

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE FARMÀCIA

**Determinació dels Paràmetres
Estructurals d'una Glicoproteïna
amb Activitat de Grup Sanguini A**

JOAN ESTELRICH I LATRÀS

R. 727. 055

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE FARMÀCIA



DETERMINACIÓ DELS PARÀMETRES
ESTRUCTURALS D'UNA GLICOPROTEÏNA
AMB ACTIVITAT DE GRUP SANGUINI A

Barcelona, setembre de 1986

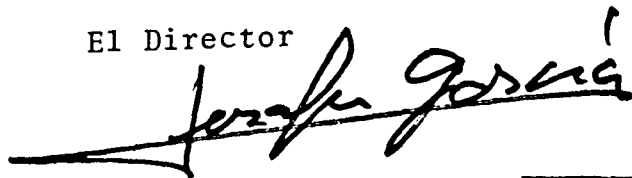
Memòria que per
optar al Grau de Doctor
en Farmàcia presenta
JOAN ESTELRICH I LATRÀS

D.SERAFIN GARCIA FERNANDEZ, Catedratic de Fisicoquímica Aplicada i Cap del Departament de Fisicoquímica Biològica

CERTIFICA: que el present treball d'investigació titolat "DETERMINACIO DELS PARAMETRES ESTRUCTURALS D'UNA GLICOPROTEINA AMB ACTIVITAT DE GRUP SANGUINI A" ha estat realitzat en el Departament de Fisicoquímica Biològica de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona sota la direcció dels Doctors Professors D.SERAFIN GARCIA FERNANDEZ, Catedratic de Fisicoquímica Aplicada i de D.ORIOL VALLS PLANELLS, Catedratiç de Fisicoquímica Aplicada.

Barcelona, setembre de 1986.

El Director



UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE FARMACIA
CATEDRA DE FISICO-QUIMICA APLICADA

He de fer palès el meu agraïment a tots els components del Departament de Físicoquímica Biològica per haver estat durant aquests anys, alhora que uns companys, uns bons amics. Voldria, a més, fer pública la gran tasca realitzada pel Dr. Ramon Pouplana, a qui tantes vegades he hagut de recòrrer i en qui sempre he trobat una resposta.

Haig d'agrair també l'ajut que en tot moment m'han proporcionat els Laboratoris Knickerbocker, i molt especialment Na Pilar Urdàiz.

Aquest agraïment és, per altre part, extensiu al Prof.Dr.Ricard Castillo, Cap del Servei d'Hemoteràpia i Hemostasi de l'Hospital Clínic de Barcelona, per haver-me proporcionat la sang amb la que s'han obtingut les glicoproteïnes estudiades.

En algunes tècniques m'ha calgut l'assistiment, total o parcial, d'altri amb més coneixements i pràctica. Aquestes persones han estat:

- Dra. Montserrat Baucells del Servei d'Espectroscòpia, en l'espectropolarimetria
- Dra. Rosa M. Cusidó, del Departament de Fisiologia Vegetal de la Facultat de Farmàcia, en l'anàlisi d'aminoàcids
- Dr. Manel Chiva, del Departament de Fisiologia Animal de la Facultat de Medicina, en l'electroforesi
- Prof. Fina Prat, del nostre Departament, en les diverses cromatografies en capa fina.

Finalment vull agrair la contínua col·laboració que, molt més enllà de les funcions que li corresponien m'ha oferit En Cristóbal Alcalá.

Per l'acabament de la tesi, la Direcció General
d'Ensenyament Universitari de la GENERALITAT DE CATALUNYA,
en base al decret 518/1983 de 6 de desembre, em concedí
un ajut per aquesta finalitat.

Plau-me encara parlar la llengua
d'aquells savis, que ompliren
l'univers de llurs costums e lleis.

Bonaventura Carles Aribau:

"Oda à la Pàtria"

ÍNDIX

A. INTRODUCCIÓ	1
1. OBJECTIU DE LA TESI	2
2. ANTÍGENS DE GRUP SANGUINI	4
2.1. ANTÍGENS	4
2.1.1. Antígens naturals	4
2.1.2. Bases moleculars de la immunogenicitat i de la especi- ficitat antigènica	6
2.2. ANTÍGENS DE GRUP SANGUINI	8
2.2.1. Funció dels antígens de grup sanguini	10
2.3. GRUP SANGUINI ABO	11
2.3.1. Estructura química	14
2.3.2. Control genètic	17
2.3.3. Els subgrups d'A i de B	19
2.3.4. Funció dels antígens ABH	22
2.4. EL CARÀCTER LIPÍDIC I/O PROTEÏNIC DELS ANTÍGENS ERITRO- CÍTICS ABH	23
3. MEMBRANES BIOLÒGIQUES	28
3.1. ESTRUCTURA DE LA MEMBRANA	29
3.2. COMPONENTS DE LA MEMBRANA	35
4. LA MEMBRANA DE L'ERITRÒCIT HUMÀ	43
4.1. CARACTERÍSTIQUES GENERALS	45
4.2. LÍPIDS	45
4.3. PROTEÏNES	48
4.3.1. Descripció general	51
4.3.1.1. Proteïnes revelades en l'electroforesi pel colorant Blue-Coomassie	51
4.3.1.2. Proteïnes revelades en l'electroforesi pel reactiu de Schiff (glicoproteïnes)	54
4.3.1.3. Proteïnes identificades per llur activitat enzimà- tica	57
4.3.2. Organització	58
4.4. GLÚCIDS	60

B. AILLAMENT I PURIFICACIÓ DE LA GLICOPROTEÏNA ANTIGÈNICA ..	61
1. OBTENCIÓ DE L'ESTROMA ERITROCÍTIC	62
1.1. MATÈRIA PRIMA	63
1.2. HEMÒLISI	63
1.3. DIÀLISI, HOMOGENITZACIÓ I LIOFILITZACIÓ	66
1.4. DETERMINACIONS ANALITÍQUES	67
1.4.1. Anàlisi química elemental	67
1.4.2. Contingut proteic	67
1.4.3. Espectre infraroig	69
1.4.4. Activitat acetilcolinesterasa	71
1.4.5. Determinació espectrofotomètrica de la tirosina i del triptofan	71
1.4.6. Anàlisi d'aminoàcids	74
2. SOLUBILITZACIÓ	77
2.1. COMPARACIÓ DE MÈTODES	82
2.1.1. Paràmetres comparatius	86
2.1.2. Conclusions	104
2.2. CARACTERÍSTIQUES ANALÍTiques DE LES GLICOPROTEÏNES OB- TINGUDES	107
2.2.1. Absorció a l'espectre ultravioleta	107
2.2.2. Dispersió rotatòria òptica	112
2.2.3. Contingut en proteïna	114
2.2.4. Contingut en glúcids	114
2.2.5. Contingut en glicoproteïna	115
2.2.6. Anàlisi d'aminoàcids	118
2.2.7. Inhibició de l'hemaglutinació	119
3. PURIFICACIÓ DE LA GLICOPROTEÏNA AMB ACTIVITAT DE GRUP SANGUINI A	126
3.1. CROMATOGRÀFIA DE FILTRACIÓ PER GEL	126
3.2. CROMATOGRÀFIA D'AFINITAT	130
C. DETERMINACIÓ DELS PARÀMETRES ESTRUCTURALS DE LA GLICOPRO- TEÏNA ANTIGÈNICA	133
1. CARACTERÍSTIQUES ANALÍTiques	134
1.1. INHIBICIÓ DE L'HEMAGLUTINACIÓ	134
1.2. CONTINGUT PROTEIC	137
1.2.1. Mètode de Lowry	137

4. CARACTERÍSTIQUES ESTRUCTURALS	200
4.1. RADI DE GIR	200
4.2. CONFORMACIÓ DE LA MOLÈCULA	200
4.3. POLARITAT I HIDROFOBICITAT DE LA MOLÈCULA	216
4.4. ACCIÓ DE CERTS AGENTS PERTORBANTS	220
5. ESTABILITAT ESTRUCTURAL	223
5.1. ACCIÓ DEL CLORHIDRAT DE GUANIDINA	223
5.2. ACCIÓ DE LA UREA	227
5.3. ACCIÓ DE LA CALOR	230
DISCUSSIÓ I CONCLUSIONS	235
BIBLIOGRAFIA	250

INTRODUCCIÓ

1. OBJECTIU DE LA TESI

Existeix en l'actualitat un gran nombre d'estudis sobre els antígens específics de grup sanguini; no obstant, la major part d'aquests estan enfocats sota el punt de vista genètic i/o immunològic, existint un gran buit pel que fa a les característiques biofísiques, fet explicable, en part, per la necessitat d'emprar, en molts casos, grans quantitats de substància, en comparació a quan es fa ús, per exemple, de tècniques immunològiques.

Aquest buit encara és més palès quan es tracta de glicoproteïnes antigèniques aïllades a partir de la membrana de l'eritròcit.

Altrament, en molts d'aquests estudis s'aporten dades que presenten una gran heterogenicitat, fet lògic atès que la metodologia emprada en l'obtenció de les glicoproteïnes ha estat molt diversa. Tot això fa que la comparació entre els resultats descrits en la bibliografia sigui, a vegades, molt difícil, especialment quan en els processos d'extracció i/o purificació s'ha fet ús de detergents, o quan l'objecte a estudi no és la molècula sencera sinó un fragment de la mateixa, obtingut per ruptura química o enzimàtica.

L'activitat de grup sanguini en els eritròcits, quan aquesta ha estat referida a substàncies no lipídiques, s'ha assignat de forma concreta a la glicoforina A, la glicoproteïna més gran present en la membrana, i també a l'anomenada banda 3, la principal proteïna de l'eritròcit, però que, en contraposició amb la glicoforina A, té un contingut minso en glúcids. En altres casos l'activitat de grup sanguini ha estat relacionada amb glicoproteïnes sense concretar-ne si es referien a les abans esmentades o es tractava d'altres molècules.

En base a això, l'objectiu de la tesi ha estat la caracterització fisicoquímica d'una molècula que químicament tingui naturalesa glicoproteïnica, anant acompanyada aquesta d'activitat de grup sanguini A.

La caracterització ha d'incidir, especialment, en la determinació dels paràmetres estructurals per les tècniques a l'abast.

L'obtenció d'aquestes glicoproteïnes s'ha realitzat fent ús dels mètodes que -a partir d'una revisió bibliogràfica prèvia- fornien uns millors i més comparatius resultats. A hores d'ara aquests mètodes han esdevingut clàssics per aquesta finalitat. Amb tot, la metodologia emprada ha estat eclècticament modificada en alguns aspectes per tal que s'obtingués un major grau de puresa i homogenicitat de la mostra.

S'ha de remarcar que l'estudi ha tingut com a punt central una substància glicoproteïna amb activitat de grup sanguini A, condicions fixades previament a l'aïllament, i a partir d'aquí, totes les proves i determinacions realitzades han tingut única i exclusivament un enfocament físicoquímic, sense parar esment en altres aspectes, com els immunològics o d'estructura fina de l'epítot, per exemple. Amb tot, s'ha previst completar aquest estudi, més endavant, i en col·laboració amb altres centres aquests aspectes ara bandejats.

2. ANTÍGENS DE GRUP SANGUINI

2.1. ANTÍGENS

El terme *antigen* s'utilitza comunment en dues acceptacions. En primer lloc defineix una substància que, injectada en un animal adient, estimula la producció d'anticòs circulants o produeix canvis de reaccionabilitat cel·lular, i, en segon lloc defineix una substància que te la propietat de reaccionar amb l'anticòs. Sens cap dubte, aquestes dues característiques són diferents. Hi ha substàncies que tenen la capacitat de reaccionar amb anticòs, però no poden per si mateixes estimular llur formació. Així, la noció d'antigen va acompanyada de dues propietats diferents: la *immunogenicitat* i l'*especificitat antigènica*. La immunogenicitat és la capacitat de provocar una resposta immune, mentre que l'especificitat queda reflectida en la naturalesa de la zona que es combina amb l'anticòs, i és definida com la capacitat d'una molècula o petites porcions d'aquesta, de reaccionar amb anticòs.

La part específica que reacciona amb l'anticòs reb el nom d'haptè, epítóp o determinant antigènic. Els determinants antigènics tenen una estructura tridimensional amb la qual s'acoblen a l'anticòs. El nombre de determinants antigènics en una molècula antigènica és variable i està en funció de les característiques químiques i el tamany de la molècula. No necessàriament tots els determinants són idèntics ni tots s'uneixen a la molècula d'anticòs en la reacció antigen-anticòs.

Els antígens poden considerar-se com pertanyents a una d'aquestes classes: antígens naturals, antígens artificials i antígens sintètics (Taula 1) (STEWART 1979).

2.1.1. ANTIGENS NATURALS

Els antígens naturals són compostos proteics (proteïnes i àcids nucleics), glucídics (glicolípid i glicoproteïnes, polisacàrids) i, molt rarament, lipoproteïnes.

Classe d' antigen	Origen	Exemples
Natural	Plantes Bacteris Animals	Particulat: Cèl·lules sanguínees, bacteris virus Soluble: Toxines, toxoides, proteïnes, glú- cids, glicoproteïnes, lipoproteï- nes
Artificial	Antígens naturals modifi- cats químicament	Proteïnes ioditzades, proteïnes conjugades a haptens, per exemple, proteïnes AZO&DNP
Sintètic	Molècules sintetitzades químicament	Polipeptíds, poli aminoàcids, copolímers d' aminoàcids multitenaris

TAULA 1. - Classes d'antígens, segons M.W.STEWARD (Immunquímica, pp.4, 1979).

Els antígens poden provenir d'organismes extraespecífics (heteroantígens), com els bacterians, els pol·lens i moltes altres substàncies animals i vegetals; poden també provenir d'individus de la mateixa espècie (al·loantígens), determinants de sensibilitzacions intraespecífiques, i poden, tanmateix, originar-se en el propi subjecte en el que palesen llurs efectes (autoantígens) determinants d'autoimmunització (MASSA i ARAYA, 1980).

La molècula que constitueix un antigen pot trobar-se dissolta en els líquids de l'organisme (antigen molecular o soluble); en altres casos, pot trobar-se fixa en diferents corpúsculs, integrant amb altres antígens el mosaic antigènic dels mateixos (antigen corpuscular o particulat).

Existeixen alguns antígens extraordinàriament difosos en la natura. L'antigen Forssman o antigen heteròfil descobert en el moltò és un dels més difosos. El presenten quasi tots els bacteris, els vegetals (excepte fèsols, arròs i civada), nombrosos animals, i els humans dels grups sanguinis A i AB. El terme *heteròfil* aplicat a un antigen, significa que el mateix es troba en més d'una espècie animal i/o vegetal.

Totes les cèl·lules implicades en la resposta immunològica tenen antígens de reconeixement, cas dels antígens d'histocompatibilitat i els receptors per a l'antigen en els limfòcits T i B.

2.1.2. BASES MOLECULARS DE LA IMMUNOGENICITAT I DE L'ESPECIFICITAT ANTIGÈNICA

Existeixen una sèrie de paràmetres moleculars (composició, tamany, forma, accessibilitat, càrrega elèctrica, configuració òptica i conformació estèrica) que controlen l'especificitat antigènica i la immunogenicitat (SELA 1969).

- *Tamany* : Es creia que els pesos moleculars inferiors a 5000-10000 no eren immunogènics, i aixó és encara cert probablement per als antigens proteics; altres molècules de baix pes molecular amb un mínim de 450 han demostrat ésser immunogènics.

Per altre part, per a calcular el tamany del determinant antigènic s'han emprat mètodes que consisteixen en inhibir la zona d'unió de l'anticòs de l'antigen homòleg emprant inhibidors de tamany creixent. En general es creu que el tamany requerit per ésser determinant antigènic és equivalent a sis anells de glucopiranososa.

- *Composició* : Els homopolímers de α -aminoàcids generalment no són immunogènics, però els polímers de dos aminoàcids ho són. A mida que augmenta el nombre d'aminoàcids diferents que formen el polímer, augmenta el poder immunogènic. Aquest poder és encara més incrementat si en les molècules es troben anells bencènics o ciclohexànics.

- *Conformació estèrica* : L'ordenació estèrica de les proteïnes antigèniques és important en llur especificitat antigènica, car les proteïnes desnaturalitzades reaccionen molt poc, si ho fan, amb anticòsos dirigits a les molècules natives. Estudis amb polipèptids sintètics han demostrat que el sistema immune és capaç de distingir una estructura en cabdell monoestadístic (*random coil*) d'una en α -hèlix, per exemple, encara que en ambdues conformacions estiguin implicats els mateixos aminoàcids.

Estudis de dicroïsm circular (SCHECHTER et al. 1971) han demostrat que quan els anticòsos per a l'estructura de α -hèlix reaccionen amb un polipèptid en conformació de cabdell monoestadístic, pot ocórrer un canvi conformacional induïnt una tendència helicoidal en el cabdell monoestadístic i aixó reb el nom de *transconformació*.

- *Càrrega* : Alguns estudis en els que es variava sistemàticament la càrrega dels antigens sintètics per alteració en la composició dels aminoàcids han revelat que la càrrega no és un requeriment per a la immunogenicitat i, en general, la càrrega no afecta a la quantitat d'anticòsos produïts. No obstant, les molècules amb una elevada càrrega són febles immunògens. És interessant realçar que hi ha una relació inversa entre les càrregues de les molècules immunogèniques i la càrrega dels anticòsos que produeixen.

- *Configuració òptica* : L'alt grau d'estereoespecificitat dels anticosos envers llurs antígens ja ha estat indicat anteriorment. A més, els polímers de D-aminoàcids són menys immunogènics que els formats pels corresponents L-isòmers. La unió de residus L-aminoàcids a la superfície d'una macromolècula sintètica formada per D-aminoàcids fa que aquesta esdevingui un bon immunògen. Sembla que la feble immunogenicitat dels polímers dels D-aminoàcids és deguda al seu incomplet catabolisme i a la seva retenció en l'organisme durant llargs períodes de temps. El lent alliberament subsegüent es tradueix en una resposta immune insensible.

- *Forma física* : La forma física d'un antigen quan s'injecta a un animal és de gran importància per a determinar si pot o no ésser immunogènic. Les proteïnes, àcids nucleics i antígens sintètics, tenen diferent immunogenicitat quan es troben en forma agregada o no agregada. Alguns antígens que no són immunogènics quan s'administren en solució salina fisiològica ho són molt quan s'administren incorporats a l'adjuvant de Freund (una emulsió d'aigua i oli en la que se suspenen *Mycobacterium tuberculosis* morts) o adsorbits a precipitats d'alum.

2.2. ANTIGENS DE GRUP SANGUINI

Els antígens de grup sanguini són estructures que expressen la *individualitat* de les superfícies cel·lulars, fluids corporals i secrecions, en contraposició als antígens d'histocompatibilitat que expressen la *individualitat* tan sols en les superfícies cel·lulars.

El perquè a les cèl·lules, fluids i secrecions les calgui expressar la seva *individualitat* és una qüestió sense resposta.

Els antígens de grup sanguini han estat descrits en l'home i en catorze, si més no, diferents espècies animals, i són l'expressió de nombroses especificitats de grup sanguini. Cadascuna d'aquestes especificitats agrupa un conjunt d'antígens vinculats entre sí i genèticament determinats i es coneix com a *sistema sanguini*. El nombre de sistemes coneguts augmenta continuament, demostrant el gran polimorfisme genètic de l'espècie.

Alguns d'aquests antígens estan restringits a la membrana de l'eritròcit, com els del grup MN, altres es troben en tots els elements de la sang (eritròcits, leucòcits, plaquetes) i altres, com els propis del grup ABH, es troben àmpliament distribuïts, essent la distribució dels antígens en els teixits dependent del grau d'evolució filogenètica (ORIOL et al. 1984).

Els principals sistemes grupals amb llurs antígens bàsics es mostren a la taula 2. Cal tenir en compte que els antígens presenten en tots els sistemes nombroses variants al·lèliques (MASSA i ARAYA, 1980).

SISTEMA	ANTIGENS
ABO	A, B, H
Lewis	Le ^a , Le ^b
Ii	I, i
Lutheran	Lu ^a , Lu ^b
MN Ss	M, N, S, s
P	P ₁ , P ₂ , p, p ^k
Rh-Hr	D, C, cE, e
Kell-Cellano	K, κ, Kpa
Duffy	Fy ^a , Fy ^b
Kidd	Jk ^a , Jk ^b
Diego	Di ^a , Di ^b
Sutter	Js ^a , Js ^b
Xg	Xg
Cartwright	Yt ^a , Yt ^b
Dombrock	Do ^a , Do ^b
Sciana-Burrell	Sc ¹ , Sc ²

TAULA 2.- Principals sistemes grupals eritrocítics
(Segons MASSA i ARAYA: Immunohematologia bàsica, 1980)

Totes les substàncies de grup sanguini són principalment glicoproteïnes i/o glicolípid amb l'especificitat antigènica determinada predominantment per glúcids. L'antigen Rh dels eritròcits humans és una excepció; és una proteïna sense glúcids i requereix per a l'expressió antigènica de grups sulfhidrils reduïts. L'antigen Rh és difícil d'extreure de la membrana en forma activa i sembla que altres components de la membrana poden estar implicats en l'especificitat antigènica, cosa que explicaria perquè l'antigen és tan làbil.

La resposta immunològica que indueixen aquests antígens està en funció de la seva naturalesa proteïnica o glucídica, podent induir la formació d'anticòs de la classe IgM (aglutinines) i/o de la classe IgG.

2.2.1. FUNCIO DELS ANTIGENS DE GRUP SANGUINI

La funció d'aquests antígens no ha estat clarificada i molt menys el perquè de trobar-se molts d'ells presents en diferents parts de l'organisme. Una hipòtesi és la de suposar que aquests antígens proporcionen una defensa enfront les invasions víriques. Quan un virus ataca un organisme, aquest respon amb anticòs dirigits contra els antígens adquirits pel virus de la membrana cel·lular del seu hoste i d'aquesta manera combat la infecció. Considerant això, l'existència d'aquests antígens pot ésser interpretada com una mena de *sabiduria cel·lular* per a sobreviure en el transcurs de la història de la interacció entre aquests organismes i els virus. Altrament, els antígens ABH no semblen tenir cap funció essencial per a la vitalitat de la cèl·lula, atès que la vida dels individus tipus *Bombay*, freturosos dels antígens ABH, és molt normal. Aquest fet feu afirmar a KALCKAR (NIKAIDO 1967) que, probablement, els determinants antigènics de grup sanguini eren un *luxe* de la cèl·lula. El desenvolupament normal dels individus *Bombay* també contrasta amb la sugerència de PANN i KUHNS (1972) de que a més de la individualitat, els antígens de grup sanguini serien uns marcadors de l'oncogènesi.

Amb el desenvolupament dels anticòsos monoclonals s'ha pogut escatir que molts dels antígens sanguinis estan associats als processos oncogènics o als de diferenciació cel·lular, i que, per la seva part, estan determinats per la seqüència dels sucres del component glucídic dels antígens. Així, aquests glúcids actuen de marcadors de la superfície i són els que distingeixen les cèl·lules maldres de les immadures, i les cèl·lules tumorals de les normals. També les seqüències glucídiques i/o algunes estructures addicionals associades amb elles, han de tenir un paper específic en el creixement normal i en la diferenciació. Per altre part, la inapropiada biosíntesi o processament de les estructures glucídiques han de contribuir al capteniment desordenat de les cèl·lules tumoroses (FEIZI 1985).

2.3. GRUP SANGUINI ABO

El grup sanguini ABO fou descobert en 1901 per Landsteiner, que definí els grups A, B i O, i completat per DeCastello i Sturli en 1902 amb el grup AB. Els antígens relacionats amb aquests grups són: grup A (antigen A), grup B (antigen B), grup O (antigen H) i grup AB (antígens A i B, alhora).

Els antígens ABH ja estan presents en fetus de 20 dies (ROUGER i SALMON, 1982), adquirint pràcticament llur expressió definitiva a l'edat de 3 anys. Durant la maduració de les sèries sanguínees sembla que ha quedat demostrat que la síntesi dels antígens ABH té lloc en l'etapa del proeritroblast.

La distribució filogènica d'aquests antígens depend, com ja s'ha apuntat, del grau d'evolució, ja que si be els antígens ABH s'han trobat en les secrecions exocrines de tots els mamífers, la presència en el teixit nerviós només s'ha palesat en els primats, i, dins d'aquest ordre, mentre que el babuí (*fam. Cercopithecidae*) els presenta també en l'endoteli vascular, el marmoset, un platirrí de la família *Cebidae*, i, per tant, menys evolucionat, no els hi conté (MOLLICONE et al., 1986) (taula 3).

MOSTRA						
ANIMAL	Saliva	Receptors olfatoris	Cèl·lules de l'oide intern	Arrel del gangli neural	Endoteli vascular	Eritròcits S.N.C.
Rata	+	+	+	-	-	-
Marmoset	+	n.d.	n.d.	+	-	-
Babuí	+	+	n.d.	+	+	-
Home	+	+	n.d.	+	+	+

TAULA 3. - Aparició seqüencial dels antígens ABH en diferents teixits de quatre estadis d'evolució filogenètica de la rata a l'home. S.N.C. = sistema nerviós central; n.d. = no determinat.

La distribució dels antígens en un individu adult és molt extensa, de forma que la major part dels teixits humans, plaquetes sanguínees, leucòcits, limfòcits, cèl·lules epidèrmiques, espermatozoides, endoteli vascular, cèl·lules amniòtiques, calostre i també cèl·lules malignes de càncer de coll uterí, del pàncrees, de l'aparell gastrointestinal, contenen el o els antígens a llur fenotipus eritrocític. El meconi és un altre font de substàncies de grup sanguini (CÔTE i VALLET, 1976).

