

CCH.
U A C P P.

3
20)

ESTUDIO DEL CANAL UNITARIO DEL ANTIBIOTICO ANFOTERICINA B

T E S I S

que para obtener el título de

LICENCIADO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

presenta

Santiago Rebolledo Antúnez

1997

1

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE GENERAL

| | |
|---|-----------|
| Resumen | 3 |
| Abreviaturas | 4 |
| Introducción. | 5 |
| Antecedentes | 6 |
| Mecanismo de acción | 28 |
| Objetivo del trabajo | 44 |
| Material y métodos | 45 |
| Resultados y discusión | 61 |
| Conclusiones | 74 |
| Bibliografía | 76 |

R E S U M E N

La anfotericina-B es un antimicótico que ha sido estudiado desde hace tiempo tanto por su importancia farmacológica como por el interés en el entendimiento de la relación estructura-función de los canales iónicos. Se ha propuesto que el canal de este antibiótico está formado por un 'barril' de monómeros y que la presencia de esteroides en la membrana es necesaria para la formación del poro. En el presente trabajo, por medio del uso de la técnica de formación de bicapas artificiales en la punta de un microelectrodo de patch-clamp a partir de una monocapa de fosfolípidos (asolectina de soya) presente en la interfase aire-agua de una suspensión de liposomas, nosotros mostramos que los canales unitarios de anfotericina B que aparecen en una membrana que contiene colesterol, también se observan cuando ésta carece de esteroides. A partir de estos resultados nosotros proponemos la idea de que el papel de los esteroides en la formación del canal de anfotericina B está relacionado con los efectos que éstos producen en la estructura misma de la membrana en lugar de una acción directa en la formación del canal.

A B R E V I A T U R A S

| | |
|------------------------|---|
| Col | Colesterol |
| DC | Dicroísmo circular |
| DMF | Dimetilformamida |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DNA | Acido desoxirribonucleico |
| ESR | Espectroscopía de spin electrónico |
| K_{app} | Constante de asociación aparente |
| LUV | Vesículas unilamelares grandes |
| MLV | Vesículas multilamelares |
| RNA | Acido ribonucleico |
| SUV | Vesículas unilamelares pequeñas |
| TEA | Tetraetilamonio |

I N T R O D U C C I O N

Las membranas biológicas juegan un importante papel en las funciones celulares. Entre ellas destaca su importancia como aislante del medio, que permite el transporte de nutrientes al interior de la célula y como la matriz de una gran cantidad de enzimas y otras proteínas que llevan a cabo la transducción de energía y la transducción de señales.

Para el transporte de compuestos dentro y fuera de la célula existen en la membrana una gran variedad de canales, acarreadores y bombas.

El estudio de los canales iónicos se encontraba limitado exclusivamente a células grandes, pero con el advenimiento de la técnica de patch-clamp, ideada por Neher y Sackmann (1976), ha sido posible su estudio en prácticamente cualquier tipo celular. Se ha descubierto que los canales iónicos participan en infinidad de procesos celulares.

El uso de antibióticos como sistemas modelo del transporte celular a impulsado enormemente el conocimiento en este campo. Algunos de estos antibióticos son los llamados poliénicos como la anfotericina B que se propone actúa formando poros en la membrana. Por su estructura simple, resulta más sencillo modelar el poro de la anfotericina B que el de los canales biológicos comunes. En el presente trabajo presentamos a la anfotericina B como un modelo de poro biológico, ya que a pesar de su estructura simple, presenta características similares con los canales de las células. Además esperamos que un mayor conocimiento a nivel molecular del funcionamiento del poro de anfotericina B nos permita mejorar en el futuro su acción como antimicótico.

A N T E C E D E N T E S

En el remoto año de 1665, Robert Hooke describía por primera vez la apariencia microscópica de los hongos (Gooday, 1977). De entonces para acá, el conocimiento de los microorganismos, de las enfermedades infecciosas y de su tratamiento se ha incrementado enormemente. Las enfermedades causadas por hongos y los agentes antimicóticos han recibido menor atención que las causas y curas de aquellas enfermedades debidas a sus contrapartes más virulentas, las bacterias y los virus. Los hongos resultan ser los patógenos más insidiosos, puesto que son eucariotes y por lo mismo, presentan menos diferencias estructurales y metabólicas con las células animales, las cuales podrían ser aprovechadas para lograr un tratamiento terapéutico eficiente.

Ultimamente, el interés por las micosis y los antimicóticos se ha incrementado debido a varias razones:

En primer lugar, la incidencia de las infecciones debidas a hongos ha aumentado por diversas causas, entre las que destacan el uso de antibióticos de espectro amplio, el uso de esteroides, así como de drogas citotóxicas e inmunosupresoras y a enfermedades inmunosupresoras como el SIDA. Los efectos secundarios de todos estos fármacos generan condiciones ideales para el crecimiento, multiplicación y diseminación de hongos patógenos oportunistas.

En segundo lugar, estudios recientes han contribuido con una descripción detallada de la célula micótica, su composición y sus vías metabólicas, permitiendo entender la manera en que actúan los agentes fungicidas.

Con excepción de ciertas dermatofitas que son patógenos obligados, los hongos patógenos tienen una existencia saprófita y su actividad patogénica es fortuita en su ciclo de vida normal. De acuerdo a Kerridge (1980), los hongos patógenos pueden ser divididos en aquellos hongos que pueden in-

fectar a un hospedero sano normal (por ejemplo, *Histoplasma capsulatum* y *Coccidioides immitis*), y en aquellos patógenos oportunistas (por ejemplo, *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans*) que comúnmente solo infectan a pacientes cuyos mecanismos de defensa normales están dañados.

Antibióticos poliénicos.

El 55% de los antibióticos descubiertos entre 1945 y 1978 provenían de las bacterias gram positivas formadoras de esporas y de micelio, actinomicetos, principalmente del género *Streptomyces*. Dentro de esta gran variedad se encuentran los antibióticos poliénicos. Desde su descubrimiento, fue notorio que estos antibióticos eran tóxicos para los hongos pero no para las bacterias (Hazen y Brown, 1951).

Por lo regular estos compuestos se extraen del micelio del organismo o, en algunas ocasiones, del cultivo completo. El aislamiento del antibiótico puro ha mostrado por lo general ser extremadamente difícil debido a su baja concentración en el medio de cultivo.

Estructura química.

El primero de estos antibióticos en ser descubierto por Hazen y Brown en 1950 fue la nistatina, que es producida por el actinomiceto *Streptomyces noursei*. A partir de entonces se han aislado alrededor de 200 de estos compuestos y solo unas 40 estructuras han podido ser dilucidadas total o parcialmente.

