía que resulta del ordenamiento molecular y que la disminución de la temperatura favorece la formación de un estado más condensado, un resultado esperado era que el valor de ΔG_c fuera menor cuando menor fuera la temperatura a la cual se realizara la compresión. Por otra parte, se podía esperar que el valor de ΔG_c fuera mayor en especies moleculares con una cadena acíclica más larga, debido a que en la compresión está implicado un mayor cambio entálpico.

A modo comparativo, para una especie expandida como 18:1 Cer, el valor de ΔG_c fue de $0.3 \pm 0.1 \text{ kcal.mol}^{-1}$, mientras que para las condensadas 16:0 Cer y 24:1 Cer ese valor fue de $0.07 \pm 0.01 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Los valores de ΔG_c obtenidos para las especies de Cer con VLCPUFA (Tabla 5) fueron en todos los casos mucho mayores que éstos, incluso para el caso en que las monocapas estaban completamente en estado LC (n-32:5 Cer y h-32:5 Cer a 8°C). Esto indica que se requiere suministrar más energía al sistema para realizar la compresión. Por lo tanto, se puede concluir que cuanto mayor es la insaturación y la longitud de la cadena acíclica de la molécula, mayor es la pérdida de entropía que se produce durante la compresión, y por lo tanto mayor es su ΔG_c .

Aún más interesante fue la comparación entre especies n-V Cer y h-V Cer. Las primeras mostraron valores de ΔG_c siempre *mayores* que sus contrapartes h-V Cer a las dos temperaturas estudiadas (Tabla 5). Los valores llamativamente más grandes de ΔG_c para las n-V Cer no sólo fueron consistentes con la gran área de superficie que ocupan las moléculas y con sus bajos valores de C_s^{-1} , sino también con el hecho de que presentaron transiciones de fase relativamente más difusas (Fig. 21 y Tabla 3). Todo esto indica que las n-V Cer tendrían una menor capacidad de empaquetamiento que las h-V Cer. Como consecuencia, en estas últimas hay una menor energía involucrada en el proceso de compresión.

Es importante destacar que la energía de compresión, además de las contribuciones entrópicas, también tiene un componente relacionado con los cambios entálpicos asociados a la transformación de fases. Por lo tanto, sumado a un mayor empaquetamiento de las cadenas acilicas, las diferencias observadas también pueden ser consecuencia de una mayor interacción entre las cabezas polares en el caso de las h-V que de las n-V Cer.

Una de las ventajas de las monocapas como sistema modelo para estudiar propiedades termodinámicas de lípidos es que se requieren menores cantidades de muestra que con las técnicas de fluorescencia y calorimetría diferencial. Además, muchos de los parámetros calculados permiten inferir ciertas características de las moléculas cuando se encuentran formando bicapas en fase *bulk* (como p. ej., liposomas). Trabajos previos proponen que la temperatura de transición determinada en bicapa está vinculada con la temperatura más baja a la cual se observa una monocapa en fase LE en todo el rango de presión (obtenida a partir de la interacción entre las regresiones lineales de presión de colapso y π_t en función de la temperatura). Así, para una serie de glicoesfingolípidos y para 16:0 Cer, se observó una coincidencia notable entre la T_m (temperatura de *melting* determinada experimentalmente mediante calorimetría diferencial de barrido) y la T_t estimada a partir de estas mediciones en monocapa (Fanani & Maggio, 2010; Maggio *et al.*, 1985). Sobre estas bases, decidimos estimar las T_m de las especies de Cer con VLCPUFA en monocapa mediante el método de intersección (Tabla 5). Los resultados mostraron valores de T_m de 45-46 °C para n-28:4 Cer y h-28:4 Cer, valores mayores para h-30:5 Cer (~ 53 °C) y menores para n-30:5 Cer (~ 36 °C).

Tablas y Figuras - Resultados II

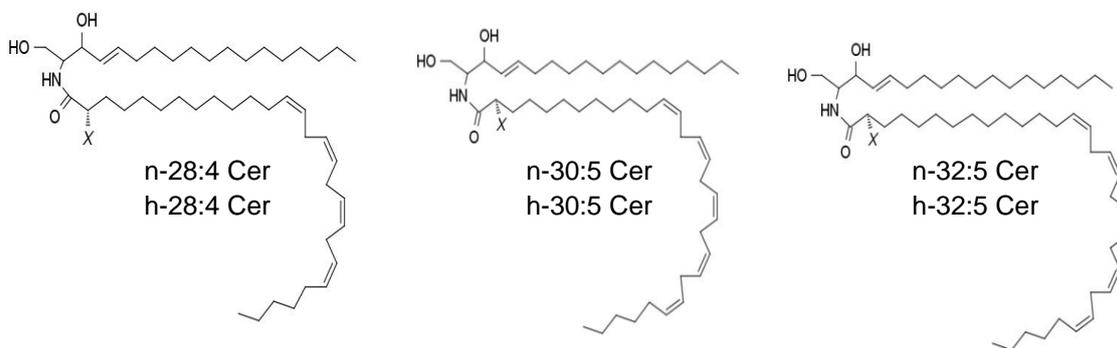


Figura 19. Estructuras esquemáticas de las especies de ceramida (Cer) con ácidos grasos poliinsaturados de muy larga cadena (VLCPUFA) no hidroxilados e hidroxilados a las que se hace referencia en la Figura 20 y en el texto. La X representa la presencia de $-H$ u $-OH$ en el segundo átomo de carbono del ácido graso, unido a la esfingosina mediante un enlace amida, en las n-V Cer y las h-V Cer respectivamente.

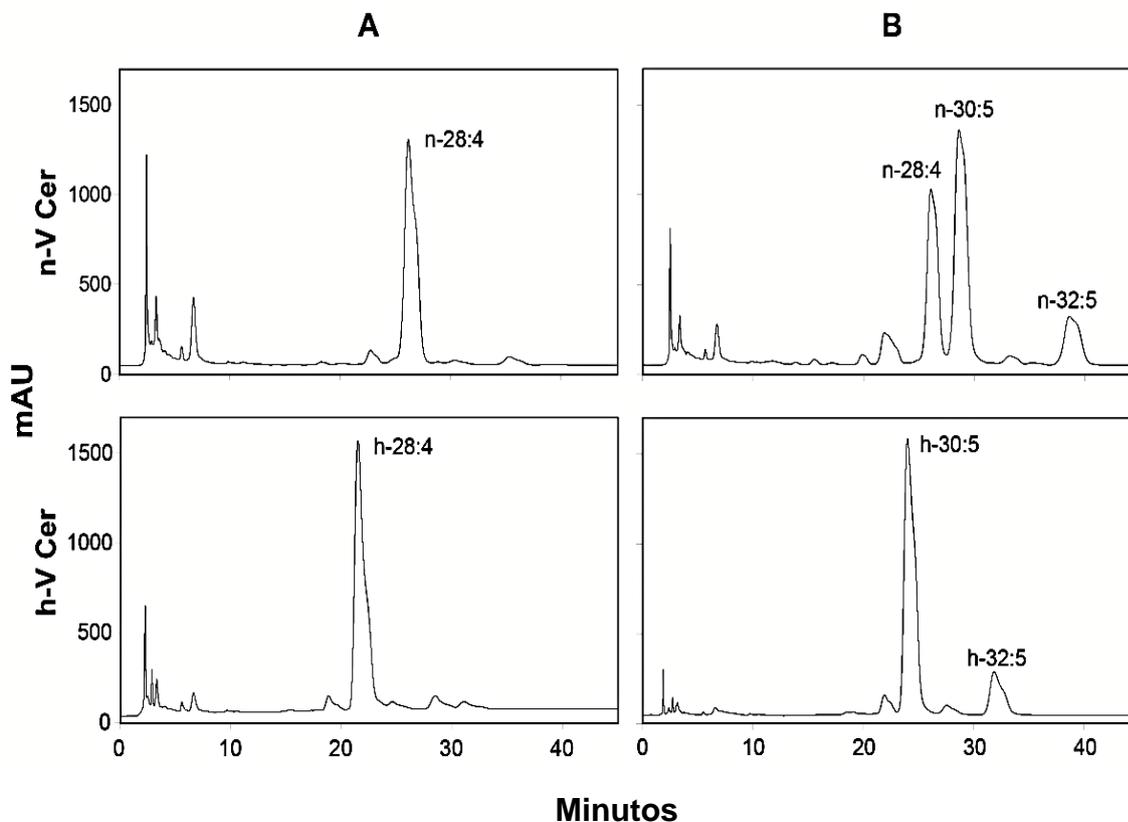


Figura 20. Separación por HPLC de las ceramidas con VLCPUFA. Una vez separadas por TLC, las fracciones de Cer con ácidos grasos no hidroxilados (n-V Cer) e hidroxilados (h-V Cer), fueron separadas de las especies con ácidos grasos saturados y monoenoicos por cromatografía impregnada con nitrato de plata, como se describe en Materiales y Métodos. En este paso, cada una de las fracciones resultó estar parcialmente resuelta en subfracciones de acuerdo con el grado de insaturación de sus ácidos grasos, es decir enriquecidas en Cer con ácidos grasos tetraenoicos (paneles A) y pentaenoicos (paneles B). Las subfracciones se inyectaron en el HPLC por separado. Cada una de las especies se colectó individualmente, obteniéndose así las seis principales especies moleculares de Cer con VLCPUFA empleadas en los estudios en monocapa. La cromatografía se llevó a cabo empleando una columna de octilsilano (C8) con una fase móvil de metanol:buffer fosfato, fluyendo a 1 mL/min. La longitud de onda del detector se fijó en 205 nm.

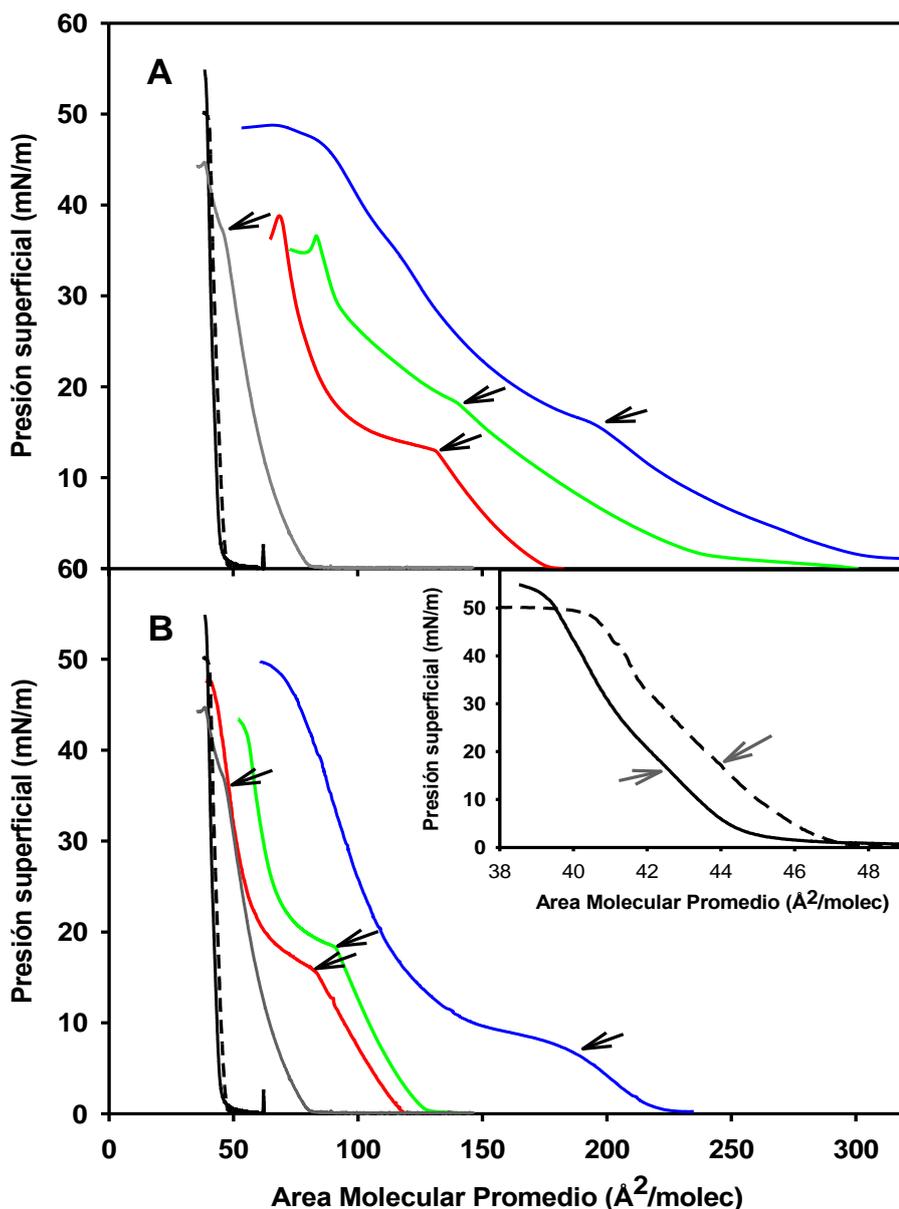


Figura 21. Isothermas de compresión de seis ceramidas con VLCPUFA. En el panel A) se muestra el comportamiento de las tres especies de n-V Cer y en el B) el de las tres especies de h-V Cer. Las curvas de ambos paneles fueron graficadas utilizando el mismo color para el mismo ácido graso, a saber: n-28:4 Cer y h-28:4 Cer (líneas rojas), n-30:5 Cer y h-30:5 Cer (líneas verdes) y n-32:5 Cer y h-32:5 Cer (líneas azules). A modo comparativo, se muestran las isothermas de 24:1 Cer (línea negra discontinua), 16:0 Cer (línea negra sólida) y 18:1 Cer (línea gris). Para una mejor visualización, el inserto muestra el gráfico de las isothermas de 16:0 Cer y 24:1 Cer con el eje x en una escala expandida. Las flechas negras indican el comienzo de la transición de fase LE→LC y las flechas grises la transición LC→S.