La naturalesa dels antígens en els teixits és diferent segons aquests siguin adsorbits o intrínsecs. DUNSTAN et al.(1985) han trobat que els antígens ABH de les plaquestes són de dos tipus (les cadenes dels antígens eritrocítics poden ésser de quatre tipus, segons es veurà més endavant): els presumiblement intrínsecs pertanyen a cadenes del tipus 2, i els adsorbits passivament, que són del tipus 1.

La capacitat de secretar substàncies amb activitat A i B és transmesa com un caràcter dominant mendelià, i és controlat per un parell de gens al·lèlics, *Se* i *se*, que són independents dels gens ABO. El gen *Se* quan està present, como homo o heterozigot, produeix la secreció. L'al·lel *se* en forma doble (*sese*) ocasiona la no secreció de les substàncies ABO en els fluids o secrecions. El 80% de les persones de raça blanca són secretors.

Substàncies que neutralitzen específicament l'acció aglutinant dels reactius anti-A, -B i -H, també es troben en moltes espècies animals i en certes plantes i microorganismes. En canvi, l'activitat Lewis (*Le^a*), antigen d'un sistema molt relacionat amb els ABO, ha estat detectada en la saliva dels no humans, però no s'ha descrit en animals inferiors. Es pensa que aquesta especificitat és una conseqüència de l'activitat d'un gen amb una evolució posterior que la dels gens ABO i H (WATKINS 1966b).

La major part de les soques bacterianes tenen especificitat ABO. En alguns casos els haptens dels antígens bacterians són idèntics als de les glicoproteïnes de les secrecions.

En certes condicions es produeixen modificacions dels antigens ABH, essent la causa més frequent el desenvolupament de les neoplàsies. Un altre variació deguda al medi es presenta per l'acció de la flora bacteriana intestinal -principalment de l'*Escherichia coli*- en individus amb antigens A₁. Aquesta variació, coneguda amb el nom de *fenomen del B adquirit* consisteix en que, a més de la lògica aglutinació dels eritròcits amb el sèrum anti-A, uns eritròcits poden, si be molt feblement, reaccionar amb el sèrum anti-B. El fet es produeix a causa d'una desacetilasa produïda pel bacteri i que provoca la transformació de la N-acetil-D-galactosamina (sucre propi de l'especificitat del grup A) en D-galactosamina, molècula estructuralment molt propera a la galactosa que és el sucre que proporciona l'especificitat B (GERBAL i ROPARS, 1976).

El pertànyer a un grup sanguini determinat és un fet definitiu, per be que s'ha observat en moltes ocasions un afebliment de l'expressió antigènica d'A en persones d'edat avançada. Per tant, es podria tenir el cas d'un fenomen fisiològic involutiu. També s'observen variacions de l'expressió antigènica en certs estats patològics (leucèmia aguda, anèmia refractària o limfoma). Un fet destacat és que en algunes leucèmies, les fases de remissió van acompanyades per un retorn envers percentatges normals d'aglutinació, que variaran de nou si es produeix una recidiva. Malgrat que s'han descrit modificacions idèntiques per a B i H, aquest fenomen no té cap explicació unívoca, car, per una part, no totes les leucèmies produeixen modificacions del grup sanguini, i, per altre, existeix la hipòtesi segons la qual es tractaria d'una mutació somàtica, que és difícil d'acceptar quan es troben implicats diferents sistemes genètics independents (GENETER i MANNONI, 1980).

2.3.1. ESTRUCTURA QUÍMICA

Els determinants antigènics del grup sanguini ABO són glúcids (units a proteïnes o a esfingolípid). El trisacàrid terminal corresponent a un antígen és comú tant per a glicoproteïnes com per a glicolípid, variant els restants glúcids.

Les glicoproteïnes tenen una masa molecular elevada i són l'estructura química predominant en els antígens de les secrecions. Els glicolípidis ho són, per la seva part, de l'endoteli capilar i del sèrum (KABAT 1973). Pel que fa als antígens de l'eritròcit, aquests poden presentar-se com glicolípidis o com glicoproteïnes. En ambdós casos l'especificitat de grup dels antígens ve donada pel glúcid terminal de la molècula (figura 1), que per aquest fet hom anomena *glúcid immunodominant*.

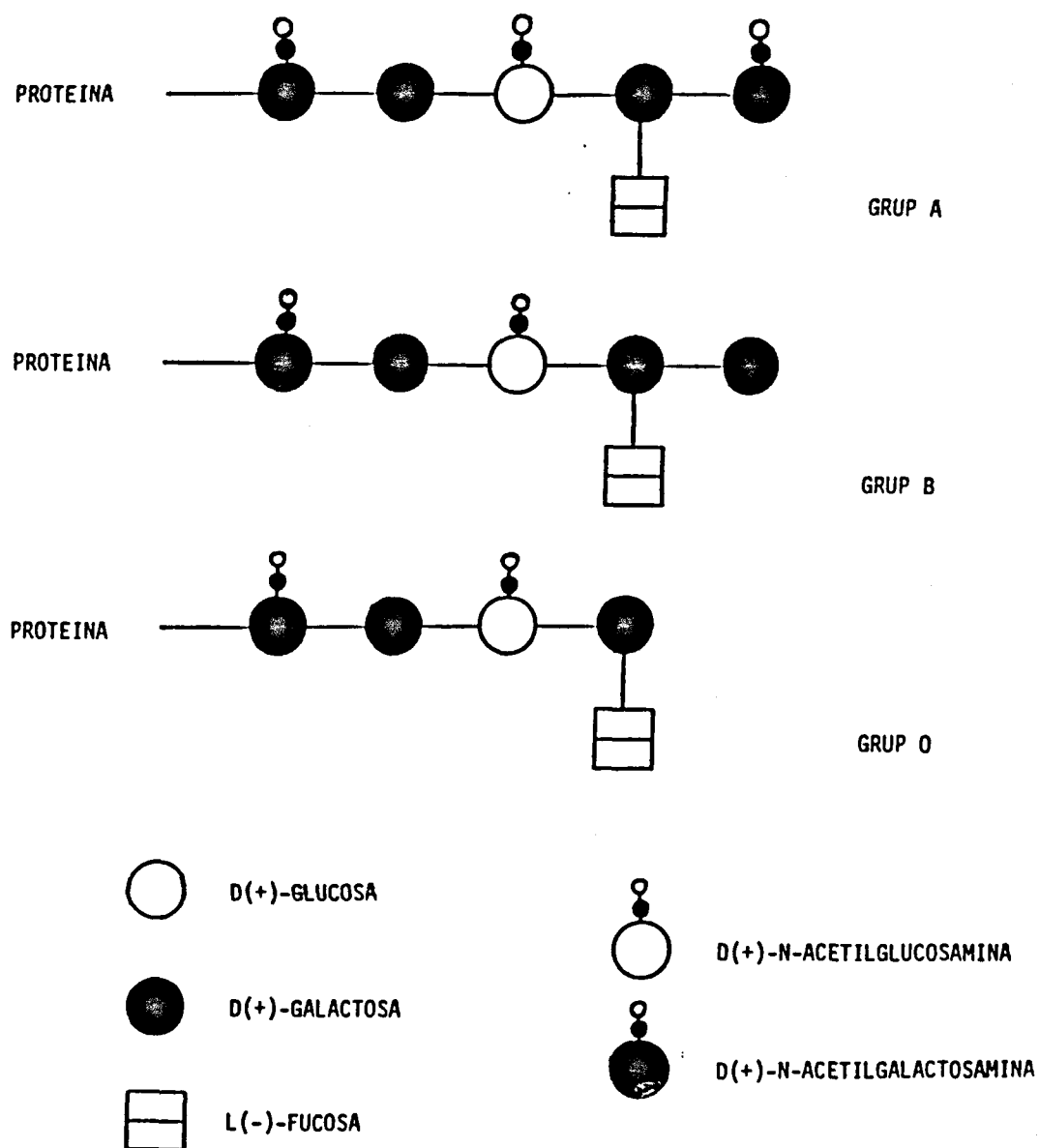


FIGURA 1.- Configuració de les cadenes glucídiques específiques de grup sanguini (ZAhLER 1968).

Les substàncies de grup sanguini poden interconvertir-se de forma experimental. Així una α -galactosidasa converteix les cèl·lules humanes de tipus B en cèl·lules de tipus O per eliminació d'una galactosa. De forma semblant, les cèl·lules de tipus O poden convertir-se en cèl·lules dels tipus A o B per incubació amb una glicosiltransferasa adient i l'UDP derivat de la N-acetilgalactosamina o galactosa, respectivament (CANDY 1980).

2.3.2. CONTROL GENÈTIC

Els antígens ABH estan genèticament controlats. Els gens A (A/A i A/-) i B (B/B i B/-) codifiquen els enzims responsables de la unió dels sucres específics que donaran lloc als antígens A i B, respectivament. El gen O (O/O), que és el tercer al·lel del locus ABO, és considerat inactiu en el sentit que no produeix cap producte anàleg als productes dels gens A i B. Els individus que pertanyen al grup O i tenen el gen secretor, *Se*, secreten una substància anomenada H. L'activitat H és també detectable en els secretors que pertanyen als grups A, B i AB, i aquesta substància és la que forma l'estructura bàsica que, per acció dels enzims codificats pels gens A i B, dona els antígens A i B. La formació d'estructures H, deguda a l'acció d'una fucosiltransferasa, és controlada per un sistema de gens independents, *Hh*; el gen *H* en forma doble o senzilla dona lloc al caràcter anomenat H, i l'al·lel *h*, present en forma doble, *hh*, ocasiona l'absència de caràcter H, i, per tant, l'absència de caràcters A i B, encara que els gens A i B estiguin presents. Aquests individus no abunden gaire i s'han trobat, predominantment a Bombay, prenguent el nom d' *individus tipus Bombay* (WATKINS 1966b). En altres casos, el caràcter *H* està molt disminuït (havent-se localitzat aquests extrany fenotipus només a l'illa de la Reunion) i aquestes diferències fenotípiques s'han interpretat com una expressió polimòrfica del gen *H* (LE PENDU 1983a).

Un sistema sanguini molt relacionat amb l'ABO, a més del secretor, és el sistema Lewis que està definit per dos gens al·lèlics, *Le* i *le*, transmesos independentment dels gens ABO i *Hh*.

Actualment són coneguts quatre antígens Lewis: Le^a , Le^b , Le^c i Le^d , la formació dels quals també està influïda pels gens H i Se . Així, l'activitat Le^b és produïda per l'acció de l'al·lel Le i de la interacció d'aquest amb el gen Se o amb el H (WATKINS 1966a). Aquests dos darrers són uns gens estructurals molt relacionats.

La taula 5 és una revisió de les dades disponibles que mostra els tres patrons principals de control genètic dels gens H i Se sobre els productes directes dels gens (les glicosiltransferases) i els determinants antigènics finals sintetitzats per les glicosiltransferases (BERNOCO et al. 1985).

	$H/-$, $Se/-$	$H/-$, se/se	h/h , $Se/-$	h/h , se/se
Enzims en sèrums i eritròcits				
A	+	+	+	+
B	+	+	+	+
H	+	+	-(a)	-
Le	-	-	-	-
Antígens sobre els eritròcits (b)				
A	+	+	-	-
B	+	+	-	-
H	+	+	-	-
Le	+	+	+	+
Antígens en la saliva				
A	+	-	+	-
B	+	-	+	-
H	+	-	+	-
Le	+	+	+	+

TAULA 5.- Presència de les glicosiltransferases ABH i Le i llurs components corporals d'acord amb els genotipus H i Se del donant. (a): en aquest sera s'ha trobat una feble activitat enzimàtica H. (b): sols es té en consideració una forta expressió d'ABH.

En resum, aquests antígens estan regits per quatre grups de gens, cadascú pertanyent a quatre llocs genètics independents. Aquests *loci* són els actualment designats com ABO, *Lele*, *Hh* i *Sese*.

2.3.3. ELS SUBGRUPS D'A I DE B

En 1911 Von Dungern i Hirszfeld demostraren l'existència de dues varietats antigèniques en el grup A (subgrups A_1 i A_2) que corresponien als productes de dos al·lels. Els antígens A_1 poden aglutinar amb la mateixa avidesa tots els sèrums anti-A de sang B i O, sempre i quan tinguin títol suficient. De la mateixa manera reaccionen amb les lectines de *Dolichus biflorus*. Els fenotipus A_2 reaccionen menys intensament amb els mateixos anticossos anti-A de la sang B i de la O, però no ho fan amb els sèrums anti- A_1 . En canvi, són sensibles a l'acció de la lectina *Ulex europaeus* (lectina anti-H). Aquestes variants reapareixien a nivell de grup AB, podent-se, doncs, dividir-se en A_1B i A_2B .

Posteriorment han anat apareixent més subgrups, de freqüència fenotípica inferior. Els principals es mostren en la taula 6.

La diferent reaccionabilitat dels eritròcits A_1 i A_2 enfront dels sèrums anti-A s'ha intentat explicar, afirmant en alguns casos que la base molecular de la diferència era quantitativa, i, en altres, que era qualitativa.

Segons la hipòtesi quantitativa els eritròcits A_1 tindrien més determinants A que els A_2 , i, per contra, els eritròcits A_2 tindrien més determinants H.

Aquesta hipòtesi està recolzada per estudis realitzats amb α -3-N-acetilgalactosaminiltransferases purificades de sèrum de tipus A_1 i A_2 , que mostren que l'enzim dels individus A_2 és menys eficient en comparació amb l'enzim A_1 (SCHECHTER et al., 1971). Tots dos enzims mostren tenir acceptors d'idèntica especificitat, emprant acceptors de baix pes molecular, però amb valors diferents de K_M , pH òptim i necessitats de cations (SCHACHTER et al., 1973).

Fenotipus de l'eritròcit	Prova globular					Prova sèrica			Substància en saliva	
	anti-A	anti-B	anti(A,B)	anti-H	anti-A ₁	A ₁	A ₂	B		0
A ₁	++++	0	++++	0	++++	0	0	++++	0	A + H
A _{int}	++++	0	++++	+++	++	0	0	++++	0	A + H
A ₂	++++	0	++++	++	0	*	0	++++	0	A + H
A ₃	++	0	++	+++	0	*	0	++++	0	A + H
A _m	0/±	0	0/±	++++	0	0	0	++++	0	A + H
A _x	0/±0	0	+ / ++	++++	0	++	0/+	++++	0	H
B	0	++++	++++	0		++++	++++	0	0	B + H
B ₃	0	+	++	++++		++++	++++	0	0	B + H
B _m	0	0	0/±	++++		++++	++++	0	0	B + H
B _x	0	0/±	0/++	++++		++++	++++	0	0	H

TAULA 6.- Reaccions serològiques dels fenotipus A i B. De + a +++++, aglutinació d'intensitat creixent; ± aglutinació feble; 0 no aglutinació; * en aquests fenotipus l'ocurrència d'anti-A₁ és variable.

SCHENKEL-BRUNNER i TUPY (1973) confirmaren les desigualtats cinètiques dels enzims que transfereixen exactament N-acetil-D-galactosamina sobre la substància H dels líquids biològics i converteixen els eritròcits 0 en A, però ho fan a velocitats de reacció molt diferents.

El model qualitatiu es fonamenta en la hipòtesi que els determinants antigènics són estructuralment diferents, i així, mentre la transferasa A₂ només faria servir estructures d'acceptor amb cadenes de tipus 2 (cf. taula 4), les transferases A₁ adicionarien N-acetil-D-galactosamina tant a cadenes del tipus 1 com a cadenes de tipus 2 (MORENO et al., 1971).

Per altre part, s'ha comprovat en glicoesfingolípids que hi ha una menor quantitat de cadenes glucídiques ramificades amb determinants A en la sang A₂, suggerint això que l'enzim A₂ emprava de forma menys eficient com acceptors les estructures molt ramificades degut a impediments estèrics.

El fet que persones de grup sanguini A₂ puguin, a vegades, produir anticòsos anti-eritròcits A₁ s'explica per aquest model.

Un altre diferència qualitativa ha estat el fet que els glicolípid amb activitat d'un o altre subgrup es troben associats a proteïnes diferents en la membrana eritrocítica.

En un estudi realitzat en saliva d'humans (secretors i no secretors) (LE PENDU et al., 1983b i 1983c) es comprovà en els secretors que l'enzim A₂ és també menys eficient en la saliva de donants Lewis positius que en la de Lewis negatius, deduint que la principal diferència entre la saliva d'individus A₁ i A₂ és que l'enzim A₂ és menys eficient que l'A₁ quan competeixen amb l'enzim Lewis pel seu acceptor comú H.

En els no secretors es comprovà que els antígens A i B trobats en la saliva tenen menys eficiència i una heterogenicitat més gran en comparació amb els antígens trobats en la saliva dels secretors.

Recentment, l'estudi amb anticossos monoclonals, per una part, i d'oligosacàrids sintètics, per un altre, ha portat a la hipòtesi de que la base molecular de la diferenciació entre els subgrups A rau tant en propietats quantitatives com qualitatives.

2.3.4. *FUNCIO DELS ANTIGENS ABH*

La funció biològica dels antígens ABH és, encara, desconeguda, si be ja s'ha indicat en parlar de la funció dels antígens de grup sanguini en general que se sap que són antígens de diferenciació i que estan molt lligats als processos oncogènics (FEIZI 1985).

En els càncers d'estòmag o de pàncreas la quantitat d'antígens A i B està molt alterada. En quant a la composició glucídica dels mateixos, així com augmenta la proporció d'àcid siàlic en els antígens MN, minva en els ABH la de galactosa i també la de N-acetilgalactosamina. En molts tumors apareix un polisacàrid amb activitat H, i en altres es troben antígens incompatibles (antígens semblants els A en individus dels grups B o O).

Els antígens del grup ABO també estan relacionats amb l'antigen carcinoembrional (CEA); aquest és un antigen que es troba present en el tracte gastrointestinal fetal i en els tumors d'aquest tracte, però no està present en el tracte gastrointestinal normal de l'adult.

La fracció glucídica d'aquest antigen és molt semblant a la fracció glucídica dels antígens ABH. L'antigen carcinoembrional no pot distingir-se de les substàncies de grup sanguini per tècniques de filtració per gel i electroforesi, i mostra la mateixa solubilitat i similar composició en glúcids i aminoàcids. Els estudis immunoquímics donen suport a la idea de que l'antigen CEA és una substància de grup sanguini ABO incompleta.

2.4. EL CARÀCTER LIPÍDIC I/O PROTEÏNIC DELS ANTÍGENS ERITROCÍTICS ABH

Els eritròcits no foren en un principi la font d'elecció d'antígens de grup ABO, car aquests s'aïllaven en quantitats molt petites en comparació a quan s'empraven secrecions o cistes ovàrics.

ECONOMIDOU et al.(1967) han determinat els llocs antigènics A i B existents en diferents eritròcits (taula 7). Posteriorment, PINTO DA SILVA et al.(1970) trobaren $8-11 \cdot 10^5$ llocs antigènics A, i actualment, FINNE (1980) ha establert que el nombre de llocs antigènics ABH per cèl·lula és de $1-3 \cdot 10^6$.

Les primeres tentatives d'extreure i aïllar antígens ABH d'eritròcits humans mostraren que les activitats d'aquestes s'havien trobats en fraccions lipídiques solubles en alcohol. Però, aquest caràcter *lipoid* fou immediatament posat en dubte en trobar que aquestes fraccions eren de composició complexa, estant formades per una mescla de fosfolípids i contaminants no lipídics. Un altre punt crític era l'assignació de caràcter haptènic a substàncies lipídiques, puix havia la possibilitat que l'activitat haptènica -com és en realitat- fos deguda a la presència de polisacàrids en la fracció lipídica.

Llocs AA₁ adult: 810.000 a 1.170.000A₁ cordó umbilical: 250.000 a 370.000A₂ adult: 240.000 a 290.000A₂ cordó umbilical: 140.000A₁B adult: 460.000 a 850.000A₁B cordó umbilical: 220.000A₂B adult: 120.000Llocs B

B adult: 610.000 a 830.000

A₁B adult: 310.000 a 560.000

TAULA 7. - Nombre de llocs antigènics en diferents tipus de sang humana.

L'ús de tècniques com la cromatografia en columna i en capa fina, feu que es pogués analitzar l'estructura d'alguns d'aquests antígens, resultant ésser glicoesfingolípid (YAMAKAWA et al.1960). Des d'ençà semblà establerta l'estructura glicolipídica dels antígens ABH presents en la membrana de l'eritròcit, reservant l'estructura glicoproteïna als antígens de les secrecions dels individus secretors. Investigacions posteriors indicaren, però, la possibilitat de que existissin glicoproteïnes en la membrana de l'eritròcit que no eren solubles en aigua i que es podien extreure amb detergents, solvents orgànics o agents caotròpics.

Per contra, els que postulaven com estructura única i característica dels antígens eritrocítics ABH la lipídica, argumentaven que l'activitat antigènica que es trobava en les preparacions proteïniques era deguda a la contaminació d'aquestes pels lípids antigènics, o bé que l'error es produïa a causa de la forta unió entre els antígens lipídics ABH i la glicoproteïna amb activitat MN.

L'existència d'esfingolípid molt glicosilats palesada per DEJTER-JUSZINSKI et al.(1978) i que tenien, malgrat el seu caràcter lipídic, propietats semblants a les de les glicoproteïnes, sembla la darrera tentativa en voler assignar un caràcter exclusivament lipídic als antígens ABH de la membrana de l'eritròcit.

La gran distribució dels antígens ABH per tot l'organisme i el fet de que les glicosiltransferases que catalitzen l'adició de sucres sobre les estructures de grup sanguini, no reconeixen el *carrier* i actuen tant sobre els lípids com sobre proteïnes (FINNE 1980) són fets que fonamenten l'opinió que els antígens ABH poden trobar-se en l'eritròcit en forma lipídica o proteïnica. VIITALA et al.(1982) indiquen que la major part (60-70%) dels determinants antigènics de l'eritròcit estan en cadenes glucídiques d'alt pes molecular unides, per enllaç N-glicosídic, a les proteïnes 4.5 i banda 3, mentre que la resta es troba, principalment, en lípids complexos poliglicosilats, i una petita part en petits glicolípid i polisacàrids.

Les taules 8 i 9 assenyalen les investigacions que han tingut com a finalitat l'aïllament d'antígens glicoproteïnics o glicolípidics, respectivament.

-
- Morawiecki, A. (1964) *Biochim.Biophys.Acta*, 83, 339.
- Poulik, M.D. i Lauf, K. (1965) *Nature*, 208, 874.
- Zahler, P. (1968) *Vox Sang.*, 15, 81.
- Whitemore, M.B. et al. (1969) *Vox Sang.*, 17, 289.
- Winzler, R.J. (1969) en "Red Cell Membranes" (dirigida per G.A.Jamieson i T.J.Greenwald), pp.157, Ed.Lippincott, Philadelphia.
- Gardas, A. i Koscielak, J. (1971) *Vox Sang.*, 20, 137.
- Yatziv, S. i Flowers, H.M. (1971) *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 45, 514.
- Marchesi, V.T. et al. (1972) *Proc.Nat.Acad.Sci.USA*, 69, 1445.
- Tanner, M.J.A. i Boxer, D.H. (1972) *Biochem.J.*, 129, 333.
- Hamaguchi, H. i Cleve, H. (1972) *Biochem.Biophys.Acta*, 278, 271.
- Cleve, H. et al. (1972) *J.Exp.Med.*, 136, 1140.
- Howe, C. et al. (1972) *Methods Enzymol.*, 28, 236.
- Akyama, Y. i Osawa, T. (1972) *Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.*, 353, 323.
- Fukuda, M. i Osawa, T. (1973) *J.biol.Chem.*, 248, 5100.
- Gardas, A. i Koscielak, J. (1973) *Eur.J.Biochem.*, 32, 178.
- Blumenfeld, O.O. i Zvilichovsky, B. (1974) *Methods Enzymol.*, 31, 168.
- Fujita, S. i Cleve, H. (1975) *Biochem.Biophys.Acta*, 382, 172.
- Anstee, D.J. i Tanner, M.J.A. (1975) *Vox Sang.*, 29, 378.
- Arimori, S. i Shinozawa, S. (1975) *Arerugi*, 24, 139.
- Takasaki, S. i Kobata, A. (1976) *J.biol.Chem.*, 251, 3610.
- Tanner, M.J.A. i Anstee, D.J. (1976) *Biochem.J.*, 153, 265.
- Kent, S.P. et al. (1977) *Vox Sang.*, 33, 193.
- Simmonds, R.J. i Yon, R.J. (1977) *Biochem.J.*, 163, 397.
- Bianchini, F. i Ceriotti, G. (1978) *Animal Blood Groups and Biochemical Genetics*, 8, supl.,1, 8.
- Lee, L.T. et al. (1978) *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*, 158, 530.
- Finne, J. et al. (1978) *FEBS Letters*, 89, 111.
- Takasaki, S. et al. (1978) *J.biol.Chem.*, 253, 6086.
- Miyamoto, S. (1979) *Hirosaki Igaku*, 31, 195.
- Blumenfeld, O.O. i Puglia, K.V. (1979) *Biochim.Biophys.Acta*, 579, 95.
- Pratt, R. i Cook, G.M.W. (1979) *Biochem.J.*, 179, 299.
- Drzeniek, Z. i Lisowska, E. (1979) *Arch.Immunol., Ther.Exp.*, 27, 253.
- Mehta, N.G. (1980) *J.Membr.Biol.*, 52, 17.
- Karkhi, K.K. i Gahnberg, C.G. (1980) *Biochem.Biophys.Acta*, 622, 344.
-

TAULA 8.- Dades bibliogràfiques dels autors que han aïllat substàncies glicoproteïniques amb caràcter ABO a partir d'eritrocits humans.

