

Cambios en la fluidez de la membrana en hepatocitos de dorada *Sparus auratus* L., 1758 asociados al descenso térmico

A. Hernández¹, M. Companyó², A. Morros² y L. Tort¹

¹ Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Barcelona. E-08193 Bellaterra (Barcelona), España. Correo electrónico: marthaadriana.hernandez@campus.uab.es

² Departamento de Biofísica. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Barcelona. E-08193 Bellaterra (Barcelona), España

Recibido en julio de 2001. Aceptado en febrero de 2002.

RESUMEN

Con el fin de estudiar la influencia de la temperatura en la dinámica de la fluidez de las membranas de hepatocitos en dorada *Sparus auratus* L., 1758, se aclimataron 15 ejemplares a 17 °C, como temperatura fisiológica de control, durante una semana. Tras la extracción de una muestra, el grupo fue sometido a descenso térmico hasta alcanzar, en una semana, los 7,5 °C, y se muestrearon de nuevo. Los ejemplares restantes fueron enfriados durante una semana más hasta alcanzar los 6 °C.

La disminución de la temperatura produjo un cambio de anisotropía, que varió de 0,2205 (r) en las condiciones de control, a 0,164 (r) con el descenso a 7,5 °C de la primera semana, y no se apreciaron diferencias significativas entre este último grupo y los peces mantenidos a bajas temperaturas hasta llegar, otra semana después, a 6 °C, revelando que las membranas sufrieron una adaptación al descenso térmico. El cambio de fluidez de las membranas adaptadas a las distintas temperaturas (17, 7,5 y 6 °C) concuerda con los datos obtenidos para la enzima de membrana Na⁺/K⁺-ATP-asa, cuya actividad enzimática también disminuye con el descenso térmico. Por tanto, es verosímil que, después de una disminución brusca de la temperatura del agua, como suele ocurrir en invierno con las condiciones de cultivo de peces, los cambios de la fluidez de la membrana se vean acompañados por una disminución de los valores de la actividad enzimática de las ATP-ases de membrana como resultado de la adaptación a la nueva temperatura.

Palabras clave: Dorada, membrana, temperatura, fluidez, adaptación homeoviscosa, actividad Na⁺/K⁺-ATP-asa.

ABSTRACT

Changes in membrane fluidity of gilthead seabream *Sparus auratus* L., 1758 hepatocytes subjected to falling temperatures

We present a study on membrane fluidity dynamics in hepatocytes of gilthead seabream *Sparus auratus* L., 1758 when exposed to thermal variations. A group of 15 specimens was acclimated to a control physiological temperature (17 °C) during one week; the fish were then subjected to diminishing temperatures during the following week, reaching 7.5 °C, and a subgroup was maintained for two weeks, reaching a final temperature of 6 °C.

The temperature drop resulted in an anisotropy change from 0.2205 (r) under control conditions to 0.164 (r) at 7.5 °C, after one week. No significant differences between this group and the fish later kept at lower temperatures, reaching 6 °C, were observed after one week; this can be interpreted as a thermal adaptation of the membranes to colder conditions. The adaptive fluidity changes at temperatures of 17, 7.5, and 6 °C were coin-

cident with the observed lessening of Na⁺/K⁺-ATP-ase enzymatic activity as temperatures fell. Therefore, it is possible that after a decrease in water temperature, common in farmed fish under winter conditions, membrane fluidity changes could be correlated with decreasing enzymatic activity in membrane ATP-ases, as an adaptive strategy.

Keywords: Gilthead seabream, membrane, temperature, fluidity, homeoviscous adaptation, Na⁺/K⁺-ATP-ase activity.

INTRODUCCIÓN

Una respuesta común, dentro de los organismos poiquiloterms, frente a las alteraciones de la temperatura es la reestructuración de las membranas biológicas. Los peces responden a las fluctuaciones del medio ambiente activando mecanismos compensatorios, principalmente en los ámbitos celular y subcelular. La respuesta más consistente frente al descenso térmico es la reconstrucción de las membranas celulares a través de un cambio en la fluidez o viscosidad de las mismas (Trueman *et al.*, 2000).