Los antibióticos poliénicos se caracterizan estructuralmente por un largo anillo macrólido de 20 a 44 miembros, el cual está compuesto por átomos de carbono cuyo cierre es efectuado por la formación de un éster o una lactona. La presencia de la lactona les confiere un pico muy característico en el espectro infrarrojo. Dentro de este anillo de macrolactona se encuentra un sistema de dobles enlaces conjugados que es el cromóforo responsable de

la absorción electrónica en la región ultravioleta del espectro. De hecho, el número de dobles enlaces conjugados presentes es la base para la clasificación química de estas sustancias. Así, los polienos con 3, 4, 5, 6 o 7 dobles enlaces conjugados son descritos como trienos, tetraenos, pentaenos, hexaenos o heptaenos, respectivamente.

Otro rasgo característico de estos compuestos es la abundancia de grupos hidroxilo presentes en su molécula. Estos grupos por lo general se encuentran distribuidos a lo largo del anillo macrolídico en átomos de carbono alternados. El número de grupos hidroxilo varía de seis a catorce en estos antibióticos. La presencia por un lado de los grupos hidroxilo y por el otro de los dobles enlaces confiere a los antibióticos poliénicos una propiedad química adicional: el ser moléculas anfifílicas o anfipáticas.

La anfipatía de estas moléculas les confiere propiedades de solubilidad especiales. Los antibióticos poliénicos purificados muestran poca solubilidad en agua y en solventes orgánicos como alcoholes, ésteres o éteres. Por el contrario, estos compuestos pueden ser disueltos por disolventes orgánicos muy polares, tales como el dimetilsulfóxido (DMSO) o la dimetilformamida (DMF). Estas soluciones pueden luego ser diluidas con agua para obtener concentraciones de antibióticos por encima de 50-100 μg .

Muchos antibióticos poliénicos tienen una carga neta conferida por la presencia de un grupo amino, un grupo carboxilo o ambos. En este último caso su molécula tiene un carácter zwitteriónico.

El grupo amino presente en algunos de los antibióticos poliénicos está asociado a un amino azúcar que está unido al anillo macrolídico a través de un enlace glucosídico. En todos los casos, este carbohidrato ha resultado ser una micosamina, es decir, una 3-amino-3,6-dideoxymanososa. La forma α -piranosa del anillo de la micosamina es generalmente más estable que la

forma α -furanosa.

Anfotericina B

La anfotericina B es el más estudiado de los antibióticos poliénicos por su importancia terapéutica en infecciones internas causadas por hongos.

La anfotericina B es el fungicida más efectivo de los dos antibióticos aislados de la cepa M4575 de *Streptomyces nodosus*, proveniente del fango del río Orinoco (Venezuela), cultivada bajo condiciones definidas y reguladas (Gold, et al., 1956; Vandeputte, et al., 1956). La diferencia entre ambos antibióticos es que la anfotericina B es alrededor de diez veces más efectiva que la anfotericina A en inhibir el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*. Esta sustancia se acumula como sedimentos en el micelio y en el medio de cultivo, del cual se extrae con isopropanol a pH 10.5. Su fórmula empírica es $C_{47}H_{73}O_{17}N$ (Borowski, et al., 1970) y tiene un peso molecular de 924.1.

La anfotericina B es el único antibiótico poliénico para el cual tanto su estructura química como su conformación absoluta son conocidas (figura 1).

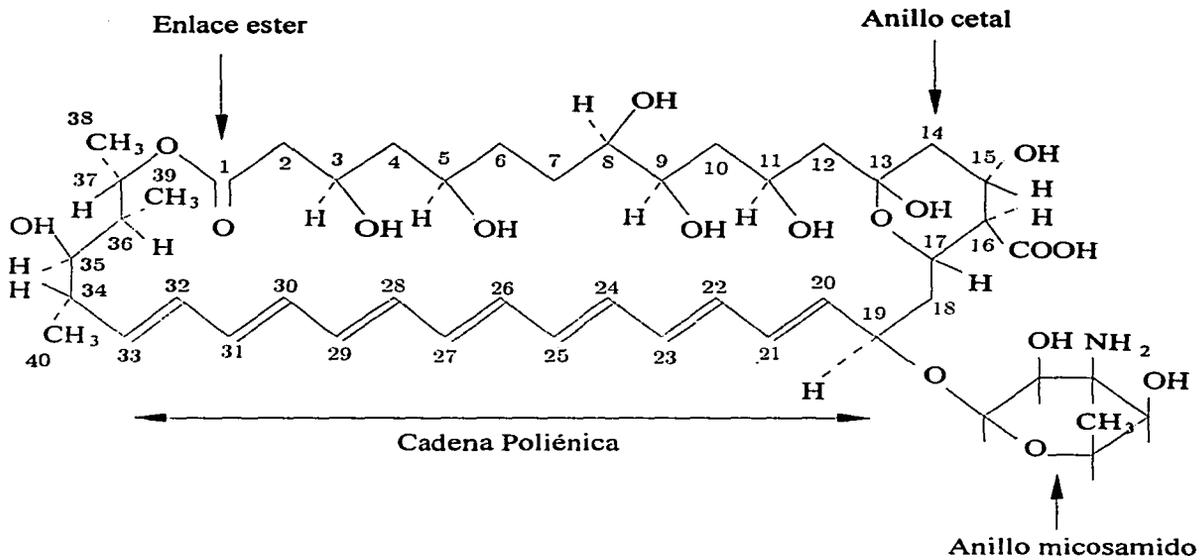


Figura 1. Estructura de la molécula de la anfotericina B.

Mechlinnski et al. (1970) y Ganis et al. (1971) prepararon un derivado N-iodoacetilo de la anfotericina B, el cual fue usado como el derivado de átomo pesado necesario para el análisis del cristal por difracción de rayos X, ya que la anfotericina B sin modificación alguna no pudo ser cristalizada. Este derivado es biológicamente activo de tal forma que es permisible equiparar la estructura y conformación de este derivado con las de la anfotericina B.

Su molécula consta de un largo anillo rectangular de macrolactona con una micosamina y de un anillo cetral en uno de sus extremos, al cual se le conoce como cabeza. El anillo macrólido de este compuesto contiene 37 átomos de carbono y posee dos segmentos claramente diferenciables. Un segmento hidrofóbico del carbono 19 al 34 que presenta siete dobles enlaces conjugados (heptaeno). El análisis de su espectro de absorción electrónica en el ultravioleta y el análisis de la cristalografía de rayos X de la anfotericina B indican que todos ellos están en la conformación trans (Ganis, et al., 1971). Paralelo a este segmento hidrofóbico se encuentra un segmento hidrofílico del carbono 1 al 15 y que presenta siete grupos hidroxilo libres. Los grupos hidroxilo de los carbonos 8, 15 y 35 son ecuatoriales, mientras que aquellos de los carbonos 3, 5, 9, y 11 están en la configuración axial con respecto al anillo de macrolactona y apuntan hacia el mismo lado del plano. Además, cálculos de minimización de la energía conformacional de la molécula de anfotericina B realizados por Rinnert y Maigret (1981) apoyan la consideración de que la conformación del anillo de macrolactona en solución es cercana a la del cristal .