-
- Landsteiner, K. i van der Scheer, J. (1925) *J.Exp.Med.*, 42, 123.
- Witebsky, E. (1927) *München.Med.Wochenschr.*, 74, 1581.
- Eisler, M. i Moritsch, P. (1928) *Z.Immunitätsforsch.*, 57, 421.
- Tokura, M. (1952) *Tohoku J.Exp.Med.*, 56, 299.
- Yamakawa, T. i Iida, T. (1953) *J.Exp.Med.*, 23, 327.
- Yamakawa, T. et al. (1960) *J.Biochem.*, 48, 490.
- Handa, S. (1963) *Jap.J.Exp.Med.*, 33, 347.
- Koscielak, J. (1963) *Biochem.Biophys.Acta*, 78, 313.
- Hakomori, S. et al. (1967) *J.Immunol.*, 98, 31.
- Hakomori, S. i Strycharz, G.D. (1968) *Biochemistry*, 7, 1279.
- Koscielak, J. et al. (1970) en "Blood and Tissue Antigens" (dirigida per D.Aminoff)
pp.163-176, Academic Press, Nova York.
- Yang, H.J. i Hakomori, S. (1971) *J.biol.Chem.*, 246, 1192.
- Hakomori, S. et al. (1972) *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 49, 1061.
- Thieif, O.W. (1972) *Blut*, 24, 314.
- Stellner, K. et al. (1973) *Biochemistry*, 12, 656.
- Wherrett, J. i Hakomori, S. (1973) *J.biol.Chem.*, 248, 3046.
- Koscielak, J. et al. (1973) *Eur.J.Biochem.*, 37, 214.
- Gardas, A. i Koscielak, J. (1974) *FEBS Letters*, 42, 101.
- Wanatabe, K. et al. (1975) *Biochemistry*, 14, 2725.
- Hanfand, P. i Egli, H. (1975) *Vox Sang.*, 28, 438.
- Hanfand, P. (1975) *Chem.Phys.Lipids*, 15, 105.
- Koscielak, J. et al. (1976) *Eur.J.Biochem.*, 71, 9.
- Gardas, A. (1976) *Eur.J.Biochem.*, 68, 177.
- Nagano, T. et al. (1977) *Nippon Hoigaku Zasshi*, 31, 180.
- Tsuji, T. et al. (1977) *Nippon Hoigaku Zasshi*, 31, 185.
- Kent, S.P. et al. (1977) *Vox Sang.*, 33, 193.
- Hakomori, S. (1978) *Methods Enzymol.*, 50, 207 i 211.
- Dejter-Juszynski, M. et al. (1978) *Eur.J.Biochem.*, 83, 363.
- Slomiany, A. i Slomiany, B. (1978) *FEBS Letters*, 90, 293.
- Koscielak, J. et al. (1978) *Arch.Immunol. Ther. Exp.*, 26, 117.
- Bianchini, F. i Ceriotti, G. (1978) *Animal Blood Groups and Biochemical Genetics*,
8, supl. 1, 8.
- Nishi, T. et al. (1979) *Nippon Hoigaku Zasshi*, 33, 86.
- Mehta, N.G. (1980) *J.Membr.Biol.*, 52, 17
-

TAULA 9. - Dades bibliogràfiques dels autors que han aïllat substàncies glicolí-
pídiques amb activitat de grup ABO a partir d'eritròcits humans.

3. MEMBRANES BIOLÒGIQUES

Les membranes biològiques són estructures, de les quals la funció fonamental és definir els límits entre els espais intra i extracel·lular i entre diversos espais intracel·lulars. Totes les altres funcions són una conseqüència de la capacitat de les membranes de servir de barreres de permeabilitat entre espais fluids.

La membrana plasmàtica d'una cèl·lula (o *plasmalemma*) és, per tant, un límit impermeable o semipermeable entre l'interior i l'exterior de la cèl·lula. L'existència d'una barrera semipermeable implica que la membrana ha de transferir alguna matèria (substàncies necessàries per al creixement i llurs productes metabòlics) i informació (com és el cas de la resposta de la cèl·lula a les hormones o en el fenomen de l'excitabilitat) a través d'aquest límit. A més, la presència d'una barrera limitant proporciona a la cèl·lula amb una superfície externa, l'estructura que li permet el reconèixer la presència d'altres cèl·lules similars o diferents, i que la distingeix d'unes altre de tipus diferent (es poden considerar els fenòmens d'inhibició per contacte, histocompatibilitat i activitat receptora de virus).

Un altre fet de la membrana que explica satisfactoriament algunes de les propietats funcionals és la capacitat de la superfície d'actuar com un suport estereo-específic dels enzims que realitzen una sèrie d'accions, com seria el cas de la fosforilació oxidativa en el mitocondri.

Durant molts d'anys, la idea de membrana cel·lular ha existit a un nivell quasi exclusivament conceptual i anà parella amb el concepte cel·lular definit per Schleiden i Schwann en 1839.

Fricke en 1923 mesurà la capacitància de la membrana de l'eritròcit, que fou de $0.81 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. En altres membranes es trobà uns valors de capacitància de $\sim 1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, la qual cosa feu suposar una similitud entre totes les membranes.

Davant aixó, la primera qüestió que sorgeix és si un únic model de membrana pot abastar totes les membranes cel·lulars o, al contrari, si l'estructura de cada membrana en particular és única i diferent a la de les altres. La resposta, probablement, se situa entre ambdós extrems, és a dir, hi ha una gran similitud entre les diferents membranes, alhora que cada membrana pot diferir en detalls que depenen de la seva composició molecular, o bé en la forma que aquests components interactuen.

3.1. ESTRUCTURA DE LA MEMBRANA

La primera estructura assignada a la membrana fou la d'una *pel·lícula monocapa*. La presència en la membrana de fosfolípids i el caràcter anfipàtic d'aquests feu que la membrana cel·lular fos relacionada amb les capes monomoleculares. Les experiències de LANGMUIR (1942) mostraren que les pel·lícules de fosfolípids podien plegar-se sobre sí mateixes formant capes múltiples en les que les superfícies polars i no polars estaven alternativament iustapostes.

En 1925 GORTER i GREDEL calcularen que els lípids presents en un eritròcit representaven el doble que el mínim valor d'àrea que calia per a formar una monocapa. Aixó menà al concepte de *dobla capa lipídica*.

La integració de les proteïnes en aquesta bicapa lipídica fou un problema solucionat per DANIELLI i DAVSON (1935) que proposaren un model en el que les proteïnes globulars estan sobre els grups polars dels fosfolípids de cada una de les cares (figura 2a). En aquest model destacava el grup hidròfil en la perifèria i l'hidròfob a l'interior. Com aquesta ordenació correspon a una estructura d'un gruix de tan sols unes molècules, quedava molt per dessota del poder de resolució del microscopi ordinari.

Amb l'aparició del microscopi electrònic no tardaren en aparèixer resultats importants. L'aparença similar en la seva superfície externa de tipus de cèl·lules molt diferents, així com de les membranes dels orgànuls existents dins d'aquelles, com és el cas dels mitocondris, portaren a ROBERTSON (1959) a la conclusió de que aquestes estructures s'havien format a partir d'una *unitat de membrana*.

Aquesta unitat oferiria una estructura de tres estrats, amb dues formacions molt destacades d'un gruixor d'uns 2.5 nm cadascuna i separades entre si per un àrea, ja menys diferenciada, de la mateixa amplada. En el desenvolupament de la teoria de la *unitat de membrana* realitzada a partir de membranes de mielina, Robertson identificà les formacions denses amb les substàncies proteïques i els grups hidròfils, i les àrees menys diferenciades amb les cadenes hidrocarbonades (figura 2 b).

La teoria de la *unitat de membrana* introduí un nou paradigma que fou acceptat durant 15 anys. Amb tot, la teoria presentava certes inconsistències, molt més patents quan s'estudiaven membranes d'altres materials que no fossin la mielina. QUINN (1976) ha destacat l'absència teòrica d'interaccions hidrofòbiques entre les proteïnes i els lípids, i la necessitat real de procediments dràstics per al trencament de les membranes.

Altres punts febles de la teoria eren la no explicació de la fluïdesa de les membranes i el no tenir en compte les proteïnes penetrants.

Per a solventar aquests punts fluïxos es desenvoluparen una sèrie de teories molt variades que han estat agrupades sota l'epígraf de *models subunitaris de membrana* (ROBERTSON 1981). La part essencial d'aquests models es trobava en la no assignació de la bicapa lipídica com a fet dominant de l'estructura.

Però no tan sols sorgiren problemes a nivell conceptual; existien també dificultats que tenien llur origen en les preparacions histològiques prèvies a la utilització del microscopi (CHAPMAN 1968). Per observar el material biològic cal que aquest es *fixi*, emprant per això permanganat potàsic o tetròxid d'osmi. Però aquests fixadors intervien també com a *colorants* al formar combinacions específiques amb alguns components de la membrana, car en la interacció dels feixos d'electrons amb els àtoms de la preparació, a l'ésser més pesants els dels fixadors, en comparació amb els del material de la membrana (carboni, hidrogen, oxigen i nitrogen), la contribució del fixador a l'electromicrofotografia és majoritària.

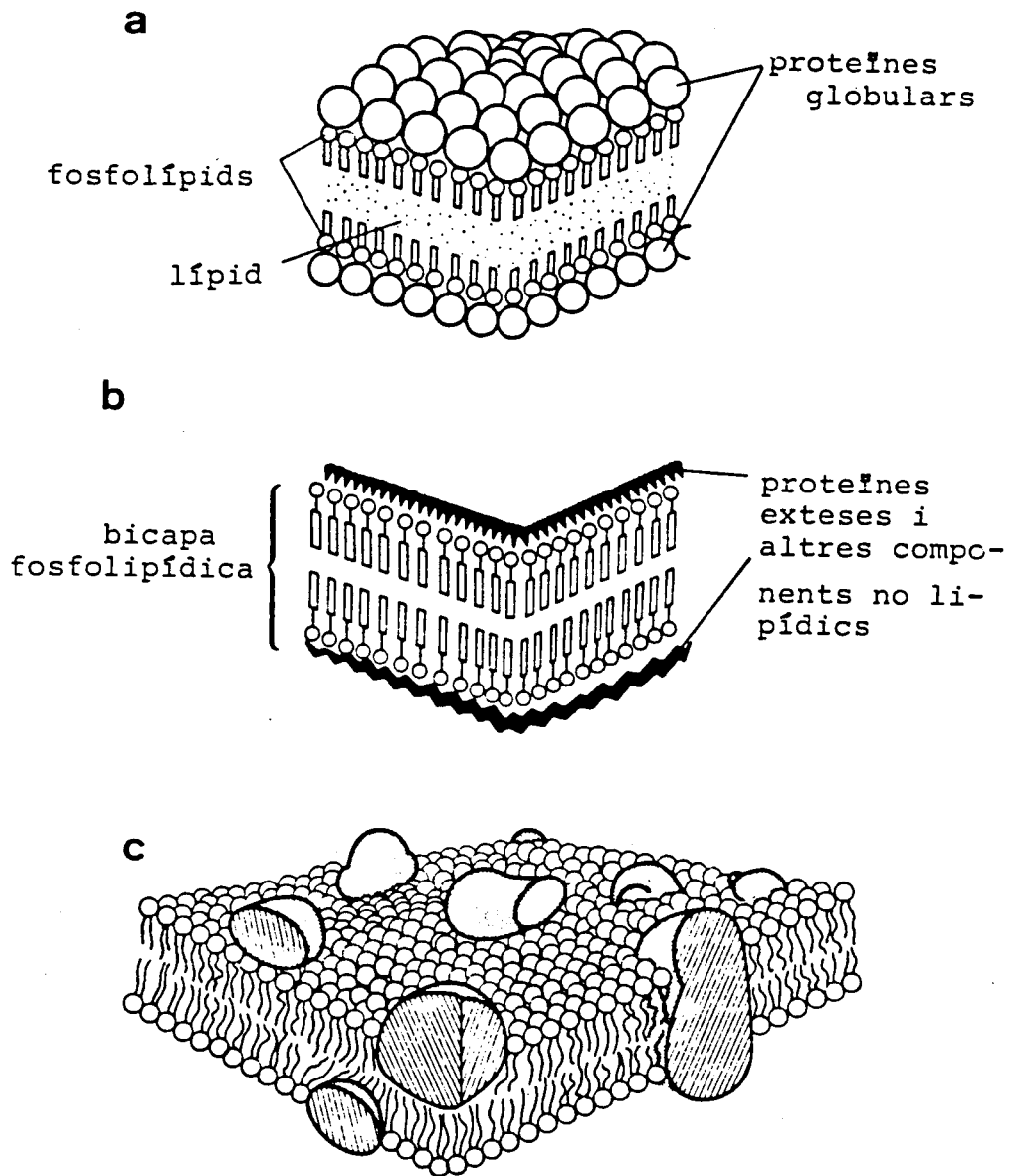


FIGURA 2.- Diferents representacions de models de membrana: (a) segons Daniells i Davson, (b) segons Robertson, (c) segons Singer i Nicolson (Extret de QUINN: The molecular biology of cell membrane, 1976).

Així, les estructures denses que s'observaren en les preparacions de membrana se suposà, al no trobar cap interpretació molecular satisfactòria, que eren degudes a la reacció del fixador amb els restes hidrocarbonats de la molècula fosfolípídica.

Les dificultats de la fixació química es resolgueren amb el mètode de MÜHLETHALER (1971) conegut com de *congelació i gravat*. Aquest consisteix en la congelació brusca, generalment en presència de glicerol, d'una mostra de petit tamany que s'introdueix a baixa temperatura en una cambra de buit per a que un cop arribat a un alt grau de buit, seccionar la superfície de la mostra amb una ganiveta també a baixa temperatura. A continuació, la temperatura de la mostra es puja fins a -100°C , la qual cosa produeix la sublimació d'una pel·lícula de gel molt fina, resultant, d'aquesta manera, la superfície seccionada gravada per sublimació al buit. Tot d'una, aquesta superfície seccionada s'ombreja amb un metall pesant, per a formar, finalment, una rèplica carbonada de la superfície en qüestió i procedir al seu examen en el microscopi electrònic.

Aquesta tècnica permeté a SINGER i NICOLSON (1972) postular la teoria del *mosaic fluid*, paradigma vàlid a hores d'ara (figura 2 c). Aquesta teoria, que està d'acord amb la termodinàmica dels sistemes macromoleculars, explica l'elevada mobilitat dels components individuals de la membrana. Així, segons Singer i Nicolson, la matriu de la membrana és una bicapa lipídica en la que les proteïnes integrals, amb estructura globular, estan absorbides per forces predominantment polars o estan interpolades en la bicapa, en contacte directe amb la regió hidrofòbica de la membrana.

A manera d'exemple aclaridor es podria dir que les proteïnes estan surant sobre la capa lipídica com si fossin un *iceberg*, penetrant, en part o en la seva totalitat, dins de la bicapa. Aquestes proteïnes poden estar unides a oligosacàrids, formant glicoproteïnes, o a lípids específics, donant lloc a lipoproteïnes.

Les molècules de les proteïnes globulars, a l'igual que els fosfolípids, són anfipàtiques. Es a dir, són estructuralment asimètriques, un extrem és molt polar i l'altre no polar.

La regió polar és aquella en la que els residus dels aminoàcids iònics i els residus sacàrids estan presents, i és la que està en contacte amb la fase aquosa en la membrana intacta; la regió no polar està mancada de residus iònics i/o de sucres, conté, per la seva part, la majoria dels residus no polars i està immersa a l'interior hidrofòbic de la membrana (figura 3).

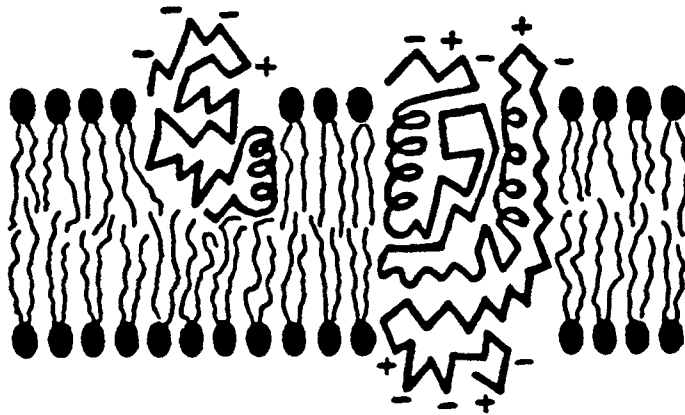


FIGURA 3.- Tall esquemàtic del model de mosaic fluid. Els fosfolípids estan representats pels cercles negres amb les dues cues. El cercle representa els grups terminals polars i iònics, mentre que les dues cues són les cadenes d'àcids grassos. Els fosfolípids estan disposats en una bicapa discontinua amb els extrems iònics i polars en contacte amb l'aigua. Les proteïnes integrals, amb les línies gruixudes representant les cadenes polipeptídiques plegades, es mostren com proteïnes globulars parcialment encastades en, i parcialment sobresortint d'ella, la membrana. Les parts que sobresurten tenen sobre llurs superfícies els residus iònics (+ o -) de la proteïna, mentre que els residus no polars es troben en les parts encastades, d'acord amb això les molècules de la proteïna són anfipàtiques. El grau en que les proteïnes integrals estan encastades i, en particular, si travessen el gruix de la membrana, depen del tamany i estructura de les molècules (De SINGER i NICOLSON, 1972).

L'estructura anfipàtica adoptada per una proteïna integral encastada en la membrana està sota control termodinàmic; és a dir, està determinada per la seqüència d'aminoàcids i l'estructura covalent de la molècula, i per la interacció amb l'entorn molecular de manera que l'energia lliure del sistema sigui mínima.

Una proteïna integral, amb tamany i estructura escaients, o un agregat apropiat de proteïnes, poden travessar la membrana de forma completa. En aquest cas, hi ha regions en contacte amb el solvent aquós a ambdues cares de la membrana.

Aquesta teoria presuposa un model dinàmic de la membrana cel·lular on tant els lípids com les proteïnes tenen una considerable llibertat de moviments, si be, està demostrat que existeix un gradient de flexibilitat en la bicapa. En els lípids, les zones més properes a la superfície de la bicapa són menys flexibles que les que es troben al centre de la mateixa. En canvi, les molècules lipídiques es troben lliures per a difondre lateralment, de manera semblant a les molècules d'una fina pel·lícula de líquid: canvien de posició amb una freqüència de l'ordre d'un mil·lió de cops per segon. No obstant, a la tercera dimensió, la mobilitat dels lípids està molt restringida. Per a que una molècula de lípid salti d'un nivell a un altre -fenomen que en anglès es coneix com *flip-flop*- el cap polar ha de passar a través de la part central hidrofòbica de la membrana, en la que és insoluble. Estudis realitzats indiquen que la tasa de *flip-flop* és tan baixa que una determinada molècula lipídica fa només un pas un cop al mes.

Com la bicapa lipídica és un fluid bidimensional, qualsevol proteïna inclosa en ella pot difondre lateralment. El caràcter fluid simplifica la tasca d'ensamblatge de la membrana, car tant les molècules lipídiques com les proteïniques poden insertar-se en qualsevol part amb la seguretat de que eventualment romandran en un altre punt. Per un altre part, la baixa freqüència de *flip-flop* permet als dos nivells oposats, la conservació de les diferents composicions de lípids i proteïnes (KORNBERG i McCONNELL, 1971).

Les membranes cel·lulars són asimètriques respecte la distribució dels lípids específics en cada una de les meitats de la bicapa, així com de les proteïnes i glicoproteïnes en una de les superfícies. A més, les membranes tenen, sovint, una distribució no uniforme de proteïnes, glicoproteïnes, lípids i glicolípid en el pla de la membrana. Per altre part, la majoria d'aquestes membranes no són estructures autònomes sinó que estan unides a altres orgànuls cel·lulars per un sistema citoesquelètic compost de microfilaments, microtúbuls i, potser, filaments intermediaris (LOTAN i NICOLSON, 1978).

L'asimetria d'aquesta estructura permet que els receptors hormo- nals, els anticosos, de virus, de lectines i d'altres agents, esti- guin presents exclusivament en la superfície externa on es troben ex- postos a l'entorn extracel·lular. L'ordenació asimètrica d'aquests components també permet el flux vectorial d'informació a través de la membrana.

Malgrat tot, certs aspectes d'aquesta teoria han de sotmetre's a revisió, essent el principal la predominància del concepte de bicapa lipídica en la descripció de la membrana, puix les propietats mecani- coquímiques de les membranes han resultat ésser completament dife- rents a les de les bicapes lipídiques. En 1974 SINGER proposà que l'espectrina feia de malla en la superfície del citoplasma i restrin- gia, d'aquesta manera, el moviment de les proteïnes integrals. Aixó fa que , en part, el model del mosaïc fluid sigui compatible amb les propietats mecanoquímiques.

L'espectroscòpia de resonància magnètica nuclear dels protons permet observar que l'aigua està present en les membranes naturals estant associada, en part, al component proteic. Aquesta tècnica tam- bé s'ha emprat per estudiar la mobilitat dels lípids en la membrana. JACOBS i OLDFIELD (1981) indiquen que la membrana citoplasmàtica és generalment més fluida que l'externa.

3.2. COMPONENTS DE LA MEMBRANA

Les membranes biològiques estan compostes principalment de lí- pids, proteïnes i glúcids. Les membranes també contenen ions com com- ponents intrínsecs i altres petites molècules, i també petites quan- titats d'àcid ribonucleic, però la proporció relativa d'aquests com- ponents és petita en relació amb els tres components majoritaris.

La relació proteïna:lípid:glúcid varia considerablement de mem- brana a membrana, passant de 75:25:0 en la membrana d'*Halobacterium Halobium*, a 49:43:8 en la de l'eritròcit humà, i tenint com extrem opost la relació 18:79:3 per a la mielina (GUIDOTTI 1972 a).

- *Lípids*

Tots els lípids de membrana són anfipàtics. En les membranes de les cèl·lules eucariòtiques hi ha tres grups principals de lípids (GUIDOTTI 1972 b):

- a) fosfolípids: molècules en les que un grup glicerol o un grup esfingosina estan units a una cadena d'àcids grassos i a un grup fosfat. Els principals fosfolípids són la lecitina, la cefalina i la esfingomielina.
- b) glicolípid: consten d'una ceramida que està esterificada en el grup hidroxil en posició C-1 per una hexosa simple o un grup d'oligosacàrids. Hi ha quatre tipus de glicolípid: cerebròsids, ceramides polihexòsides, sulfàtids i gangliòsids.
- e) esterols: el principal dels quals és el colesterol. El paper del colesterol en les membranes rau en el control de la fluidesa de les cadenes hidrocarbonades dels fosfolípids, la qual cosa permet el manteniment d'un estat semilíquid més que d'un estat semisòlid. Es podria dir que el colesterol actua com un equalitzador de la fluidesa de la membrana.

STEIM et al.(1969) han observat que en els bacteris aquesta funció la realitzen els àcids grassos i la quantitat de colesterol en llurs membranes és quasi nul·la.

HARRISON i LUNT (1977) indiquen també l'existència, encara que en petita quantitat, d'àcids grassos lliures, i d'àcids mono, di i triglicèrids. Tot i que la composició lipídica en un tipus particular de membrana és relativament constant, aquesta composició varia molt d'una membrana a un altre.

La figura 4 indica de forma esquemàtica la diferent composició, prenguent com a base el pes sec, de quatre tipus de membrana (DAVIES 1979).

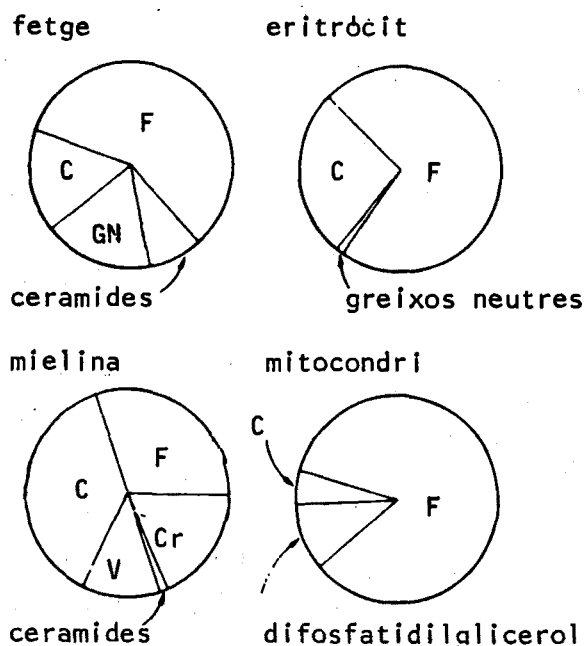


FIGURA 4.- Composició lipídica de quatre tipus de membrana: C) colesterol; F) fosfolípids; GN) greixos neutres; Cr) cerebròsids; V) varis.

- Proteïnes

Les proteïnes de membrana poden ésser perifèriques o integrals.

Les perifèriques són aquelles que aconsegueixen les següents propietats:

- s'extreuen de les membranes de forma intacta només incrementant la força iònica del medi o afegint un agent quelant
- es dissocien lliures de lípids
- en estat dissociat són relativament solubles en solucions aquoses.