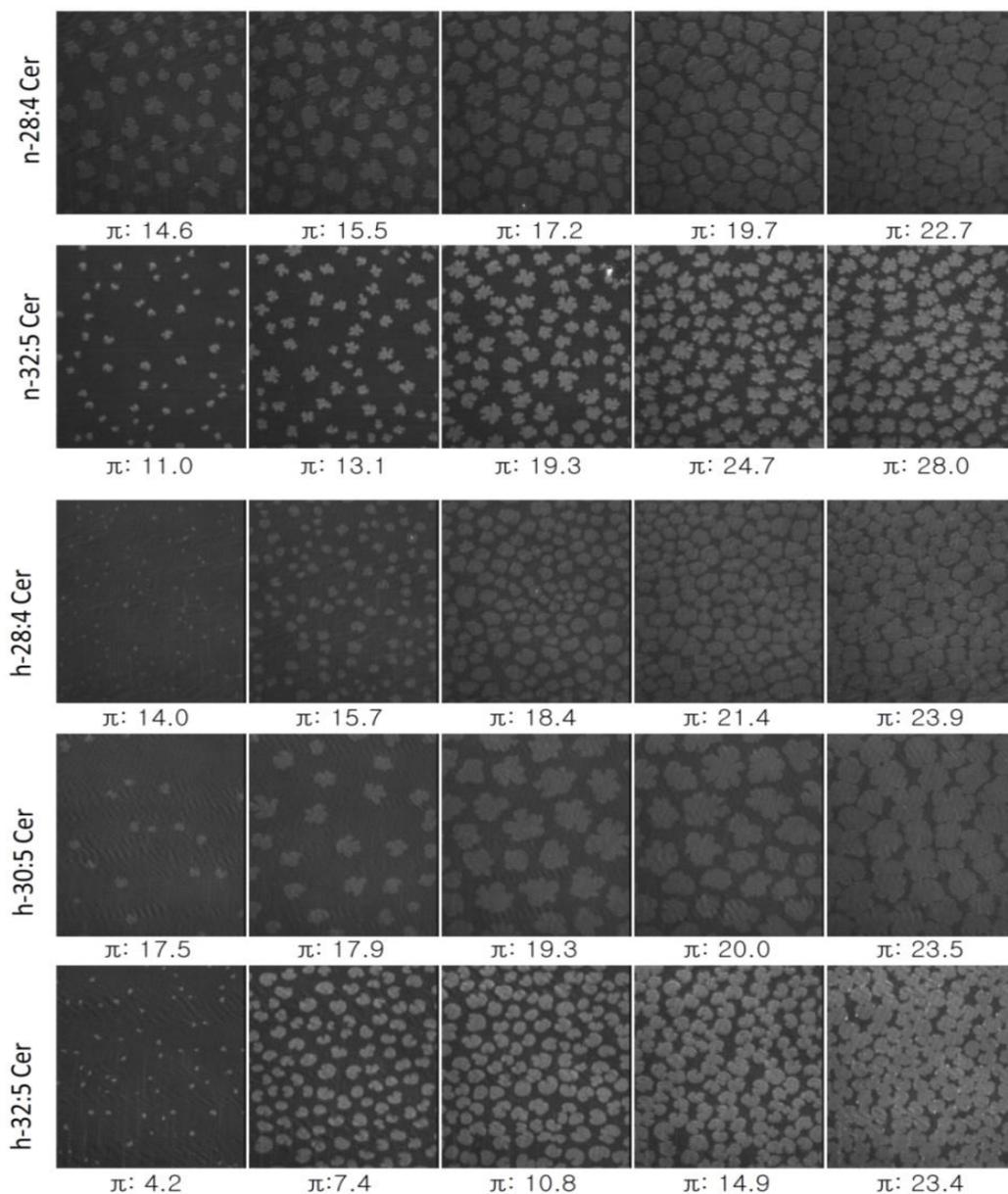


Figura 22. Microscopía de ángulo de Brewster (BAM) de monocapas de seis ceramidas con VLCPUFA en la región de la transición de fase LE-LC. La coexistencia de fases se evidencia mediante la aparición de dominios lipídicos que varían en forma, tamaño y empaquetamiento a diferentes presiones superficiales. Los dominios más brillantes (gris claro) corresponden a una fase condensada y están rodeados por una fase expandida (gris oscuro/negro). Esto se debe a que la fase condensada posee un mayor espesor e índice de refracción que la expandida. En cada fila se indica la especie molecular de ceramida, y debajo de cada micrografía el valor de presión superficial a la cual fue tomada. Para una mejor visualización, se bajó el rango del nivel de gris (0-100) de la escala original (0-255). Las micrografías son representativas de 2 experimentos independientes. El tamaño de las imágenes representa un área de 200 x 250 μm .

TABLA 3. Parámetros característicos de las especies moleculares de ceramida con VLCPUFA en monocapas. Comparación con ceramidas con ácidos grasos de menor longitud e insaturación

Ceramida	10 mN/m				30 mN/m			
	MMA	Cs ^{-1a}	Estado de fase	ΔV	MMA	Cs ^{-1a}	Estado de fase	ΔV
n-28:4 Cer	141 ± 4	62 ± 4	LE	248 ± 5	78 ± 4	80 ± 4	LC	379 ± 9
n-30:5 Cer	182 ± 3	37 ± 2	LE	258 ± 7	102 ± 6	46 ± 14	LE-LC	301 ± 10
n-32:5 Cer	222 ± 3	37 ± 2	LE	306 ± 7	125 ± 2	50 ± 2	LC	380 ± 7
h-28:4 Cer	101 ± 3	56 ± 6	LE	172 ± 1	58 ± 4	74 ± 9	LC	248 ± 1
h-30:5 Cer	106 ± 2	69 ± 9	LE	168 ± 4	60 ± 1	93 ± 7	LC	257 ± 4
h-32:5 Cer	140 ± 5	20 ± 6	LE-LC	215 ± 5	97 ± 3	71 ± 8	LC	266 ± 4
n-18:1 Cer	65 ± 3	59 ± 7	LE	237 ± 5	50 ± 2	91 ± 6	LE	274 ± 6
n-16:0 Cer	43 ± 2	307 ± 10	LC	475 ± 6	41 ± 1	433 ± 10	S	513 ± 20
n-24:1 Cer	45 ± 2	644 ± 12	LC	428 ± 10	42 ± 1	904 ± 15	S	431 ± 10

^aCalculado a partir de la Ecuación 6.

TABLA 4. Estimación de la organización molecular de las especies de ceramida con VLCPUFA en monocapa

Ceramida	Dimensión Molecular		Fase LC (30 mN/m)		
	Volumen de la cadena acílica(V) ^a (Å ²)	Largo de la cadena acílica(L) ^b (Å)	Espesor semi-empírico ^c (Th) (Å)	L/Th	μ_L^d (mD)
n- 28:4 Cer	1292	22.7	16.6 ± .8	1.4 ± 0.1	832 ± 40
n- 30:5 Cer	1346	23.2	13.2 ±0.8	1.8 ± 0.1	777 ± 25
n- 32:5 Cer	1400	24.3	11.2 ± 0.2	2.2 ± 0.1	1255 ± 10
h- 28:4 Cer	1292	22.7	22.0 ± 2.0	1.0 ± 0.1	360 ± 20
h- 30:5 Cer	1346	23.2	22.4 ± 0.4	1.0 ± 0.1	400 ± 18
h- 32:5 Cer	1400	24.3	14.4 ± 0.4	1.7 ± 0.1	668 ± 22
n- 16:0 Cer	969	18.4	23.6 ± 0.8	0.8 ± 0.1	551 ± 33
n- 24:1 Cer	1185	22.0	28.2 ± 0.2	0.8 ± 0.1	463 ± 25

^aCalculado como la sumatoria de los volúmenes promedio de las dos cadenas acilicas asimétricas de Cer, obtenido a partir de la Ecuación 17.

^bCalculado como el promedio del largo de las dos cadenas acilicas asimétricas, obtenido a partir de la Ecuación 18.

^cCalculado como V/MMA-

^dCalculado a partir de la Ecuación 7.

TABLA 5. Parámetros termodinámicos de las especies moleculares de ceramida con VLCPUFA en monocapa

Ceramida	21 °C			8 °C			π_t -T vs. colapso π -T (°C)
	LE→LC presión de transición (π_t) (mN/m)	Presión de colapso (mN/m)	Energía libre de compresión ^a (kcal/mol)	LE→LC presión de transición (π_t) (mN/m)	Presión de colapso (mN/m)	Energía libre de compresión ^a (kcal/mol)	
n-28:4 Cer	15 ± 2	39 ± 1	0.99 ± 0.05	6 ± 1	44 ± 1	0.72 ± 0.01	45 ± 4
n-30:5 Cer	23 ± 2	39 ± 2	1.64 ± 0.04	14 ± 1	45 ± 2	1.58 ± 0.05	36 ± 6
n-32:5 Cer	16 ± 1	47 ± 1	1.90 ± 0.03	-----	45 ± 1	1.53 ± 0.01	-----
h-28:4 Cer	15 ± 1	45 ± 2	0.72 ± 0.02	5 ± 1	48 ± 1	0.50 ± 0.01	46 ± 5
h-30:5 Cer	19 ± 1	42 ± 2	0.78 ± 0.04	11 ± 1	45 ± 1	0.53 ± 0.01	53 ± 3
h-32:5 Cer	5 ± 2	44 ± 1	1.00 ± 0.07	-----	41 ± 1	0.66 ± 0.05	-----

^aObtenido por integración de las isotermas de compresión desde 1 mN/m a 35 mN/m.

RESULTADOS III

Interacciones entre esfingomielinas y ceramidas con VLCPUFA en monocapa

Debido a que la SM con VLCPUFA se encuentra concentrada en la cabeza del espermatozoide y que la misma es hidrolizada a Cer con VLCPUFA durante la reacción acrosomal inducida *in vitro*, en esta sección nos concentramos en estudiar las propiedades de sistemas modelo que contienen SM y Cer en distintas proporciones, tanto fijas como cambiantes en el tiempo. Para los estudios en monocapa descritos en este capítulo, elegimos las especies h-28:4 SM y h-28:4 Cer.

1. Comparación entre esfingomielinas y ceramidas puras

Las monocapas formadas por la h-28:4 SM mostraron un valor muy bajo de Cs^{-1} a valores altos de π (30 mN/m), y similar al de otras SM en fase LE (18:1 SM y 16:0 SM; Tabla 6). En contraste, el valor de Cs^{-1} para los films de h-28:4 Cer fue muy bajo, y menor que el de las especies de Cer comunes en estado LC o S (18:1 Cer o 16:0 Cer, respectivamente; Tabla 6). Teniendo en cuenta la clasificación usual de los estados de fase en función de los valores de Cs^{-1} , esto implicaría que el estado del film de h-28:4 Cer a 30 mN/m se acercaría más a un estado LE que a uno LC. Sin embargo, tal como se observó en Resultados II, mediante el análisis de la isoterma de compresión y de los datos de BAM, la h-28:4 Cer presentó, en estas condiciones, un estado de fase tipo LC.

Debido a que el comportamiento de h-28:4 SM fue similar al del resto de las SM en estado LE (Tabla 6) y a que esta SM mostró un valor de Cs^{-1} mayor que el de su contraparte h-28:4 Cer, pese a que esta última se encuentra en estado LC, una de las consecuencias de la conversión enzimática de h-28:4 SM en h-28:4 Cer sería una disminución de la Cs^{-1} del film.

Con el objetivo de definir en forma más precisa el estado de fase de las monocapas formadas por estos lípidos, se examinó el grado en que su presencia

facilita o restringe el desplazamiento lateral, esto es, coplanar a la superficie, de una partícula. Para tal fin, se esparcieron microesferas de látex de tamaño micrométrico sobre las monocapas de SM o Cer y se comparó la velocidad de su desplazamiento sobre la superficie de cada film. La dependencia del desplazamiento cuadrático medio (MSD) de las microesferas en un film con los intervalos de tiempo se relaciona con el coeficiente de difusión (D) de las microesferas mediante la ecuación 14, y es modulado por el valor del *shear* (deformación en el plano sin cambio en el área) del film (Wilke *et al.*, 2010).

Las monocapas de 18:1 SM y de h-28:4 SM en estado LE presentaron valores de D ~ 20 veces mayores que los de 16:0 SM en estado LC (Tabla 6). Comparando 16:0 SM (estado LC) con 16:0 Cer (estado S), encontramos diferencias pequeñas en los valores de D, probablemente debido a que la posibilidad de difusión de las partículas en ellas es tan pequeña que se encuentra próxima al límite de detección de nuestro método. En cambio, sí se observaron diferencias entre 18:1 SM (estado LE) y 18:1 Cer (estado LE), ya que la primera “permitió” un valor de D casi dos veces más alto que la segunda.

La h-28:4 SM y la h-28:4 Cer presentaron dos comportamientos claramente muy diferentes: en condiciones similares, los valores de D fueron 100 veces más altos en h-28:4 SM que en h-28:4 Cer. Los altos valores de D obtenidos con h-28:4 SM (informativos de bajo valor de *shear*, y por lo tanto baja viscosidad) corresponde con una fase LE; mientras que los bajos valores de D obtenidos con la h-28:4 Cer (mayor viscosidad) se corresponden con un estado de fase condensado (Tabla 6 y Fig. 23). Un punto importante a remarcar es que en la monocapa de h-28:4 Cer la difusión fue más restringida aún que en la de 16:0 Cer, la cual en estas condiciones se encuentra en un estado sólido.

Los parámetros de difusión estudiados complementaron el análisis de las propiedades de compresibilidad de los films, confirmando que, a 30 mN/m, las monocapas puras de h-28:4 SM se encuentran en un estado LE, mientras las de h-

28:4 Cer se encuentran en un estado condensado (del tipo LC). La pregunta de por qué, a diferencia de la h-28:4 SM, la h-28:4 Cer muestra el inusual comportamiento de formar una fase LC que es fácilmente compresible pero que al mismo tiempo restringe tanto la difusión, continúa siendo muy intrigante.

En los capítulos anteriores, los resultados habían sugerido que la larga porción insaturada de la cadena acílica de las Cer y las SM con VLCPUFA se encontraría en una posición curvada, con gran libertad de movimiento. Por otra parte, considerando las características estructurales de ambos lípidos, es evidente que las Cer disponen de una cabeza polar de menor tamaño y menos polar que las SM, y por lo tanto, menos apta para impedir que la abultada cadena hidrocarbonada entre en contacto con la interfase. Ello permitiría un contacto parcial de las cadenas hidrofóbicas con la fase acuosa, que sería *menor* en el caso de las SM y *mayor* en el caso de las Cer con VLCPUFA. Esta posibilidad se encuentra sustentada, entre otros parámetros, por el valor notablemente alto del momento dipolar y de MMA de las segundas, y por el hecho de que para comprimir h-28:4 Cer se requiere mayor energía que la requerida que para comprimir h-28:4 SM (un valor de ΔG_c 26 % mayor) y mucho mayor energía aún que la requerida para comprimir 16:0 Cer (un ΔG_c 10 veces superior) (Tabla 6).

El alto valor de ΔG_c de h-28:4 Cer puede atribuirse al proceso de ordenamiento y de condensación de sus largas e insaturadas cadenas acílicas. Como se determinó en las secciones anteriores, para la h-28:4 SM se obtuvo un bajo valor de ΔS_{ec} atribuible al cambio de área por la compresión, el cual contribuyó al ΔG_c sólo en 0.34 ± 0.01 kcal/mol (calculado como $T \cdot \Delta S_{ec}$). En cambio, en el caso de la h-28:4 Cer, la disminución de área al condensar contribuyó en 0.50 ± 0.01 kcal/mol al ΔG_c (también calculado como $-T \cdot \Delta S_{ec}$). Esta diferencia puede atribuirse a la cabeza polar, que en el caso de la h-28:4 SM es el grupo fosfocolina y en el caso de la h-28:4 Cer es sólo un grupo hidroxilo libre.

2. Propiedades de films conteniendo esfingomielinas y ceramidas premezcladas

A continuación estudiamos en monocapas las propiedades de la mezcla h-28:4 SM/h-28:4 Cer en distintas condiciones de equilibrio, es decir, en sistemas formados con una pre-mezcla de los lípidos en determinadas proporciones. Comparadas con los componentes SM o Cer al estado puro (100 %), las pre-mezclas SM/Cer mostraron isotermas de compresión con propiedades intermedias (Fig. 24).

Para las mismas mezclas binarias SM/Cer, la Figura 25 presenta, en cuatro paneles, I) el diagrama de fases de las mezclas, II) el exceso de energía libre de compresión, III) el momento dipolar perpendicular a la interfase (μ_{\perp}), y IV) el MMA de los componentes de la mezcla a 30 mN/m.

A temperatura ambiente, la isoterma de h-28:4 Cer pura mostró una transición de fase LE \rightarrow LC a 15 ± 1 mN/m. La Fig. 25-I muestra la presión de transición de fase LE \rightarrow LC (círculos blancos) y la presión de colapso de la monocapa (círculos negros). Como regla general, cuando dos o más componentes se mezclan, se incrementa la entropía del sistema, y la mezcla es termodinámicamente más *estable* que los componentes puros. De esta manera, la fase LE binaria se vuelve más estable que la fase LC, predominando aún a presiones altas. Nuestras observaciones con las mezclas SM/Cer (Fig. 25-I) estuvieron de acuerdo con esta norma, pues cuando la monocapa es más rica en h-28:4 SM, esta presión de transición se incrementó, indicando una estabilización del estado LE por una mezcla favorable de sus componentes.

La Fig. 25-II muestra el exceso de energía libre (ΔG_{exc}) de las monocapas puras de SM y Cer y de las mezclas SM/Cer, calculadas a partir del área bajo la curvas de compresión desde 1 a 35 mN/m. Este parámetro representa la *diferencia* de energía entre el ΔG_c experimental de la mezcla binaria y el ΔG_c calculado para una mezcla ideal (Gaines, 1966). En el presente estudio, las ΔG_{exc} mostraron valores *positivos*

cuando las monocapas contenían una fracción molar de Cer ≥ 0.25 (Fig. 25-II). Por lo tanto, los valores de ΔG_c obtenidos experimentalmente fueron mayores que los valores de ΔG_c calculados para una mezcla ideal (inserto Fig. 24). Esto se debe a la prevalencia de la fase LE en un rango de presión más amplio que el esperado para un comportamiento ideal, lo que se tradujo en un mayor cambio de área, en una mayor entropía del sistema, y por lo tanto en un mayor requerimiento de energía para comprimir el film.