Anexo al anillo de macrolactona hay un anillo cetral cíclico de seis miembros que une los átomos de carbono en la posición 13 (cetona) y 17 (hidroxilo). La micosamina se une a través de un enlace β -glucosídico al grupo hidroxilo del carbono 19 que se encuentra en un extremo de la molécula. Tanto el

anillo cetálico como el anillo de piranosa de la micosamina se encuentran en conformación de silla. La cola de la molécula de anfotericina B presenta un grupo hidroxilo en el carbono 35 y contiene 14 centros asimétricos, los cuales están en el anillo macrolídico lactona.

Al igual que los otros antibióticos poliénicos, la anfotericina B es muy poco soluble en agua cuando el pH está por arriba de 2 y por debajo de 11, es decir, es un anfótero. Este comportamiento se debe a la amina primaria de la micosamina y al grupo carboxilo del carbono 16 del anillo cetálico.

Espectroscopía.

Los antibióticos poliénicos se caracterizan por tener un intenso espectro de absorción en el ultravioleta. Estos son muy similares y se deben al sistema de dobles enlaces conjugados del anillo de macrolactona (Oroshnik, et al., 1955). Cuando estos compuestos se disuelven en dimetilsulfóxido absorben entre los 300 y 450 nm. La longitud de onda exacta de absorción depende de la longitud de la cadena poliénica y del índice de refracción del disolvente. El espectro presenta una estructura vibracional y por lo general se observan cuatro bandas.

Exactamente a la misma longitud de onda se observan ligeras bandas de dicroísmo circular (DC). Puesto que el coeficiente de extinción de estos antibióticos es muy alto, sus espectros de resonancia Raman son intensos y pueden ser registrados a muy bajas concentraciones. Sin embargo, su señal es poco afectada por el entorno de la molécula.

Los antibióticos poliénicos son solubles en agua a muy bajas concentraciones como $10^{-8}M$. A mayores concentraciones, las bandas cambian ligeramente y una ancha banda sin estructura aparece en el lado azul del espectro, la cual corresponde a un doblete dicroico muy intenso y que es interpretada como una banda excitónica. En presencia de lípidos, proteínas

o lipoproteínas, las bandas de longitud de onda de mayor absorción de los antibióticos poliénicos en agua se modifican y concomitantemente, la banda excitónica desaparece. Los cambios que se observan en los espectros de DC son similares, pero aportan mayor información, porque dichas bandas pueden cambiar de signo e intensidad de acuerdo a la naturaleza del lípido con el cual interactúe.

Los polienos con cadenas menores como dienos, trienos, tetraenos fluorescen y registran cambios de su fluorescencia en presencia de lípidos; pero los polienos heptaenos como la anfotericina B no presentan fluorescencia.

En agua, bajas concentraciones (10^{-8} M) de anfotericina B generan un espectro de absorción electrónica similar al de ésta en dimetilsulfóxido. Se observan cuatro bandas entre los 420 y 320 nm (409, 385, 365 y 347 nm) (Bolard, et al.,1980). Conforme aumenta la concentración de la anfotericina B en agua, el espectro se modifica progresivamente y arriba de 10^{-4} M se observa un espectro totalmente nuevo. Las bandas cerca de los 400 nm son remplazadas por otras a 420, 385 y 360 nm y una intensa y amplia banda se genera aproximadamente a 340 nm (Bolard, et al.,1980).

El dicroísmo circular a bajas concentraciones de anfotericina B presenta cuatro bandas positivas a 409, 385, 365 y 347 nm. Los espectros de DC de la anfotericina B en dimetilsulfóxido y en 75% de etanol a concentraciones de 10^{-4} M o menores muestran bandas positivas a 412, 385, 361 nm y un hombro a 352 nm. Estas bandas son características de sistemas conjugados. La estructura fina vibracional observada en esta región de longitud de onda muestra que la molécula existe como monómero (Balakrishnan y Easwaran, 1993).

El espectro de dicroísmo circular es altamente dependiente de la polaridad del disolvente. La anfotericina B en agua y en disolventes no polares como

el cloroformo y el acetonitrilo a concentraciones de 10^{-5} - 10^{-4} M presenta un espectro de dicroísmo circular con un fuerte doblete centrado alrededor de los 342 nm con una intensa banda a 328 nm y gran elipticidad. El doblete dicroico ha sido atribuido a la agregación de la anfotericina B organizada en una estructura asimétrica. La banda positiva de dicroísmo circular es un indicador del grado de agregación del antibiótico. Como podemos ver, la espectroscopia de los antibióticos poliénicos es fuertemente dependiente del medio, el estado de agregación y otros compuestos con los que interactuen éstos, de ahí su importancia en dilucidar el posible mecanismo de acción e implicaciones farmacológicas.

Agregación.

Estudios de dispersión de luz en soluciones de anfotericina B indican un sistema agregado de aproximadamente 600Å de tamaño y de alrededor de 2000 moléculas en la fase acuosa (Rinnert, et al., 1977; Ernst, et al., 1981). Los datos obtenidos de absorción electrónica y de dicroísmo circular de la anfotericina B en solución acuosa fueron analizados por Hemenger y colaboradores (1983), quienes propusieron un arreglo helicoidal para estos agregados. El espectro de DC del antibiótico en cloroformo y acetonitrilo a aproximadamente 10^{-4} M es similar en sus características al de la anfotericina B en agua, excepto por una disminución en su amplitud. Esto se debe a la formación de agregados con menor número de moléculas de antibiótico en estos disolventes. La forma bimodal del espectro de dicroísmo circular es un indicador de una estructura multimolecular en la cual los cromóforos heptaeno presentan interacciones excitónicas.

Dependiendo de la temperatura, el solvente de origen, la concentración de la solución base, el tiempo transcurrido desde la disolución, la naturaleza del amortiguador y su concentración final, la anfotericina B puede estar pre-

sente en forma soluble como monómeros o como oligómeros. Más allá de una concentración crítica, el antibiótico se empieza a presentar en forma de agregados o micelas. Es decir, el antibiótico está presente como un equilibrio entre monómeros, oligómeros solubles y agregados insolubles. Para el monómero de anfotericina B, un pico de absorción electrónica es detectado a 409 nm con un coeficiente de extinción de aproximadamente $120,000 M^{-1}cm^{-1}$; para los oligómeros solubles se observa un pico a 420 nm con un coeficiente de extinción de $11,600 M^{-1}cm^{-1}$. La anfotericina B disuelta en metanol a concentraciones menores de $10^{-4} M$ se encuentra totalmente en forma monomérica, con un pico de absorción electrónica a 407 nm y un coeficiente de extinción de $150,000 M^{-1}cm^{-1}$. El espectro de dicroísmo circular presenta un intenso doblete dicroico para la forma oligomérica de la anfotericina B centrado aproximadamente a 340 nm (el pico positivo a 325 nm y el pico negativo a 350 nm), mientras que el espectro del monómero en esta región de longitud de onda es despreciable.