Això suggereix que aquestes proteïnes estan unides a les membranes per forces febles no covalents (potser de tipus electrostàtic). Exemples d'aquestes proteïnes són el citocrom c de les membranes mitocondrials i l'espectrina dels eritròcits.

No obstant això, la major proporció de les proteïnes de membrana (>70%) correspon a les proteïnes integrals, caracteritzades per que:

- requereixen tractaments molt dràstics per obtenir-les de les membranes: detergents, àcids biliars, desnaturalitzants o solvents orgànics.

- poden formar agregats amb altres proteïnes
- en alguns casos estan unides a sucres, formant glicoproteïnes
- si no formen glicoproteïnes no són solubles en medis aquosos
- presenten una enorme heterogenicitat respecte al pes molecular
- no existeix cap seqüència d'aminoàcids que es pugui relacionar amb una proteïna estructural.

Amb tot, el que determina que una proteïna sigui perifèrica o integral és la seqüència dels aminoàcids. En les primeres, la disposició dels grups polars és simètricament quasi esfèrica, podent d'aquesta manera, interaccionar tota la superfície amb les molècules d'aigua i esdevenen proteïnes solubles monodisperses. En les integrals, la disposició dels grups polars i no polars de la proteïna permet adoptar l'estructura anfipàtica (figura 5).

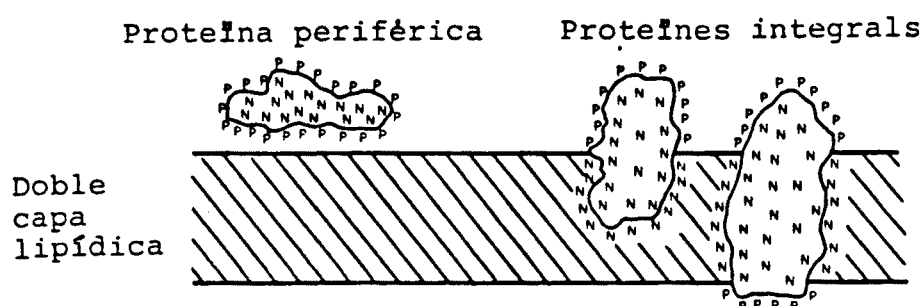


FIGURA 5.- Disposició de les proteïnes perifèriques i integrals respecte a la bicapa lipídica; P = grups polars; N = grups no polars.

Estudis realitzats emprant el dicromisme circular revelen l'existència de quantitats variables de conformació α -hèlix en les proteïnes integrals. Recientment, l'estudi de la bacteriorodopsina (un monòmer) i del citocrom oxidasa (un dímer) (UNWIN i HENDERSON 1984) mitjançant difracció d'electrons ha menat a la conclusió de que el plegament de les proteïnes integrals és semblant al de les perifèriques.

Així, les cadenes semblen plegar-se en grups regulars d' α -hèlix i fulles β en les zones proteïques que travessen la part interior hidrofòbica de la bicapa, i mostren torsions i plegaments irregulars fora de la membrana.

- Glúcids

Els glúcids de les membranes biològiques dels mamífers no es troben en forma aïllada sinó formant enllaços amb lípids (glicolípid, ja descrits) o amb proteïnes (glicoproteïnes).

Malgrat ésser, pel que fa a la masa, un dels constituents menors de la membrana, el component glucídics tenen molt d'interés car són responsables, si més no en part, dels processos de reconeixement cel·lular a escala molecular i dels de comunicació amb l'entorn (reaccions antígen-anticòs, recepció d'hormones, recepció de virus, interaccions cèl·lula-cèl·lula), és a dir, dels fenòmens socials de la cèl·lula i dels que marquen la seva identitat. Aquesta darrera funció té un significat molt important, des d'el moment que s'ha demostrat que els glúcids presents en la superfície cel·lular s'alteren quan la cèl·lula esdevé cancerosa.

La funció dels glúcids en les membranes plasmàtiques dels no mamífers és poc coneguda. Mentre s'han trobat glicolípid en cèl·lules de bacteris, fongs i plantes superiors, només es pot assegurar una funció estructural de les glicoproteïnes com a constituent de la paret cel·lular (HARRISON i LUNT, 1977).

SHARON (1975) ha descrit el paper essencial que tenen unes glicoproteïnes en actuar com a factors sexuals en dues soques copulants del llevat *Hansenula wingei*.

Tan sols s'han trobat 9 monosacàrids en les glicoproteïnes, que generalment es combinen formant oligosacàrids de no més de 15 unitats de sucre. Els sucres detectats són (CANDY 1980):

- D-galactosa
- D-manosa
- L-fucosa (6-desoxi-L-galactosa)
- N-acetil-D-glucosamina
- N-acetil-D-galactosamina
- D-glucosa
- àcids siàlics (àcid N-acetilneuramínic i àcid N-glicolilneuramínic)

- D-xilosa (només en les plantes)
- L-arabinosa (només en les plantes)

La quantitat i tipus de sucre varia d'una classe de membrana a altre, però la majoria de les membranes plasmàtiques de mamífers contenen d'un 2 a 10% en pes de glúcid. Amb l'excepció de les membranes de Golgi, la major part de les membranes intracel·lulars contenen molts pocs glúcids.

Els glúcids estan units a la cadena polipeptídica per una unió O-glicosídica, àlcali làbil, entre un carboni lateral de l'acetilgalactosamina i els grups hidroxil de la serina o de la treonina. Alternativament es formen enllaços N-glicosídics (o glicosilamínics) entre una acetilglucosamina i el nitrogen amídic d'una asparagina.

També s'ha postulat l'existència d'enllaços entre la cisteïna i la glucosa, observats en glicopèptids aïllats de la membrana eritrocítica i trobats també en l'orina (WALBORG 1978).

La ruptura de l'enllaç glicosídic per una base es produeix mitjançant reaccions de β -eliminació.

En una sèrie de glicoproteïnes, que no són membranars, però que amb tota seguretat, poden servir de pauta general, s'ha predit l'estructura secundària del segment peptídic que s'enllaça amb el sucre, fent ús de la determinació de CHOU i FASMAN (1974). Hom observa que la part glucídica d'una glicoproteïna es troba en la zona externa, essent l'enllaç del tipus anòmer β (AUBERT et al. 1976).

Les glicoproteïnes de membrana poden ésser de dos tipus: glicoproteïnes integrals en les que una part de la cadena peptídica està associada amb la regió hidrofòbica de la bicapa, o glicoproteïnes perifèriques que no s'associen amb la regió hidrofòbica de la bicapa, però que poden associar-se amb la superfície externa de la membrana a través d'enllaços iònics.

També s'ha trobat que certes glicoproteïnes poden existir en complexos oligomèrics (WANG i RICHARDS, 1974) o en complexos amb proteïnes perifèriques (ELGSAETER et al. 1976).

Un dels postulats essencials del model dels mosaic fluid, el de la seva concepció dinàmica, es palesa respecte les glicoproteïnes per mesures de la mobilitat lateral d'aquestes. Hom dedueix que mentre algunes poden difondre lliurement o rotar al voltant d'un eix normal al pla de la membrana, d'altres tenen els moviments limitats a causa de l'associació que tenen amb elements del citoesquelet (figura 6).

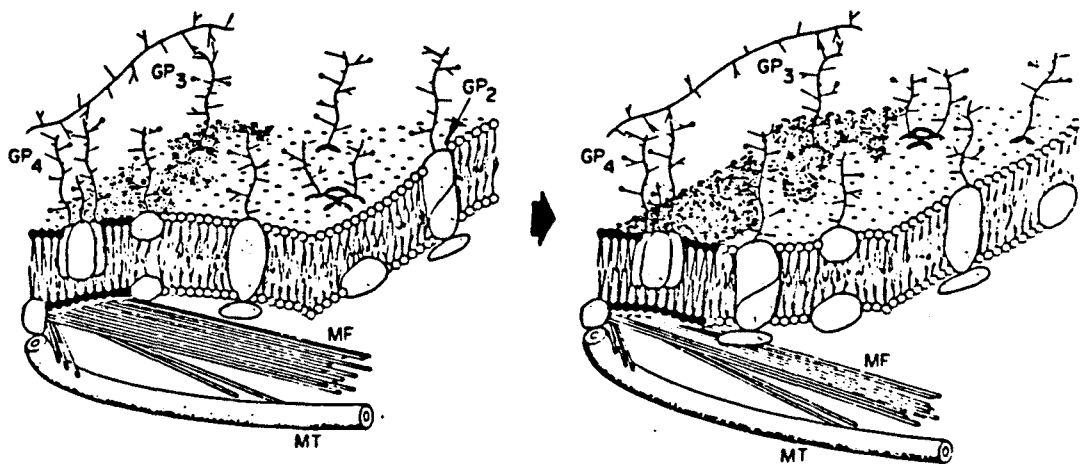


FIGURA 6.- Model del mosaic fluid de l'estructura de membrana. La representació esquematitza el control transmembranar sobre la distribució i mobilitat de les glicoproteïnes de la superfície cel·lular pels components perifèrics i el citoesquelet associat a la membrana. En aquest exemple, la mobilitat dels complexos de glicoproteïnes integrals GP₃ i GP₄ està controlada pels components perifèrics de la superfície externa i també per unions transmembranars amb elements citoesquelètics associats a la membrana. Per altre part, els complexos GP₃ i GP₄ poden ésser retinguts en la zona específica dels lípids (àrea ombrejada), mentre que el complex GP₂ existeix en un estat lliure o no estàtic amb capacitat de mobilitat lateral. (MF) microfilaments; (MT) microtúbuls (NICOLSON 1976).

Aquesta jerarquia de mobilitats per als diferents components de la membrana sugereix que la cèl·lula pot controlar la mobilitat d'alguns components a fi de mantenir una certa formació topogràfica determinada pels receptors cel·lulars en la identificació i altres fenòmens cel·lulars que requereixen una comunicació transmembranar. Com que aquests ordenaments topogràfics són dinàmics i no estàtics, poden ocórrer canvis ràpids i reversibles en la topografia membranar en resposta a estímuls intra o extracel·lulars.

Finalment cal assenyalar l'existència d'asimetria respecte els glúcids: aquests sempre es troben en la cara externa de la membrana.

4. LA MEMBRANA DE L'ERITROCIT HUMÀ

La membrana eritrocítica separa el contingut de l'eritrocit del medi exterior. Aquest és l'únic orgue que posseeix, les funcions del qual són mecàniques i de transport.

La membrana eritrocítica ha estat objecte de nombrosos estudis. Aquests poden realitzar-se en cèl·lules intactes o en membranes obtingudes per tractament dels eritrocits amb medis hemolítics que alliberen l'hemoglobina i permeten obtenir l'estroma (ghost, o sigui fantasma, en la terminologia anglesa). L'estroma pot formar vesícules que es distingeixen segons llur permeabilitat i orientació. Les vesícules que tenen una permeabilitat semblant a la dels eritrocits es coneixen com *segellades* (resealed), les que tenen la permeabilitat augmentada s'anomenen *foradades* (leaky). En quant a l'orientació, les vesícules poden tancar-se de forma normal (right side out) o en forma invertida (inside out).

Aquestes diferenciacions en les propietats de les vesícules s'obtenen segons les diverses metodologies d'obtenció d'estromes. Entre les membranes aïllades i les cèl·lules intactes poden haver diferències significatives. La diferent susceptibilitat entre l'estroma i la cèl·lula enfront l'atac de les fosfolipases (totes les fosfolipases són actives enfront dels estromes, mentre que sols algunes ho són enfront les membranes intactes) feu que ZWAAL i ROELOFFSEN (1976) possessin en dubte la bondat del model del mosaic fluid.

Els estromes poden mostrar algunes de les formes observades en els eritrocits intactes. Aquests canvis de forma van acompanyats de canvis de volum. Ambdós canvis són reversibles i no dependents de l'energia (JOHNSON et al. 1980).

HEATH et al. (1982) han estudiat per difracció per làser la deformabilitat de les membranes aïllades, trobant que, al contrari del que es creia, la concentració fisiològica de calci és menyspreable quan es compara el seu efecte al de la deshidratació cel·lular.

Existeix l'evidència que la deformabilitat de l'eritròcit inalterat minva amb l'edat. LINDERKAMP i MEISELMAN (1982) han determinat les propietats mecàniques, osmòtiques i geomètriques d'eritròcits, joves i vells, emprant tècniques micropipètiques. Els resultats indiquen que la disminució relativa de la superfície de la membrana i l'increment de la viscositat poden ésser determinants importants que afecten el descens de la deformabilitat.

Si bé, en línees generals, es pot assignar un model de membrana per un eritròcit interespecífic, les diferències ja entre les espècies de mamífers són prou importants com per a no poder fer pas una generalització global. Així, per exemple, la relació entre el component fosfolipídic i el colesterol és en els mamífers aproximadament constant, però hi ha marcades diferències de valor en les diferents fraccions de fosfolípids. Com exemple, la figura 7 mostra gràficament la composició lipídica en quatre espècies.

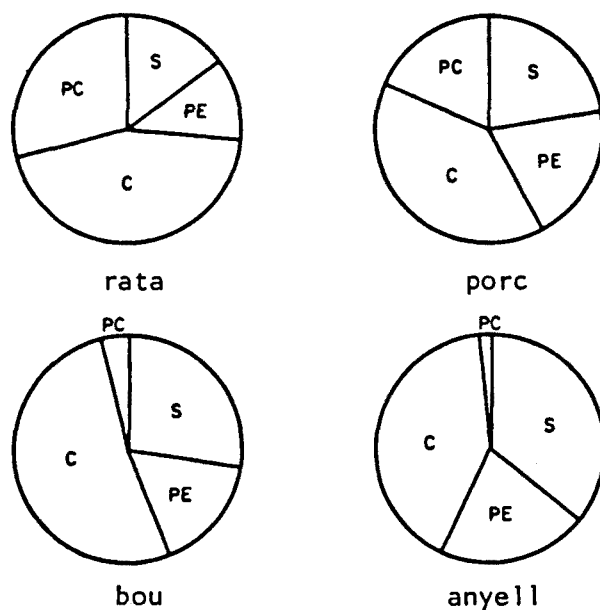


FIGURA 7.- Variació de la proporció d'esfingomielina (S) i fosfatidilcolina (PC) en la fracció lipídica total dels eritròcits de varies espècies. Els lípids remanents consisteixen principalment en colesterol (C) i fosfatidiletanolamina (PE). La suma de fosfatidilcolina i esfingomielina és un valor relativament constant dels lípids de la membrana però la relació entre ambdós fosfolípids varia segons l'espècie.

Els eritròcits humans tenen especificitat d'espècie, és a dir, es distingeixen dels eritròcits d'altres espècies de mamífers. En proves d'hemaglutinació, la diferent titulació del sèrum anti-eritròcit humà enfront de mostres antigèniques d'origen desconegut és un valor indicatiu de l'origen de la sang (HARA et al., 1982).

4.1. CARACTERISTIQUES GENERALS

Cada eritròcit te una masa compresa entre 1.25-1.35 pg, una densitat de 1.15 g/mL, una superfície de 140 μm^2 , un gruix de 7.5 nm i un volum de 101 μm^3 .

Les membranes eritrocítiques humanes estan formades per un 52% de proteïnes, un 40% de lípids i un 8% de glúcids, respecte a la masa total.

En general es pot considerar que aquesta estructura és un sistema multisubunitari que conté les següents molècules:

- 200·10⁶ molècules de fosfolípids
- 240·10⁶ molècules de colesterol
- 12·10⁶ molècules de glicolípid
- 6·10⁶ molècules de proteïnes

i un nombre no especificat d'ions i petites molècules.

Comparant la reactivitat de la membrana de forma intacta o en forma de vesícula oberta s'ha pogut estudiar la superfície citoplasmàtica de la membrana i així comprovar una de les propietats més importants de la membrana, la seva asimetria.

4.2. LÍPIDS

Els lípids de la membrana de l'eritròcit estan compostos per:

- fosfolípids (glicerofosfolípids i esfingomielines)
- glicoesfingolípid
- colesterol

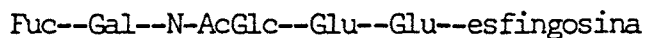
Els glicerofosfolípids constitueixen el 50-70% dels lípids totals de la membrana. Els fosfolípids de colina (fosfatidilcolina i esfingomielines) representen, per la seva part, el 50-60% dels fosfolípids totals (taula 10).

LÍPID	% DE FÓSFOR LIPÍDIC TOTAL
Fosfatidiletanolamina	26.03
Fosfatidilcolina	28.25
Esfingomielina	24.57
Fosfatidilserina	13.38
Acid fosfatídic	2.07
Fosfatidil inositol	1.13
Lisofosfatidilcolina	1.06
Components menors	3.52

TAULA 10.- Components majoritaris fosfolipídics de l'eritròcit humà.

La relació fosfatidilcolina/esfingomielina és molt variable, mentre en els herbívors hi ha poca fosfatidilcolina i molta esfingomielina, en la resta de mamífers el component majoritari és la fosfatidilcolina.

Els glicoesfingolípid o glicolípid contribueixen en el 5-20% dels lípids. Els glicolípid amb activitat de grup ABH contenen fucosa, galactosa, N-acetilglucosamina, glucosa i, en el cas dels antígens A, N-acetilgalactosamina. Posteriorment s'ha trobat que també formen complexos poli-(glicosil)-ceramides. KOSCIELAK et al.(1978) proposa la fórmula general següent per a les glicosilceramides:



i amb 2-3 residus de N-acetilgalactosamina en cas de glicosilceramides amb activitat de grup sanguini A. HAKOMORI (1978) ha desenvolupat un mètode per a separar aquests glicolípid segons la longitud de les cadenes. DEJTER-JUSZYNSKI et al.(1978) han aïllat uns esfingolípid molt glicosilats, amb activitat ABH, que són solubles en aigua i se separen junt amb les glicoproteïnes en l'extracció cloroformo-metanòlica.

El colesterol constitueix el 24-45% dels lípids. Té molta importància en la fluïdesa i viscoelasticitat de la membrana (CHABANEL et al. 1983), si bé en el cas de l'aglutinació en fred han d'intervenir altres factors (FLAMM 1982).

Els gangliòsids i els sulfàtids no s'han trobat en les membranes d'eritròcits humans, però els gangliòsids estan presents en la membrana de l'eritròcit de cavall, gos i gat.

Les principals característiques estructurals de la bicapa lipídica són la mobilitat lateral i l'asimetria. En la part externa de la membrana de l'eritròcit es troben glicoesfingolípid, fosfatidilcolina i esfingomièlina, mentre que a la interna hi ha fosfatidiletanolamina i fosfatidilserina.

S'ha comprovat amb fluofurs que la fluidesa de la bicapa lipídica de l'eritròcit és més gran en la part externa que en la interna (COGAN i SCHACHTER, 1981).

L'asimetria de la membrana de l'eritròcit, pel que fa als lípids, s'ha palesat utilitzant marcadors específics de certs grups químics i també amb l'ús de fosfolipases i esfingomièlinasa. Segons els enllaços que trenquin, les fosfolipases es classifiquen en: fosfolipasa A₂ (present en el verí d'algunes serps), fosfolipases B i C (presentes en alguns microorganismes) i fosfolipasa D. Les fosfolipases no hidrolitzen l'esfingomièlina, que és atacada per una esfingomièlinasa extreta de *Staphylococcus aureus*.

En l'home, l'estudi dels efectes comparats de diferents fosfolipases A sobre els eritròcits intactes i sobre les vesícules permeables, ha permès valorar en un 66% la fracció de fosfatidilcolines localitzades en la cara externa; la utilització de l'esfingomièlinasa, per altre part, ha permès establir que el 80% de les esfingomièlines es troben en la cara externa. Aquests resultats estan d'acord amb els obtinguts gràcies al marcatge químic dels grups de la superfície de membrana. Així, si els eritròcits d'hervíbers resisteixen millor el verí de serp que altres mamífers, és degut a que el principal fosfolípid de la part externa de la membrana és l'esfingomièlina, resistent a la fosfolipasa A₂ del verí.

A la desigualtat de la distribució dels grups polars en les dues capes de la membrana, hi ha que afegir una desigualtat de les càrregues (només les fosfatidilserines posseeixen una càrrega negativa neta a pH fisiològic) i una desigualtat en la distribució de les cadenes policarbonades (les cadenes policarbonades de la part externa són més saturades que les de la part interna).

Els eritròcits són capaços de canviar llurs fosfolípids amb els fosfolípids plasmàtics. Això fa que l'absència de síntesi *de novo* de fosfolípids en l'eritròcit no impliqui necessàriament l'absència de tota renovació fosfolipídica durant la vida dels eritròcits. Cal afegir que l'eritròcit és susceptible de bescanviar el seu colesterol. Així, la membrana perd el seu colesterol quan els eritròcits estan en un sèrum pobre en colesterol o en contacte amb liposomes sense colesterol. Un esgotament important del colesterol de la membrana eritrocítica modifica la seva permeabilitat. Per contra, la membrana s'enriqueix en colesterol quan els eritròcits es posen en contacte amb liposomes rics en colesterol, produint, així, un aplanament dels eritròcits.

4.3. PROTEÏNES

L'estudi i localització de les proteïnes de membrana s'ha realitzat en eritròcits sencers, en estroma o en vesícules, normals o invertides. Aquest estudi comprén, a més, diferents tractaments amb molècules marcadores o proteòlisi produïda per enzims proteolítics.

Altres mètodes d'estudi inclouen la tècnica de *congelació i gravat* i les tècniques immunoquímiques que empren anticossos específics d'un antigen determinat present en la superfície de la membrana.

Una característica diferenciadora de les proteïnes de la membrana de l'eritròcit és la menor mobilitat lateral en la superfície externa en comparació amb la que gaudeixen proteïnes d'altres teixits (PETERS et al., 1974). Les proteïnes que apareixen sobre la superfície exterior de la membrana són transmembranars i entren en contacte en la cara interna de la membrana amb una proteïna especial, l'espectrina; aquestes interaccions explicarien la limitació de la mobilitat lateral de les principals proteïnes de la membrana eritrocítica.

El valor del contingut proteic de la membrana eritrocítica varia segons la tècnica emprada en la quantificació. Així es té 0.57 pg per *ghost* quan s'analitza el contingut en nitrogen i 0.673 pg/*ghost* segons la valoració colorimètrica de Lowry. SHELTON i LANGDON (1984) quantifiquen les proteïnes de l'eritròcit després de separar-les per PAGE-SDS i valorant les taques per anàlisi d'aminoàcids, trobant un valor de 0.375 (± 0.034) pg/*ghost*.

El contingut en aminoàcids de la membrana de l'eritròcit segons ROSENBERG i GUIDOTTI (1968)(taula 11) no mostra diferència significativa amb altres membranes.

LYS	5.2	HIS	2.4	ARG	4.5
ASP	8.5	THR	5.9	SER	6.3
GLU	12.2	PRO	4.3	GLY	6.7
ALA	8.1	¹ / ₂ CYS	1.1	VAL	7.1
MET	2.0	ILE	5.3	LEU	11.3
TYR	2.4	PHE	4.2	TRP	2.5

TAULA 11.- Composició en aminoàcids (en % de mols) dels polipèptids de les membranes dels eritròcits humans.

La primera sistemàtica de les proteïnes s'assolí quan hom desenvolupà la tècnica d'electroforesi en gel de poliacrilamida en presència de dodecil sulfat sòdic (SDS).

FAIRBANKS et al.(1971) obtingueren la separació de 7 bandes proteïniques (numerades del 1 al 7) després de tenyir-les amb Blue-Coomassie, colorant no específic de proteïnes, i quatre bandes (PAS-1, PAS-2, PAS-3 i PAS-4), després de la tinció amb el colorant d'Schiff, colorant específic de glicoproteïnes (figura 8). Aquesta és la nomenclatura amb la que esconeixen les proteïnes de la membrana de l'eritròcit i que ha estat lleugerament modificada en 1974 per STECK.

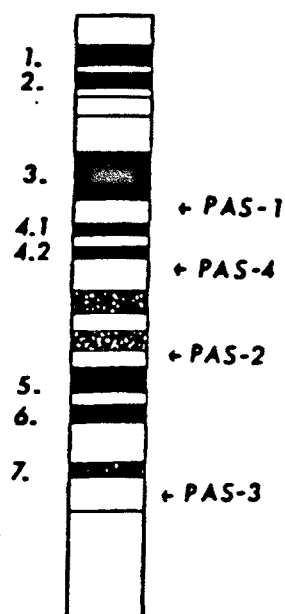


FIGURA 8.- Electroforograma de les proteïnes de membrana de l'eritròcit en gel de poliacrilamida en SDS. Les bandes indicades com 4.1 i 4.2 no se separen en les condicions emprades en el treball original de Fairbanks et al.(PICARD 1977).

La figura 9 mostra la mesura densitomètrica d'aquestes taques electroforètiques.