En la Fig. 25-III se graficó la relación entre el μ_{\perp} y la composición del film, observándose un comportamiento lineal a 30 mN/m. Esta condición puede observarse en el caso de un comportamiento ideal, o bien en el caso de que ocurra una completa desmezcla de los componentes (Gaines, 1966). La linealidad que observamos indica que las moléculas de cada componente se encuentran en un entorno similar al esperado para una monocapa del componente puro.

La Fig. 25-IV presenta la variación del área molecular promedio (MMA) de las muestras conteniendo mezclas SM/Cer en función de la proporción de Cer. Llamativamente, a diferencia del comportamiento ideal (mostrado por la línea de puntos), esta relación no fue lineal, mostrando que existe una región de condensación a una concentración de Cer X_{Cer} igual o mayor a 0.50.

La visualización de los films binarios de SM/Cer mediante BAM (Fig. 26) nos permitió analizar el área de cada fase en las monocapas resultantes. A 30 mN/m, los films mostraron una fase LE homogénea hasta $X_{\text{Cer}} \sim 0.25$. A la misma presión, mayores X_{Cer} resultaron en la formación de dominios redondeados, los cuales se fueron incrementando en tamaño a medida que las monocapas se enriquecían en Cer, hasta quedar una proporción muy pequeña de fase LE, con características similares a la monocapa de h-28:4 Cer pura. De esta manera puede concluirse que la línea de equilibrio queda establecida entre una fase LE conteniendo h-28:4 Cer con un valor de $X_{\text{Cer}}^{\text{LE}} = 0.25$ y una fase LC conteniéndola prácticamente pura ($X_{\text{Cer}}^{\text{LC}} \sim 1$).

La ley de la palanca establece que, para la coexistencia de fases LE/LC, el área de superficie cubierta por cada fase es una función de la composición y del área molecular de sus componentes en el límite de la fase (ecuación 15). Si dicha ley se cumple, entonces la composición de las fases que coexisten permanece constante a lo largo de las distintas composiciones de la línea de equilibrio (Fidorra *et al.*, 2009). El análisis de las imágenes de BAM con proporciones crecientes de Cer (en el rango $0.25 < X_{\text{Cer}} < 1.0$) sugirió una mayor cobertura de la superficie por la fase LC de la que se podría esperar según la regla de la palanca. Esto coincidió con el rango de composiciones en el cual se observó una condensación del MMA (Fig. 25-IV).

A medida que la fracción de SM en fase LE disminuyó por el aumento de la X_{Cer} , la fase LC no se incrementó en forma proporcional como cabría de cumplirse la regla de la palanca. Este hecho indicaría que parte de la h-28:4 SM queda incluida dentro de los dominios enriquecidos en h-28:4 Cer, lo cual por una parte permitiría una transición de fase isotérmica LE \rightarrow LC para la SM, y por otra explicaría la condensación del MMA en el sistema que se observa en la Fig. 25-IV. En conjunto, los resultados descritos en esta sección concuerdan en indicar que la h-28:4 SM se encuentra parcialmente incorporada dentro de los dominios condensados enriquecidos en h-28:4 Cer.

3. Propiedades de films de mezclas de esfingomielinas y ceramidas generados enzimáticamente

Según lo observado en estudios previos llevados a cabo en distintos sistemas modelo de monocapa (Fanani *et al.*, 2010) y de bicapa (Ruiz-Arguello *et al.*, 2002), la esfingomielinasa (SMasa) empleada en el presente estudio tiene una gran sensibilidad por el estado de fase de su sustrato. Así, la enzima exhibe una alta actividad sobre monocapas de SM 16:0 pura a valores bajos de presiones de superficie ($\pi = 10$ mN/m) en los cuales esta SM se encuentra en un estado LE ($3.4 \pm 0.3 \times 10^{13}$ moléculas. min^{-1} . cm^{-2}), mientras que su actividad es casi nula a valores de π superiores al de la transición de fase de este sustrato.

A diferencia de las monocapas de 16:0 SM, las de h-28:4 SM mostraron un estado de fase LE en un rango más amplio de valores de π , lo que coincidió con el hecho de que la enzima permaneció activa a presiones mayores ($2.4 \pm 0.3 \times 10^{13}$ moléculas. $\text{min}^{-1} \text{cm}^{-2}$ a $\pi = 20 \text{ mN/m}$). Sobre esta base, esperábamos que la SM con VLCPUFA fuese un buen sustrato para la SMasa, tal vez mejor que la 16:0 SM. Sin embargo, la actividad enzimática medida fue levemente menor en la monocapa de h-28:4 SM que en la de 16:0 SM. Esto podría deberse a dos factores: por un lado, a que la enzima tuviese mayor *afinidad* o “preferencia” por 16:0 SM que por h-28:4 SM, y por otro, a la diferencia de *densidad de superficie* (número de moléculas/ cm^2) entre ambos sustratos (menor para h-28:4 SM que para 16:0 SM a la misma presión).

Las imágenes de BAM revelaron que durante el proceso hidrolítico SM \rightarrow Cer ocurre nucleación y crecimiento de tamaño de dominios condensados enriquecidos en Cer. Se observó una interesante diferencia morfológica entre los dominios generados por la acción de la SMasa cuando el sustrato era 16:0 SM que cuando era h-28:4 SM, los cuales adoptaron una forma estrellada y redondeada, respectivamente (Fig. 27). La topografía de superficie obtenida por la actividad enzimática para monocapas de h-28:4 SM a tiempos largos de reacción (esto es, cuando la misma había concluido) llevó a la formación de dominios vermiformes (Fig. 27), creados por fusión de los dominios redondeados formados previamente. Esta tendencia no se observó en la sección anterior al usar premezclas conteniendo altas relaciones h-28:4 Cer / h-28:4 SM ni en las muestras conteniendo h-28:4 Cer pura.

Tablas y Figuras – Resultados III

TABLA 6. Análisis comparativo de parámetros físicos de SM y Cer en monocapa a 30 mN/m.

Ácido graso	Esfingomielinas			Ceramidas		
	16:0	18:1	h-28:4	16:0	18:1	h-28:4
MMA ($\text{\AA}^2/\text{molec}$)	47 ± 1^a	60 ± 1^a	83 ± 1	41 ± 1	50 ± 2	58 ± 4
Cs ⁻¹ (mN/m)	160 ± 3	106 ± 6	90 ± 9	433 ± 10	91 ± 6	74 ± 9
D ($10^{-4} \cdot \mu\text{m}^2/\text{s}$) ^b	57 ± 10	1370 ± 80	1240 ± 130	40 ± 7	785 ± 60	11 ± 3
ΔG_c (kcal/mol) ^c	0.35 ± 0.01	0.36 ± 0.01	0.57 ± 0.04	0.07 ± 0.01	0.30 ± 0.05	0.72 ± 0.02
ΔV (mV)	297 ± 14	199 ± 7	156 ± 5	513 ± 20	274 ± 6	248 ± 5
Estado de fase	LE-LC	LE	LE	S	LE	LC

^a Tomado de la referencia 49

^b Calculado a partir de 15-20 experimentos de seguimiento de partícula única, empleando la Ecuación 14.

^c Integrando la isoterma de compresión entre valores de π de 1 a 35 mN/m.

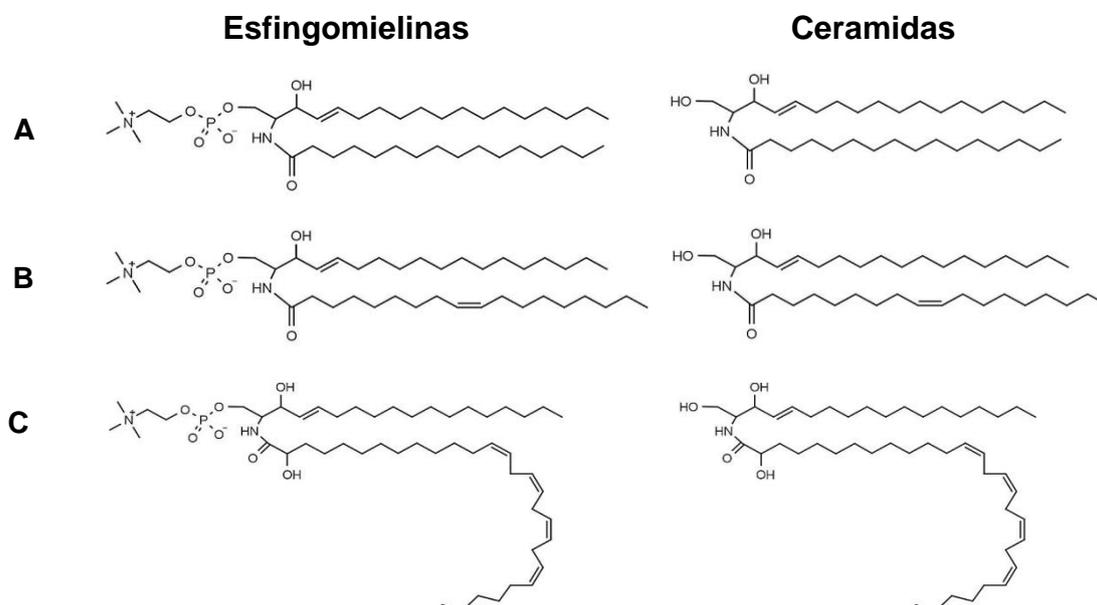
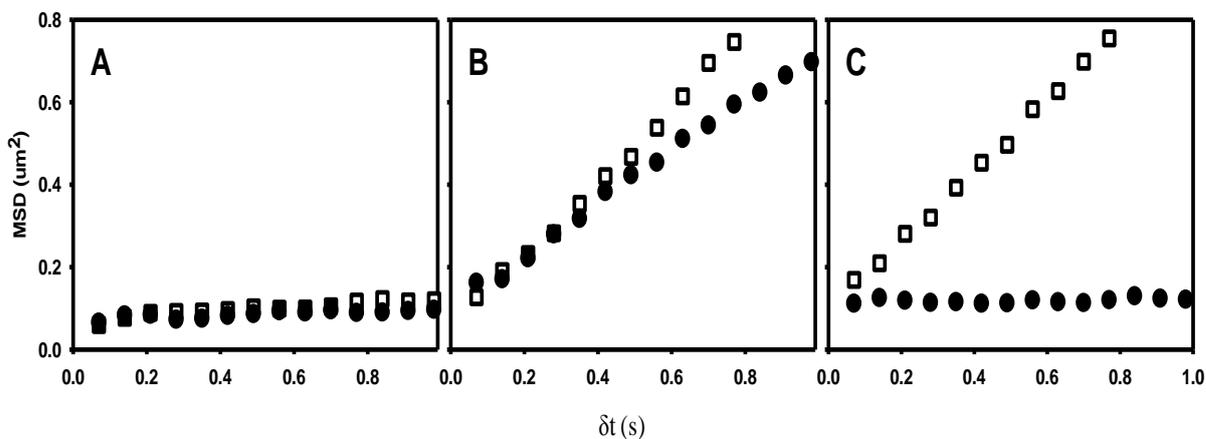


Figura 23. Seguimiento de partícula única de microesferas de látex en monocapas de diferentes esfingomielinas y sus correspondientes ceramidas. Se muestra para un experimento representativo, el desplazamiento cuadrático medio (MSD) de microesferas de 3 μm en monocapas de SM y Cer puras, calculado a diferentes intervalos de tiempo (δt), medidos en segundos. Los símbolos representan monocapas de SM (cuadrados) y de las correspondientes Cer (círculos) a 30 mN/m. En cada panel se comparan los pares de SM y Cer, A) con 16:0, B) con 18:1 y C) con h-28:4. Abajo se representan esquemáticamente las estructuras de las tres SM y de las tres Cer aquí mencionadas.

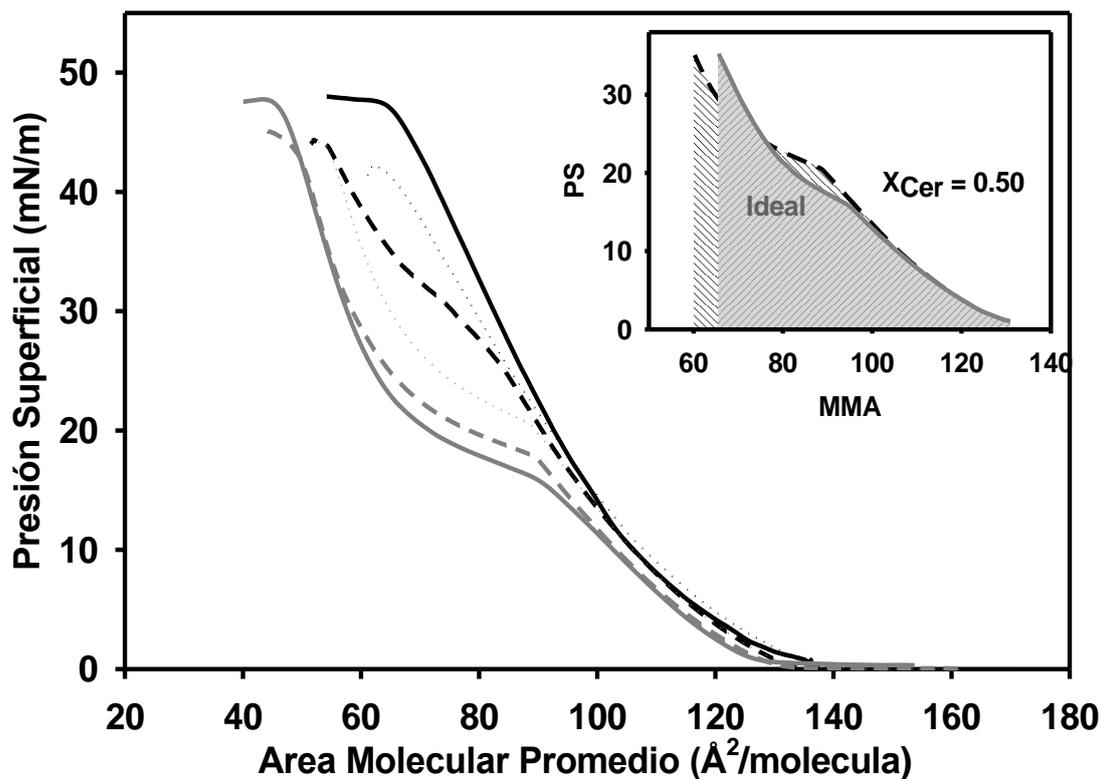


Figura 24. Isothermas de compresión de monocapas compuestas por diferentes proporciones de h-28:4 SM y h-28:4 Cer. Se muestra el comportamiento de monocapas compuestas por h-28:4 SM pura (línea negra sólida), de h-28:4 Cer pura (línea gris sólida), y de las mezclas con diferentes relaciones molares de Cer/SM: 0.1 (línea gris discontinua), 0.25 (línea gris punteada), 0.5 (línea negra discontinua), y 0.75 (línea negra punteada) a una temperatura de 22 °C. Cada curva muestra un experimento representativo que difiere en menos de 2 Å²/molécula y 2 mN/m de sus réplicas. El inserto muestra que el área bajo la curva de la isoterma experimental de la monocapa que contiene $X_{Cer} = 0.50$ (línea negra discontinua) es mayor que el área bajo la curva de la isoterma ideal (zona gris).