Los ácidos grasos están entre los principales constituyentes de los lípidos de las membranas biológicas y son muy móviles en el plano de la bicapa. Las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos experimentan cambios continuos, especialmente cuando son expuestos a variación térmica, y estos cambios incluyen modificaciones de la estructura de los ácidos grasos cuando el aumento o la disminución de la temperatura se encuentran fuera de su rango óptimo. Durante el descenso térmico, las membranas pasan de un estado líquido-cristalino en temperatura fisiológica normal a una fase gel-fluida más ordenada, donde la geometría molecular de los ácidos grasos es cilíndrica; por el contrario, cuando la temperatura aumenta, las membranas pasan a un estado hiperfluido o fase de hexágono, no laminar, y la geometría de las moléculas se vuelve cónica (Hazel, 1995).

Dado que la dorada *Sparus auratus* L., 1758 criada en cautividad se ve habitualmente afectada por las variaciones térmicas bruscas y, en especial, por el descenso térmico (enfermedad del invierno), el objetivo de este trabajo fue el estudio de la fluidez de las membranas biológicas en condiciones fisiológicas normales y durante una disminución brusca de la temperatura del agua. Además, se analizó la actividad de la enzima Na⁺/K⁺-ATP-asa, ya que se ha constatado que existe una correlación entre el orden de las membranas y la actividad de las enzimas de membrana.

MATERIAL Y MÉTODOS

Peces

Se aclimataron 15 ejemplares de dorada a 17°C en un tanque durante una semana, transcurrida la cual fueron muestreados cinco peces. El resto fue sometido a descenso térmico durante una semana hasta alcanzar los 7,5°C (disminución de 1,5°C/día), momento en que se muestrearon otros cinco. El resto fue sometido a descenso térmico una semana más hasta alcanzar los 6°C y, pasado este tiempo, fueron sacrificados.

Extracción de membranas celulares

El hígado de todos los peces muestreados fue extraído para aislar la membrana plasmática de los hepatocitos utilizando el método de Armstrong y Newman (1985), modificado por Williams y Hazel (1994), y depositado en *buffer* sacarosa A (0,25M/Tris-HCl 0,02M). Los hígados fueron homogeneizados y colocados sobre *buffer* sacarosa B a 41 %. Se centrifugó a 22 600 G durante 30 minutos, fue colectado el sobrenadante del límite del *buffer* B y se volvió a centrifugar 15 minutos a 7 000 G. El *pelet* fue resuspendido en 1 ml de *buffer* A y colocado en solución de Percoll a 18 %. Fue realizada una tercera centrifugación de 25 minutos a 33 000 G y, después, se cubrieron con *buffer* sacarosa C a 66 %. Se centrifugó a 100 000 G durante 2 horas, tras lo que la fracción final se localizó en la parte superior como una fina lámina. En esta fracción se calculó la concentración de proteínas (Bradford, 1976) y se prepararon alícuotas de 100 mg/ml para almacenar en *buffer* Tris-HCl a -80 °C.

Medición de anisotropía

El orden de las moléculas hidrocarbonadas de las membranas de hepatocitos fue determinado realizando mediciones de la polarización fluorescen-

te con un fluorímetro con forma de T y utilizando una sonda fluorescente 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH).

Para cada muestra fue proyectada una rampa de temperatura entre 4 y 40 °C, así como los espectros de emisión y de excitación del fluorímetro, 375 y 500 nm respectivamente, utilizando un programa Multinov Prog®.

La anisotropía fluorescente (r) del DPH se calcula como

$$r = (I_{pl} - I_{pp}) / (I_{pl} + 2I_{pp})$$

donde I_{pl} es la intensidad de emisión en paralelo e I_{pp} es la intensidad de emisión en perpendicular.

Las intensidades de emisión fueron corregidas con un factor G y también se corrigió el efecto ocasionado por la dispersión de luz de las partículas en suspensión (*scattering*).