Una forma sencilla de cambiar el estado de agregación de la anfotericina B en solución acuosa es mediante el cambio de temperatura. A temperaturas elevadas, el espectro de dicroísmo circular indica que la anfotericina B cambia de un estado más asociado a uno más monomérico.

Autooxidación.

Se ha reportado que los antibióticos poliénicos presentan autooxidación (Dekker y Ark, 1959; Rickards, et al., 1970) y se cree que éste es el posible mecanismo de su inactivación (Beggs, 1978). Así, los siete dobles enlaces conjugados que posee la molécula de anfotericina B la hacen propensa a procesos de autooxidación. Se ha demostrado que la adición de antioxidantes retarda la inactivación de la anfotericina B (Andrews, et al., 1977; Andrews, et al., 1979). También se ha establecido que los mayores productos de degradación

de los polienos son sus correspondientes epóxidos y se ha propuesto que resultan de un proceso que implica la formación de radicales libres (Rickards, et al., 1970). Sin embargo, un estudio directo por espectroscopía de spin electrónico (ESR) de estos sistemas de reacción fracasó en producir espectros de radicales libres, posiblemente debido a su baja concentración o a su rápida cinética si se trata del paso limitante. La detección es posible cuando se sigue la pérdida de la señal de ESR debida a la reacción de un nitróxido estable con los radicales libres formados como intermediarios de la autooxidación del antibiótico. Midiendo el consumo de oxígeno como indicador de la autooxidación, se observa que ésta y la formación de radicales ocurren en la misma escala de tiempo que la inactivación del antibiótico (Lamy-Freund, et al., 1985; Schreier y Lamy-Freund, 1993).

Efecto antimicótico.

En 1961 Kinsky observó que los polienos alteran la permeabilidad de la membrana plasmática de *Neurospora crassa*. Además, este autor notó una disminución del peso seco del micelio, acompañada de una salida de componentes celulares (sales inorgánicas, aminoácidos, azúcares, nucleótidos) hacia el medio de cultivo. Estas observaciones, junto con la imposibilidad de demostrar *in vitro* algún efecto sobre los sistemas enzimáticos conocidos sugirió fuertemente que el principal efecto de los antibióticos poliénicos era incrementar la permeabilidad de la membrana celular.

Se ha reportado la fuga de pequeñas moléculas como iones fosfato y ácidos carboxílicos del interior de las células en presencia de antibióticos poliénicos. Sin embargo, la pérdida de iones potasio del interior de la célula parecería ser la más frecuente y la más significativa. Esta pérdida no está necesariamente relacionada con el efecto letal del antibiótico como lo demostró Zygmunt (1966), quien comparó la pérdida de K^+ y la inhibición del crecimiento

en *Candida albicans*. Si bien hay una excelente correlación entre estos dos parámetros para algunos polienos, no lo es tanto para otros. De esta manera, se puede clasificar a los antibióticos poliénicos por la relación que guardan sus efectos fungistático y fungicida en dos grupos. El primero estaría constituido principalmente por trienos, tetraenos, pentaenos y algunos hexaenos en los cuales ambos efectos son prácticamente indistinguibles. El segundo grupo estaría representado por heptaenos (anfotericina B) o antibióticos similares como la nistatina. En presencia de estos compuestos se produce una considerable fuga del K^+ intracelular a concentraciones en las cuales no se provoca una alta muerte celular. Al parecer en este caso ninguno de los efectos fungistático y fungicida del antibiótico están relacionados directamente con la pérdida del K^+ intracelular. Este grupo de antibióticos poliénicos tiene un efecto fungistático a bajas concentraciones, mientras que su efecto fungicida se empieza a observar conforme aumenta su concentración. Esta clasificación es la misma si se le basa en la relación existente entre la salida inducida de K^+ intracelular y la hemólisis causadas por estos antibióticos.

Al parecer esta diferencia en los efectos provocados por ambos grupos de antibióticos poliénicos se debe a su mecanismo de acción. Si bien ambos actúan principalmente en la membrana celular, el primer grupo produce un notorio daño a la estructura de ésta como lo muestran estudios de microscopía electrónica con células en presencia de antibióticos como la filipina. En el caso de los miembros de este grupo, la asociación del antibiótico con el esteroles de la membrana al parecer resulta en la formación de complejos de unos 20 nm de diámetro dentro de la región hidrofóbica de la bicapa fosfolipídica, causando de esta forma un serio daño a la membrana.

En cambio, la incorporación de polienos largos como la anfotericina B y la nistatina a la membrana plasmática de organismos sensibles parece resultar

más bien en la producción de un poro acuoso que consiste de un anillo de 0.4-1 nm de diámetro, formado por varias moléculas de antibiótico. Por lo general, los polienos pequeños producen mayor daño en la membrana, aunque los de mayor anillo tienen una mayor actividad antimicótica.

Otra diferencia notable entre estos grupos es la selectividad en cuanto al tipo de células que afectan. Aquellos como la anfotericina B afectan principalmente células que tienen al ergosterol como estero principal, tal es el caso de los hongos. Mientras que aquéllos como la filipina son más dañinos para células que contienen colesterol en su membrana plasmática como las células de mamífero.

El hecho causante de la muerte celular es un tema aun en debate. La salida de K^+ de la célula facilita la entrada de protones, lo que provoca una acidificación interna. Esta acidificación lleva a una precipitación irreversible de los componentes citoplásmicos. A la vez que se da la pérdida de K^+ , disminuye la síntesis de proteínas y RNA, así como la captura de aminoácidos y el consumo de glucosa (Liras y Lampen, 1974). También se ha reportado que la glucólisis es inhibida como resultado de la disminución de K^+ después de tratar con polienos. Algunos autores han reportado que la inhibición de la glucólisis que resulta por la salida de K^+ de la célula en presencia de antibióticos poliénicos disminuye o no se presenta cuando se agregan iones K^+ y NH_4^+ a la solución externa, evitando con ello su difusión.

El estudio de la inhibición de la fermentación de maltosa en *Saccharomyces cerevisiae* en presencia de anfotericina B o nistatina, ha llevado a proponer que el primer evento producido por estos antibióticos es un aumento de la permeabilidad a protones de la membrana plasmática y no la fuga de K^+ . De este modo, puesto que la acumulación de K^+ en las levaduras está ligada al gradiente de protones (Peña, 1975), la pérdida de K^+ del interior

de la célula sería una consecuencia de esta mayor permeabilidad a protones.

Otra posible causa de la muerte celular es la intervención de la anfotericina B en el daño oxidativo de la membrana celular. Se ha observado que la lisis de protoplastos de *Candida albicans* disminuye hasta un 80% en hipoxia si se le compara con incubaciones en aire.

No obstante que se ha reportado que la anfotericina B, la nistatina y la levorina inhiben la actividad enzimática de la ATPasa y la lactato deshidrogenasa de *Candida albicans*, la concentración de antibiótico requerida *in vitro* es mucho más elevada que la concentración mínima necesaria para inhibir el crecimiento de estos microorganismos.