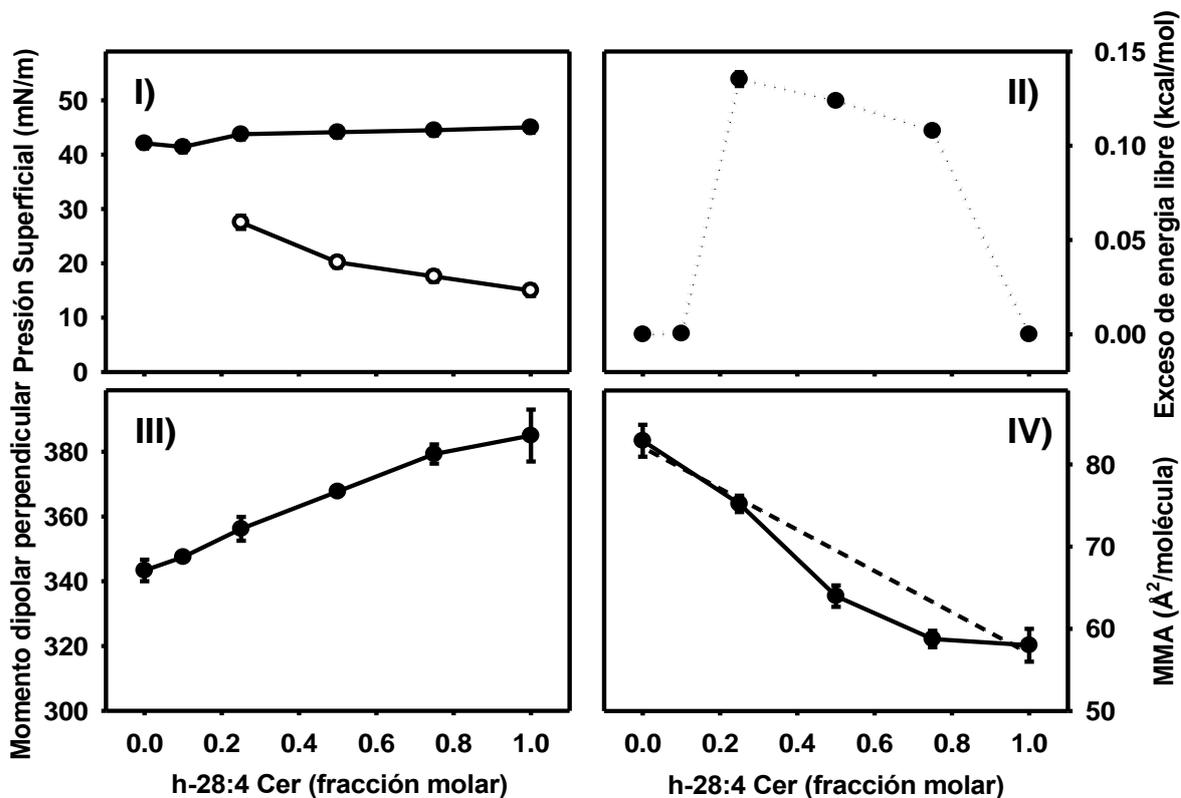
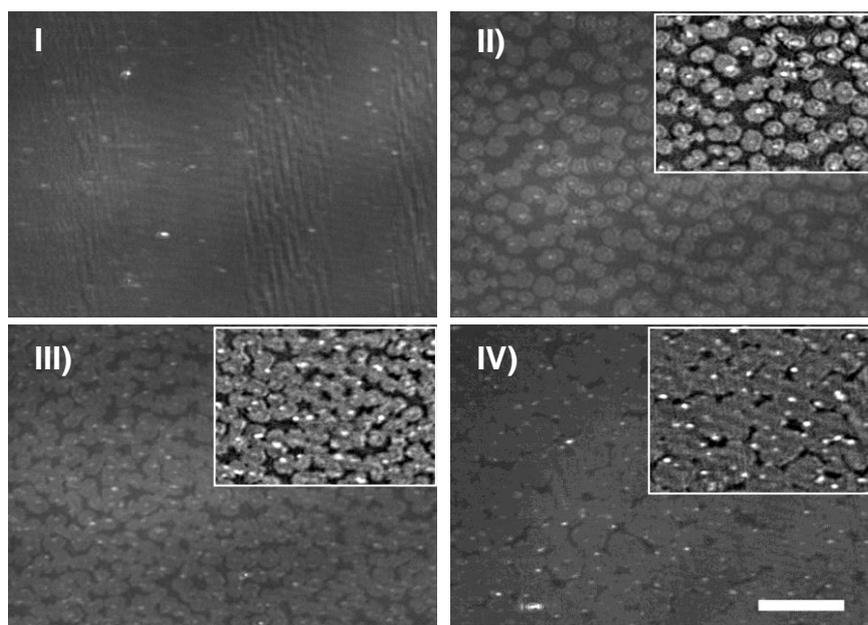


Figura 25. Comportamiento de mezclas binarias SM/Cer. En el panel I) se presenta el diagrama de fases de las mezclas, mostrando los valores de la presión de transición LE \rightarrow LC (círculos blancos) y de la presión de colapso (círculos negros). En el panel II) se representa el exceso de energía libre de compresión (ΔG_{exc}) de las monocapas puras y binarias, calculado como la diferencia entre el área bajo la curva de compresión (desde 1 mN/m a 35 mN/m) de cada monocapa y el área bajo la curva de la respectiva curva ideal. En el III) se grafica el valor del momento dipolar molecular perpendicular a la interfase (μ_{\perp}); y en el panel IV) se describe el valor del área molecular promedio (MMA) de las mezclas a 30 mN/m en función de la composición. La línea discontinua representa el comportamiento esperado para una mezcla ideal.

A



B

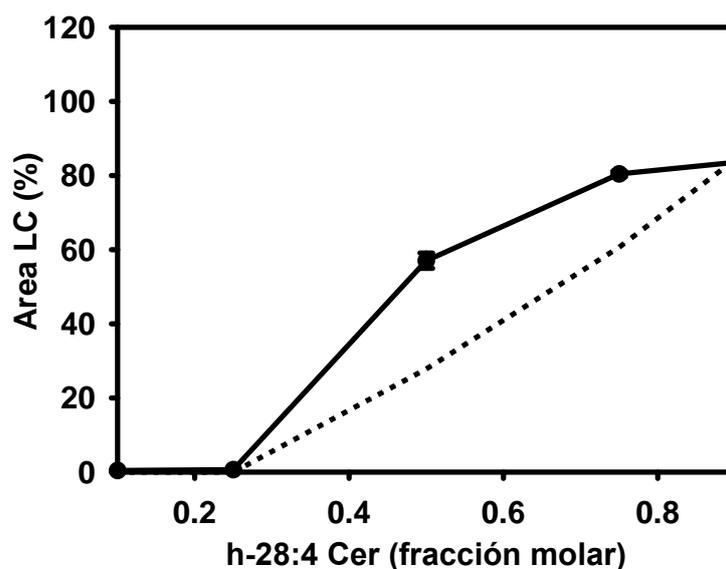


Figura 26. Coexistencia de fases de h-28:4 SM y h-28:4 Cer en monocapas de Langmuir. A) Imágenes de microscopía de ángulo de Brewster (BAM) a 30 mN/m de mezclas en monocapa conteniendo SM y I) 0.25, II) 0.50, III) 0.75 (fracción molar) de Cer y IV) h-28:4 Cer pura. El inserto muestra las mismas imágenes destacadas por la aplicación de un filtro. La barra en IV) representa 50 μm . B) Porcentaje de área ocupado por la fase LC en monocapas a 30 mN/m (símbolos). La barra de error (menor al tamaño del símbolo) indica el SEM de 4-10 fotos de dos experimentos independientes. La línea punteada representa el porcentaje de área ideal, de acuerdo con la regla de la palanca, que debería ocupar la fase condensada de h-28:4 Cer pura y en equilibrio con una fase LE con 0.25 mol % de Cer, según las ecuaciones 15 y 16.

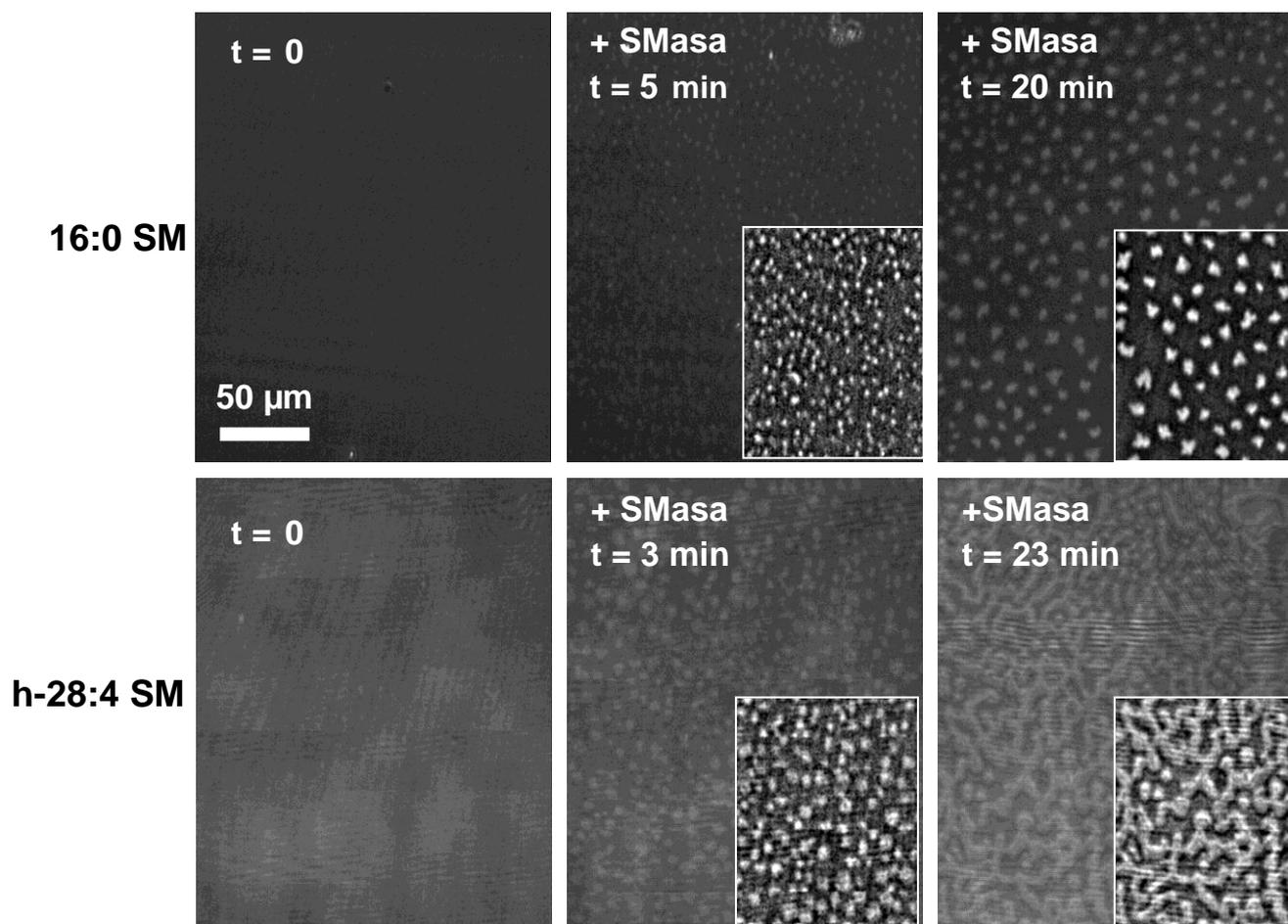


Figura 27. Imágenes obtenidas por BAM de dos especies de SM durante su conversión a las correspondientes Cer por acción de la esfingomielinasa (SMasa). Los films estuvieron formados inicialmente ($t = 0$) por 16:0 SM pura a 10 mN/m y por h-28:4 SM pura a 20 mN/m. Hacia la derecha se observan los efectos a distintos tiempos (en minutos) después de haber agregado la enzima. El inserto muestra las mismas imágenes, pero destacadas por la aplicación de un filtro. El tamaño de la barra en el primero de los paneles representa 50 μm .

DISCUSIÓN

1. Esfingomielinas con VLCPUFA en sistemas modelo de bicapa

1.1. Comportamiento de sistemas puros

El presente estudio mostró que las SM con VLCPUFA presentaron un comportamiento más cercano al de los glicerofosfolípidos con ácidos grasos poliinsaturados que al de las especies de SM con ácidos grasos saturados. En liposomas de lípidos puros, la T_t representa la temperatura necesaria para transformar una fase gel ordenada en una fase líquido cristalina desordenada. Nuestros estudios de fluorescencia mostraron que, independientemente de la presencia o ausencia del grupo hidroxilo, las especies mayoritarias de n-V y h-V SM compartieron la característica común de tener valores de T_t muy bajos, esto es, por debajo de los 5 °C, con la excepción de n-32:5 SM y h-32:5 SM, cuyas T_t fueron cercanas a los 22 °C. Esto permite concluir que las largas e insaturadas cadenas acílicas de estas SM, se encuentran en un estado desordenado a temperatura fisiológica, en contraste con la conocida 16:0 SM, cuya T_t es de 42 °C, y con SM saturadas más largas, como 18:0 SM o 24:0 SM, cuyas T_t son aún mayores. Esta comparación demuestra que en las SM con VLCPUFA el posible efecto en aumentar la T_t que debería resultar del inusual largo de sus cadenas acílicas es contrarrestado holgadamente por el efecto que la presencia de sus múltiples dobles ligaduras ejercen para reducirla.

Pese a las diferencias en el largo de cadena y en el número de estas insaturaciones entre las especies que componen las fracciones n-V SM y h-V SM, el hallazgo de que los valores de GP fueran menores para las especies presentes en la primera que para las correspondientes especies presentes en la segunda a todas las temperaturas estudiadas indica que, aunque ambas se encuentran en el mismo estado de fase, las h-V SM siempre se encuentran en un estado relativamente más ordenado que sus contrapartes n-V SM. Una explicación para esto es que la presencia del grupo

2-hidroxilo en las h-V SM introduce una fuerza de atracción adicional entre las moléculas que conforman la bicapa, debido a la formación de puentes de hidrógeno intermoleculares.

Esta conclusión encuentra apoyo en estudios previos sobre las propiedades biofísicas de los glicolípidos, en los que la presencia de un grupo hidroxilo en la posición 2 de la cadena acílica estabiliza su interacción e incrementa su temperatura de fusión (Boggs *et al.*, 1988; Singh *et al.*, 1992). Dicho efecto también fue observado en estudios realizados con SMs sintéticas, donde se determinó que la T_t es 5-10 °C más alta para las SM 2-hidroxiladas (h-16:0 SM y h-22:0 SM) que para sus contrapartes no hidroxiladas (16:0 SM and 22:0 SM) (Ekholm *et al.*, 2011).

La diferencia originada por la presencia del grupo hidroxilo también fue observada en las mediciones de *r* empleando DPH (Fig. 8), aún cuando esta sonda fluorescente tiene una localización diferente a la del Laurdan en la bicapa. El Laurdan se posiciona principalmente en la interfase hidrofílica-hidrofóbica (Antollini & Barrantes, 1998), con su cola de ácido láurico interdigitada con las cadenas acílicas en la región más cercana a la superficie, por lo que sensa principalmente las características lipídicas en la región cercana a los grupos carboxílicos de los ácidos grasos de los lípidos. Por su parte el DPH tiende a localizarse más cercano al core hidrofóbico de la membrana (Lakowicz *et al.*, 1979), sensando variaciones en las regiones más profundas de la misma. Fue por lo tanto interesante que la influencia del hidroxilo en las bicapas fuera lo suficientemente significativa como para que se pudiera detectar también con esta sonda.

La localización de las sondas a distintas alturas de la bicapa nos brindó información complementaria. La comparación entre las distintas especies moleculares con VLCPUFA nos permitió concluir que el Laurdan no fue capaz de discriminar diferencias de longitud del ácido graso entre n-28:4 y n-30:5 o entre h-28:4 y h-30:5 (Fig. 12). Esto puede atribuirse en parte a que el segmento saturado que estos ácidos grasos tienen entre el grupo carboxilo y la primera doble ligadura difiere poco (13

carbonos en 28:4 SM, 12 carbonos en 30:5 SM). En contraste, al comparar el comportamiento de estas mismas especies empleando DPH, éste reveló un menor grado de orden en la membrana con 30:5 SM que con 28:4 SM. Ello permite concluir que el incremento en una doble ligadura en el ácido graso ejerce un efecto mayor en disminuir el orden en cercanías del centro de la bicapa que el que ejerce el incremento en dos átomos de carbono en aumentar dicho orden.