Actividad de Na⁺/K⁺-ATP-asa

Se determinó la actividad de la enzima ATP-asa utilizando microplacas de 96 pozos (basado en Flik, Wendelaar Bonga y Fenwick, 1983). Las muestras fueron diluidas (1 µg/µl de proteína) en SEI *buffer* (sucrosa 250 mol l⁻¹, Na₂EDTA 10 mmol l⁻¹, imidazol 50 mol l⁻¹, pH: 7,3) e incubadas durante una hora con saponina (0,2 mg/mg de proteína). Se colocaron 5 µl de muestra en cada pozo y, a continuación, 100 µl de un *buffer* A en la mitad de cada muestra (4 pozos) y un *buffer* E en la otra mitad de la muestra (4 pozos), siendo todos incubados a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se agregó ácido tricloroacético (TCA) para detener la reacción y un reactivo de color a base de sulfato de hierro. La actividad se determinó como la concentración de fosfato inorgánico liberado colorimétricamente (690 nm) atendiendo a la diferencia entre los dos *buffer* A y E, de los que uno contiene ouabaina, bloqueadora de la actividad.

RESULTADOS

Se determinó la estructura física de las membranas de hepatocitos mediante la medición de anisotropía de la DPH. La polarización fluorescente de la DPH de las membranas incubadas entre 4 y 40 °C, tanto en peces aclimatados a 17 °C como en peces sometidos a descenso térmico, mostró la misma pauta. La polarización decrece con el incre-

mento de la temperatura de incubación, delatando un ambiente de mayor fluidez de las membranas a mayor temperatura (figura 1).

El valor de la anisotropía media en membranas aisladas de los ejemplares sometidos a descenso térmico hasta alcanzar 7,5 y 6 °C (0,164 (r) y 0,1434 (r), respectivamente), decreció desde 0,2205 (r) (valor medio de anisotropía de los peces aclimatados a 17 °C), mostrando diferencias significativas (figuras 1 y 2). Sin embargo, los peces aclimatados hasta alcanzar los 6 °C (una semana más de descenso térmico a partir de los 7,5 °C) no mostraron grandes cambios de anisotropía con respecto a los peces que alcanzaron los 7,5 °C.

La actividad de la enzima ATP-asa de membrana de los peces sometidos a las distintas pruebas se mostró correlacionada con la anisotropía de las mismas, es decir, se constató una disminución de la actividad enzimática de la ATP-asa con la polarización de membrana (figura 2).

DISCUSIÓN

La disminución de la temperatura del agua hasta 7,5 y 6 °C provoca en doradas aclimatadas a 17 °C

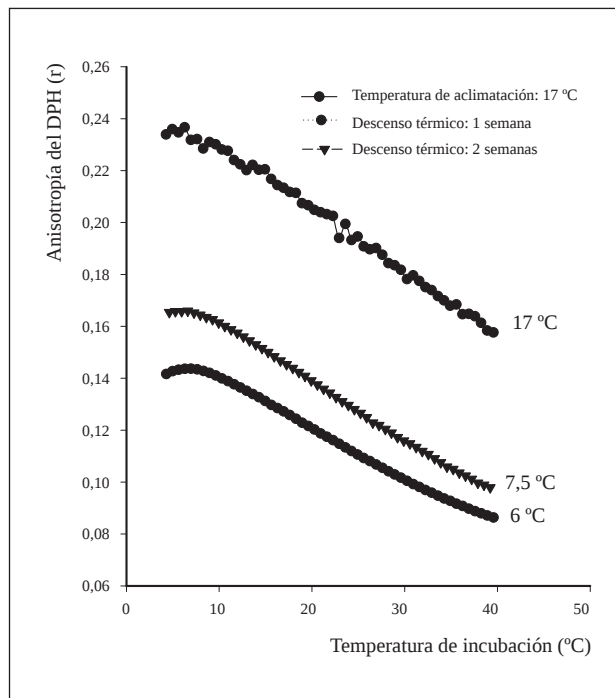


Figura 1. Anisotropía de membranas de hepatocito en ejemplares de dorada aclimatados una semana a 17 °C (controles) y luego sometidos a descenso térmico, durante una semana, primero, hasta alcanzar los 7,5 °C, y después, una semana más hasta alcanzar los 6 °C.