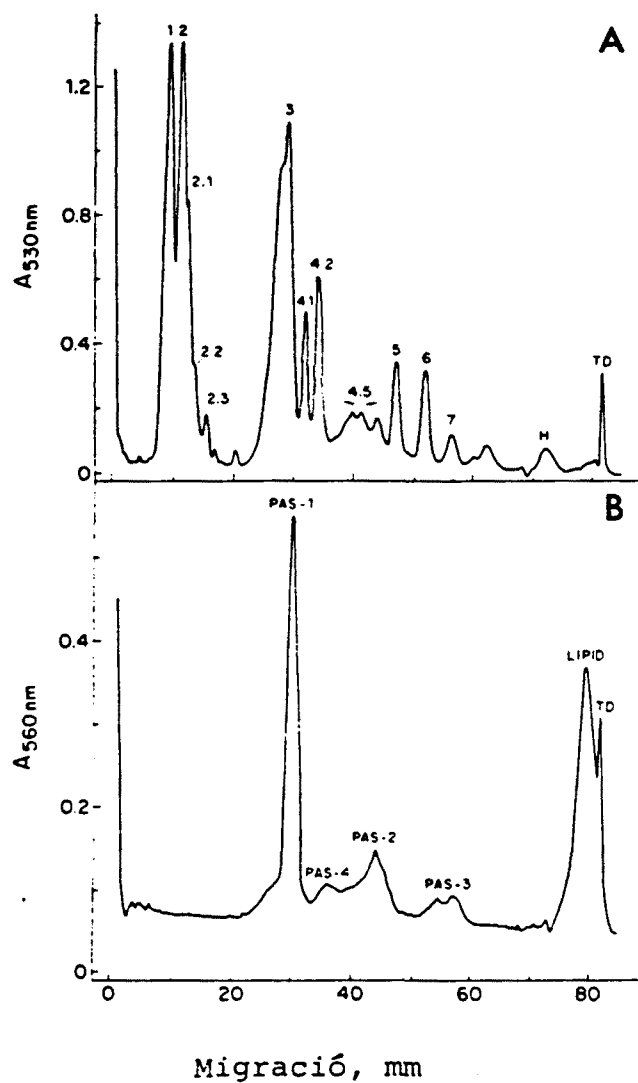


FIGURA 9.- Polipèptids i glicoproteïnes de membrana de l'eritròcit. (A) Mesura densitomètrica d'un gel tenyit amb Blue-Coomassie després de l'electroforesi de 10 μ L de *ghosts* empacats (40 μ g de proteïna). (B) Un gel similar tenyit amb PAS. H, cadenes polipeptídiques d'hemoglobina; TD, senyal del registre del colorant (STECK 1974).

Junt amb aquests polipèptids hi ha d'altres que pel seu tamany no són tenyits i que han pogut identificar-se en base a la seva activitat enzimàtica.

També hi ha un grup de glicopèptids que no són marcats pel colorant PAS i han estat detectats per tècniques enzimàtiques de marcatge (GAHMBERG i HAKOMORI, 1973).

4.3.1. DESCRIPCIÓ GENERAL

A continuació es descriuen les principals proteïnes de la membrana de l'eritròcit.

4.3.1.1. Proteïnes revelades en l'electroforesi pel colorant Blue-Coomassie.

a) Proteïnes 1 i 2: constitueixen el que genèricament s'anomena espectrina. Aquesta és el constituent més gran de la membrana de l'eritròcit (representa el 25% de les proteïnes membranars) (FAIRBANKS et al., 1971). Està composta de dues subunitats desiguals: la α (o proteïna 1), de 240000 daltons, i la β (o proteïna 2) de 220000 daltons. Els dímers i altres derivats es formen per l'associació de subunitats α amb subunitats β ; aquestes últimes solen estar fosforilades (MARCHE-SI 1983).

Aquestes són proteïnes perifèriques situades en la cara interna de la membrana. Pel que fa al tamany, composició de les subunitats i propietats hidrodinàmiques, són semblants al complexe actomiosina del teixit muscular (GUIDOTTI 1972 a).

Formen amb la proteïna 5 (o actina eritrocítica) un sistema contràctil sobre la cara interna de la membrana, essent el conjunt el responsable de les propietats mecàniques dels eritròcits. Per altre part, la modulació dels caràcters reològics dels eritròcits es realitza a través de la fosforilació de l'espectrina.

HARRIS i NEEM (1978) han pogut separar les dues subunitats de l'espectrina, que tenen valors de 9.0 S i 22.5 S, respectivament.

Per la seva part, DUNBAR i RALSTON (1980) han caracteritzat de forma hidrodinàmica heterodímers de l'espectrina. La mesura dels paràmetres termodinàmics del dímer han resultat incompatibles amb una estructura globular compacta i amb un model de cilindre rígid. El pes molecular del dímer és, per aquests investigadors, de 470.000, mentre que per a JI et al. (1980) és de 420.000, 710.000 per al trímer i 910.000 per al tetràmer, valors trobats a partir de l'entrecreuament de les membranes amb reactius heterobifuncionals fotosensibles.

L'espectrina estableix interaccions específiques amb les zones de la proteïna 3 i de la glicoforina que sobresurten per la cara interna, cosa que sembla frenar la mobilitat lateral de les proteïnes transmembranars. L'alteració d'aquestes interaccions està relacionada amb diverses malalties sanguïnees hereditàries (GOODMAN i SHIFFER, 1983).

L'espectrina està ancorada a la bicapa lipídica a través de l'associació de la subunitat β amb una proteïna unida a la membrana que fou identificada com banda 2.1 i que actualment s'anomena anquirina o sindeïna. Aquesta és una proteïna globular de 200.000 daltons i, si bé, mediatitza l'acostament de l'espectrina a la membrana, no pot ésser considerada una proteïna integral (COHEN 1983).

b) Proteïna 3: Es la major proteïna de la membrana. Representa prop del 30% de la masa proteica. Es una proteïna integral de pes molecular aproximat de 100.000. S'hidrolitza per una pronasa en un polipèptid de 70.000 i altres pèptids més petits (GUIDOTTI 1972 a).

Aquesta proteïna és la responsable del transport d'anions a través de la membrana (CABANTCHIK et al., 1975), i també del transport, per difusió facilitada, de la glucosa, i controla, a més, els moviments de l'aigua deguts a les eventuais variacions de la pressió osmòtica.

Aquesta proteïna conté un 5-8% de glúcids i una inusual composició d'aminoàcids en la que aproximadament el 50% dels residus són no polars. En aquest aspecte s'assembla a la proteïna proteolipídica de la mielina. Consta de dues parts estructuralment diferents: un fragment de 43.000 daltons (amb el N-terminal) situat en la superfície citoplasmàtica soluble en aigua. No actua en el transport d'ions i la seva funció és la unió a l'esquelet de la membrana.

Aquest fragment també s'uneix a enzims glicolítis i a l'hemoglobina. Un altre fragment, aquest de 52.000 daltons, es troba associat hidrofòbicaament a la membrana. Per ruptura amb quimiotripsina hom obté un fragment de 35.000 daltons que es troba fora de la membrana i conté el C-terminal. Es un fragment molt glicosilat que conté els aminoàcids necessaris per al transport d'ions (bescanvia un anió Cl^- per cada HCO_3^-). Entre aquest fragment i el residu citoplasmàtic, roman, després de la ruptura enzimàtica, un fragment de 17.000 daltons, que creua la membrana un nombre senar de cops, donat que l'extrem N terminal és intracel·lular i l'extrem C-terminal està en la zona susceptible a l'atac per la quimiotripsina. Els fragments de 17.000 i 35.000 daltons romanen associats no covalentment després de la ruptura extracel·lular amb quimiotripsina; la proteòlisi no produeix inhibició del transport d'ions.

BOXER et al.(1974) radioiodinitzant membranes intactes i estromes, comprovaren que l'organització d'aquesta proteïna era la mateixa en ambdós casos.

JENKINS i TANNER (1977 b) han tractat proteolíticament la proteïna amb termolisina i tripsina. En tots els fragments obtinguts s'han trobats glúcids, si be en més quantitat en la zona C-terminal. Aquesta zona també conté els receptors per a la concanavalina A i les lectines de *Phaseolus vulgaris* i *Ricinus communis*. Els mateixos autors (1977 a) indiquen que el tipus de fragments obtinguts és dependent de la força iònica.

FINNE (1980) ha trobat que aquesta proteïna te activitat de grup. Aquest fet no havia estat descobert abans car aquest component no se solubilitzava ni amb la tècnica del cloroform-metanol (HAMAGUCHI i CLEVE, 1972) ni amb la del diodesalicilat de liti (MARCHESI i ANDREWS 1971).

YOKOI et al.(1983) han detectat l'activitat sanguínea Rh-Hr en la banda 3 obtinguda de l'estroma de sang D^+ .

Per altre part, aquesta proteïna es troba associada en forma de dímers, que, a la vegada, poden associar-se en tetràmers. La cinètica de la inhibició del transport iònic per estilbenodisulfonats indica que la inhibició reversible d'una subunitat no afecta el transport iònic de l'altre subunitat. Aixó no implica, necessàriament, que el monòmer tot sol pugui transportar els ions (JENNINGS 1984).

c) Proteïna 4: Apareix en quatre zones, bandes 4.1 i 4.2, regió 4.5 i banda 4.9. Les bandes 4.1 i 4.2 tenen unes masses de 78.000 i 72.000 respectivament. La banda 4.1 és una proteïna globular que forma part de l'esquelet eritrocític. Apareix com una única banda quan se sotmet a electroforesi en gel que emprà una sola solució amortidora, però quan s'empra una solució amortidora discontinua, apareix com un doblet espaiat designat per 4.1a i 4.1b (MÜLLER i MORRISON, 1977). ANDERSON i LOURIEN (1984) afirmen que la proteïna 4.1 s'associa específicament al domini citoplasmàtic de la glicoforina sobre les vesícules de la membrana invertida de l'eritròcit. Aquesta associació està regulada per cofactors polifosfoinosítids (ANDERSON i MARCHESI, 1985).

La regió 4.5 és una proteïna perifèrica situada sobre la cara interna de la membrana. FINNE (1980) ha trobat que aquesta banda té activitat de grup sanguini.

La banda 4.9 és una fosfoproteïna de 48.000 daltons. És poc coneguda, sabent-se que està present a concentracions equimolars amb els tetràmers de l'espectrina. SIEGEL i BRANTON (1982) indiquen que el polipèptid 4.9 purificat pot interaccionar amb filaments d'actina a fi de reduir la velocitat de polimerització de l'actina, i possibilitar, d'aquesta manera, l'estabilització d'oligòmers curts d'actina.

d) Proteïna 5: Actualment s'anomena actina eritrocítica. És una proteïna perifèrica de massa molecular 45.000. Forma amb l'espectrina un sistema contràctil responsable de les propietats mecàniques de l'eritròcit.

e) Proteïna 6: És el monòmer del gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa (CARAWAY i SHIN, 1972). És un dels pocs enzims intraeritrocítics en el que el lligam -parcial- envers la membrana és degut a interaccions electrostàtiques específiques, probablement per mitjà de la proteïna 3 (KANT i STECK, 1973). Està situada en la cara interna de la membrana i és del tipus perifèric.

4.3.1.2. Proteïnes revelades en l'electroforesi pel reactiu de Schiff (glicoproteïnes).

Les membranes contenen dos grups principals de glicoproteïnes: les que contenen àcid siàlic i les que no.

En les primeres, l'àcid siàlic està lligat als residus galactosil/N-acetilgalactosaminil en posició penúltima. En les segones, les glicoproteïnes tenen els residus galactosil/N-acetilgalactosaminil sense àcid siàlic. Les glicoproteïnes poden uniformitzar-se trencant l'àcid siàlic amb tripsina.

Les glicoproteïnes són totes integrals, sobresortint la part glucídica totalment en la part externa de la membrana.

a) glicoproteïnes PAS-1 i PAS-2: Es coneixen també com glicoforina, major sialoglicoproteïna i glicoproteïna MN. Representen el 75% de la totalitat de les glicoproteïnes i contenen la major part de l'àcid siàlic. El PAS-1, de 83.500 daltons, és el dímer del PAS-2, de masa compresa entre 47.000 i 50.000 daltons. Ambdues formes són interconvertibles per canvis de temperatura en presència del detergent Triton X-100 (LILJAS et al., 1976).

JAVAID i WINZLER (1974) descrigueren una unitat monomèrica de la glicoforina de masa molecular igual a 24.000, mentre que altres autors com SEGREST et al. (1971) i GREFATH i REYNOLDS (1974) demostraren que la major sialoglicoproteïna estava formada d'agregats. GARVIN (1980) ha trobat que la glicoforina pot presentar tres formes: una, d'una masa molecular de 65.700 daltons, que és un dímer, i 2 formes monomèriques de 31.000 i 27.900 daltons, respectivament. Les tres tenen idèntica densitat de càrrega superficial.

La glicoforina és la molècula membranar de l'eritròcit més ben estudiada. Consta de 131 aminoàcids i 16 cadenes de sucres (TOMITA i MARCHESI, 1975). La molècula es pot dividir en 3 zones: una amb 64 aminoàcids que conté el residu N-terminal i les cadenes glicosídiques. A continuació hi ha una zona central amb 32 aminoàcids no polars, units a les cadenes alifàtiques dels fosfolípids, i finalment 35 aminoàcids que contenen una proporció elevada de residus hidròfils, diàcits, serina i treonina. Aquest segment, que conté el grup C-terminal, està capacitat per a captar cations com el calci i interactuar amb els pèptids bàsics i els grups aminats dels fosfolípids. L'extremitat d'aquesta cadena polipeptídica s'exten per la superfície citoplasmàtica de la membrana.

SCHULTE i MARCHESI (1979) han examinat la conformació de la glicoforina mitjançant difracció circular. En solució aquosa és del 27% d' α -hèlix, 10% de forma β i el 63% de cabdell monoestadístic. En presència del detergent aniònic laurilsulfat sòdic o del *zwitterionic* Ammonyx-10, la conformació sols canvia lleugerament, mostrant un petit increment de la part helicoidal. Segons aquests autors la part glucídica contribueix poc a l'espectre del difracció circular.

STIBENZ i GEYER (1980) han predit l'estructura secundària del segment hidròfil N-terminal. Troben que el 35.9% és d' α -hèlix, el 6.3% de fulla β , el 6.3% de gir β i el 51.5% de cabdell monoestadístic.

LUTZ i FEHR (1979) han trobat la mateixa proporció d'àcid siàlic en eritròcits vells que en joves. Amb tot, el contingut total d'àcid siàlic és un 15% més baix en els eritròcits vells. Aixó pot indicar que hi ha la mateixa relació àcid siàlic/glicoforina en els eritròcits vells que en els joves, però al haver-hi menys àcid siàlic total, implica que amb l'envelliment l'eritròcit perd glicoforines.

La part externa de la glicoforina té activitat de grup sanguini ABO, MN, i porta, a més, els receptors per al virus influenza i les lectines. Les activitats M i N poden ésser separades, sotmetent les glicoproteïnes a un fraccionament en columna de DEAE-Sephadex (COOK i EYLAR, 1965).

Juant amb la relació de l'àcid siàlic amb l'activitat de grup sanguini MN, la presència d'aquest àcid sobre les càrregues glucídiques dels fragments hidròfils en la superfície externa de la membrana explica les propietats electronegatives de la superfície cel·lular.

b) glicoproteïna PAS-3: Té una composició glucídica semblant a la glicoforina. No arriba a sobresurtir en la part interna (FURTHMAYR et al., 1975). El pes molecular és de 25.000.

c) glicoproteïna PAS-4: Es troba situada en l'electroforegrama entre les bandes PAS-1 i PAS-2. És de naturalesa i funció desconegudes (PICARD 1977).

Pel que pertoca a la metodologia emprada per Fairbanks et al., LILJAS (1978) postula l'ús del desoxicolat sòdic (DOC) en comptes del SDS quan es realitza l'electroforesi en gel de poliacrilamida. Aquest detergent assoleix separar quatre zones glicoproteïniques.

L'electroforesi bidimensional amb SDS revela diversos components, tres dels quals migren en la regió del PAS-2. Una de les bandes obtingudes amb l'electroforesi amb DOC, conté el component PAS-3 i aquesta glicoproteïna es presenta com a monòmer, quan s'empra DOC, i com a agregat si s'empra SDS.

La major part de les glicoproteïnes se separen d'acord amb llur pes molecular per PAGE-SDS, però les sialoglicoproteïnes presenten anomalies en la linealitat de la relació migració-pes molecular, car capten més fortament el SDS que les proteïnes perifèriques degut a la presència de glúcids. Aixó condueix a l'error de tenir uns pesos moleculars més elevats que el seu valor real. LILJAS (1978) suposa que probablement passa el mateix amb les altres glicoproteïnes quan s'empra gels de baixa concentració de poliacrilamida. Emprant DOC la unió al detergent és semblant per a totes les proteïnes.

L'activitat de grup sanguini que no sigui la MN (ABO, P, Ss, Le, I, ...) es troba en les glicoproteïnes abans descrites i també està present en altres glicoproteïnes, enmascarades per les PAS o bé formen part del grup de glicoproteïnes menors.

GARDAS i KOSCIELAK (1973) foren els que en primer lloc aïllaren glicoproteïnes amb activitat ABO a partir de l'extracció de l'estroma amb butanol, si bé els autors no descartaven la possibilitat de contaminació de les fraccions glicoproteïniques amb glicolípid.

FUJITA i CLEVE (1975) caracteritzaren dues glicoproteïnes menors amb activitat de grup sanguini A.

MIYAMOTO (1979) emprant lectines de *Phaseolus lunatus* i de *Sophora japonica* han aïllat dues glicoproteïnes que tenen respectivament activitat de grup sanguini A, M i N, i A, B, OM i ON.

Les glicoproteïnes amb activitat ABO, com a substàncies antigèniques que són, ja s'han descrit a l'apartat 2.3. d'aquesta INTRODUCCIÓ.

4.3.1.3. Proteïnes identificades per llur activitat enzimàtica

a) $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPasa}$: Es troba en la cara externa de la membrana. És un enzim numèricament poc freqüent.

b) $\text{Ca}^{++} - \text{ATPasa}$: Està situada en la cara interna. ROSENTHAL et al. (1970) han suggerit que pot estar associada amb l'espectrina.

c) *Protein-quinases*: La zona catalítica es troba en la cara interna (RUBIN et al. 1973) i llur activitat minva amb l'envelliment de l'eritròcit. Llurs principals substrats són la proteïna 2 (espectrina) i la proteïna 3.

d) *Adenilciclasa*: Està situada en la cara interna i si be en les aus està acoblada amb els receptors α -adrenèrgics que es troben en la cara externa, aquest acoblament no ha pogut palesar-se en els eritròcits humans.

e) *Acetilcolinesterasa*: Es una proteïna perifèrica que es pot extreure per tractament amb solucions amortidores d'alta força iònica.

f) Altres activitats enzimàtiques descrites són les de la nucleòsidpirofosfatasa, p-nitrofenil-fosfatasa, 5'-nucleotidasa i catecol-O-metil-transferasa (DELAUNAY 1978).

4.3.2. ORGANITZACIÓ

La figura 10 resum la disposició esquemàtica de les principals proteïnes estructurals de la membrana.

Les proteïnes de l'eritròcit que forma l'esquelet són les que regulen la capacitat de deformació de la membrana i les que proporcionen la forma discoide característica de l'eritròcit.

La capacitat de de deformació de la cèl·lula és cabdal en la funció alliberadora d'oxigen, però també ho és la capacitat de poder suportar la deformació durant el flux. Aquesta propietat està influïda per tres factors diferents: deformabilitat de la membrana, relació àrea de la superfície cel·lular/volum, i viscositat citoplasmàtica.

El paper desenvolupat per les proteïnes de l'esquelet eritrocític no queda circunscrit a les propietats de la membrana, ans també juguen un paper secundari en la regulació de la deformabilitat cel·lular per influència en l'àrea de la superfície cel·lular i, probablement, en el contingut en aigua (MOHANDAS et al., 1983). A més, aquestes proteïnes també controlen la mobilitat i distribució laterals de les glicoproteïnes (SHEETZ 1983).

L'espectrina és el principal component d'aquestes proteïnes, encara que el descens de la flexibilitat de l'espectrina no és el principal mecanisme funcional que pugui fonamentar la deformabilitat de l'eritròcit (MIKKELSEN et al. 1984).

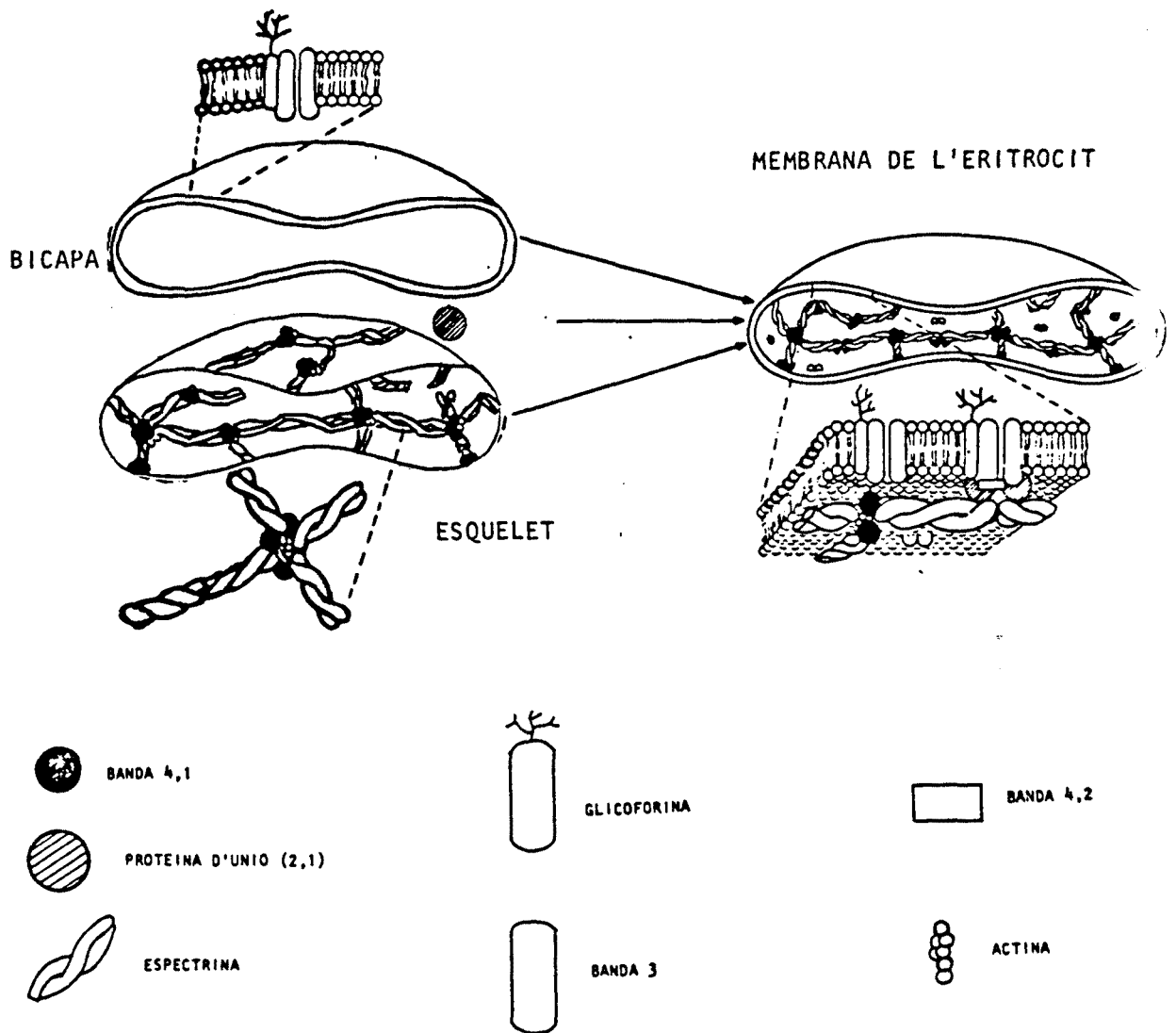


FIGURA 10.- Representació esquemàtica de l'organització de la membrana eritrocítica humana. Tan'en la bicapa lipídica com en l'esquelet de la membrana, la densitat de les proteïnes dibuixades en la figura és menor que la que realment es troba en la membrana (SHEETZ 1983).

En general, cada polipèptid pot ésser assignat a una o altre cara de la membrana. Els components que travessen la membrana ho fan de forma anisotròpica, amb la part glucídica en la cara externa. Estan, per altre part, molt ben ancorats dins del nucli hidrofòbic. Els constituents confinants a la cara interna (amb l'excepció de la proteïna 7) estan units per enllaços més reversibles, presumiblement en punts específics. També estan presents polipèptids oligomèrics que, per la seva part, formen complexos amb altres proteïnes en la superfície citoplasmàtica.

4.4. GLÚCIDS

Els glúcids en la membrana de l'eritròcit es troben units a esfingolípid (un 7% del total glucídic) o a proteïnes (93%).

Els glúcids presents són: galactosa, manosa, fucosa, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina i els àcids siàlics. Aquest últim és el que proporciona la major part de les càrregues negatives de la superfície de l'eritròcit.

El contingut d'aquests sucres, quan s'expressa en nmol/mg de pes sec de membrana, es troba que és significativament més petit en els eritròcits vells que en els joves (BLADIER 1980). No obstant, no s'ha trobat cap diferència entre ambdós tipus de membrana quan les composicions s'expressen com residus per 100 residus de glúcids. Això suggereix que ha d'haver un descens homogeni del contingut glucídic durant l'envelliment *in vivo*.

En un principi es postulava que el nombre mig de residus glucídics units a molècules de lípids o proteïnes era de 15-20, però darrerament s'han trobat residus amb més nombre de glúcids. Aquests sucres poden ramificar-se, possibilitat que és similar en les glicoproteïnes i en els glicolípid. En els glicoesfingolípid el glúcid lligat a l'esfingosina és generalment la glucosa.