Una interesante diferencia surgió al comparar las curvas producidas con cada sonda a altas temperaturas (45 °C). Así, mientras que con DPH los valores de r fueron *bajos* y similares para las todas las SM en estudio, los valores de GP con Laurdan fueron más *altos* para las SM con VLCPUFA que para las fracciones de SM ricas en ácidos grasos saturados (Fig. 8). El comportamiento del DPH fue el esperado, consistente con el hecho de que, a esa temperatura, en la región del core hidrofóbico de la bicapa todas estas fracciones de SM se encuentran en un estado similar, caracterizado por un alto grado de desorden. En cambio, lo que informaba el Laurdan parecía paradójico. Sin embargo, teniendo en cuenta que este marcador se localiza superficialmente y que sensa principalmente el estado de los segmentos *saturados* de las cadena acílicas, una explicación para este comportamiento estaría dada por la gran diferencia existente entre los ácidos grasos de las SM estudiadas. En el caso de las SM con ácidos grasos saturados y rectos, como el 16:0 o 18:0, tanto éstos como las moléculas de SM tienen amplia libertad de movimiento en las bicapas a alta temperatura, lo que explica el bajo valor de GP observado. En cambio, en el caso de las SM con VLCPUFA los ácidos grasos, si bien tienen un segmento saturado y recto de entre 10 y 12 átomos de carbono, éste es *seguido* de una porción más grande, de entre 18 y 20 átomos de carbono (de los cuales, entre 13 y 16 están involucrados en las 4 y 5 dobles ligaduras interrumpidas por metilenos, y 6 forman parte de la porción terminal). El valor de GP más alto para éstas últimas que para las saturadas a alta temperatura puede interpretarse como que este largo segmento impone una importante restricción a la libre movilidad de las moléculas de SM con VLCPUFA.

Con la excepción de las especies de mayor longitud de cadena (n-32:5 SM y h-32:5 SM), la transición de fase de las SM con VLCPUFA ocurre a temperaturas por debajo de los 5 °C, en su mayor parte probablemente bajo cero, como es el caso de la 18:1 SM (Erand & Erand, 2004). Teniendo en cuenta datos experimentales del laboratorio de Marsh (Marsh *et al.*, 1990) utilizando una serie homóloga de especies de SM con ácidos grasos saturados de 16 a 24 átomos de carbono, la Tt se relaciona con el número de átomos de carbono de la cadena acílica (N) de acuerdo con la siguiente expresión:

$$Tt (°C) = 27.17 + 0.91 \times N$$

Por lo tanto, una molécula de SM con una cadena de ácido graso saturada de 32 átomos de carbono debería tener una Tt de 56.3 °C, esto es, 30 °C mayor que el valor experimental de ~21 °C que determinamos para la n-32:5-SM. Esto destaca el gran impacto que tienen las dobles ligaduras sobre la Tt en el caso de la 32:5 SM.

Empleando la expresión anterior, se puede estimar que el aumento en ocho átomos de carbono desde 16:0 SM a 24:0 SM incrementa la Tt en sólo 7.3 °C, es decir que cada disminución en dos átomos de carbono en la serie contribuye con una caída de sólo 1.82 °C en la Tt. Es llamativo por lo tanto que la disminución de dos átomos de carbono entre las n- o h- 32:5 SM (Tt ~ 22 °C) y las n- o h- 30:5 SM (Tt bajo cero) lleve a una caída en la Tt de más de 20 °C. En el caso de ácidos grasos monoenoicos, se requiere una disminución de seis átomos de carbono para observar una disminución similar en la Tt, ya que la de 24:1 SM es de 24 °C (Bjorkqvist *et al.*, 2009), mientras la de 18:1 SM es menor a 0 °C (Erand & Erand, 2004).

1.2. Interacciones de n-V SM y h-V SM con otros lípidos

El estudio de un sistema binario PC:SM, utilizando DMPC y las distintas fracciones de SM en estudio, mostró dos comportamientos bien definidos y opuestos: mientras que el agregado de las especies ricas en ácidos grasos saturados de SM

aumentó la Tt de la DMPC, el aumento de la proporción de n-V o h-V SM la disminuyó marcadamente. Esto es interesante porque complementa trabajos previos en los que se invierten las características de las cadenas acílicas de los lípidos pero se obtiene el mismo efecto. Así, la adición de proporciones crecientes de una PC insaturada a una membrana modelo formada por 16:0 SM, *decrece* progresivamente la Tt de esta última (Ruiz-Arguello *et al.*, 2002). Por lo tanto, las n-V y h-V SM estarían jugando en nuestro caso el rol de lípidos “fluidificantes”, contrario al consenso general de que en las membranas celulares las SM son lípidos estructurales que restringen la movilidad lipídica en las bicapas.

Si bien ambas subfracciones, n-V y h-V SM, disminuyeron la Tt de DMPC, el hecho de la magnitud de esta disminución fuese mayor con el agregado de n-V SM que con h-V SM fue consistente con las diferencias observadas entre los valores de GP cuando estas SM fueron estudiadas en sistemas puros.

Las propiedades observadas hasta aquí sugirieron que, a diferencia de las especies moleculares de SM mayoritarias (Jaikishan & Slotte, 2011), las n-V y h-V SM, al tener un efecto “fluidificante” en una membrana, podría esperarse que no segregaran en dominios condensados enriquecidos en SM/Col cuando se encuentran en sistemas lipídicos más complejos, como es el caso del sistema ternario DOPC:Col:SM (1:1:1). Las dos estrategias experimentales empleadas en este estudio confirmaron esta hipótesis. La tendencia que tienen las SM con ácidos grasos saturados de 14 a 24 átomos de carbono a segregar lateralmente con el Col es favorecida por los valores relativamente altos de su Tt y por la baja miscibilidad entre estos dominios relativamente compactos y los lípidos que en este sistema se encuentran en un estado desordenado, en este caso la DOPC (Jaikishan & Slotte, 2011). La ausencia de segregación de las subfracciones n-V o h-V SM con el colesterol es consistente con el hecho de que la Tt de estas SM es baja. Estos resultados sugieren que, a temperatura fisiológica, y en membranas naturales donde las especies de SM saturadas y monoenoicas coexisten con las que contienen

VLCPUFA, las primeras se encuentren formando dominios líquido ordenados mientras que las últimas se encuentren en áreas más “desordenadas” de la membrana, ricas en GPL y relativamente pobres en Col. Esta idea es apoyada por resultados experimentales obtenidos en espermatozoides de toro. Éstos se caracterizan por contener una alta proporción de SM (20 % del total de fósforo lipídico), la cual es muy rica en n-VLCPUFA (aproximadamente el 70 % de sus ácidos grasos) (Furland *et al.*, 2007a). Después de la exposición de los espermatozoides a Tritón X-100 a una temperatura de 4 °C, todas las especies n-V SM fueron halladas en la fracción de membrana soluble en el detergente, mientras que la pequeña fracción de membrana insoluble en el mismo, representando los dominios lipídicos líquido-ordenados, se encontró enriquecida en SM saturadas, principalmente 16:0 SM.

3. Esfingomielinas con VLCPUFA en sistemas modelo de monocapa

Los experimentos realizados en monocapas de Langmuir permitieron determinar distintos parámetros fisicoquímicos usualmente empleados para estudiar el comportamiento de las moléculas organizadas en la interfase agua-aire. Esto permitió obtener una valiosa información acerca de las interacciones que ocurren entre las moléculas durante su empaquetamiento lateral, así como de los cambios termodinámicos implicados en ellas. Como en el caso de las bicapas, abordamos el estudio desde una perspectiva comparativa, tomando como referencia a las SM comunes y mayoritarias en las membranas celulares de muchas células, cuyas propiedades ya han sido ampliamente caracterizadas.

Al estudiar su estado de fase, teniendo en cuenta las isothermas obtenidas a 22 °C, concluimos que cada una de las seis especies moleculares con VLCPUFA mostraron un comportamiento similar al de la oleoil SM (18:1 SM), ya que como ésta no presentaron quiebres que indicaran una transición de fase y mostraron valores de C_s^{-1} bajos. Esto evidenció que estas moléculas de SM con VLCPUFA estudiadas se

encuentran en un régimen líquido expandido, disponiendo de una alta libertad conformacional.

Una característica notable de estas SM fue que sus valores de MMA fueron llamativamente grandes con respecto a los de las SM saturadas, lo cual indica que un mismo número de moléculas ocupa un área mucho mayor en la membrana. Además, comparando los valores de MMA entre las seis especies con VLCPUFA estudiadas, se hizo evidente que las h-V SM mostraron menores áreas moleculares que las equivalentes n-V SM. Cuando se obtuvieron las isotermas a 7 °C, sólo n-32:5 SM y h-32:5 SM mostraron transiciones de fase LE → LC de primer orden, siendo más pronunciada en la última que en la primera.

Otro aspecto que se confirmó con las SM espermáticas de rata en monocapa fue que las interacciones intermoleculares dadas por la presencia del grupo hidroxilo en la posición 2 de la cadena acílica en las h-V SM favorece las interacciones moleculares, permitiendo un grado de empaquetamiento relativamente mayor que el de las n-V SM durante el proceso de compresión, llevándolas a ocupar un área relativamente menor en el plano. Ello fue consistente con el mayor grado de orden de las cadenas acílicas observado para las h-V SM que para las n-V SM cuando estaban organizadas en estructuras de bicapa, evidenciado por mayores valores de GP.

Tomados en conjunto, los resultados obtenidos en bicapa y monocapa fueron consistentes ya que en ambos sistemas es posible encontrar especies moleculares de SM con VLCPUFA que puedan sufrir cambios de fase al bajar la temperatura, en el rango entre 37 °C y 5 °C, como fue el caso de las especies mencionadas. Puede predecirse por lo tanto que esto también podría ocurrir en el caso de SM con VLCPUFA de mayor número de átomos de carbono. Los espermatozoides de grandes mamíferos como el toro y el carnero, por ejemplo, contienen SM con 32 y 34 átomos de carbono con 5 y 6 dobles ligadura (Furland *et al.*, 2007a). Como el 32:5 en estas SM pertenece a la serie n-3, el segmento saturado de su porción acílica es más largo en un carbono (C16) que el del 32:5 n-6 aquí estudiado, mientras que para el 34:5 n-3

este segmento tiene 18 carbonos de longitud. Estas SM podrían verse afectadas con cambios de fase durante el enfriamiento que usualmente se emplea para conservar las gametas.

El hecho de que las especies de SM con VLCPUFA son componentes exclusivos de células germinales y espermatozoides maduros de mamíferos, localizándose en la cabeza de estos últimos, sumado a las características distintivas que estas SM proporcionan a las membranas, sugiere que su presencia podría tener implicancias en la fertilidad del espermatozoide. Aparentemente, cuando los espermatozoides se encuentran en su entorno natural a temperatura fisiológica, estas particulares SMs están naturalmente destinadas a no sufrir transiciones de fase y a no segregarse lateralmente con el colesterol dentro de dominios ordenados. Sin embargo, dichos cambios de fase y/o interacciones podrían ocurrir cuando las gametas son sometidas a bajas temperaturas, como es lo habitual para su conservación, o durante los procedimientos usuales en el laboratorio de investigación.

El entorno lipídico altamente desordenado generado por las especies de SM con VLCPUFA podría ser requerido para que proteínas específicas del espermatozoide se encuentren en un estado funcional óptimo a temperatura fisiológica. De esta manera, una inoportuna segregación lateral de fases que lleve a la separación de estas SMs del microambiente de las proteínas de membrana, podría inducir la colisión de éstas, o su inclusión forzada en dominios lipídicos más ordenados, perdiendo de esta manera su organización natural en la membrana. Esto podría causar la disfunción de dichas proteínas, la cual podría ir desde una activación indeseada hasta una inactivación irreversible.

4. Ceramidas con VLCPUFA en sistemas modelo de monocapa

De la misma forma en que estudiamos las especies moleculares de SM, con las seis especies moleculares de Cer con VLCPUFA se formaron monocapas de Langmuir para obtener las isothermas de compresión a 22 °C. Este estudio nos permitió

determinar que estas ceramidas se diferenciaron diametralmente, no solo de otras Cer ampliamente distribuidas en la naturaleza (16:0 Cer, 18:1 Cer y 24:1 Cer), sino también de las correspondientes especies de SM con la misma cadena acílica, en cuanto a sus propiedades reológicas y de superficie.

En contraste con las SM, todas las especies de Cer con VLCPUFA mostraron una transición de fase en el rango de presión de entre 5 y 20 mN/m, siguiendo un patrón característico en los valores de π_t , determinado por el largo de cadena y grado de insaturación de sus ácidos grasos. Dichas transiciones se manifestaron como un quiebre en las isotermas y por cambios en el proceso de nucleación y crecimiento de dominios LC, que fueron claramente observados mediante BAM.

Con esta técnica se pudo observar que las Cer con VLCPUFA se organizan en dominios con bordes irregulares y forma de flor, los cuales permanecen separados entre sí hasta que la mayor parte del film se encuentra en la fase LC (Fig. 22). Este mismo comportamiento fue observado previamente para otras especies de Cer (Dupuy *et al.*, 2011), y es característico de la formación de una fase LC con un mayor potencial de superficie que el de la fase LE (ver tabla 3 para su comparación). Esto induce una repulsión molecular intra-dominio que lleva a la formación de dominios con formas no circulares (McConnell, 1991). A su vez este alto potencial genera un alto grado de repulsión inter-dominio que impide la coalescencia entre los dominios de Cer, lo que explica que éstos tiendan a disponerse en forma de una red organizada (Hartel *et al.*, 2005).

Distintos trabajos que estudiaron la relación entre la estructura molecular de los lípidos y sus estados de fase, mostraron que el acortamiento de la cadena acílica (Dupuy *et al.*, 2011), o la introducción de un doble enlace en posición 9 del ácido graso, como es el caso de la 18:1 Cer, lleva a la formación de monocapas expandidas que se transforman en fases condensadas a altos valores de π_t (Lofgren & Pascher, 1977). Estos valores para 18:1 Cer son considerablemente más altos que cualquiera de los valores de π_t de las Cer con VLCPUFA examinadas en este estudio. Sin

embargo, cuando la doble ligadura en lugar de en la posición 9 se encuentra en la posición 15 del ácido graso, como es el caso de la 24:1 Cer, las moléculas pueden empaquetarse formando una fase LC a temperatura ambiente (Holopainen *et al.*, 2001; Lofgren & Pascher, 1977) y exhibir una transición LC → S muy similar a la que muestra la 16:0 Cer.

Al igual que las correspondientes SM con VLCPUFA (Fig.11), en las especies de 30:5 Cer, 28:4 Cer y 32:5 Cer (Fig.19) hay 12, 13 y 14 átomos de carbono, respectivamente, entre el carbono involucrado en la unión amida y la primera doble ligadura de la serie de 4 o 5 dobles enlaces en conformación *cis* que presenta la cadena del ácido graso. Este segmento tiene por lo tanto una longitud intermedia entre los 9 carbonos del 18:1 y los 15 del 24:1. Coincidentemente, en monocapas, las especies moleculares de Cer con VLCPUFA se comportaron de una manera intermedia entre las especies con 18:1 y las especies con 16:0 o 24:1, mostrando tanto una fase LE como LC a temperatura ambiente (Fig. 21). La existencia de la fase LC puede ser atribuida a sus porciones saturadas, las cuales facilitan interacciones de Van der Waals entre las cadenas acílicas, mientras que la fase LE puede ser atribuida a la presencia de sus numerosas dobles ligaduras, que promueven un comportamiento mucho más expandido, originado por el desordenamiento de sus cadenas acílicas y la consecuente reducción de su grado de empaquetamiento.

Como se mencionó anteriormente, el *módulo de compresibilidad* C_s^{-1} es uno de los parámetros más empleados para caracterizar una fase lipídica en monocapa, pues brinda información acerca de la elasticidad del film. Llamativamente, para las seis especies moleculares de Cer con VLCPUFA analizadas los valores de C_s^{-1} obtenidos posteriormente a la transición de fase, esto es, en el estado LC, fueron *menores* que los obtenidos para 16:0 Cer y para 24:1 Cer en su fase LC (Holopainen *et al.*, 2001; Lofgren & Pascher, 1977), e incluso menores que los de glicerofosfolípidos en fase LC, para los cuales el valor de C_s^{-1} es > 200 mN/m (Smaby *et al.*, 1996; Smaby *et al.*,

1997). Esto indica que las propiedades de la fase LC de las Cer con VLCPUFA no se corresponden con las características elásticas típicas de una fase LC tradicional.