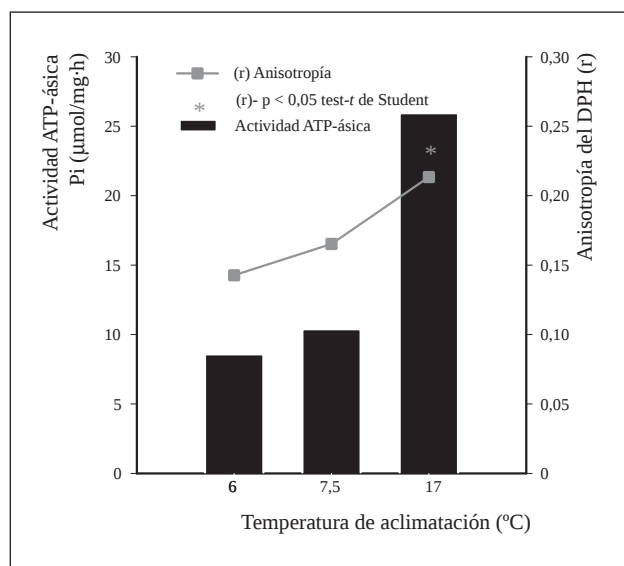


Figura 2. Comparación entre la actividad enzimática de la ATP-asa y el valor de anisotropía de las membranas de hepatocitos de dorada para las distintas temperaturas de aclimatación (17, 7,5 y 6 °C).

un incremento del orden o fluidez de los componentes lipídicos de las membranas de los hepatocitos (la fluidez está inversamente correlacionada con el valor de polarización). Esta compensación de las membranas celulares para preservar sus propiedades físicas, de fluidez, orden u otras, frente a los disturbios térmicos ocasionados tanto por encima como por debajo de su temperatura fisiológica normal, se ha denominado adaptación homeoviscosa (Cossins, 1994). La disminución de la temperatura hasta los 7,5 °C a provocado un aumento en la rigidez de la membrana; sin embargo, no se han encontrado diferencias significativas entre los valores de anisotropía de éstos y los aclimatados, tras una semana más, hasta a 6 °C. Este hallazgo concuerda con el concepto de adaptación homeoviscosa de las membranas, ya que es probable que las mismas, después de la disminución brusca de la temperatura y su posterior tiempo de adaptación a la nueva temperatura, tiendan a intentar restablecer su condición original.

La conservación de la dinámica de fases o estados de membrana es interespecífica. Se ha podido comprobar que, en las doradas, la fluidez de

las membranas biológicas puede encontrarse en un rango cercano a los 0,22 (r) en peces criados a 17 °C. Sin embargo, se ha visto que esta adaptación es muy variable y que puede producirse sin compensación de la función de las proteínas de membrana, como se observa con la disminución de la actividad enzimática de la ATP-asa. Existe una correlación entre el orden de la membrana y la actividad de la Na⁺/K⁺-ATP-asa que indica que el ambiente de sus componentes lipídicos puede reprimir o facilitar los movimientos proteínicos requeridos para la catálisis (Hazel, 1995). Es probable, por tanto, que la actividad de la enzima ATP-asa de membrana de hepatocitos requiera, para su función, de una organización de la estructura lipídica, cuyos componentes se encuentren en una fase que tienda al estado líquido-cristalino a temperatura fisiológica normal.

BIBLIOGRAFÍA

- Armstrong, J. y J. Newman. 1985. A simple, rapid method for the preparation of plasma membranes from liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 238: 619-628.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72: 248-254.
- Cossins, A. 1994. Homeoviscous adaptation of biological membranes and its functional significance. En: *Temperature adaptation of biological membranes*. A. Cossins (ed.): 63-76. Portland Press. Londres.
- Hazel, J. 1995. Thermal adaptation in biological membranes: Is homeoviscous adaptation the explanation? *Annu. Rev. Physiol.* 57: 19-42.
- Flik, G., S. E. Wendelaar Bonga y J. C. Fenwick. 1983. Ca²⁺-dependent phosphatase and ATPase activities in eel gill plasma membranes. I. Identification of Ca²⁺-activated ATPase activities with non-specific phosphatase activities. *Comp. Biochem. Physiol.* 76 (B): 745-754.
- Trueman, R., P. Tikku, M. Caddick y A. Cossins. 2000. Thermal thresholds of lipid restructuring and delta(9)-desaturase expression in the liver of carp (*Cyprinus carpio* L.). *J. Exper. Biol.* 203: 641-50.
- Williams, E. y J. Hazel. 1994. Membrane fluidity and hemilayer temperature sensitivity in trout hepatocytes during brief in vitro cold exposure. *Am. J. Physiol.* 266 (3): R773-R780.