Una funció important dels glúcids en les membranes és la d'ancorar els lípids i proteïnes que els porten: el caràcter polar i carregat quasi negativament dels glúcids els impideix endinsar-se en la zona hidrofòbica de la membrana.

Altre funció, molt més subtil, és l'estructural, com quan actuen de determinants antigènics (grups sanguinis) i/o de receptors de diverses substàncies (virus, lectines). Es a dir, l'ordenació particular dels monosacàrids que formen la part glucídica de les glicoproteïnes i glicolípid és la causa de l'especificitat de cada eritròcit.

Segons això, algunes de les glicoproteïnes presents en la membrana eritrocítica són els antigens de grup sanguini ABO, dels que ja s'ha definit llur estructura (cf. apartat 2.3.1. d'aquesta INTRODUCCIO) i de les que, més endavant, es farà l'estudi fisicoquímic en llurs paràmetres més representatius.

AILLAMENT I PURIFICACIÓ DE LA GLICOPROTEINA ANTIGENICA

1. OBTENCIÓ DE L'ESTROMA ERITROCÍTIC

La metodologia emprada per a l'obtenció de l'estroma eritrocític es resumeix en la figura 12.

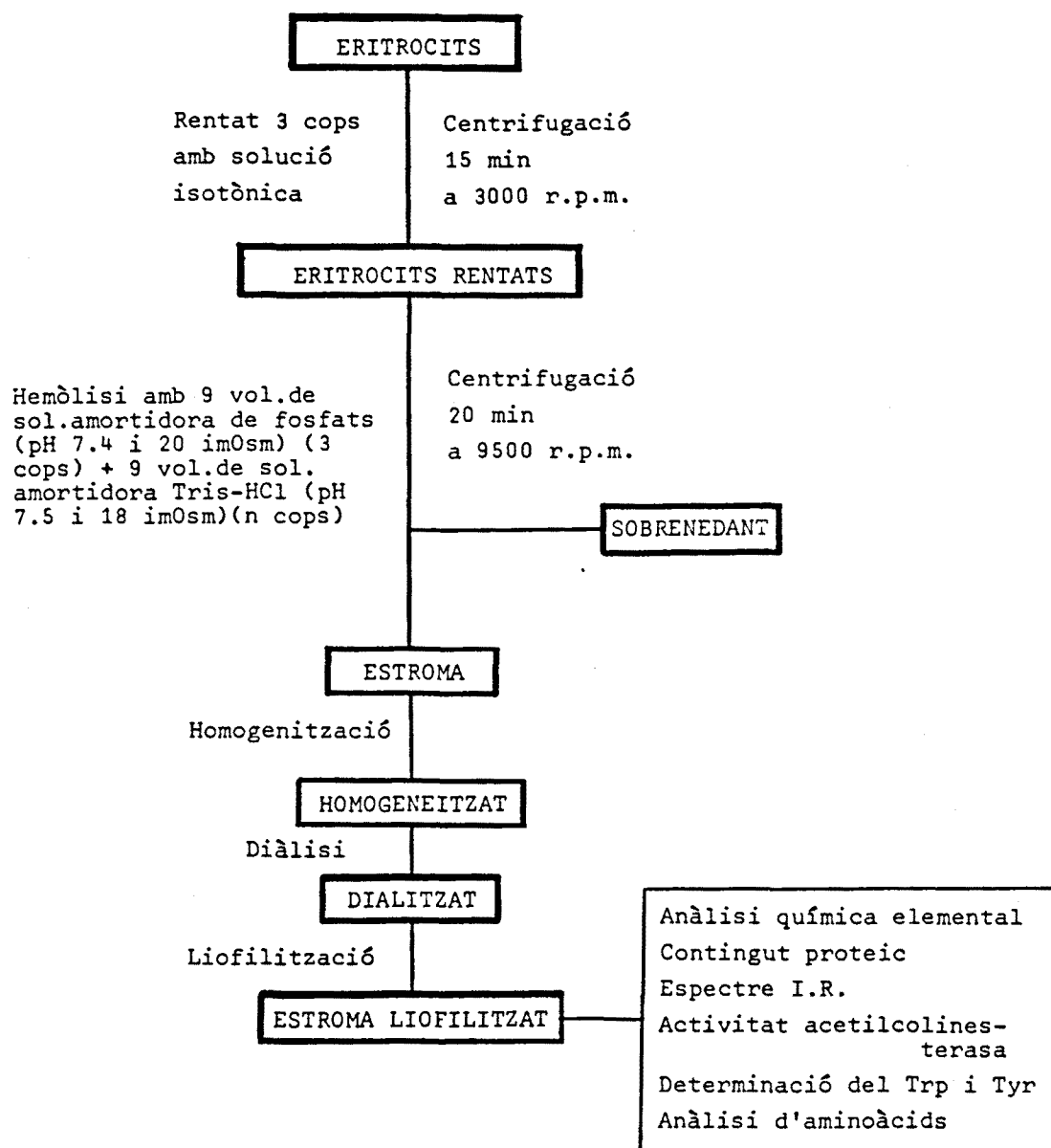


FIGURA 12.- Esquema de la metodologia emprada en l'obtenció de l'estroma eritrocític.

1.1. MATÈRIA PRIMA

El material a partir del qual s'ha obtingut l'estroma, ha consistit en eritròcits empaquets de grup sanguini A, provinents d'unitats sanguínees de 500 mL conservades en dextrosa-citrat. Aquests eritròcits han estat rentats tres cops amb solució salina isotònica (clorur sòdic al 0.85% en aigua destil·lada) i centrifugats en cada rentat a 3000 r.p.m. durant 15 minuts.

Els eritròcits han estat donats pel Banc de Sang de l'Hospital Clínic de Barcelona i provenien de donants sans.

Amb la finalitat de tenir un major grau d'homogenitat en la matèria prima, la sang emprada en l'obtenció de l'estroma complia les següents condicions:

- a) pertanyia al grup sanguini A₁⁺
- b) no tenia més de 3 setmanes a partir de la data d'extracció
- c) el títol enfront aglutinines estava comprès entre 1/64 i 1/128 (ambdós valors inclosos). El títol s'ha determinat per hemaglutinació directa realitzant la prova en porta. Com aglutinina sempre s'ha emprat un mateix reactiu anti-grup A (Cromatest anti-A, lot 01419, Knickerbocker, Barcelona)
- d) la transmitància d'una suspensió d'eritròcits al 0.5% (v/v) en solució salina isotònica havia d'ésser inferior al 10% (o absorbància superior a 1.2) realitzant la lectura a 540 nm (figura 13). La determinació es realitzà en un espectrofotòmetre Perkin-Elmer 124.

En total s'han emprat mostres sanguínees de divuit donants.

1.2. HEMÒLISI

El procés d'alliberament de l'hemoglobina continguda a l'interior de l'eritròcit constitueix l'*hemòlisi*. La matèria resultant després de l'hemòlisi és l'*estroma* i és, essencialment, la membrana de l'eritròcit. En cas d'obtenir l'estroma per mitjans hipotònics, la matèria resultant reb el nom d'*espectre* (ghost en anglès) i les membranes resultants són una mescla de formes estomatocítiques i discoidals (JOHNSON et al. 1980).

TURBIDIMETRIA

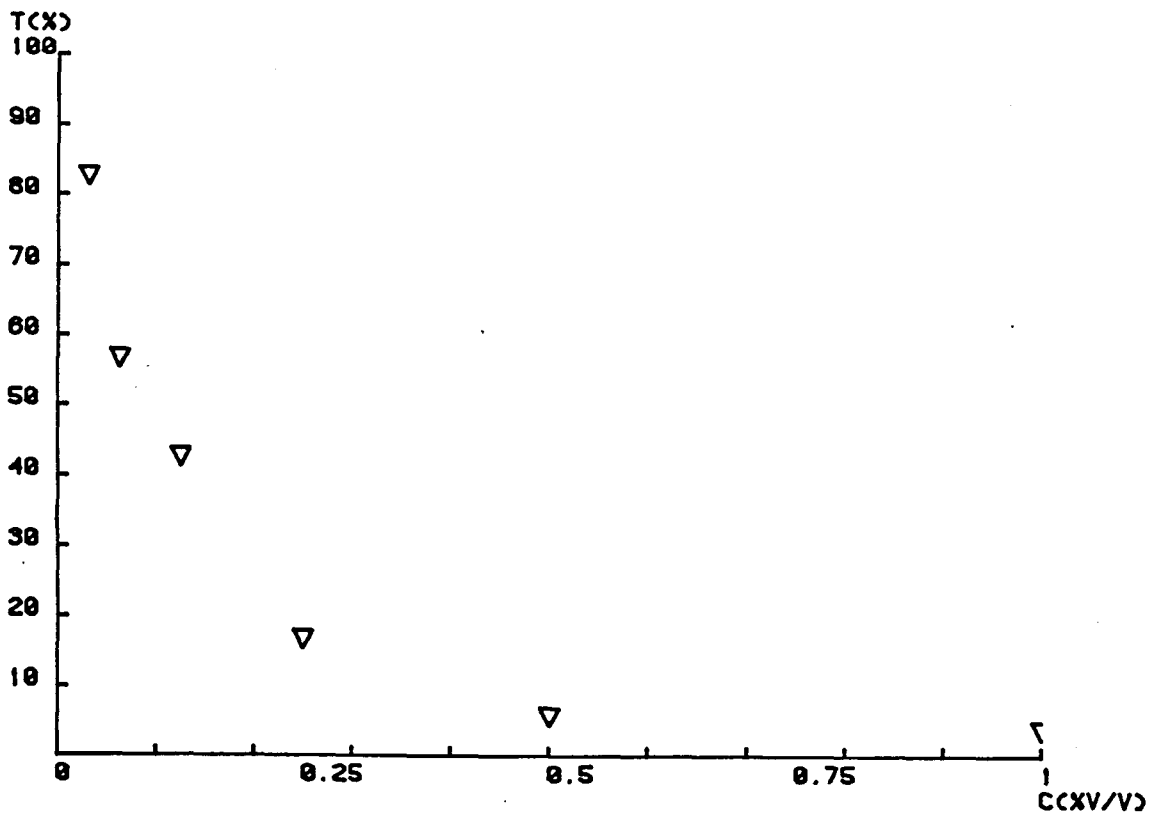


FIGURA 13.- Valors de les transmissió produïdes a 540 nm per diferents suspensions d'eritròcits en solució salina.

Les membranes de l'eritròcit poden obtenir-se per fragmentació (sonicació, homogenització en medi hipo o isotònic, congelació i descongelació, ...), per lisi química (digitonina, saponina, detergents, substàncies caotrópiques, ...), per lisi hipotònica (solucions amortidores a baixa força iònica: fosfats, citrats, Tris-HCl, bicarbonat, ... aigua destil·lada) o per lisi isotònica (el bicarbonat amònic i el imidazol produeixen en pocs minuts la lisi a temperatura ambient, mentre que les solucions isotòniques de Tris-HCl i de glucosa requereixen 120 minuts a 44°C per assolir l'hemòlisi).

A la taula 12 s'indiquen les tècniques hemolítiques més emprades. D'aquestes, la que ha tingut més acceptació és la de DODGE et al. (1963) que proporciona unes membranes que mantenen una disposició semblant a la de l'eritròcit intacte.

En un estudi previ (ESTELRICH i POUPLANA, 1985) s'ha comprovat que els mètodes que empen solucions amortidores de fosfats o de Tris-HCl són els que proporcionen unes quantitats més grans d'hemoglobina alliberada.

METODE	REFERENCIA
Congelació i descongelació	Jorpes (1932)
Sonicació	Kahane i Razin (1969)
Lisi química	Levisohn i Razin (1973)
- digitonina	Ponder (1955)
- saponina	Koscielak et al. (1973)
- tolué	Newman i Uhlenbruck (1977)
- fenol al 90%	
Lisi hipotònica	
- solució amortidora de fosfats (pH 7,4 / 20 imOsm)	Dodge et al. (1963)
- solució amortidora de bicarbonat (pH 7,4 / 20 imOsm)	Bramley et al. (1971)
- solució amortidora Tris-HCl (pH 7,6 / 20 imOsm)	Rosenberg i Guidotti (1968)
- solució amortidora de fosfats (pH 7,2; 10 mM + EDTA 1 mM + ClNa 20 mM)	Weed et al. (1963)
- solució de clorur sòdic al 0,1% saturat amb anhídrid carbònic	Ponder (1942)
- aigua destil·lada freda	Bernstein et al. (1938)
- solució d'Àcid acètic 60 mM	Tučková (1978)
- solució amortidora de fosfats (o Tris) i centrifugació en glucosa	Tomoda et al. (1984)

TAULA 12.- Principals tècniques hemolítiques.

Per obtenir l'estroma s'ha emprat una modificació de la tècnica de DODGE et al.(1963) descrita en l'estudi abans esmentat. Aquesta modificació consisteix en realitzar les tres primeres hemòlisis amb solució amortidora de fosfats pH 7.40 (± 0.20) i 20 (± 2) imOsm, i les següents hemòlisis amb solució amortidora Tris-HCl de pH 7.50 (± 0.03) i 18 (± 1) imOsm, fins que s'obtinguin les membranes blanques o lleugerament rosades i el sobrenedant sigui clar.

En cada pas s'ha centrifugat durant 20 min a 9500 r.p.m. ($\sim 14700 g$) a 4°C en una centrífuga Sorvall RC-5.

Atés la importància de la baixa osmolaritat de la solució hemolitzant i a l'alteració de la capacitat amortidora a baixes forces iòniques s'ha controlat el valor de la força iònica en qualsevol punt del procés a partir de les dades subministrades pels valors de l'osmolaritat (en osmòmetre Fiske Osmometer) i del pH (en pH-metre digital Crison model 501).

1.3. DIÀLISI, HOMOGENITZACIÓ I LIOFILITZACIÓ

Un cop reunides les membranes obtingudes segons l'apartat anterior, aquestes se suspenen al 50% en solució amortidora fisiològica (PBS) i es dialitzen durant tota la nit enfront 10-15 volums d'aigua destil·lada, mantenint el conjunt a 4°C .

La diàlisi s'ha realitzat en tubs de diàlisi Visking, de tamany 6-27/32". Abans del seu ús les membranes s'han preparat amb el següent tractament:

- a) ebullició amb aigua destil·lada durant 30 minuts
- b) ebullició amb aigua destil·lada i una mica de bicarbonat sòdic durant 10 minuts
- c) ebullició amb etanol al 50% durant 10 minuts
- d) ebullició amb aigua destil·lada durant 5-10 minuts
- e) ebullició amb EDTA sòdic 1 mM durant 1 minut

Després de la diàlisi les membranes són homogenitzades en la mateixa suspensió en un homogenitzador Dounce, i a continuació, són liofilitzades en un liofilitzador Telstar.

1.4. DETERMINACIONS ANALÍTIQUES

En les membranes liofilitzades (estroma) s'han realitzat les següents determinacions analítiques:

- 1.4.1. Anàlisi química elemental
- 1.4.2. Contingut proteic
- 1.4.3. Espectre infraroig
- 1.4.4. Activitat acetilcolinesterasa
- 1.4.5. Determinació espectrofotomètrica del triptofan i de la tirosina
- 1.4.6. Anàlisi d'aminoàcids

1.4.1. ANÀLISI QUÍMICA ELEMENTAL

S'ha determinat el contingut en hidrogen, carboni, sodi i nitrogen en un analitzador Carlo Erba 1106. Els percentatges trobats són els següents:

- sodi: 2.4%
- carboni: 52.6%
- hidrogen: 7.51%
- nitrogen: 10.8%

1.4.2. CONTINGUT PROTEIC

El contingut proteic de l'estroma s'ha determinat per la tècnica de LOWRY et al. (1951). En aquest cas, com en el de qualsevol homogenitzat, cal tractar previament l'estroma de forma que les proteïnes siguin accessibles als reactius. Això s'assoleix per digestió alcalina o per tractament amb detergents.

Pel que fa a la digestió alcalina, la perllongada exposició de les proteïnes proteolipídiques (18 hores) a la sosa 0.5 N a 37°C, preconitzada per HESS i LEWIN (1965), produeix una oxidació dels lípids, la qual cosa interfereix fortament la valoració per la tècnica de Lowry (EICHBERG i MOKRASCH, 1969). Per tant, la digestió s'ha realitzat amb sosa 0.1 N a 39°C durant 180 min, condicions que, segons GLAZER i SMITH (1961) fan possible la ionització total dels grups fenòlics presents, responsables de la cromogenicitat de les proteïnes.

En quant als detergents, els no interferidors són el dodecil sulfat sòdic (SDS) i el desoxicolat sòdic (PETERSON, 1979). En aquest cas la tècnica seguida ha estat la de MARKWELL et al. (1981) que empra SDS al 1%.

Com solució proteica estandard s'ha emprat per a totes les determinacions una solució d'albumina sèrica bovina (BSA) a una concentració de 100 µg/mL. D'aquesta solució s'agafen 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 i 1 mL, i es completa fins un volum de 1 mL amb aigua desionitzada.

L'estroma s'ha emprat com suspensió a concentració de 0.500 mg/mL.

Les absorbàncies s'han determinat a 500 nm, longitud d'ona més adient per aquest interval de concentracions en comparació amb altres també emprades (660, 720 i 750 nm).

Totes les determinacions s'han realitzat per triplicat.

a) Contingut proteic determinat per digestió alcalina

El valor obtingut ha estat del 49.09% de contingut proteic referit al pes de l'estroma liofilitzat.

Degut a que el valor de l'absorbància de l'estroma està dins dels límits lineals de la corba de calibració, no ha calgut transformar les variables absorbància i concentració en llurs valors recíprocs per obtenir la linealització de la recta estàndar (CAMPBELL 1983).

Per altre part, com la quantitat de sosa en les alíquotes analitzades és aproximadament de 0.5 mmols i, segons MAKKAR et al. (1982), el límit de no interferència amb la valoració és de 0.3 mmols, s'ha realitzat paral·lelament una determinació emprant la modificació del mètode proposada pels mateixos autors esmentats, i que consisteix en afegir sulfat amònic en quantitat igual a la meitat del nombre de mols de sosa i escalfament a bany maria durant 15 minuts. Amb això, es formen hidròxid amònic i sulfat sòdic, que no interfereix.

Els valors de les absorbàncies obtinguts amb aquesta prova paral·lela, sols varien en ± 0.02 envers els obtinguts sense incloure la modificació, diferències que es poden considerar degudes, doncs, a fluctuacions aleatòries.

b) Contingut proteic determinat per mitjà de detergents

El valor obtingut ha estat del 56.1%.

Les diferències envers el mètode anterior pot explicar-se per una part, per un major grau de solubilització de les proteïnes assolit pel detergent, i, per altre, pel lleuger augment de l'absorbància que produeix el SDS en la tècnica de Lowry.

1.4.3. ESPECTRE INFRAROIG

L'estroma dispersat en bromur potàsic s'ha determinat en un espectrofotòmetre per I.R. Perkin Elmer 1430. L'espectre infraroig obtingut amb l'estroma (figura 13) mostra les següents característiques:

- Regió per sobre dels 2700 cm^{-1} : Hi ha una banda d'absorció a 3300 cm^{-1} , lleugerament afilada que pot correspondre a una vibració tensional d'una amina primària. Altres absorcions queden reflexades pels pics ben definits a 2925 i 2855 cm^{-1} , indicatius de l'enllaç C-H on el carboni està en forma sp^3 .
- Regió entre 2000 i 1500 cm^{-1} : Apareixen pics a aproximadament 1730 , 1660 i 1540 cm^{-1} . El primer correspon a la vibració del grup carbonil, quasi segurament d'un aldehyd alifàtic. El segon és característic d'una amida I i de que els enllaços formats per ponts d'hidrogen es troben en forma d' α -hèlix. L'absència d'absorció a 1630 cm^{-1} indica que l'estructura en β -fulla no està present en la molècula (SCHELLMAN i SCHELLMAN, 1962) i l'absorció a 1540 cm^{-1} és pròpia de grups NH(amida II) o d'anells aromàtics.
- Regió entre 1500 i 1000 cm^{-1} : Apareix un pic a 1450 cm^{-1} , representatiu dels grups $-\text{CH}_2$ i/o CH_3 (vibració de deformació asimètrica); a 1390 cm^{-1} el pic representa els mateixos grups $-\text{CH}_2/\text{CH}_3$ (vibració de deformació asimètrica); a 1390 cm^{-1} representa els mateixos grups $\text{CH}_2/-\text{CH}_3$ però indicativa d'una vibració de deformació simètrica, l'absorció a 1070 cm^{-1} és característica dels grups alcohol primari i secundari, així com de la vibració tensional del grup P-O-C; la vibració del grup P=O -pròpia dels lípids- es manifesta a 1240 cm^{-1} ; a 1170 cm^{-1} també es posa en relleu el grup P=O, o be, els alcohols terciaris.

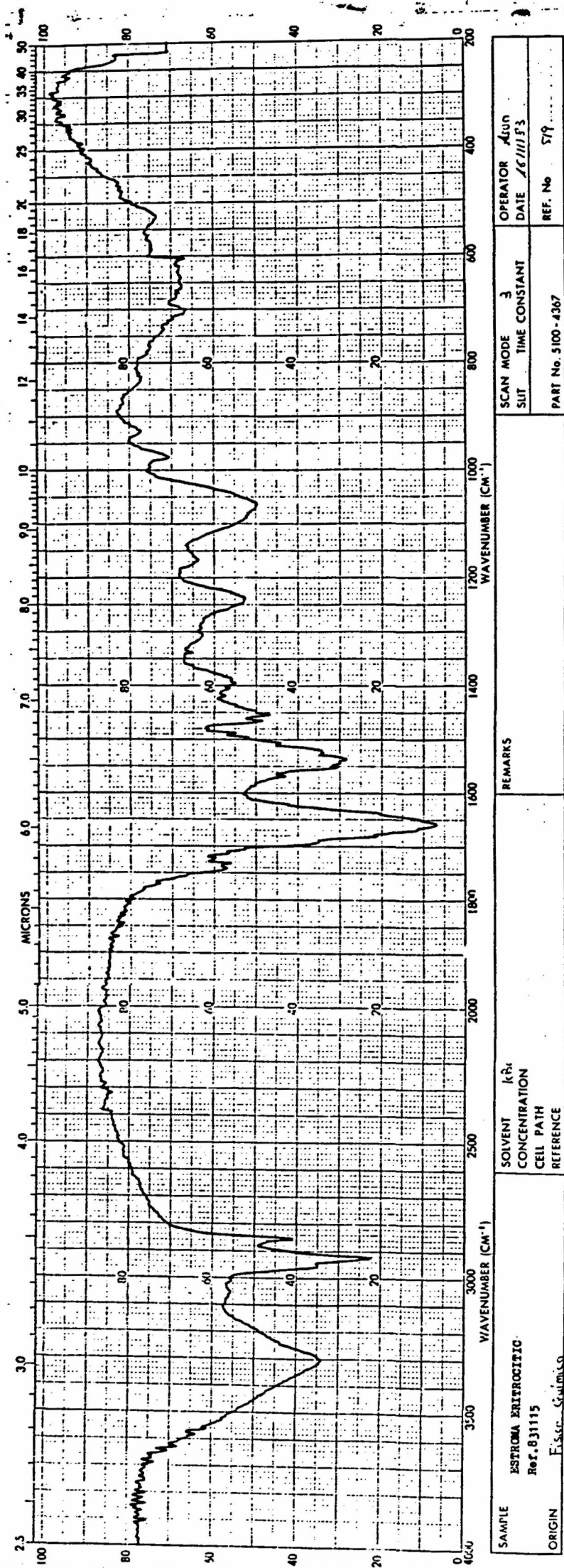


FIGURA 13.- Espectre I.R. de l'estroma eritrocític determinat en pastilla de KBr.

- Regió per sota dels 900 cm^{-1} : L'absorció a 710 cm^{-1} pot indicar la possibilitat de que es trobi el grup $-\text{CH}_2-$, si be, aquesta zona està subjecta a moltes interferències.

L'espectre obtingut és semblant a l'obtingut per MADDY i MALCOLM (1965). Quan les proteïnes de la membrana s'extreuen amb *n*-butanol proporcionen un espectre amb absència d'estructura β -fulla, però si l'extracció s'ha fet amb dimetilformamida, es troba un component en β -fulla, la qual cosa indica que aquesta estructura ha estat induïda pel solvent (CHAPMAN et al.1968).

1.4.4. ACTIVITAT ACETILCOLINESTERASA

L'activitat acetilcolinesterasa (acetilcolina acetilhidrolasa, EC.3.1.1.7) s'ha valorat determinant els μmols d'acetat formats per l'adició de l'estroma a una quantitat d'acetiltiocolina (Sigma, Estats Units).

Amb NaCl 0.15 M, clorur d'acetiltiocolina 10 mM i 0.2-0.6 mg d'estroma es fa una suspensió (10 mL) a pH 7.6 i 37°C . El pH es manté per adició de NaOH 0.1 M. L'activitat es calcula en un radiometer TTT 60 equipat amb un pH-metre pH M62 Standard i un mòdul REA 160, segons l'adició de sosa en els 8-20 primers minuts.

S'obté un resultat de 0.82 unitats d'enzim per mg d'estroma liofilitzat. Una unitat d'activitat acetilcolinesterasa es defineix com la quantitat d'enzim que hidrolitza 1 μmol d'acetilcolina per minut.

L'activitat específica és expressada en unitats per mg de pes de membrana (HELLER i HANAHAN, 1972).