Un estudio minucioso de las propiedades reológicas de estas ceramidas a partir del cálculo de parámetros de difusión permitió complementar el análisis de las propiedades de compresibilidad de los films. Así, pudo confirmarse que, a 30 mN/m, las monocapas puras de h-28:4 SM se encuentran en un estado LE, mientras las de h-28:4 Cer pura se encuentran en una llamativa fase LC. Esta fase es al mismo tiempo fácilmente compresible pero con una alta restricción de la difusión, ya que mostró valores de difusión inclusive más bajos que la 16:0 Cer en el estado sólido (Fanani & Maggio, 2010). Es importante destacar que es la primera vez que se adjudica este comportamiento a un lípido, sin embargo un comportamiento semejante ha sido descrito para polímeros en monocapa en un régimen semidiluido y buenas condiciones de solvente (Martin, 2010). Dichos films de polímeros muestran tanto un bajo valor del módulo de compresibilidad como bajas propiedades de difusión, atribuido a que las estructuras de larga cadena forman una intrincada red y presentan un enrollamiento de esas largas cadenas.

En concordancia con las correspondientes SM, las especies de Cer con VLCPUFA mostraron un mayor valor de MMA respecto a las Cer ordinarias, tanto en su estado LE como LC (Fig. 21), siendo estos valores mayores a medida que aumentó la longitud del ácido graso ($28 < 30 < 32$). Otra concordancia fue que en las Cer también se evidenció que el empaquetamiento molecular y el grado de ordenamiento de las cadenas fue menor para las n-V Cer que para las h-V Cer, lo que se reflejó en el hecho de que éstas últimas ocuparon una menor área y presentaron transiciones de fase LE \rightarrow LC más pronunciadas y cooperativas (Fig. 21).

Así, en las h-V Cer se confirmó la capacidad de los grupos hidroxilo en posición 2 de la cadena del ácido graso de promover una mayor interacción intermolecular, promovida por uniones tipo puente hidrógeno entre ellos, de manera aún más pronunciada que en el caso de las SM h-V. Esto puede deberse a que, al carecer del

grupo fosforilcolina y exponer tan sólo un pequeño grupo hidroxilo como cabeza polar, disminuye el impedimento estérico y permite un mayor acercamiento entre las moléculas a la altura de la sección hidrofóbica de la membrana, facilitando a una mayor interacción entre ellas.

Al igual que sus contrapartes SM, se evidenció que las Cer con VLCPUFA se encuentran con sus ácidos grasos en una conformación curvada, siendo esta característica aún más marcada en las n-V Cer que en las h-V Cer. Esto se condice con el hecho de que los valores de Th obtenidos para las seis especies de Cer con VLCPUFA fueron aún menores que los obtenidos para las Cer de cadena más corta utilizados como referencia. Además, también en concordancia con lo observado previamente en el caso de las SM, las especies n-V Cer formaron membranas de menor valor de Th , esto es, menor espesor, que las correspondientes h-V Cer. En la Figura 28 se resumen esquemáticamente algunas de las propiedades distintivas de estas SM y Cer.

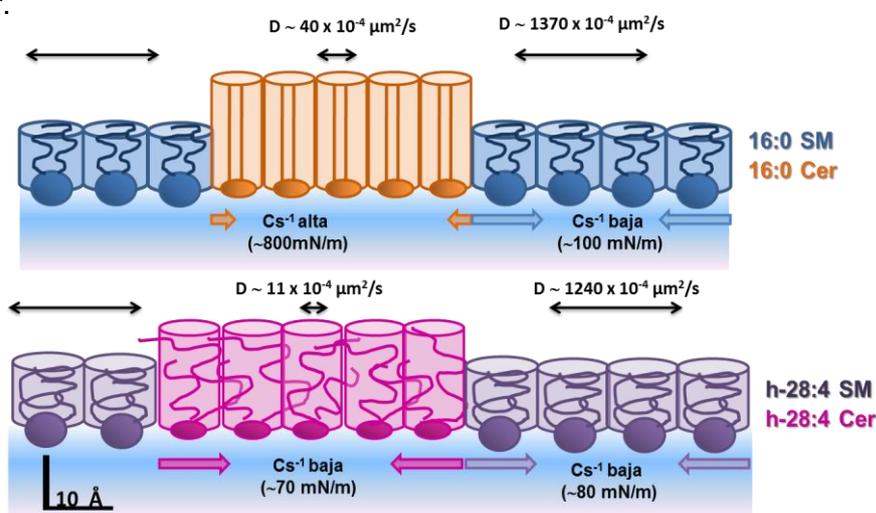


Figura 28. Representación esquemática de films enriquecidos en SM y Cer con coexistencia de fases. El objeto cilíndrico representa el volumen ocupado por 16:0 SM (azul), 16:0 Cer (naranja), h-28:4 SM (violeta) y h-28:4 Cer (magenta). Las líneas rectas dentro del cilindro naranja representa a las dos cadenas hidrocarbonadas de 16:0 Cer, en una conformación extendida en fase sólida, mientras que las líneas curvas dentro del cilindro magenta representan las cadenas enrolladas de h-28:4 Cer en una fase líquido condensada laxa. Las fases enriquecidas en SM están representadas en un estado líquido expandido. Las flechas sobre cada fase representan la movilidad lateral de los componentes de la fase de acuerdo con los experimentos de seguimiento de partícula única y las flechas de color debajo de cada fase representan las propiedades de compresibilidad del film. Los valores de D y Cs^{-1} fueron extrapolados de la Tabla 6.

El *mismatch* hidrofóbico (asimetría existente entre la cadena de esfingosina y el de la cadena acílica) es otra característica que distingue a las SM y Cer en estudio de las más comunes. Por ejemplo esta diferencia llega a ser de 14 carbonos entre la esfingosina (C18) y el VLCPUFA 32:5. En trabajos previos se comparó el comportamiento de ceramidas con ácidos grasos saturados de distinto largo de la cadena acílica (C10, C12, C14 y C16) en monocapas de Langmuir (Dupuy *et al.*, 2011; Smaby *et al.*, 1996; Smaby *et al.*, 1997), observándose que el espesor del film y el momento dipolar de superficie del estado condensado se incrementaban con el largo de la cadena. Varias de las características que fueron observadas en la superficie (electroestática, topografía y espesor de los films) en estas ceramidas fueron atribuidas al *mismatch* hidrofóbico. Dichos resultados apoyaron la idea de que en el estado LC, el segmento de la esfingosina que excede el largo de la cadena acílica del ácido graso se encuentra flexionado sobre este último, aliviando así el *mismatch* hidrofóbico y manteniendo en lo posible las interacciones hidrofóbicas (Dupuy *et al.*, 2011). En el caso de nuestras SM y Cer con 28-32 átomos de carbono se observa un *mismatch* en el sentido *opuesto*, es decir que el largo de la cadena acílica excede en muchos átomos de carbono al largo de la esfingosina. En este caso el segmento excedente del ácido graso es el que se encontraría curvado sobre la relativamente más corta cadena de la esfingosina, tal como sugieren los valores del espesor semi-empírico de los films de estas especies de SM y Cer.

Si bien no es factible en la práctica realizar estudios en bicapa con Cer puras como los hechos previamente con SM puras, analizando su comportamiento en monocapas de Langmuir es posible inferir ciertos aspectos de su comportamiento si estuviesen organizadas en fase *bulk*. Así, mediante una estrategia metodológica previamente empleada para glicoesfingolípidos (Maggio, 1994), calculamos la Tt de las especies de Cer con VLCPUFA, estimando que estas Cer mostrarían transición de fase a temperaturas entre 36 °C y 53 °C cuando se encuentran formando estructuras en fase *bulk* (Tabla 5). Esto permite pensar que a temperatura fisiológica las Cer con

VLCPUFA se encontrarían en un estado de fase más condensado que las respectivas SM con VLCPUFA, además de poseer propiedades reológicas completamente diferentes.

Sumado a las propiedades termotrópicas y de superficie, un parámetro de gran importancia de los lípidos son sus propiedades geométricas. Como fue propuesto previamente (Israelachvili *et al.*, 1980; Maggio, 1985) la geometría molecular determina la adopción de estructuras supramoleculares favorables, por ser energéticamente estables. Debido a su pequeña cabeza polar en relación a sus dos segmentos hidrofóbicos, todas las especies moleculares de Cer se encuentran en el grupo de moléculas con forma de “cono invertido”. Como regla general, en un medio acuoso y en situaciones en que se acumulan en una membrana debido a su producción aumentada a partir de esfingolípidos (Maggio *et al.*, 1988), esta característica geométrica favorece la formación de estructuras con curvatura negativa en dichas membranas (Maggio *et al.*, 1978; Maggio, 1994). La larga y abultada cadena acílica de las Cer con VLCPUFA podría potenciar aún más este efecto, particularmente en el estado expandido, por lo que la presencia de estas moléculas podría jugar un rol importante en favorecer eventos de fusión que ocurren en la cabeza del espermatozoides durante la reacción acrosomal, un proceso que requiere que en la membrana se formen intermediarios lipídicos con curvatura negativa.

Aspectos termodinámicos

Los cambios que ocurren durante el proceso de compresión de las especies moleculares en estudio, llevado a cabo a 22 °C y 7 °C, mostraron que las SM con VLCPUFA presentaron valores de ΔG_c mayores que las SM de cadena más corta usadas como referencia. Esto significa que el ordenamiento durante el proceso de compresión de la larga y abultada cadena acílica de las primeras requiere una mayor energía que el de las segundas. El mismo análisis reveló que estas SM mostraron una llamativa diferencia con el comportamiento de las correspondientes ceramidas.

Considerando que, por un lado, durante la compresión ocurre una pérdida de entropía que resulta del ordenamiento molecular, y que por otro la disminución de la temperatura favorece la formación de un estado más condensado, que lleva a una menor variación entrópica, parecía lógico esperar que el valor de la variación de la energía libre de compresión (ΔG_c) fuera menor cuando menor fuera la temperatura a la cual se realizaba la compresión. Sin embargo, este fue el caso sólo para las especies moleculares de Cer con VLCPUFA, que mostraron una disminución del ΔG_c cercana al 34 % cuando la monocapa fue enfriada de 22 °C a 7 °C, mientras que los valores de ΔG_c obtenidos para las SM con VLCPUFA permanecieron constantes pese al enfriamiento. Esta diferencia puede atribuirse a la cabeza polar, que en el caso de estas SM es el grupo fosforilcolina, grande, altamente polar e hidrofílico, y en el caso de las Cer es sólo un pequeño grupo hidroxilo.

En trabajos previos los esfingolípidos simples Cer y galactosil-Cer mostraron valores negativos del cambio de la entropía durante la compresión (ΔS_c), mientras que los gangliósidos, más complejos por contener cabezas polares grandes y altamente hidratadas, mostraron valores positivos de ΔS_c . (Fidelio *et al.*, 1986; Maggio, 1994). Estos contrastes fueron atribuidos a que durante la compresión, en los esfingolípidos con mayor cabeza polar el incremento de la libertad causado por la pérdida de moléculas de agua desde la esfera de hidratación del grupo polar es un importante contribuyente al aumento de la entropía, el cual se opone a la entropía negativa que deriva del ordenamiento de las cadenas acílicas que también ocurre al comprimir. Nuestros resultados también pueden ser explicados mediante la relación entre estos dos factores opuestos. Así, los menores valores de ΔS_c obtenidos para las SM comparado con las respectivas Cer reflejarían la resultante entre la disminución del orden causada por la salida de las moléculas de agua asociadas a la porción fosforilcolina y el aumento del ordenamiento de las cadenas acílicas durante el proceso de compresión.

5. Propiedades de films conteniendo mezclas de esfingomielina y ceramida

Teniendo en mente que un resultado de la reacción acrosomal es que se produce la reacción irreversible $SM \rightarrow Cer$, como consecuencia de lo cual la cabeza espermática se vuelve rica en Cer, y conociendo que tales SM y Cer en los espermatozoides contienen VLCPUFA, nos preguntamos qué pasaría biofísicamente durante esta conversión. El siguiente paso fue, por un lado, estimar el comportamiento de las mezclas SM/Cer con VLCPUFA en distintas condiciones de equilibrio, y por otro, evaluar los efectos de la conversión $SM \rightarrow Cer$ mediada por una esfingomielinasa, esto es, una condición fuera del equilibrio, sobre las propiedades de los films.

El estudio en monocapas de sistemas compuestos por distintas proporciones de h-28:4 SM y h-28:4 Cer permitió ahondar en el conocimiento de su miscibilidad. Nuestras experiencias se inspiraron en un trabajo previo en el que se realizó un estudio minucioso de la solubilidad de las especies moleculares de Cer con distinto largo de su cadena acílica realizado en sistemas modelo de bicapa formados con 16:0 SM (Westerlund *et al.*, 2010). En él se demuestra que la 16:0 Cer presenta una baja solubilidad en los dominios ricos en 16:0 SM, mientras que la más larga e insaturada 24:1 Cer muestra una mayor solubilidad en la correspondiente SM. En nuestro caso, la h-28:4 Cer presentó una solubilidad aún mayor que la de ésta última en films formados por h-28:4 SM ($X_{Cer} \sim 0.25$). Así, hasta una $X_{Cer} \sim 0.25$, el film se encontró homogéneo, mostrando una única fase, y sólo al incrementar la proporción de h-28:4 Cer por encima de este valor comenzó a aparecer una fase enriquecida en Cer. Sin embargo, debido a la relativamente alta solubilidad entre ellas, una parte de la h-28:4 SM quedó incluida en los dominios condensados de h-28:4 Cer. Esta conclusión fue apoyada por la mayor cobertura de la superficie de las monocapas por la fase LC de la que se podría esperarse según la regla de la palanca (Fig. 26 B) y por la disminución del área molecular promedio de las mismas monocapas en el mismo rango de composiciones

(Fig. 25-IV). Esto es, al aumentar la proporción de Cer, el comportamiento de estas mezclas se aleja del ideal.

Esta conclusión encontró apoyo en una observación similar reportada previamente para la mezcla 16:0 SM/16:0 Cer en monocapa, realizada con el mismo enfoque (Busto *et al.*, 2009). A bajas presiones (< 15 mN/m), la 16:0 SM pura se encuentra en estado LE y la 16:0 Cer en fase LC. A estas presiones, la solubilidad de 16:0 Cer en la fase LE es muy baja ($X_{\text{Cer}}^{\text{LE}} \sim 0.05$), y la composición de la fase LC muestra un alto contenido de SM ($X_{\text{Cer}}^{\text{LC}} \sim 0.4$) (Busto *et al.*, 2009). Esto fue interpretado por los autores como un punto composicional favorecido por ser termodinámicamente estable, conclusión que fue confirmada posteriormente en sistemas de bicapa (Leung *et al.*, 2012).

Cuando comparamos la actividad de la SMasa en monocapas formadas por h-28:4 SM y 16:0 SM, determinamos que la enzima presentó actividad significativa con las primeras a presiones altas, a las cuales la actividad enzimática sobre la segundas es nula (por ejemplo, a presiones superficiales $\pi > 20$ mN/m). Atribuimos esta diferencia a que las monocapas de h-28:4 SM mostraron un estado de fase LE en un rango más amplio de valores de π que las de 16:0 SM. La reacción $\text{SM} \rightarrow \text{Cer}$ sólo puede tener lugar cuando la enzima presente en la subfase agua-aire tiene la posibilidad de ubicar correctamente en su sitio activo la cabeza polar de su sustrato SM, por lo cual encontrará restringido su acceso al mismo si el sustrato SM se encuentra en el estado condensado. Esta interpretación es consistente con trabajos previos en bicapa (Ruiz-Arguello *et al.*, 2002; Ruiz-Arguello *et al.*, 2002) y en monocapa (Fanani *et al.*, 2010) en los que se concluyó que la SMasa tiene una gran sensibilidad por el estado de fase de su sustrato, y en los que se interpretó que dicho estado tiene un importante efecto regulador sobre la actividad enzimática.