Como se puede apreciar, el efecto de la anfotericina B en las células es complejo y depende de una variedad de factores como la dosis, el modo en que se administra y la fase de crecimiento en que se encuentran las células. De esta manera, se ha propuesto que los efectos de la anfotericina B en las células pueden ser divididos en tres períodos separados y dependientes de la dosis: estimulación, permeabilización y lisis.

A bajas concentraciones de anfotericina B, ocurre un efecto estimulatorio el cual se manifiesta en particular por un incremento en las unidades formadoras de colonias de hongos y en una proliferación de células animales en cultivo y una más eficiente incorporación de precursores marcados en su DNA y RNA. Las bases de este efecto se desconocen. Concentraciones iguales o mayores de antibiótico también afecta la permeabilidad de la membrana celular para cationes monovalentes; ésto se manifiesta en una fuga y una disminución del K^+ intracelular o un flujo de Na^+ o Rb^+ extracelulares al interior de la célula. En este estado, el crecimiento de las células se inhibe y también puede ocurrir muerte celular. A altas concentraciones de antibiótico, las células se lisan, probablemente la ruptura de la membrana se debe a la

acción directa de la anfotericina B.

Las misteriosas discrepancias entre los resultados *in vitro* y clínicos han llevado a sugerir que la anfotericina B tiene un efecto inmunoestimulante en el hospedero que resulta en una mayor respuesta antipatógena. Se sabe que la anfotericina B estimula la función de algunos tipos de células. Este efecto estimulador en macrófagos y linfocitos resulta en un incremento de la respuesta inmune. Se ha demostrado que la anfotericina B puede activar macrófagos para que se adhieran al plástico, incrementa los niveles de prostaglandina E_2 y mata bacterias, parásitos y células en cultivo. Estos efectos estimuladores ocurren a concentraciones específicas de anfotericina B; mayores concentraciones son tóxicas para las células del hospedero, disminuye la quimiotaxis de leucocitos polimorfonucleares y la fagocitosis y aniquilamiento por parte de los macrófagos. Así, a concentraciones de antibiótico que frenan el crecimiento de hongos, pero que resultan ser demasiado bajas como para afectar a las células de mamífero, puede presentarse una estimulación inmunológica del hospedero; todo esto debido a la selectividad del antibiótico por el tipo de esterol en la membrana.

Hay algunos reportes que indican que eventos dependientes de oxidación se encuentran involucrados en la estimulación de las células de sistema inmune inducida por la anfotericina B. Una de estas evidencias es el hecho de que enzimas como la catalasa y la superóxido dismutasa son capaces de inhibir algunos efectos estimuladores debidos a la anfotericina B.

Importancia clínica.

Los antibióticos poliénicos son letales para los hongos, los platelmintos, las algas superiores, entre otros; y además, lisan a los glóbulos rojos en soluciones isotónicas. Las membranas de las células de todos estos organismos contienen esteroides. Los polienos no tienen ningún efecto en bacterias y algas verde-

azules, ambos carecen de cualquier tipo de esterol en su membrana.

Estos antibióticos son efectivos cuando se les emplea contra muchas especies de hongos como:

Candida albicans, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Trichophyton*, *Microsporium*, *Epi-dermophytes*, *Aspergillus*, *Penicillum*, entre otros. Su actividad fungicida varía considerablemente dependiendo del tipo de hongo de que se trate.

Desafortunadamente, a pesar de su excelente actividad antimicótica, pocos de estos compuestos se han podido utilizar en el tratamiento de infecciones causadas por hongos, ya que su utilidad terapéutica ha sido limitada por su baja solubilidad, su lenta difusión, su inestabilidad y, sobre todo, por su alta toxicidad. Aunque existen muchos antibióticos poliénicos solo tres de ellos son útiles clínicamente en el tratamiento de infecciones micóticas: nistatina, anfotericina B y candicidina. La nistatina se utiliza en el tratamiento de infecciones en la piel, membranas mucosas y en el tracto gastrointestinal. La anfotericina B y la candicidina también son usadas en el tratamiento de infecciones superficiales debidas a hongos como *Candida albicans*.

La anfotericina B está indicada en el tratamiento de blastomicosis, histoplasmosis, criptococosis, candidiasis, torulopsosis, paracoccidioidomiosis, coccidioidomiosis, mucormicosis craneofacial, aspergilosis invasiva, y esporotricosis extracutánea.

En estudios *in vitro*, la gran mayoría de los hongos que causan micosis sistémicas son inhibidos en su crecimiento por la anfotericina B a concentraciones que son alcanzables en la sangre después de la aplicación de una dosis por vía intravenosa. Las concentraciones mínimas inhibitorias son comúnmente menores que 2.5 $\mu\text{g/ml}$ para varios microorganismos. La relevancia de la determinación *in vitro* de las concentraciones mínimas letales no

es clara, ya que el alcanzar estas concentraciones de anfotericina B en la sangre y los líquidos corporales implica una alta toxicidad. Las concentraciones mínimas inhibitorias se ven afectadas por múltiples factores como el tamaño del inóculo, la temperatura y la duración de la incubación y la composición del medio. Por lo general, hay una buena correlación entre la efectividad del antibiótico *in vitro* y los resultados clínicos de la terapia.

Además de su acción antimicótica, muchos antibióticos poliénicos también presentan actividad efectiva contra protozoarios de importancia clínica como tricomonadas, *Entamoeba histolitica*, *Naegleria*, *Leishmania* y Tripanosomas.

Ni la anfotericina B ni la nistatina son absorbidas significativamente por el tracto gastrointestinal. Para su uso en el tratamiento de infecciones internas, la anfotericina B es suministrada como un polvo seco que consiste de 50 mg de anfotericina B, 41 mg de desoxicolato de sodio y 25.2 mg de fosfato de sodio en viales de vidrio con atmósfera de nitrógeno gaseoso. A esta combinación de sales se le conoce comercialmente con el nombre de Fungizon. Después de adicionar 10 ml de agua destilada y una vigorosa agitación se obtiene una suspensión amarilla, una dispersión coloidal de micelas de anfotericina B y desoxicolato. Antes de su inyección, la suspensión inicial debe ser diluida con una solución estéril de 5% de glucosa hasta una concentración final que no debe exceder 0.1 mg/ml. El pH debe estar entre 4.2 y 6.5 para minimizar la descomposición y la agregación del antibiótico (Hoeprich, 1978). Esta suspensión diluida puede ser usada en forma intravenosa o en inyección local en el sitio infectado del cuerpo.

La efectividad del tratamiento depende de la facilidad con que el antibiótico pueda penetrar al sitio afectado. Estudios realizados en el primate *Macaca mulata* muestran que el sitio de mayor acceso de la anfotericina B son los riñones, con menores cantidades en el hígado, pulmones, tiroides, corazón,

pancreas y huesos, mientras que uno de los lugares de menor acceso es el sistema nervioso central. Inmediatamente después de la inyección intravenosa de la droga, se encuentra un poco más del 10% de su bioactividad en el plasma, fuertemente asociada con proteínas del plasma (incluyendo lipoproteínas y albúmina). La administración en forma intravenosa de la anfotericina B ha producido concentraciones pico de 0.5-3 $\mu\text{g/ml}$ en el plasma. La vida media reportada en el plasma es alrededor de 24 horas y la anfotericina B se excreta lentamente en la orina, aunque ésta solo representa un pequeño porcentaje de la cantidad suministrada (Fields, et al., 1970).