1.4.5. DETERMINACIÓ ESPECTROFOTOMÈTRICA DEL TRIPTOFAN I DE LA TIROSINA

Hi ha uns aminoàcids (triptofan, tirosina, glicina, hidroxilisina, cistina, cisteïna, ...) que es poden determinar en la proteïna sense necessitat d'hidrolitzar-la (BLACKBURN 1968). D'aquests aminoàcids, la tirosina i el triptofan són els que forneixen millors resultats, podent-se analitzar en medi àcid, bàsic o neutre (DONOVAN, 1969).

L'absorbància de les proteïnes a l'espectre ultravioleta entre 250 i 320 nm es deu principalment als aminoàcids tirosina (Tyr), triptofan (Trp) i fenilalanina (Phe), si bé l'absorbància d'aquest últim pot menysprear-se en comparació amb els altres dos.

En medi bàsic, existeixen les tècniques de GOODWIN i MORTON (1946) i la de BENCZE i SCHMID (1957), que calcula la relació tirosina/triptofan a partir de dues característiques fonamentals de les corbes d'absorció: (a) el pendent de la línia tangent als dos màxims espectrofotomètrics indica la relació de Tyr/Trp i (b) l'absorbància del pic més gran és una mesura del contingut en Tyr-Trp.

El mètode de Goodwin i Morton, que és el que s'ha emprat, tracta les proteïnes com sistemes de dos components, en els que la corba d'absorció d'una proteïna és la suma de les absorcions dels aminoàcids que la componen. Això, si bé no totalment cert, permet una bona aproximació.

En sosa 0.1 N, medi emprat per aquesta tècnica, les corbes d'absorbància de la Tyr i el Trp s'intersecten en 2 punts: a 257.15 i a 294.4 nm, en aquests punts d'intersecció l'absorbància és una mesura directa de la concentració molar total de Tyr i Trp. A altres longituds d'ona, l'absorbància varia amb les proporcions relatives dels dos aminoàcids. Si es determinen els valors de les absorbàncies a 294.4 nm (longitud d'ona propera al màxim de la Tyr) i a, per exemple, 280 nm, i definint per x els mols totals de Trp+Tyr per litre de solució, i $x - y$ els mols de Trp, y seran, per tant, els mols de Tyr, i així:

$$\begin{aligned} A_{294.4} &= \epsilon_{294.4} \cdot x \\ A_{280} &= y \cdot \epsilon'_{280} + (x - y) \cdot \epsilon''_{280} \end{aligned}$$

on A és l'absorbància determinada i ϵ'_{280} i ϵ''_{280} , els coeficients d'absorció molar de la Tyr i del Trp, respectivament. Aquests coeficients s'han calculat previament obtenint-se els següents valors: $\epsilon_{294.4} = 2375$, $\epsilon'_{280} = 1567$ i $\epsilon''_{280} = 5225 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Així, a partir d'una suspensió d'estroma liofilitzat en sosa 0.1 N (pH > 13.5) de concentració igual a 1.03 mg/mL, incubada a 39°C durant 3 hores, s'han obtingut els valors d'absorbància següents (figura 14) emprant un espectrofotòmetre Hewlett-Packard A-8531:

$$\begin{aligned} A_{294.4} &= 0.780 \\ A_{280} &= 0.857 \end{aligned}$$

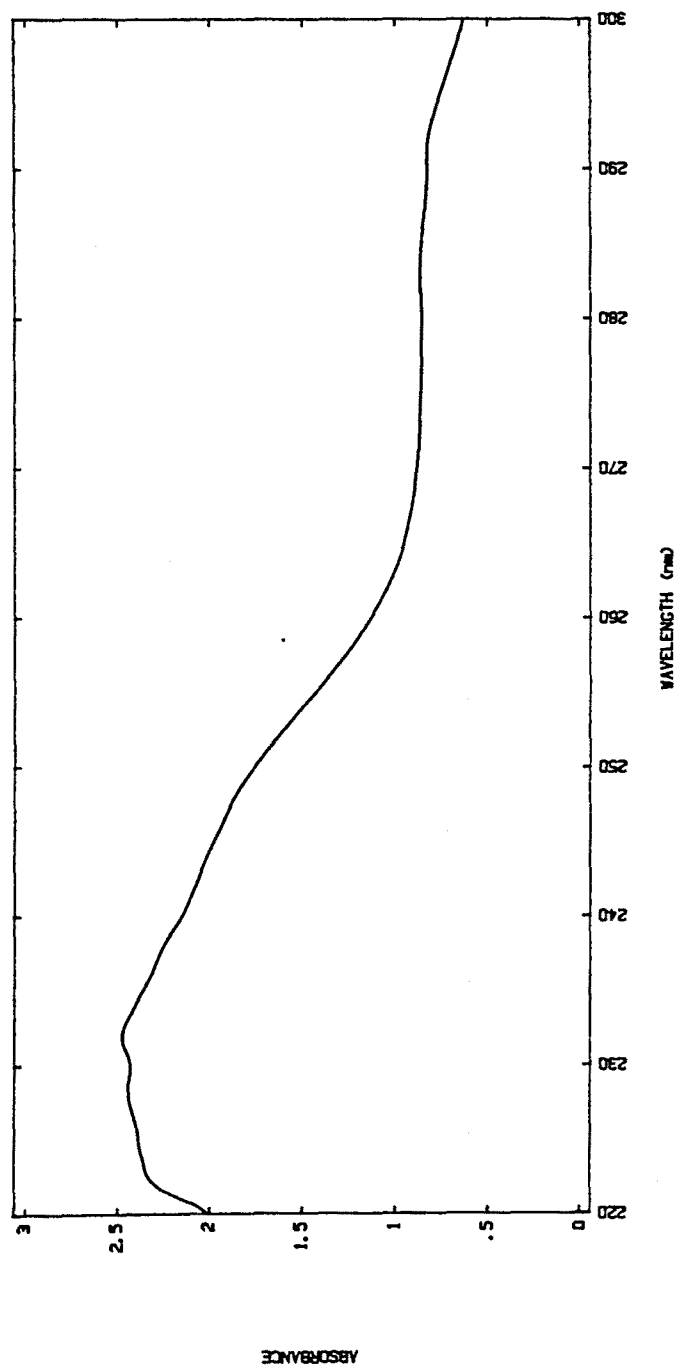


FIGURA 14.- Espectre d'absorció a l'ultravioleta d'una suspensió d'estroma en NaOH 0.1 N, a concentració igual a 1.03 mg/mL després d'incubació a 39°C durant 3 hores.

Amb aquestes dades s'obtenen els següents valors:

$$\begin{aligned}x &= 3.2824 \cdot 10^{-4} \text{ mols totals} \\y &= 2.3511 \cdot 10^{-4} \text{ mols de tirosina} \\x - y &= 0.9313 \cdot 10^{-4} \text{ mols de triptofan}\end{aligned}$$

essent la relació Tyr/Trp igual a 2.524

1.4.6. ANÀLISI D'AMINOÀCIDS

L'anàlisi del contingut en aminoàcids (figura 15) s'ha realitzat segons la tècnica de MOORE i STEIN (1963) en un analitzador d'aminoàcids Chromaspeck Rank Hilger.

A partir d'una mostra liofilitzada s'ha realitzat la hidròlisi amb HCl 6 N en tubs tancats en els que s'ha efectuat el buit. Després de 24 hores a 110 C el material està hidrolitzat i els aminoàcids es troben en forma de clorhidrats. Un cop s'han refredat els tubs, l'excés d'àcid s'elimina en un rotovapor.

En la taula 13 s'expressen els resultats obtinguts en grams d'aminoàcid per gram d'estroma i com a número de mols per 1000 mols totals.

Certs aminoàcids com la serina, treonina, cisteïna i tirosina, es descomposen parcialment durant la hidròlisi mentre que el triptofan experimenta una descomposició gairebé total; així doncs, els valors de la taula han estat corregits en un 10% per a la serina i en un 5% per a la cisteïna, treonina i tirosina, que són els percentatges respectius de descomposició d'aquests aminoàcids. El valor del triptofan s'ha obtingut a partir de la relació Tyr/Trp calculada en l'apartat anterior.

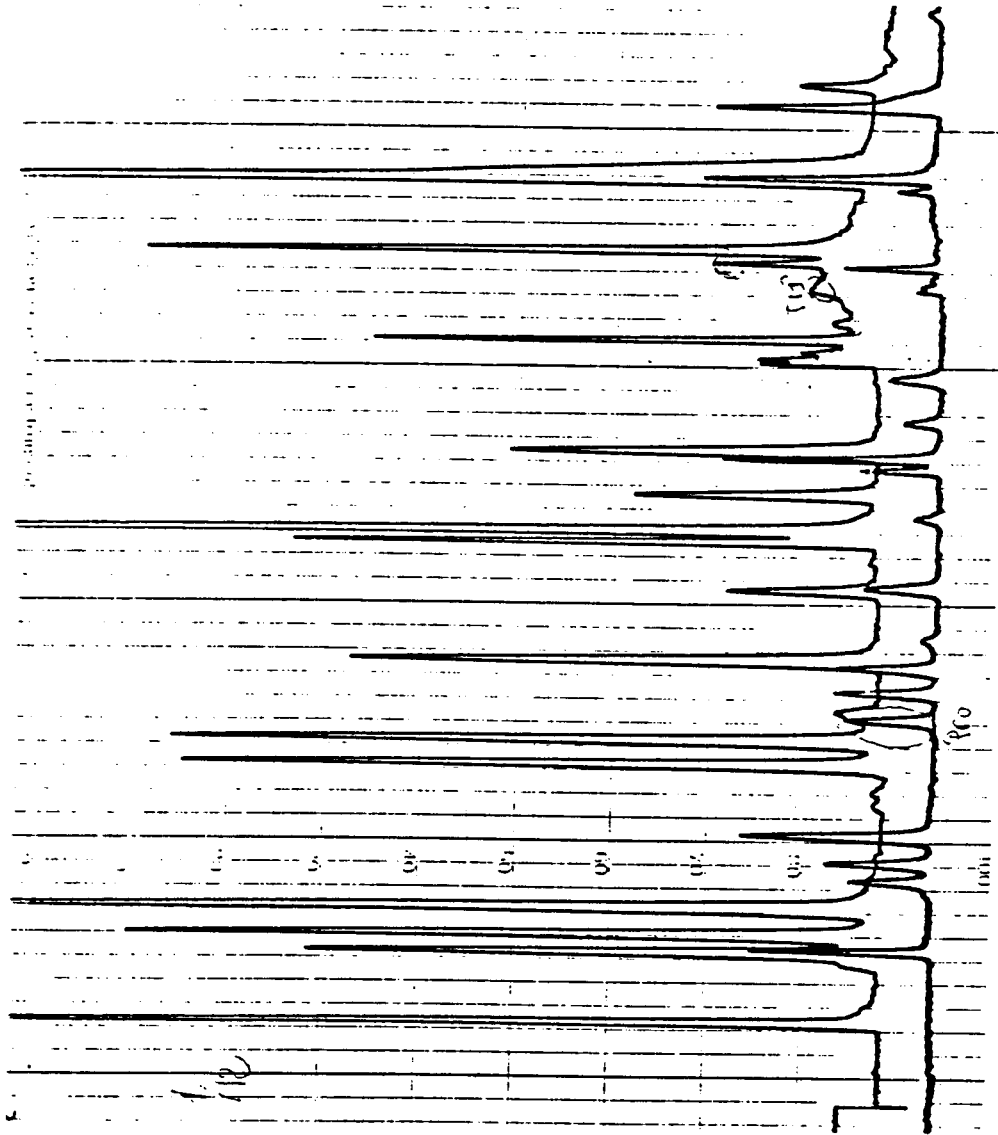


FIGURA 15.- Aminograma de l'estroma eritrocític.

Aminoàcid	<u>Grams d'aminoàcid</u> Grams d'estroma	Número de residus per 1000 residus
<i>Hidrofòbics</i>		
Metionina	0.0085	16.75
Valina	0.0245	66.89
Isoleucina	0.0193	47.21
Leucina	0.0419	102.37
Triptofan	0.0091	14.21
Tirosina	0.0203	35.87
Fenilalanina	0.0236	45.74
<i>Neutres</i>		
Treonina	0.0211	56.70
Serina	0.0287	87.63
Prolina	0.0195	54.29
Glicina	0.0183	78.08
1/2 Cisteïna	0.0046	12.59
Alanina	0.0225	80.90
<i>Àcidics</i>		
Aspàrtic	0.0329	79.58
Glutàmic	0.0471	102.93
<i>Bàsics</i>		
Lisina	0.0214	46.85
Histidina	0.0150	28.83
Arginina	0.0232	42.59

TAULA 13.- Composició en aminoàcids de l'estroma eritrocític. Els valors de l'aspàrtic i del glutàmic corresponen, en realitat, al conjunt aspàrtic + asparagina, i glutàmic + glutamina, respectivament.

2. SOLUBILITZACIÓ

En un sentit estricte, la solubilització de l'estroma implicaria la dispersió en el solvent de totes les molècules aïllades que el componen, de manera que esdevingués un estat en el que les interaccions solut-solut fossin menyspreables. Si a més, cal tenir en les molècules un significat biològic, les molècules aïllades han de retenir llurs conformacions natives (i biològicament actives).

En realitat, per solubilització de membranes s'entén el procés que converteix l'estat complex de la membrana intacta en un estat més senzill que permet l'anàlisi dels components de la membrana per mètodes que no poden aplicar-se en la membrana intacta.

En tot cas, per a poder dir que s'ha arribat amb èxit a la solubilització es requereix que les partícules solubles tinguin un coeficient de sedimentació relativament baix -en termes pràctiques les partícules no haurien de sedimentar després d'1 hora de centrifugació a 100.000·g (aquest valor aplicat a un medi amb densitat propera a la de l'aigua) (MADDY i DUNN, 1976).

A aquesta condició han d'acompanyar-la altres, com el descens de la complexitat de les partícules solubilitzades en relació amb la membrana intacta i a l'abolició d'unions intermoleculares, si aquestes no són necessàries per a la funcionalitat d'una determinada proteïna.

El caràcter dels solvents emprats varia segons la naturalesa del material a solubilitzar. Els lípids poden solubilitzar-se fàcilment en solvents no polars o en medis aquosos mitjançant sonicació. En quant a a les proteïnes, l'elecció de solvent depend de la localització de la proteïna. Les proteïnes perifèriques com que estan unides a la membrana predominantment, o exclusivament, per interaccions electrostàtiques, poden extreure's amb solucions d'agents quelants (aquest seria el cas de la gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa). Les proteïnes que es troben immerses totalment en la capa bilipídica, s'extreuen amb solvents orgànics. En el cas que aquí interessa, el de les glicoproteïnes amb activitat antigènica, com ja s'ha descrit en l'apartat 4.3.1.2. de la INTRODUCCIÓ, tenen part de la cadena en medi aquós i part en medi lipídic.

Teòricament, un gran nombre de solvents orgànics són potencialment adients per a solubilitzar les proteïnes i glicoproteïnes que es troben parcialment submergides en la capa lipídica. No obstant, els solvents orgànics tenen dues grans desventatges: (a) virtualment totes les tècniques de química proteïnica són més eficaces en condicions aquoses, i (b) la demostració de l'activitat biològica és gairebé exclusivament confinada al medi aquós.

Cal, doncs, emprar un solvent que, per una part alliberi les proteïnes dels lípids i, per altre, proporcioni una fase aquosa on es trobin presents les glicoproteïnes. Aixó s'assoleix amb certs tractaments a base de solvents orgànics i solvents polars, i també amb els detergents.

Les propietats solubilitzants dels detergents rau en llur caràcter amfifílic, el qual permet la interacció tant amb les regions hidrofíliques com amb les lipofíliques, formant micelles que imiten l'interior hidrofòbic de la bicapa lipídica de la membrana.

En la solubilització per detergents hi ha dos tipus d'interaccions d'importància capital: la interacció de les molècules de detergent amb els components de la membrana i les interaccions entre les molècules de detergent. En el primer cas és sabut que a altes concentracions de detergent pot ocórrer un canvi de la conformació. En el segon, la interacció entre les molècules de detergent té molta importància puix la concentració efectiva de detergent per a lligar-se amb la proteïna no és la concentració total de detergent sinó la de detergent lliure.

En condicions escaients d'excés de detergent, l'estructura de la membrana es desorganitza, i els lípids i proteïnes es troben, llavors, en les micelles de detergent, de forma que cada proteïna o complex proteïnica està present en una micel·la separada.

S'ha emprat un gran nombre de detergents en estudis de fisicoquímica biològica (HELENIUS i SIMONS, 1975; HELENIUS et al., 1979).

Els detergents iònics, cas del SDS, tendeixen a desnaturalitzar les proteïnes per destrucció de llur estructura secundària, terciària i quaternària, si bé, a concentracions baixes, es mantenen llurs propietats antigèniques.

Els detergents no iònics o els lleugerament iònics són menys desnaturalitzants i poden emprar-se per extreure de la membrana elements que preserven les interaccions proteïna-proteïna.

Amb tot, l'ús de detergents presenta inconvenients força importants: elevada absorptivitat a 280 nm, inducció de precipitats en la tècnica de valoració de proteïnes de Lowry et al., interferències en la valoració de BRADFORD (1976), i -en cas de detergents iònics i inclús del desoxicolat sòdic, interferències en l'electroforesi en l'enfocament isoelèctric-, elevat pes micel·lar que impossibilita la filtració per gel car la variació en el tamany de la proteïna és menyspreable en comparació amb el tamany de la micel·la.

En la taula 14 es resumeixen esquemàticament els tipus de solvents emprats per a solubilitzar les proteïnes de la membrana de l'eritròcit.

D'aquests mètodes els que es defineixen com específics per a glicoproteïnes són el d'HAMAGUCHI i CLEVE (1972), basat en l'extracció dels lípids per la mescla cloroform/metanol (2:1, v:v), el de MARCHESI et al. (1972) que fa servir el diodesalicilat de liti com a solvent principal, i l'extracció amb fenol de HOWE et al. (1973), la de BLUMENFELD i ZVILICHOVSKY (1973) que solubilitza les membranes amb piridina aquosa i, finalment, FINNE (1980) empra una tècnica per obtenir glicoproteïnes que es fonamenta en l'extracció lipídica de SVENNERHOLM i FREDMAN (1980) i en la modificació de DEJTER-JUSZYNSKI et al. (1978).

1. Modificació de les condicions electrostàtiques de l'entorn de les membranes
- (a) Baixa força iònica (aigua) Harris (1971) Complexe proteínic multiunitari
Hamaguchi i Cleve (1971) Polipèptids d'alt pes molecular
- (b) Baixa força iònica + agent quelant (EDTA, p.e.) Tillack (1970) Alliberament del 40% de les proteïnes de l'eritròcit, generalment d'elevat pes molecular
- (c) Baixa força iònica + agent reductor (ditioeritritol) Maddy i Dunn (treball no publicat) Alliberament de les proteïnes, que són extretes pel EDTA
- (d) Alta força iònica Tanner i Gray (1971) Extracció específica de gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa
- (e) pH baix (Àcid acètic diluït) Maddy i Kelly (1971) Solubilització de les proteïnes de l'estroma també solubilitzades pel EDTA
- (f) pH alt (sosa diluïda) Steck i Yu (1973) Solubilització d'algunes proteïnes solubilitzades també pel EDTA
2. Modificació dels grups ionogènics de les membranes
- (a) Reactius ionogènics de tipus sulfidril Carter (1973) Solubilització d'algunes proteïnes de la membrana
- (b) Oxiàcids (maleic, citràconic, dimetilmaleic) Moldow et al. (1972) Solubilització general
3. Agents caotròpics-perturbants de proteïnes
- (a) Tiocianat potàsic Morrison i Neurath (1953) Extracció de proteases actives
- (b) Urea Lauf i Poulik (1968) Les proteïnes extretes s'havien separat per electroforesi en gel de midó
- (c) Clorhidrat de guanidina Gwynne i Tanford (1970) Quasi solubilització total de les proteïnes, però algunes interaccions proteïna-lípid es mostren resistents
- (d) Diodesalicilat de liti Marchesi et al. (1972) Solubilització de les glicoproteïnes-glicoforines purificades amb un tractament amb fenol
4. Enzims
- (a) Tripsina i termolisina Jenkins i Tanner (1976) Obtenció de fragments de la glicoproteïna més gran
- (b) Pronasa Nanni et al. (1977) Solubilització de proteïnes a partir d'eritròcits d'anyell
- (c) Neuraminidasa Godin i Schrier (1970) Diferents fragments proteínics
- (d) Quimotripsina Akyama i Osawa (1972) Fragments externs de les proteïnes de membrana
- (e) Fosfolipases (A₂, D i C) Seghier et al. (1977) Alliberament de substàncies antigèniques amb activitat de grup B
5. Solvents orgànics
- (a) n-Butanol Maddy (1966) Les substàncies lipídiques passen a la fase butanòlica
- (b) n-Butanol + EDTA Maddy et al. (1972) La presència d'EDTA facilita el fraccionament de les proteïnes solubilitzades per l'acció del butanol
- (c) 2-Cloroetanol Zahler i Weibel (1970) Solubilització completa

(d) dimetilformamida	Chapman et al. (1968)	El solvent indueix una certa estructura en -fulla en les proteïnes
(e) hexa-fluoracetona	Juliano (1972)	Solubilització general
(f) cloroform/metanol		
(f.1.) relació 1:1 (v/v)	Reed et al. (1960)	Obtenció d'estroma exent de lípids
(f.2.) relació 2:1 (v/v)	Hamaguchi i Cleve (1972)	Solució aquosa de glicoproteïnes amb diversa activitat antigènica
(f.3.) relació 1:2 (v/v)	Svennerholm (1980)	L'extracció lipídica forneix un material exent de lípids
(g) n-butanol + etanol	Gardas i Koscielak (1971)	Solubilització de proteïnes amb contaminants lipídics
(h) n-butanol + cloroform	Finne (1978)	Solubilització general
(i) etanol abs. + cloroform	Hakomori (1978)	Solubilització general
(j) etanol + èter	Rosenberg i Guidotti (1968)	Solubilització general
(k) 2-mercaptoetanol + EDTA	Liljas et al. (1974)	Extracció de proteïnes desnaturalitzades
(l) acetona	Koscielak et al. (1973)	Solubilització parcial
(m) àcid acètic al 90%	Schubert et al. (1972)	Solubilització de les proteïnes que no són solubles en àcid acètic diluït
(n) fenol	Howe et al. (1973)	Obtenció d'una solució aquosa de glicoproteïnes
(o) piridina aquosa	Blumenfeld i Zvilichovsky (1973)	Solubilització preferent de les glicoproteïnes
7. Detergents no iònics		
(a) Triton X-100	Fiori et al. (1971)	Solubilització general de diverses fraccions proteïniques
(b) Tween 20	Liljas et al. (1974)	Obtenció de fraccions proteïniques que no són solubilitzades per altres tècniques
(c) Lubrol WX	Bjerrum i Lundhal (1974)	Preparació de proteïnes per immunoelectroforesi
(d) Berul Emu-043	Bjerrum et al. (1974)	Preparació de proteïnes per immunoelectroforesi
8. Detergents iònics		
(a) Desoxicolat i/o colat sòdics	Liljas (1978)	Proteïnes que mantenen la major part de les propietats fisicoquímiques degut al baix pes micel·lar del detergent
(b) Dodecilsulfat sòdic (SDS)	Simmonds i Yon (1977)	Obtenció de proteïnes dissociades en subunitats monomèriques

TAULA 14.- Solvents i tècniques emprades en la solubilització de proteïnes de membrana de l'eritròcit.

2.1. COMPARACIÓ DE MÈTODES

Davant l'existència de diverses tècniques per extreure glicoproteïnes de la membrana, hom ha cregut oportú realitzar un estudi comparatiu de les principals, a fi de tenir uns criteris objectius que justifiquin l'elecció d'un mètode o altre.

Els mètodes escollits per a realitzar l'estudi comparatiu són el d'Hamaguchi i Cleve, el de Marchesi et al. i el de Finne.

El d'Hamaguchi i Cleve (figura 16) es basa en l'extracció de lípids per mitjà de la mescla $\text{Cl}_3\text{CH}/\text{MeOH}$ a una relació 2:1 (v/v), definida per FOLCH-PI et al. (1951) com molt adient per extreure lípids.

Els autors indiquen que en la fase aquosa es troben presents les activitats antigèniques I, Ss, MN, A, B i H. La interfase conté la major part de les proteïnes de membrana, excepte les principals glicoproteïnes, i la fase orgànica mostra activitat antigènica A, B i H i està excepta de glicoproteïnes.

Amb aquest tractament es recupera un 3.7% de la proteïna present en l'estroma, valor comprés dins d'una forquilla de 2.6 i 4.9%.

Posteriorment, Dejter-Juszynski et al. han afegit a la tècnica una doble extracció butanòlica de la part aquosa, amb la finalitat d'extreure els glicolípidis de baix pes molecular que, segons els esmentats investigadors, estan presents en aquesta fase.

El mètode de Marchesi et al. (figura 17) empra el diodesalicilat de liti (LIS) com agent dissociant de pèptids, i el fenol com a substància extractora de lípids. La glicoproteïna aïllada és una única cadena polipeptídica amb un 60% de glúcids i un 40% de proteïna. El pes molecular del monòmer és aproximadament de 50.000. Aquesta molècula transporta els antígens de grup sanguini A, B, I, MN, i els receptors per al virus *influenza* i per a diverses fitoaglutinines.

La proteïna recuperada és del 3-4% de la present en l'estroma.