Con respecto a la actividad enzimática medida, ésta fue similar aunque levemente *menor* en la monocapa de h-28:4 SM que en la de 16:0 SM. Esto podría deberse a que la enzima tuviese mayor afinidad o “preferencia” por 16:0 SM que por h-

28:4 SM. Sin embargo, observamos que la SMasa de *Bacillus cereus* exhibió una actividad similar con dos sustratos diferentes, 16:0 SM y 18:1 SM, cuando se encuentran en el mismo estado de fase (datos no mostrados). Un factor de mayor importancia para explicar esta diferencia es que el número de moléculas/cm², es ostensiblemente menor para h-28:4 SM que para 16:0 SM (Fig. 16). Así, comparando dos presiones en las que ambos sustratos se encuentran en el mismo estado de fase, el film formado por 16:0 SM tiene una densidad de superficie de 1.52×10^{14} moléculas/cm², mientras que el formado por h-28:4 SM contiene 1.075×10^{14} moléculas/cm² (~ un 30 % menos). Esta idea se encuentra soportada por un trabajo previo en el que se determinó que la enzima empleada para realizar este estudio responde en una forma Michaeliana a la densidad de superficie del sustrato (Fanani & Maggio, 2000).

La forma que adoptan los dominios de Cer generados por la SMasa tiene relación con las diferencias de *potencial de superficie* existentes entre el sustrato y el producto generado, lo que determina el tipo de interacción que prevalece, esto es, o bien la repulsión intradominio, o bien la tensión de línea (Fanani *et al.*, 2010). Así, entre las monocapas puras de 16:0 SM y de 16:0 Cer, la diferencia de potencial de superficie es > 200 mV, mientras que entre monocapas puras de h-28:4 SM y de h-28:4 Cer dicha diferencia de potencial fue bastante menor (~ 90mV) (Tabla 6). Ello explica que en el caso del primer par se favorezca la formación de dominios con forma estrellada, porque prevalece la repulsión inter-dominio, mientras que en el segundo par dicha fuerza es menor, prevaleciendo la tensión de línea, lo que resulta en la formación de dominios redondeados con una menor relación entre su borde y su área.

La diferencia en el grado de *repulsión* entre los dominios cuando hay fases coexistentes de SM y Cer también es importante en determinar el patrón de organización estructural inter-dominio. La interfase 16:0 SM/16:0 Cer generada enzimáticamente muestra un amplio rango composicional en el que los dominios se ordenan en una red o grilla hexagonal, debido a que la repulsión inter-dominio

predomina sobre la energía térmica (Hartel *et al.*, 2005). En el caso de la interfase h-28:4 SM/h-28:4 Cer, la menor repulsión inter-dominio, potenciada por el hecho de que el sistema se encuentra fuera del equilibrio durante la acción de la SMasa, favorecería la fusión de los dominios redondeados enriquecidos en h-28:4 Cer, lo que explicaría la formación de las estructuras vermiformes observadas (Fig. 27).

Considerando los datos en conjunto, concluimos que aunque los films de h-28:4 SM/h-28:4 Cer mostraron varias similitudes con el par 16:0 SM/16:0 Cer, en el caso del primer par, la acción de la SMasa con formación de dominios enriquecidos en Cer pudo ocurrir a una presión mayor, cercana a la presión promedio a la que se encuentra una membrana biológica. Además, el film de h-28:4 SM incorporó una mayor cantidad de h-28:4 Cer dentro de la fase LE que el correspondiente par 16:0 SM/16:0 Cer y promovió una textura de la superficie distintiva como consecuencia de la menor repulsión dipolar inter-dominio.

CONCLUSIONES

El primer logro importante en el desarrollo de esta tesis fue el aislamiento de las fracciones de SM y de Cer enriquecidas en VLCPUFA, no hidroxilados y 2-hidroxilados, esfingolípidos típicos de las células germinales y espermatozoides de rata, y de las especies moleculares mayoritarias contenidas en ellas. Utilizando sistemas modelo de monocapa y bicapa de distinta complejidad fue posible obtener datos que en algunos casos se confirmaron entre sí y en otros se complementaron, permitiendo afirmar que la mayoría de las propiedades de estas SM y Cer difieren considerablemente de las correspondientes a las especies con ácidos grasos saturados y monoinsaturados conocidas, ubicuas en casi todos los tejidos de mamífero.

En sistemas de bicapa se pudo determinar aspectos del comportamiento termotrópico de las SM con VLCPUFA, indagar sobre sus transiciones de fase, determinar los efectos de su presencia sobre las transiciones de fase de un glicerofosfolípido de propiedades biofísicas conocidas y evaluar su capacidad de interactuar con el colesterol.

En sistemas de monocapa, tanto para SM como para Cer con VLCPUFA, se pudo determinar sus transiciones de fase en función de la compresión, así como parámetros hasta ahora desconocidos de su organización lateral, lo que incluye área molecular, estructura que adoptan sus cadenas en el espacio y su capacidad de difusión lateral en el plano de los films. También se pudo observar directamente, mediante la microscopía de ángulo de Brewster, los dominios de Cer en monocapas mixtas de SM-Cer y en monocapas puras de SM por efecto de la conversión enzimática de SM en Cer.

La información recopilada a partir de ambos sistemas modelo empleados permite concluir que las especies de SM con VLCPUFA a temperatura fisiológica, a diferencia de las especies saturadas (p. ej. 16:0 SM), se encuentran en un estado de fase líquido

altamente desordenado. También concordaron en mostrar que sólo las especies moleculares con cadena acílica más larga, n-32:5 SM y h-32:5 SM, sufrieron transiciones de fase como consecuencia de los cambios de temperatura y de presión en los rangos estudiados. Asimismo, en ambos sistemas, tanto las SM como las Cer que tienen un hidroxilo en posición 2 de su ácido graso presentan una mayor interacción entre ellas que las especies equivalentes que no poseen dicho grupo. Cuando se encuentran en una bicapa formando sistemas mixtos con otros lípidos, las SM con ambos tipos de VLCPUFA tienden a jugar el rol de lípidos “fluidificantes”, disminuyendo la Tt de GPL saturados, como la DMPC, y a no formar dominios ordenados ricos en colesterol, como lo hace la 16:0 SM.

Cuando están en forma de monocapas puras, tanto las SM como las Cer con VLCPUFA comparten algunas propiedades, entre las que se destaca el hecho de que ocupan una gran área de superficie por molécula y forman films de espesor menor al esperado. Estas propiedades permiten inferir que en las membranas ambas se organizan con sus cadenas hidrofóbicas parcialmente incurvadas sobre sí mismas, lo que concuerda con que su porción distal es considerablemente más larga que la porción esfingosina y que contiene una serie de varias dobles ligaduras.

Otras propiedades estudiadas mostraron diferencias entre las SM examinadas y sus correspondientes Cer. Hallamos que ambas moléculas se encuentran en distinto estado de fase a temperatura ambiente (LE para las SM y LC para las Cer). Además, se observó que difieren significativamente en sus propiedades reológicas: las de Cer resultaron ser atípicas ya que su fase LC es muy viscosa (como corresponde a una fase LC) al mismo tiempo que tiene una baja compresibilidad (asemejándose en este aspecto a una fase LE). Este comportamiento, similar al observado en los polímeros, estaría dado por la disminuída libertad de movimiento que impondría, a estas especies de Cer, el parcial enrollamiento de sus largas cadenas acílicas

Otro comportamiento inusual se observó cuando se estudió la coexistencia en monocapas de SM y Cer con VLCPUFA. A medida que aumenta la proporción de Cer,

la mezcla ocupa un área *menor* que la esperada y, paralelamente, la fase *LC* presenta una cobertura de la superficie del film *mayor* a la esperada. Este comportamiento, distinto del ideal, permite inferir que la generación de Cer con VLCPUFA a partir de las respectivas SM modifica el estado de fase de estas últimas. En el seno de los dominios formados por estas Cer la solubilidad de la SM es relativamente más alta, y su difusión dentro de ellos está relativamente más restringida, que lo que ocurre en el caso de los dominios de 16:0 Cer formados a partir de 16:0 SM.

La cabeza espermática contiene en su membrana plasmática especies de SM con VLCPUFA que, junto con otros lípidos insaturados, conforman un entorno lipídico altamente desordenado. Al ser estas SM activamente hidrolizadas por una SMasa durante la reacción acrosomal, al terminar la misma la cabeza espermática llega a estar relativamente enriquecida en Cer con VLCPUFA. El hecho de que esto resulta en la nucleación y crecimiento de dominios condensados ricos en Cer con propiedades atípicas, podría estar relacionado con la función de estas Cer en el espermatozoide, esto es, formar dominios que doten a la membrana de propiedades biofísicas específicas. Teniendo en cuenta que la SM se encuentra en la hemicapa externa de esta membrana, y que en este caso la Cer favorece la formación de estructuras lipídicas con curvatura negativa, las Cer así generadas podrían intervenir en los eventos de fusión que se sabe tienen lugar *in situ* en la gameta, y que llevan a incrementar la permeabilidad de su membrana plasmática, permitiendo así la salida del contenido acrosomal. En vista de que estas Cer quedan asociadas a la gameta, podrían también jugar un rol en la fertilización, al intervenir en la interacción oocito-espermatozoide.

REFERENCIAS

1. Agbaga, M. P., Brush, R. S., Mandal, M. N., Henry, K., Elliott, M. H., and Anderson, R. E. (2008) Role of Stargardt-3 macular dystrophy protein (ELOVL4) in the biosynthesis of very long chain fatty acids. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 105: 12843-12848.
2. Ale, E. C., Maggio, B., and Fanani, M. L. (2012) Ordered-disordered domain coexistence in ternary lipid monolayers activates sphingomyelinase by clearing ceramide from the active phase. *Biochim Biophys Acta*, 1818: 2767-2776.
3. Angelova and Dimitrov. (1986) Liposome electroformation. *Faraday Discuss.Chem.Soc.*, 81: 303-311.
4. Angelova, M. I., Soléau, P., Meléard, J., Faucon, F., and Bothorel P. (1992) Preparation of giant vesicles by external AC electric fields. Kinetics and applications. *Progr.Colloid Polym.Sci*, 89: 127-131.
5. Antollini, S. S. and Avelano, M. I. (2002) Thermal behavior of liposomes containing PCs with long and very long chain PUFAs isolated from retinal rod outer segment membranes. *J.Lipid Res.*, 43: 1440-1449.
6. Antollini, S. S. and Barrantes, F. J. (1998) Disclosure of discrete sites for phospholipid and sterols at the protein-lipid interface in native acetylcholine receptor-rich membrane. *Biochemistry*, 37: 16653-16662.
7. Avelano, M. I. (1987) A novel group of very long chain polyenoic fatty acids in dipolyunsaturated phosphatidylcholines from vertebrate retina. *J.Biol.Chem.*, 262: 1172-1179.
8. Barenholz, Y. and Thompson, T. E. (1980) Sphingomyelins in bilayers and biological membranes. *Biochim.Biophys.Acta*, 604: 129-158.
9. Barenholz, Y. and Thompson, T. E. (1999) Sphingomyelin: biophysical aspects. *Chem Phys Lipids*, 102: 29-34.
10. Bjorkqvist, Y. J., Brewer, J., Bagatolli, L. A., Slotte, J. P., and Westerlund, B. (2009) Thermotropic behavior and lateral distribution of very long chain sphingolipids. *Biochim.Biophys.Acta*, 1788: 1310-1320.
11. Bligh, E. G. and Dyer, W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can.J.Biochem.Physiol*, 37: 911-917.
12. Boggs, J. M., Koshy, K. M., and Rangaraj, G. (1988) Influence of structural modifications on the phase behavior of semi-synthetic cerebroside sulfate. *Biochim.Biophys.Acta*, 938: 361-372.
13. Brockman, H. L., Jones, C. M., Schwebke, C. J., Smaby, J. M., and Jarvis, D. E. (1980) Application of Microcomputer-Controlled Film Balance System to Collection and Analysis of Data from Mixed Monolayers. *J.Colloid Interface Sci.*, 78: 502-512.
14. Brown, R. E. (1998) Sphingolipid organization in biomembranes: what physical studies of model membranes reveal. *J.Cell Sci.*, 111 (Pt 1): 1-9.

15. Brown, R. E. and Brockman, H. L. (2007) Using monomolecular films to characterize lipid lateral interactions. *Methods Mol.Biol.*, 398: 41-58.
16. Busto, J. V., Fanani, M. L., De, T. L., Sot, J., Maggio, B., Goni, F. M., and Alonso, A. (2009) Coexistence of immiscible mixtures of palmitoylsphingomyelin and palmitoylceramide in monolayers and bilayers. *Biophys J*, 97: 2717-2726.
17. Christie, W. W. (1982) A simple procedure for rapid transmethylation of glycerolipids and cholesteryl esters. *J.Lipid Res.*, 23: 1072-1075.
18. Davies, J. T. and Rideal, E. K. (1963) *Interfacial Phenomena*. 217-281.
19. De Tullio, L., Maggio, B., and Fanani, M. L. (2008) Sphingomyelinase acts by an area-activated mechanism on the liquid-expanded phase of sphingomyelin monolayers. *J Lipid Res*, 49: 2347-2355.
20. Dupuy, F., Fanani, M. L., and Maggio, B. (2011) Ceramide N-Acyl Chain Length: A Determinant of Bidimensional Transitions, Condensed Domain Morphology, and Interfacial Thickness. *Langmuir*, 27: 3783-3791.
21. Dupuy, F. and Maggio, B. (2012) The hydrophobic mismatch determines the miscibility of ceramides in lipid monolayers. *Chem.Phys.Lipids*, 165: 615-629.
22. Ekholm, O., Jaikishan, S., Lonnfors, M., Nyholm, T. K., and Slotte, J. P. (2011) Membrane bilayer properties of sphingomyelins with amide-linked 2- or 3-hydroxylated fatty acids. *Biochim.Biophys.Acta*, 1808: 727-732.
23. Epand, R. M. and Epand, R. F. (2004) Non-raft forming sphingomyelin-cholesterol mixtures. *Chem Phys Lipids*, 132: 37-46.
24. Fanani, M. L., Hartel, S., Maggio, B., De, T. L., Jara, J., Olmos, F., and Oliveira, R. G. (2010) The action of sphingomyelinase in lipid monolayers as revealed by microscopic image analysis. *Biochim.Biophys Acta*, 1798: 1309-1323.
25. Fanani, M. L. and Maggio, B. (2000) Kinetic steps for the hydrolysis of sphingomyelin by bacillus cereus sphingomyelinase in lipid monolayers. *J Lipid Res*, 41: 1832-1840.
26. Fanani, M. L. and Maggio, B. (2010) Phase state and surface topography of palmitoyl-ceramide monolayers. *Chem.Phys.Lipids*, 163: 594-600.
27. Fidelio, G. D., Maggio, B., and Cumar, F. A. (1986) Molecular parameters and physical state of neutral glycosphingolipids and gangliosides in monolayers at different temperatures. *Biochim Biophys Acta*, 854: 231-9.
28. Fidorra, M., Garcia, A., Ipsen, J. H., Hartel, S., and Bagatolli, L. A. (2009) Lipid domains in giant unilamellar vesicles and their correspondence with equilibrium thermodynamic phases: a quantitative fluorescence microscopy imaging approach. *Biochim.Biophys Acta*, 1788: 2142-2149.
29. Furland, N. E., Oresti, G. M., Antollini, S. S., Venturino, A., Maldonado, E. N., and Aveldano, M. I. (2007a) Very long-chain polyunsaturated fatty acids are the major acyl groups of sphingomyelins and ceramides in the head of mammalian spermatozoa. *J.Biol.Chem.*, 282: 18151-18161.
30. Furland, N. E., Zanetti, S. R., Oresti, G. M., Maldonado, E. N., and Aveldano, M. I. (2007b) Ceramides and sphingomyelins with high proportions of very long-chain