La efectividad del tratamiento de una micosis sistémica depende del tipo y la severidad de la infección, los mecanismos de defensa del paciente y del control de los efectos tóxicos del antibiótico.

Toxicidad.

El principal factor limitante para el empleo terapéutico de los polienos es su alta toxicidad. Como ya hemos mencionado, la anfotericina B es el menos tóxico de estos antibióticos para ser utilizado en el tratamiento de infecciones sistémicas. Sin embargo, cuando se aplica por vía intravenosa presenta serios efectos tóxicos.

Algunos de estos malestares pueden ser fácilmente controlables, pero otros pueden ser tan graves que obligan a parar el tratamiento.

Las soluciones de anfotericina B irritan el endotelio venoso y pueden causar dolor y tromboflebitis en el sitio de la inyección. Jaqueca, náusea, escalofríos, fiebre, dolor de músculos y articulaciones, anorexia, pérdida de peso, disfunción del octavo nervio craneal, trombocitopenia, disfunción hepática y reacciones alérgicas son algunos de los efectos colaterales que pueden presentarse.

Anemia e hipocalcemia también ocurren con frecuencia y estudios *in vitro*

demuestran que la anfotericina B tiene un efecto hemolítico en eritrocitos. Sin embargo, los eritrocitos de los pacientes tratados por vía intravenosa con anfotericina B no muestran evidencia directa de daño, por lo que se sospecha que la anemia causada por el antibiótico podría deberse al efecto sobre las células precursoras en lugar de la hemólisis de los eritrocitos maduros.

Por mucho el efecto más grave de la anfotericina B es su nefrotoxicidad. Esta tiene dos componentes principales: disminución de la tasa de filtrado glomerular probablemente derivada de una vasoconstricción renal y una deteriorada excreción ácida acoplada con hipocalemia. Se ha observado con frecuencia un funcionamiento renal anormal con aumento de urea en la sangre y altas dosis de antibiótico pueden causar degeneración de los túbulos renales. La nefrotoxicidad invariablemente ocurre con la administración sistémica y, por lo regular, es el principal factor que limita la dosis de antibiótico y que lleva incluso a la suspensión del tratamiento.

Al menos en parte, estos efectos colaterales probablemente son resultado de la interacción de la anfotericina B con las membranas celulares del hospedero que contienen colesterol

A lo largo de los últimos años, se han desarrollado nuevas estrategias en un esfuerzo por superar las desventajas asociadas con el uso clínico de la anfotericina B (Brajtburg, 1990).

1) Se han desarrollado agentes antimicóticos alternativos.

2) Se han sintetizado y estudiado derivados de la anfotericina B con el fin de disminuir su toxicidad sin afectar demasiado su calidad de antibiótico (Chen, et al., 1977; Saint-Julien, et al., 1992).

3) Mejores terapias para la cura de ciertas infecciones micóticas se han logrado mediante la combinación de la anfotericina B con otros antimicóticos. Una aproximación a este problema fue impulsada por Medoff y colaboradores

en 1971. Ellos observaron el efecto *in vitro* de la anfotericina B junto con otro agente antimicótico, la 5-fluorocitosina y fueron capaces de obtener efectos tóxicos potenciados: los efectos debidos a los dos antibióticos juntos eran mayores a la suma de los efectos de cada uno por separado. El razonamiento detrás del uso de un segundo agente radica en que la mayor permeabilidad de la membrana celular inducida por la anfotericina B favorece la entrada de la 5-fluorocitosina o alguna otra droga al interior de la célula.

4) Con la idea de que la toxicidad del antibiótico depende en parte de su estado de agregación, se han probado nuevas preparaciones de anfotericina B con resultados prometedores. Entre estas nuevas preparaciones destacan una dispersión coloidal de anfotericina B y colesteryl sulfato llamada Amphocil (Berman, et al., 1992; Hostetler, et al., 1992) y la encapsulación de la anfotericina B en liposomas formados con distintas mezclas de fosfolípidos (Schiffman y Klein, 1977; Peterson, et al., 1991).

Resistencia.

La resistencia de hongos a la anfotericina B es un evento poco frecuente. De hecho se podría decir que no representa un problema clínico serio. En un estudio de 2015 cepas de *Candida albicans* aisladas de fuentes clínicas por Athar y Winner en 1971 no fue posible encontrar alguna resistente a la nistatina o a la anfotericina B. Sin embargo, su incidencia real es difícil de determinar debido a que no se realizan estudios rutinarios de susceptibilidad, y no hay pruebas estandarizadas que podrían ser usadas para comparar los resultados de diferentes laboratorios.

Aunque se ha podido inducir resistencia de algunos hongos a la anfotericina B *in vitro*, ésto por lo regular trae consigo una disminución en su virulencia y éstos vuelven a ser susceptibles después de cultivarse en un medio libre de antibiótico (Hebeka y Solotorovsky, 1965). Por ejemplo, se han aislado

mutantes resistentes de *Candida albicans* en varios laboratorios que han sido utilizadas para el estudio del metabolismo de los esteroides y de la interacción del polieno con la membrana plasmática.

Se han descrito por lo menos tres tipos de resistencia.

1) Algunas cepas de hongos son resistentes porque reducen el contenido de ergosterol en su membrana plasmática, principalmente debido a alguna deficiencia en su vía de síntesis, y aparecen en la misma esteroides menos afines a la anfotericina B (Woods, 1971; Woods, et al., 1974; Grindle y Farrow, 1978). La existencia de estas mutantes apoya la noción de que el esteroide es requerido para la acción de los polienos.

2) Sin embargo, una alteración de la composición lipídica por sí sola no implica una mayor resistencia al antibiótico. Por ejemplo, se han encontrado casos en que mutantes de *Candida albicans* resistentes a la anfotericina B presentan un mayor nivel de ergosterol en su membrana que las células de la cepa silvestre. También existen otros casos en que la resistencia no está asociada a cambios significativos ni cualitativos ni cuantitativos de la composición de los esteroides de la membrana de dichos microorganismos. Así, esta resistencia podría deberse a la inducción de una enzima que degrade al antibiótico poliénico.

3) Finalmente, hay cepas de *Candida albicans* que sufren cambios en la permeabilidad de su membrana pero que permanecen viables *in vitro*. El mecanismo de este último caso de resistencia no se ha entendido aún.