El mètode de Finne (figura 18) està basat en part en l'extracció de Svennerholm i Fredman, que empra la mescla $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (4:8:3, v/v/v), a relació envers l'estroma de 3 a 1 (v/v); i per altre, en l'extracció cloroformo-metanòlica abans esmentada, així com en la doble extracció amb *n*-butanol. La recuperació és del 3.3%.

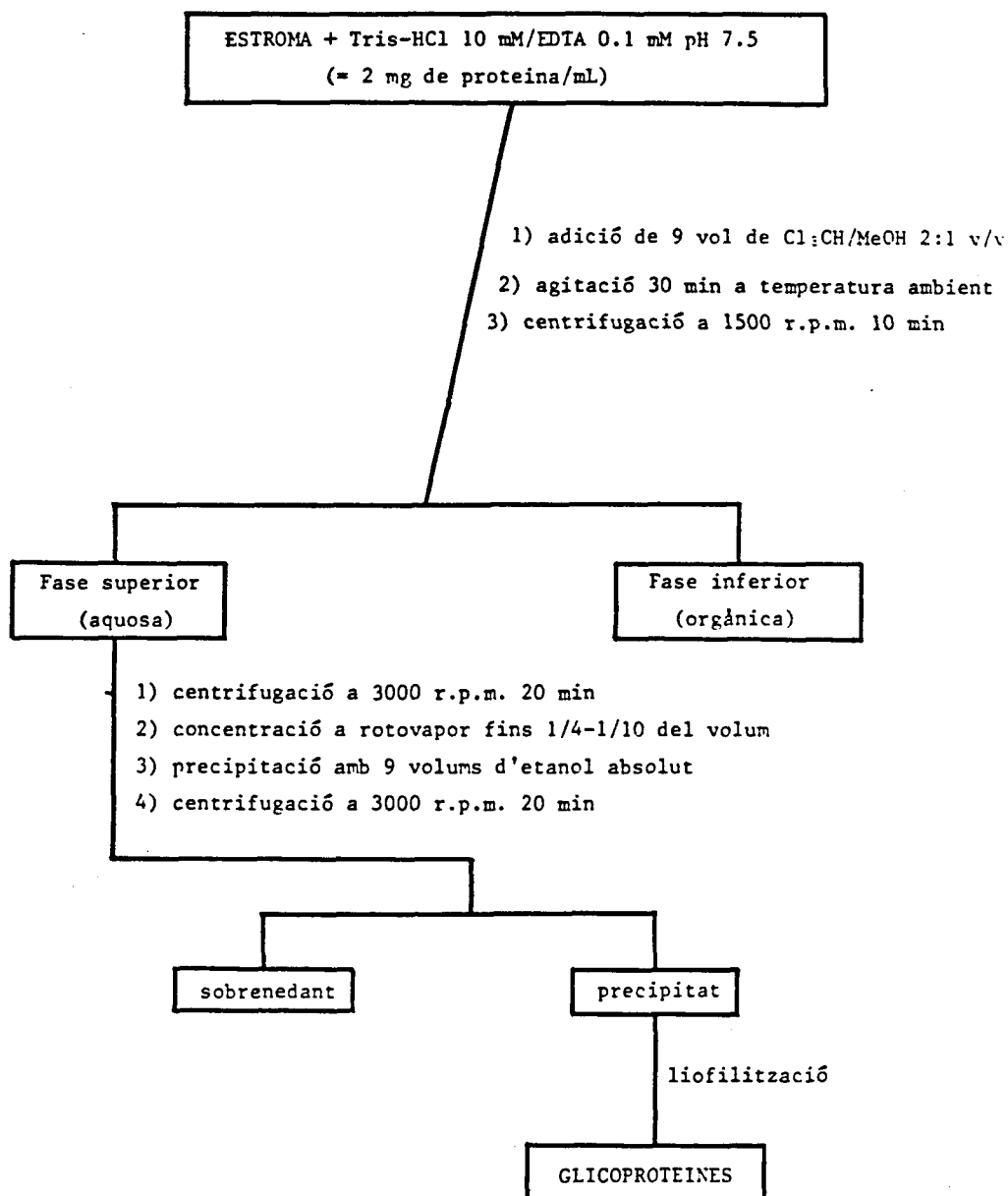


FIGURA 16.- Esquema del mètode d'obtenció de glicoproteïnes segons Hamaguchi i Cleve (1972).

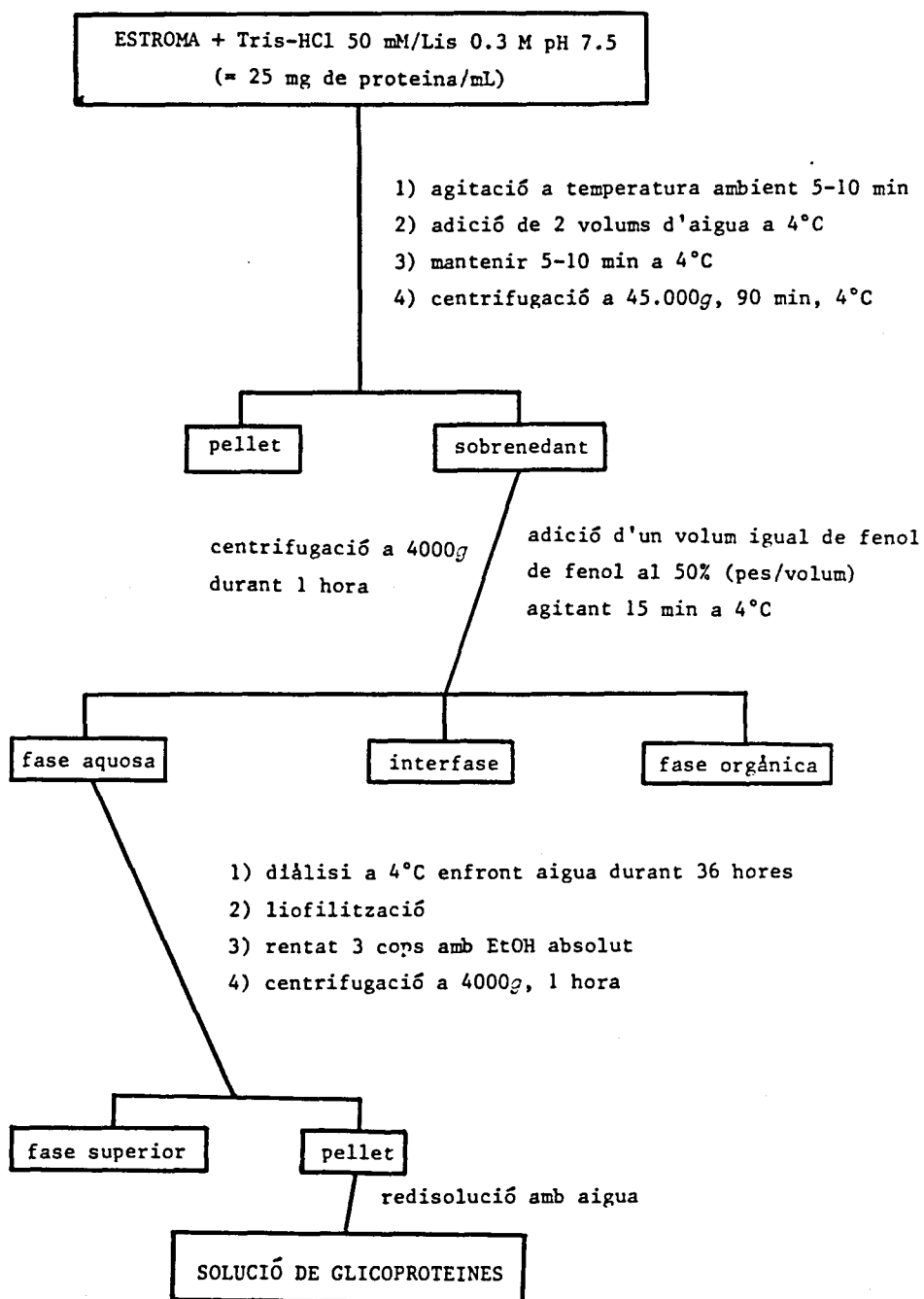


FIGURA 17.- Mètode d'obtenció de glicoproteïnes segons Marchesi et al. (1972).

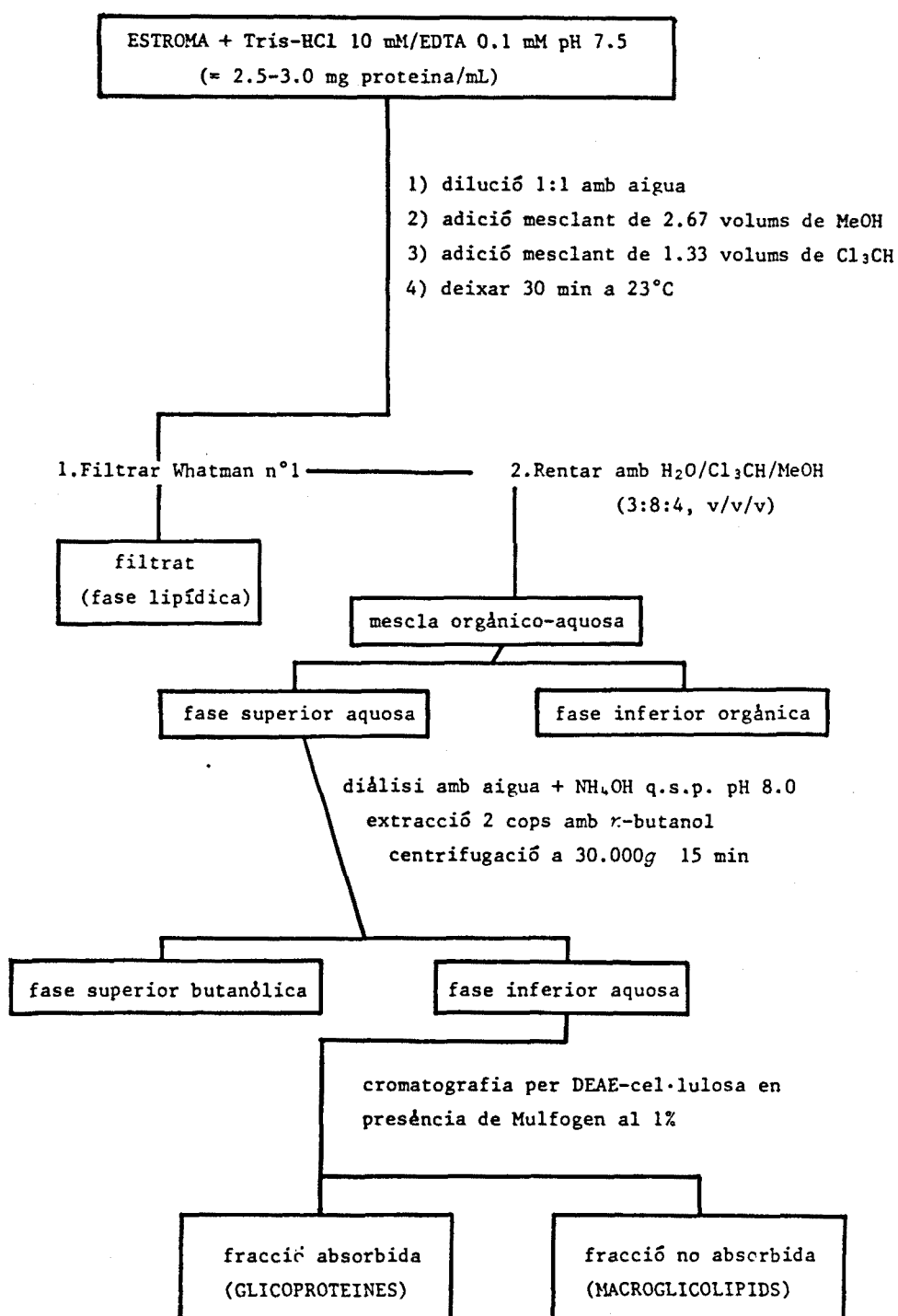


FIGURA 18.- Esquema del mètode d'obtenció de glicoproteïnes segons Finne (1980).

2.1.1. PARÀMETRES COMPARATIUS

Els paràmetres de comparació d'aquestes tècniques han estat els quatre següents:

- cromatografia en capa fina
- espectroscopia infraroja
- contingut proteic
- capacitat inhibidora de l'hemaglutinació

El material de comparació ha estat la fase aquosa obtinguda i a partir de la qual s'han de precipitar les glicoproteïnes. Com la tècnica de precipitació de les glicoproteïnes és comuna als tres mètodes, és vàlid extrapolar els resultats obtinguts amb aquesta fase als que s'obtidrien amb les glicoproteïnes finals, simplificant, d'aquesta manera, la metodologia i minimitzant els errors.

En els tres mètodes s'ha partit d'una suspensió d'estroma liofilitzat en solució amortidora Tris-HCl. Tots els reactius emprats han estat de qualitat analítica, havent-se obtingut el diodesalicilat de liti d'Eastman Kodak (11187). S'ha fet ús d'aigua bidestil·lada en permanganat potàsic amb posterior purificació per un sistema Milli-Q (Millipore).

- Cromatografia en capa fina

Hom ha emprat com a fase estacionària cromatofolis de gel de sílice (Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck 5554) de 0.2 mm de gruïdor.

Com a líquids de desenvolupament hom s'ha emprat els següents sistemes solvents, proposats per RANDEATH (1965) com a més idonis:

- I. Cl₃CH/MeOH/H₂O (65:25:4, v/v/v) per a fosfolípids
- II. Eter de petroli/EtOEt/AcOH glacial (90:10:1, v/v/v) per a lípids neutres
- III. Eter de petroli/Cl₃CH (90:10, v/v) per a colesterol
- IV. Propanol/H₂O (7:3, v/v) i
- V. Cl₃CH/MeOH/H₂O (65:35:8, v/v/v) ambdós per a glicolípid de baix pes molecular.

El revelat s'ha realitzat amb vapors de iode o per observació sota llum ultravioleta a $\lambda = 254$ nm.

a) mètode d'Hamaguchi i Cleve

Amb el sistema solvent I s'ha palesat l'existència de fosfolípids en la fase orgànica i en la interfase. No apareixen taques fosfolipídiques en la fase aquosa.

La fase orgànica també conté lípids neutres i colesterol -o els seus derivats- segons hom pot observar-se amb els sistemes solvents II i III. En canvi, no apareix cap taca en els sistemes solvents IV i V en la fase aquosa. En concret, en el sistema solvent V es mostra el front d'elució quan s'observa sota llum ultravioleta, sense que els vapor de iode mostrin cap taca.

Tampoc no s'observa la presència de substància en la zona d'aplicació, així, doncs, hom pot afirmar que, en aquesta fase, no hi ha macroglicolípids ni poliglicosilceramides, car no tenen mobilitat en aquests sistemes solvents (KOSCIELAK et al., 1977).

Si hom cromatografia alhora una alíquota d'una solució de glicoproteïna humana de la fracció V del sèrum (Pentex, Miles 82-319-1, Estats Units) en solució amortidora PBS, s'obté un capteniment semblant.

En cas de fer una doble extracció amb *n*-butanol de la fase aquosa, l'existència de substàncies lipídiques sols es palesa quan l'extracció amb $\text{Cl}_3\text{CH}/\text{MeOH}$ ha estat incompleta.

b) Mètode de Marchesi et al.

Amb la fase orgànica, desecada en un rotovapor i dissolta amb cloroformo-metanol (2:1, v/v) s'ha comprovat l'existència de fosfolípids, lípids neutres i colesterol, en els sistemes solvents I, II i III, respectivament. A més, les substàncies que componen la fase orgànica tenen mobilitat en els sistemes solvents IV i V.

La fase aquosa d'aquest mètode no presenta mobilitat en els sistemes solvents I, II, III i V, i, en canvi, en el sistema IV, s'observa part de la substància en el front de la fase mòbil sota llum a 254 nm.

c) mètode de Finne

Amb el sistema solvent I apareixen fosfolípids en la fase lipídica i en menor quantitat en la fase inferior orgànica. Un cas semblant passa amb el sistema solvent II, propi dels lípids neutres. Pel que fa al sistema III, propi del colesterol, hom observa que la mostra aplicada de la fase inferior orgànica roman en la zona d'aplicació, mentre que hi ha mobilitat en la fase anomenada lipídica.

El sistema solvent IV mostra l'existència de glicolípid de baix pes molecular en la fase superior aquosa, mentre que amb el sistema V aquests glicolípid es posen de manifest tant en la fase superior aquosa com en la inferior orgànica.

Després de la doble extracció butanòlica, les fases butanòliques cromatografiades amb el sistema solvent V presenten -al revelar-les amb vapors de iode- taques indicatives de la presència de lípids. Aquests no s'observen en la fase inferior aquosa, la qual cosa indica que en aquest cas si que cal l'extracció amb *n*-butanol per assolir una delipidació total.

- *Espectroscopia I.R.*

La determinació s'ha realitzat en un espectrofotòmetre per I.R. Perkin Elmer 1430, dispersant la mostra en KBr, quan aquesta és sòlida, o emprant plaques de NaCl o dissolucions amb Cl_3CH si són líquides.

Aquesta determinació té com a finalitat veure les variacions que cada pas representa en les respectives metodologies envers l'estroma de partida.

Per altre part, NAVARRO et al.(1984) han desenvolupat una tècnica, basada en la determinació de les àrees -que representen les intensitats d'absorbància- en l'interval entre 1730 i 1745 cm^{-1} (aquest límit pot perllongar-se fins 1800 cm^{-1}), que quantifica l'èster lipídic i en l'interval entre 1650 i 1700 cm^{-1} que correspon a l'amida I d'una proteïna desnaturalitzada.

a) Mètode d'Hamaguchi i Cleve

L'espectre I.R. d'una alíquota liofilitzada obtinguda de la part aquosa (figura 19) fet amb pastilla de KBr, mostra absorvància a 3200 cm^{-1} , amb una forma pròpia de la vibració de tensió del grup -OH.

El pic a 2090 cm^{-1} podria indicar la vibració de tensió del grup *zwitterion* NH_3^+ que, sovint, no s'observa.

El pic a 1630 cm^{-1} és propi de l'amida I (vibració de tensió del grup carbonil) mentre que el pic a 1550 cm^{-1} és propi de l'amida II (vibració de tensió del grup C-H i de flexió del grup N-H).

El pic a 1460 cm^{-1} és, per la seva part, propi dels grups -CH₂- i CH₃.

El pic a 1410 cm^{-1} indica vibració del grup -OH en el pla. L'amida III (vibració de tensió del grup C-N i de flexió del grup N-H) s'observa a 1290 cm^{-1} . A 1040 cm^{-1} , l'absorvància pot ésser indicativa dels grups C-C, C-O i C-N, i en aquest cas seria ben raonable que correspongués a la vibració tensional dels grups C-O presents en els glúcids.

La fase orgànica s'ha determinat emprant cloroform com a solvent, i l'espectre (figura 20) mostra un ample pic a 3400 cm^{-1} , que podria indicar el grup -OH associat intramolecularment. Els pics a 2850 i 2925 cm^{-1} , també presents a l'estroma, indiquen l'enllaç C-H on el carboni està en forma sp^3 .

El pic a 1735 cm^{-1} és el propi d'un éster lipídic (aldehid alifàtic), el corresponent a 1650 cm^{-1} caracteritza les amides I.

El pic a 1465 cm^{-1} podria indicar la presència de grups -CH₂ o vibrant amb deformació asimètrica. La deformació simètrica dels mateixos grups es reflexa a 1380 cm^{-1} . L'absorvància en la zona de 1210 a 1240 cm^{-1} és pròpia del grup P=O.

El petit pic a 1085 cm^{-1} pot ésser assignat a diferents grups.

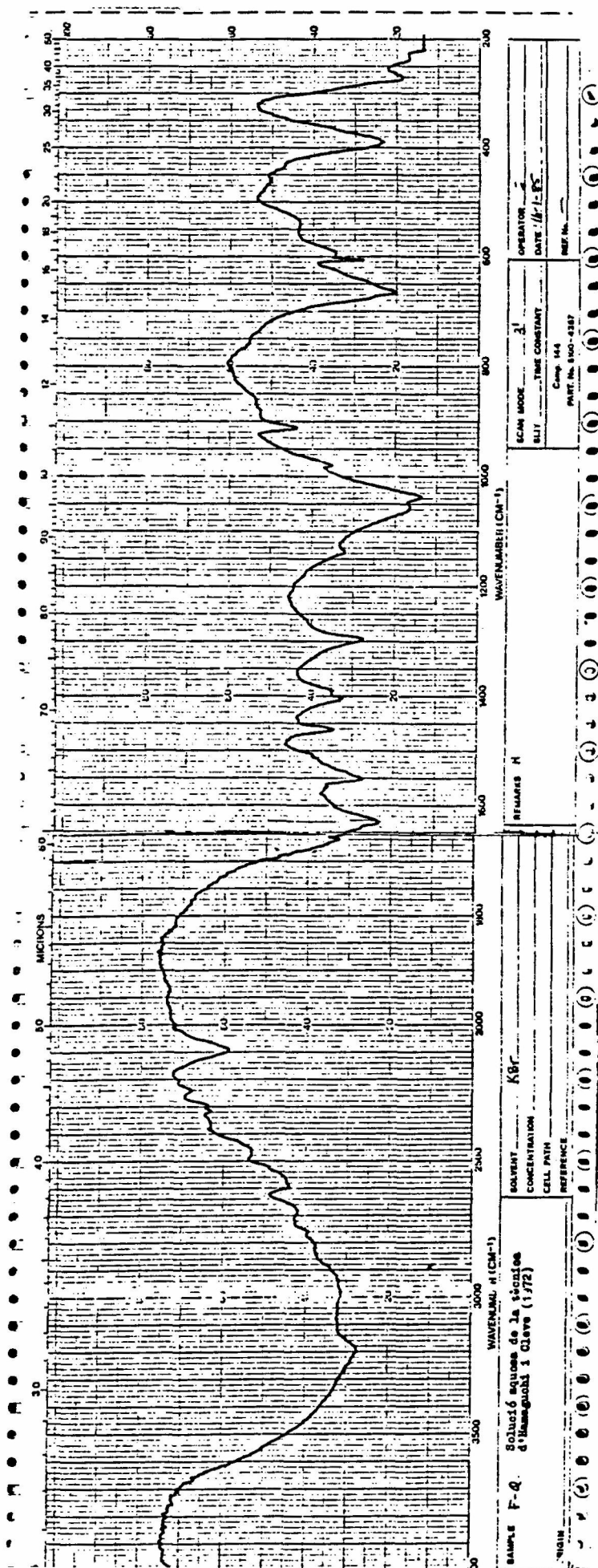


FIGURA 19.- Espectre I.R. de la fase aquosa obtinguda per la tècnica d'Hamaguchi i Cleve.

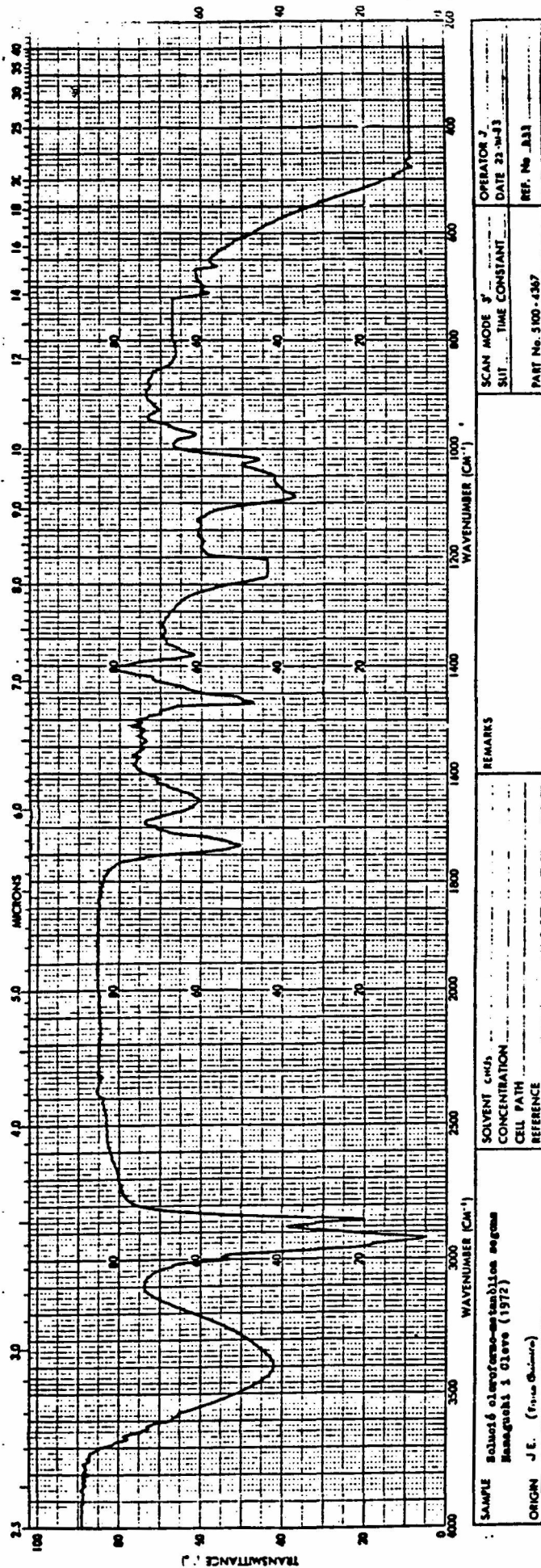


FIGURA 20.- Espectre I.R. de la fase orgànica obtinguda en la tècnica d'Hamaguchi i Cleve.