- polyunsaturated fatty acids in mammalian germ cells. *J.Biol.Chem.*, 282: 18141-18150.
31. Gaines, G. L. (1966) Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces.
 32. Goni, F. M. and Alonso, A. (2009) Effects of ceramide and other simple sphingolipids on membrane lateral structure. *Biochim.Biophys.Acta*, 1788: 169-177.
 33. Goni, F. M., Contreras, F. X., Montes, L. R., Sot, J., and Alonso, A. (2005) Biophysics (and sociology) of ceramides. *Biochem Soc Symp*, 177-188.
 34. Grunberger, D., Haimovitz, R., and Shinitzky, M. (1982) Resolution of plasma membrane lipid fluidity in intact cells labelled with diphenylhexatriene. *Biochim.Biophys.Acta*, 688: 764-774.
 35. Hartel, S., Fanani, M. L., and Maggio, B. (2005) Shape transitions and lattice structuring of ceramide-enriched domains generated by sphingomyelinase in lipid monolayers. *Biophys J*, 88: 287-304.
 36. Holopainen, J. M., Angelova, M. I., and Kinnunen, P. K. (2000) Vectorial budding of vesicles by asymmetrical enzymatic formation of ceramide in giant liposomes. *Biophys.J.*, 78: 830-838.
 37. Holopainen, J. M., Brockman, H. L., Brown, R. E., and Kinnunen, P. K. (2001) Interfacial interactions of ceramide with dimyristoylphosphatidylcholine: impact of the N-acyl chain. *Biophys J*, 80: 765-75.
 38. Holopainen, J. M., Metso, A. J., Mattila, J. P., Jutila, A., and Kinnunen, P. K. (2004) Evidence for the lack of a specific interaction between cholesterol and sphingomyelin. *Biophys.J.*, 86: 1510-1520.
 39. Huyghe, S., Schmalbruch, H., De, G. K., Verhoeven, G., Guillou, F., Van Veldhoven, P. P., and Baes, M. (2006) Peroxisomal multifunctional protein 2 is essential for lipid homeostasis in Sertoli cells and male fertility in mice. *Endocrinology*, 147: 2228-2236.
 40. Israelachvili, J. N. (1991) Aggregation of amphiphilic molecules into micelles, bilayers and biological membranes. Academic Press, 366-389.
 41. Israelachvili, J. N., Marcelja, S., and Horn, R. G. (1980) Physical principles of membrane organization. *Q Rev Biophys*, 13: 121-200.
 42. Jaikishan, S. and Slotte, J. P. (2011) Effect of hydrophobic mismatch and interdigitation on sterol/sphingomyelin interaction in ternary bilayer membranes. *Biochim.Biophys.Acta*, 1808: 1940-1945.
 43. Kates Morris. (1972) Techniques of lipidology; isolation, analysis and identification of lipids. 571.
 44. Lai, E. C. (2003) Lipid rafts make for slippery platforms. *J.Cell Biol.*, 162: 365-370.
 45. Lakowicz, J. R., Gryczynski, I., Gryczynski, Z., and Dattelbaum, J. D. (1999) Anisotropy-based sensing with reference fluorophores. *Anal.Biochem.*, 267: 397-405.

46. Lakowicz, J. R., Prendergast, F. G., and Hogen, D. (1979) Differential polarized phase fluorometric investigations of diphenylhexatriene in lipid bilayers. Quantitation of hindered depolarizing rotations. *Biochemistry*, 18: 508-519.
47. Leung, S. S., Busto, J. V., Keyvanloo, A., Goni, F. M., and Thewalt, J. (2012) Insights into sphingolipid miscibility: separate observation of sphingomyelin and ceramide N-acyl chain melting. *Biophys.J.*, 103: 2465-2474.
48. Lheveder, C., Meunier, J., and Henon, S. (2000) Brewster Angle Microscopy.
49. Li, X. M., Smaby, J. M., Momsen, M. M., Brockman, H. L., and Brown, R. E. (2000) Sphingomyelin interfacial behavior: the impact of changing acyl chain composition. *Biophys.J.*, 78: 1921-1931.
50. Lofgren, H. and Pascher, I. (1977) Molecular arrangements of sphingolipids. The monolayer behaviour of ceramides. *Chem Phys.Lipids*, 20: 273-284.
51. Lopez-Montero, I., Velez, M., and Devaux, P. F. (2007) Surface tension induced by sphingomyelin to ceramide conversion in lipid membranes. *Biochim.Biophys.Acta*, 1768: 553-561.
52. Maggio, B. (1985) Geometric and thermodynamic restrictions for the self-assembly of glycosphingolipid-phospholipid systems. *Biochim Biophys Acta*, 815: 245-58.
53. Maggio, B. (1994) The surface behavior of glycosphingolipids in biomembranes: a new frontier of molecular ecology. *Prog.Biophys.Mol.Biol.*, 62: 55-117.
54. Maggio, B., Albert, J., and Yu, R. K. (1988) Thermodynamic-geometric correlations for the morphology of self- assembled structures of glycosphingolipids and their mixtures with dipalmitoylphosphatidylcholine. *Biochim Biophys Acta*, 945: 145-60.
55. Maggio, B., Ariga, T., Sturtevant, J. M., and Yu, R. K. (1985) Thermotropic behavior of glycosphingolipids in aqueous dispersions. *Biochemistry*, 24: 1084-92.
56. Maggio, B., Cumar, F. A., and Caputto, R. (1978) Induction of membrane fusion by polysialogangliosides. *FEBS Lett*, 90: 149-52.
57. Martin, A. M. (2010). Dynamics of interfacial systems (PhD Thesis) ed.; Universidad Computense de Madrid, Facultad de Ciencias Químicas.
58. Mayor, S. and Rao, M. (2004) Rafts: scale-dependent, active lipid organization at the cell surface. *Traffic.*, 5: 231-240.
59. McConnell, H. M. (1991) Structures and transitions in lipid monolayers at the air-water interface. *Annu.Rev.Phys.Chem.*, 42: 171-195.
60. McIntosh, T. J., Vidal, A., and Simon, S. A. (2003) Sorting of lipids and transmembrane peptides between detergent-soluble bilayers and detergent-resistant rafts. *Biophys.J.*, 85: 1656-1666.
61. Montes, L. R., Ruiz-Arguello, M. B., Goni, F. M., and Alonso, A. (2002) Membrane restructuring via ceramide results in enhanced solute efflux. *J Biol Chem*, 277: 11788-11794.
62. Munro, S. (2003) Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell*, 115: 377-88.

63. Niemela, P., Hyvonen, M. T., and Vattulainen, I. (2004) Structure and dynamics of sphingomyelin bilayer: insight gained through systematic comparison to phosphatidylcholine. *Biophys.J.*, 87: 2976-2989.
64. Oresti, G. M., Ayuza Aresti, P. L., Gigola, G., Reyes, L. E., and Aveldano, M. I. (2010a) Sequential depletion of rat testicular lipids with long-chain and very long-chain polyenoic fatty acids after X-ray-induced interruption of spermatogenesis. *J.Lipid Res.*, 51: 2600-2610.
65. Oresti, G. M., Luquez, J. M., Furland, N. E., and Aveldano, M. I. (2011) Uneven distribution of ceramides, sphingomyelins and glycerophospholipids between heads and tails of rat spermatozoa. *Lipids*, 46: 1081-1090.
66. Oresti, G. M., Reyes, J. G., Luquez, J. M., Osses, N., Furland, N. E., and Aveldano, M. I. (2010b) Differentiation-related changes in lipid classes with long-chain and very long-chain polyenoic fatty acids in rat spermatogenic cells. *J.Lipid Res.*, 51: 2909-2921.
67. Parasassi, T., De, S. G., Ravagnan, G., Rusch, R. M., and Gratton, E. (1991) Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of Laurdan fluorescence. *Biophys.J.*, 60: 179-189.
68. Parasassi, T., Giusti, A. M., Raimondi, M., and Gratton, E. (1995) Abrupt modifications of phospholipid bilayer properties at critical cholesterol concentrations. *Biophys.J.*, 68: 1895-1902.
69. Parasassi, T., Loiero, M., Raimondi, M., Ravagnan, G., and Gratton, E. (1993) Absence of lipid gel-phase domains in seven mammalian cell lines and in four primary cell types. *Biochim.Biophys.Acta*, 1153: 143-154.
70. Pike, L. J. (2004) Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochem.J.*, 378: 281-292.
71. Poulos, A., Johnson, D. W., Beckman, K., White, I. G., and Easton, C. (1987) Occurrence of unusual molecular species of sphingomyelin containing 28-34-carbon polyenoic fatty acids in ram spermatozoa. *Biochem.J.*, 248: 961-964.
72. Ramstedt, B. and Slotte, J. P. (2002) Membrane properties of sphingomyelins. *FEBS Lett.*, 531: 33-37.
73. Robinson, B. S., Johnson, D. W., and Poulos, A. (1992) Novel molecular species of sphingomyelin containing 2-hydroxylated polyenoic very-long-chain fatty acids in mammalian testes and spermatozoa. *J.Biol.Chem.*, 267: 1746-1751.
74. Ruiz-Arguello, M. B., Basanez, G., Goni, F. M., and Alonso, A. (1996) Different effects of enzyme-generated ceramides and diacylglycerols in phospholipid membrane fusion and leakage. *J Biol Chem*, 271: 26616-26621.
75. Ruiz-Arguello, M. B., Veiga, M. P., Arrondo, J. L., Goni, F. M., and Alonso, A. (2002) Sphingomyelinase cleavage of sphingomyelin in pure and mixed lipid membranes. Influence of the physical state of the sphingolipid. *Chem Phys Lipids*, 114: 11-20.
76. Simons, K. and Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387: 569-72.

77. Singer, S. J. and Nicolson, G. L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 720-731.
78. Singh, D., Jarrell, H. C., Florio, E., Fenske, D. B., and Grant, C. W. (1992) Effects of fatty acid alpha-hydroxylation on glycosphingolipid properties in phosphatidylcholine bilayers. *Biochim.Biophys.Acta*, 1103: 268-274.
79. Slotte, J. P. (1997) Cholesterol-sphingomyelin interactions in cells--effects on lipid metabolism. *Subcell.Biochem.*, 28: 277-293.
80. Smaby, J. M., Kulkarni, V. S., Momsen, M., and Brown, R. E. (1996) The interfacial elastic packing interactions of galactosylceramides, sphingomyelins, and phosphatidylcholines. *Biophys J*, 70: 868-877.
81. Smaby, J. M., Momsen, M. M., Brockman, H. L., and Brown, R. E. (1997) Phosphatidylcholine acyl unsaturation modulates the decrease in interfacial elasticity induced by cholesterol. *Biophys J*, 73: 1492-1505.
82. Vereb, G., Szollosi, J., Matko, J., Nagy, P., Farkas, T., Vigh, L., Matyus, L., Waldmann, T. A., and Damjanovich, S. (2003) Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 8053-8.
83. Westerlund, B., Grandell, P. M., Isaksson, Y. J., and Slotte, J. P. (2010) Ceramide acyl chain length markedly influences miscibility with palmitoyl sphingomyelin in bilayer membranes. *Eur.Biophys.J.*, 39: 1117-1128.
84. Wilke, N. and Maggio, B. (2009) The influence of domain crowding on the lateral diffusion of ceramide-enriched domains in a sphingomyelin monolayer. *J Phys Chem B*, 113: 12844-12851.
85. Wilke, N., Vega, M. F., and Maggio, B. (2010) Rheological Properties of a Two Phase Lipid Monolayer at the Air/Water Interface: Effect of the Composition of the Mixture. *Langmuir*.
86. Xu, X. and London, E. (2000) The effect of sterol structure on membrane lipid domains reveals how cholesterol can induce lipid domain formation. *Biochemistry*, 39: 843-849.
87. Zanetti, S. R., de Los Angeles, M. M., Rensetti, D. E., Fornes, M. W., and Avelano, M. I. (2010a) Ceramides with 2-hydroxylated, very long-chain polyenoic fatty acids in rodents: From testis to fertilization-competent spermatozoa. *Biochimie*, 92: 1778-1786.
88. Zanetti, S. R., Maldonado, E. N., and Avelano, M. I. (2007) Doxorubicin affects testicular lipids with long-chain (C18-C22) and very long-chain (C24-C32) polyunsaturated fatty acids. *Cancer Res.*, 67: 6973-6980.
89. Zanetti, S. R., Monclus, M. L., Rensetti, D. E., Fornes, M. W., and Avelano, M. I. (2010b) Differential involvement of rat sperm choline glycerophospholipids and sphingomyelin in capacitation and the acrosomal reaction. *Biochimie*, 92: 1886-1894.

PRODUCCIÓN ORIGINADA DE ESTA TESIS

1. Artículos publicados en revistas internacionales con referato

- "Unique thermal behavior of sphingomyelin species with nonhydroxy and 2-hydroxy very-long-chain (C28-C32) polyunsaturated fatty acids" **Peñalva DA**, Furland NE, Aveldaño MI, Antollini SS (2013) *Journal of Lipid Research*; 54(8):2225-35.
- "Atypical surface behavior of ceramides with nonhydroxy and 2-hydroxy very long-chain (C28–C32) PUFAs". **Peñalva DA**, Oresti GM, Dupuy F, Antollini SS, Maggio B, Aveldaño MI and Fanani ML (2014) *BBA Biomembranes*; 1838(3):731-8.
- "Surface behavior of sphingomyelins with very long chain polyunsaturated fatty acids and effect of their conversion to ceramides". **Peñalva DA**, Wilke N, Maggio B, Aveldaño MI, Fanani ML. (2014) *Langmuir*; 30(15):4385-95.

2. Artículo en preparación

- "Changes in biophysical properties of membranes containing shingomyelins with very long chain PUFA induced by its hydrolysis". **Peñalva DA**, Fanani ML, Maggio B, Aveldaño MI, Antollini SS.

3. Trabajos presentados en reuniones científicas

- "Changes in biophysical properties of membranes containing shingomyelins with very long chain PUFA induced by its hydrolysis". **Peñalva DA**, Fanani ML, Maggio B, Aveldaño MI, Antollini SS. XLII Reunión Anual Sociedad Argentina de Biofísica (SAB) realizada en la ciudad de Carlos Paz, Córdoba entre los días 2 al 4 de diciembre de 2013.
- "Surface behaviour of sphingomyelins with very long chains (C28-C32) PUFAs and their interaction with premixed or enzymatically generated ceramides". **Peñalva DA**, Wilke N, Maggio B, Aveldaño MI, Fanani ML. XLII Reunión Anual Sociedad

Argentina de Biofísica (SAB) realizada en la ciudad de Carlos Paz, Córdoba entre los días 2 al 4 de diciembre de 2013.

- “Behavior of sphingomyelins with very long chain fatty acids in bilayers and monolayers” **Peñalva, DA**, Fanani, ML, Maggio B, Aveldaño MI, Antollini SS. VIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), realizada en Mendoza, Argentina, entre los días 29 de Octubre y 1 de Noviembre de 2012.
- “Surface properties of ceramides with very long chain polyunsaturated fatty acids (VLCPUFA)” **Peñalva DA**, Fanani ML, Oresti GM, Antollini SS, Maggio B, Aveldaño MI. XLI Reunión Anual Sociedad Argentina de Biofísica (SAB) realizada en la ciudad de San Javier Tucumán entre los días 5 al 7 de diciembre de 2012.
- “Propiedades biofísicas de esfingomielinas con ácidos grasos poliinsaturados de muy larga cadena (VLCPUFA)” **Peñalva DA**, Furland NE, Aveldaño MI and Antollini SS. XL Reunión anual de la Sociedad Argentina de Biofísica realizada en la ciudad de Buenos Aires entre los días 5 al 7 de diciembre de 2011.
- “Thermal behavior of sphingomyelins with very long chain polyunsaturated fatty acids (VLCPUFA)”. **Peñalva DA**, Furland NE, Aveldaño MI and Antollini SS. XLVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), realizada en la ciudad de Puerto Madryn, Argentina, entre los días 30 de Noviembre y 3 de Diciembre de 2010.
- “Propiedades biofísicas de esfingomielinas con ácidos grasos poliinsaturados de muy larga cadena (VLCPUFA)”. **Peñalva DA**, Furland NE, Aveldaño MI and Antollini SS. II Jornadas de Posgrado del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, realizadas en Bahía Blanca, los días 16 y 17 de Diciembre de 2010.