El primer blanco del antibiótico es la membrana plasmática, pero para tener acceso a éste, la anfotericina B primero debe atravesar la rígida pared celular del hongo, la cual está compuesta de quitina y beta-1,3-glicanos. El papel exacto de estos últimos en la disminución del acceso de la anfotericina B a la membrana plasmática y por ende a una resistencia significativa, es

poco conocido. Existe evidencia de que la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* tiene una porosidad limitada y que excluye a polietilen glicoles de pesos moleculares mayores a 800. A pesar de esto, los antibióticos poliénicos con pesos moleculares de alrededor de 1000 pueden penetrar hasta la membrana plasmática. Además, al parecer la unión de los antibióticos poliénicos a la pared celular de las levaduras es rápida y se ha propuesto un sitio de unión para el antibiótico. Como la pared celular carece de esteroides, este sitio debe ser distinto al sitio de unión de los antibióticos en la membrana plasmática.

La nistatina y la anfotericina B son rápidamente asimiladas por la pared celular de las células de *Saccharomyces cerevisiae* y luego difunden lentamente a través de la pared hacia la membrana plasmática. Cuando los grupos sulfidrilo y amino de la pared celular han sido modificados, la captura de la anfotericina B es casi instantánea.

También se ha observado que ocurren cambios fenotípicos en la estructura y la organización de la pared celular de *Candida albicans* después del cese del crecimiento que resultan en una mayor resistencia tanto contra antibióticos poliénicos como contra imidazoles.

Queda claro la importancia de los antibióticos poliénicos, en general y de la anfotericina en particular como el fármaco más eficaz en el tratamiento de infecciones sistémicas por hongos, no obstante sus desventajas. En el capítulo siguiente trataremos de su importancia como modelo de canal biológico.

MECANISMO DE ACCION

Como mencionamos en el capítulo anterior, al parecer la acción más importante de la anfotericina B se lleva a cabo a nivel de la membrana plasmática y la mayoría de la evidencia experimental apunta al requerimiento de algún tipo de esteroles en la bicapa. En la presente sección nos enfocaremos en su posible mecanismo de acción dentro de la membrana.

Interacción antibiótico-esterol.

La evidencia que apoya la hipótesis de que la interacción de los antibióticos poliénicos con el esteroles de las membranas en las que actúa, viene principalmente de tres fuentes:

i) La presencia de esteroides en membranas naturales y artificiales hace que éstas sean sensibles a los antibióticos poliénicos.

Desde un principio fue notorio que los antibióticos poliénicos resultaban ser tóxicos para los hongos y otros eucariontes, pero no para las bacterias. Sin embargo, pasarían muchos años para que se dilucidara la posible causa de esta selectividad. En 1961, Kinsky demostró que los antibióticos poliénicos alteraban la permeabilidad de la membrana de *Neurospora crassa*. El observó que estos antibióticos causaban una rápida disminución del peso micelial seco, el cual es acompañado por la fuga de componentes celulares (sales inorgánicas, aminoácidos, azúcares, nucleótidos) al medio de cultivo.

Los antibióticos poliénicos son nocivos para todos aquellos organismos que contienen algún tipo de esteroles en su membrana. Por ello, estos antibióticos no provocan ningún efecto en procariontes, cuyas membranas se encuentran libres de esteroides.

También se ha obtenido evidencia directa del requerimiento de esteroides en un estudio de sensibilidad de *Acholeplasma laidlawii* a filipina. Este orga-

nismo, si bien no contiene esteroides en su membrana, es capaz de incorporarlos a ésta si se encuentran en el medio de cultivo. Se pudo observar que la filipina inhibía el crecimiento y causaba la lisis de las células en presencia de colesterol, pero que no tenía ningún efecto sobre aquellas crecidas en su ausencia. Al parecer el esteroide es necesario para la toxicidad del antibiótico.

De Kruijff y colaboradores (1974 a,b) midieron el aumento en la permeabilidad de la membrana plasmática de *Acholeplasma* inducida por antibióticos poliénicos. Estos autores encontraron un aumento de la permeabilidad inducida por filipina, nistatina y anfotericina B sólo si algún tipo de esteroide estaba presente en la membrana. En este caso, el tipo de esteroide es importante, con al menos dos requerimientos estructurales evidentes:

(1) Un grupo 3- β -hidroxilo. El colesterol y el colestanol, ambos con un grupo 3- β -hidroxilo, son activos, mientras el epicolesterol y el epicolestanol, ambos con un grupo 3- α -hidroxilo, son inactivos.

(2) El núcleo esteroide debe ser plano. El coprostanol con un anillo doblado (cis) A/B es inactivo, mientras que todos los esteroides activos presentan anillos coplanares.

Además, un grupo cetónico no puede sustituir al grupo 3- β -hidroxilo del esteroide.

Los resultados fueron idénticos cuando se utilizaron liposomas.

ii) La adición de esteroides al medio de cultivo de algunos hongos antagonizan a los antibióticos poliénicos.

Gottlieb y colaboradores (1958, 1961) observaron que al poner esteroides al medio de cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* se prevenían los cambios en permeabilidad y la inhibición del crecimiento inducidos por filipina. Al parecer hay una competencia entre los esteroides de la membrana y los del medio de cultivo por el antibiótico.

iii) Mediante el empleo de diferentes métodos fisicoquímicos ha sido posible demostrar la existencia de una interacción entre la anfotericina B y esteroides en medio acuoso y en otros sistemas.

La filipina, la anfotericina B y la nistatina muestran cambios similares en su espectro en el ultravioleta inducidos por la presencia de colesterol libre en la solución acuosa (Norman et al., 1972 a, b). La absorción máxima característica del grupo poliénico cambia su intensidad relativa pero no así su longitud de onda. Esto sugiere que se trata de una interacción relativamente débil con alguna restricción conformacional de la parte poliénica de la molécula.

En liposomas, la anfotericina B interactúa preferentemente con aquellos que contienen algún esteroide plano y con un grupo 3- β -hidroxilo, aunque puede presentar una pequeña pero significativa interacción con esteroides no planos y con un grupo 3- α -hidroxilo. También se observan estos cambios cuando la filipina y la anfotericina B interactúan con membranas de eritrocito y *Acholeplasma* que contienen colesterol. Estos cambios no se observan cuando la membrana de *Acholeplasma* carece de esteroides. No se ha observado evidencia clara por espectroscopía electrónica en la región del ultravioleta de que la nistatina interactúa con liposomas o con membranas de *Acholeplasma* que contiene colesterol.

En espectros de absorción con luz polarizada se ha podido identificar que la anfotericina B interactúa con monocapas compuestas únicamente por lecitina, colesterol y concentraciones equimolares de ambos. Se observan cambios en los picos de absorción dependientes del colesterol presente. Estos resultados son consistentes con la inserción dependiente de colesterol de la molécula de anfotericina B dentro de la monocapa con su eje más largo (paralelo a su parte poliénica) perpendicular al plano de la monocapa.

En resumen, aunque estos datos demuestran directamente la interacción de la anfotericina B con los esteroides, existen algunas discrepancias entre los datos espectroscópicos y los efectos fisiológicos.

Otra técnica utilizada para estudiar la interacción de los antibióticos poliénicos con membranas que contienen colesterol es la calorimetría diferencial de barrido. La cantidad de energía de la transición del estado de cristal líquido al de gel de dielaidoil fosfatidilcolina disminuye por el colesterol. Este efecto se explica como resultado del aumento de fluidez que provoca el colesterol en el estado gel. Tanto la filipina, la anfotericina B como la nistatina revierten parcial o completamente esta disminución de la energía necesaria para dicha transición. Ninguno muestra efecto en ausencia de colesterol. Por lo tanto, la filipina, la anfotericina B y la nistatina al parecer poseen el mismo modo de acción para reducir la interacción del colesterol con los fosfolípidos. Cabe señalar que los mismos requerimientos estructurales de la molécula de colesterol para optimizar la interacción entre éste con los fosfolípidos, es decir, para que un esteroide afecte la temperatura de transición en una membrana fosfolipídica es necesario que presente en su molécula un grupo 3- β -hidroxilo y su núcleo esteroide debe ser plano. Por lo tanto, es posible sugerir una competencia entre las moléculas de antibiótico y las de fosfolípido por las de colesterol en la bicapa.

Estudios de unión a membranas.

La asociación de la anfotericina B con liposomas está acompañada por un aumento en la absorbancia de este antibiótico a longitudes de onda pequeñas en relación con las considerables de longitud de onda larga del espectro de la anfotericina B. El cambio de absorción a 385 o a 409 nm o la razón entre los picos a 325 y a 408 nm han sido usados para monitorear la unión de la anfotericina B a liposomas.

Utilizando el dicroísmo circular en membranas con fosfolípidos en estado de gel ha sido posible demostrar la existencia de una fuerte interacción con vesículas unilamelares pequeñas, apareciendo bandas positivas características. Esta interacción, observada en liposomas carentes de colesterol, es ligeramente dependiente del esteroles presente en la membrana. En estudios de intercambio se observa una mayor interacción del antibiótico con liposomas en el estado de cristal líquido (incluso cuando éstas contienen colesterol).

A pesar de cierta evidencia contradictoria, se ha establecido que la anfotericina B se une a liposomas de fosfatidilcolina en estado de cristal líquido. La presencia en la membrana de esteroides con un grupo 3- β -hidroxilo modifica la unión.

La constante de asociación aparente (K_{app}) de la anfotericina B a los liposomas decrece en presencia de esteroides, pero el número de sitios de unión (n) se incrementa considerablemente. Así, en liposomas que contienen 25% de colesterol o ergosterol, el valor nK_{app} es 35 veces y 284 veces mayor, respectivamente, que aquel de vesículas formadas por fosfolípidos puros. La constante de asociación no depende de la cadena lateral del fosfolípido, excepto para una dilauril fosfatidilcolina, para la cual es marcadamente elevada (Witzke y Bittman, 1984).

Efecto en la permeabilidad de la membrana.

Bicapas artificiales.

i) Liposomas

La anfotericina B y la nistatina presentan una mayor interacción con liposomas que contienen colesterol que con los que carecen de él. Estudios con liposomas han mostrado que ambos antibióticos causan cambios selectivos de permeabilidad si hay colesterol en la bicapa, haciendo a la membrana más permeable a potasio que a glucosa.

Kinsky y colaboradores (1966) demostraron por microscopía electrónica que la filipina crea hoyos de 125 Å de diámetro en liposomas que contienen colesterol y en eritrocitos; pero no así, en liposomas carentes de colesterol.

En liposomas, los estudios de la selectividad de la permeabilidad a iones de la anfotericina B no arrojan resultados muy precisos. En la mayoría de ellos, la anfotericina B se agrega una vez ya formados los liposomas y por lo tanto, a un solo lado de la membrana. A razones bajas de antibiótico/lípido (a una concentración de alrededor de 10^{-3} M por 10^{-3} M de lípido total) la fuga de sodio y de potasio se observa en vesículas multilamelares (MLV) (DeKruiff, et al., 1974a; Oku, et al., 1980), vesículas unilamelares grandes (LUV) (Cybulska, et al., 1981) o vesículas unilamelares pequeñas (SUV) (Teerlink, et al., 1980; Vertut-Croquin, et al., 1983) que tienen esterol, cuando se agrega anfotericina B. Bajo condiciones similares, cuando se observa la pérdida de sodio y de potasio, se retienen en el compartimiento interno glucosa en MLV (DeKruiff, et al., 1974a), y carboxifluoreceína en LUV (Capuzzo y Bolard, 1985).

A mayores razones de antibiótico/lípido, arriba de 10^{-2} , el efecto parece ser distinto y la selectividad iónica es menos clara. De hecho, se ha llegado a observar fuga de Co^{2+} en MLV y de Mn^{2+} , tetraetilamonio (TEA), en SUV.

Mediciones del efecto de la anfotericina B en la permeabilidad de LUV, usando un método osmótico, sugieren que la anfotericina B puede formar dos tipos de canales activos que difieren en su diámetro interno, dependiendo de la concentración total de antibiótico y del tiempo transcurrido después de mezclar éste con los liposomas (Cohen, 1986; Cohen, et al., 1990).

A pesar de que estos estudios arrojan datos ambiguos con respecto a la selectividad iónica, al parecer la adición de la anfotericina B a un solo lado de liposomas que contienen esterol a razones bajas de antibiótico/lípido, au-

menta la permeabilidad de la membrana preferentemente a cationes monovalentes hidratados pequeños.

En estudios cinéticos, cuando se agrega anfotericina B a SUV o LUV, el intercambio de Na^+/H^+ se lleva a cabo muy rápidamente hasta que alcanza un valor fijo en el que permanece estable.

En casi todos estos estudios parece indispensable la presencia de algún tipo de esteroles en los liposomas para que la anfotericina B afecte su permeabilidad; sin embargo, HsuChen y Feingold (1973) reportaron un aumento en la permeabilidad a glucosa marcada con C^{14} en liposomas de dipalmitoil fosfatidilcolina a $24^{\circ}C$, en presencia de anfotericina B y en ausencia de esteroides. Esto sugiere que el requerimiento de esteroides en membranas en estado de cristal líquido para que la anfotericina B actúe no es más que un requerimiento estructural de la membrana.

ii) Estudios en membranas planas.

En bicapas negras (bicapas formadas al 'pintar' con fosfolípidos, disueltos en algún solvente orgánico como el decano, a través de un orificio en una partición de teflón que separa dos compartimentos con soluciones acuosas) la anfotericina B y la nistatina aumentan en varios órdenes de magnitud la permeabilidad a iones monovalentes, es decir, reduce considerablemente la resistencia eléctrica de las bicapas.

En estos casos, solo se observan cambios significativos de la permeabilidad de la bicapa cuando se encuentra presente algún tipo de esteroles con ciertos requerimientos estructurales como, por ejemplo, el colesterol, ergosterol, etc.

La nistatina y la anfotericina B provocan grandes aumentos de conductancia cuando se agregan tanto a uno como a ambos lados de la bicapa. En este caso, la permeabilidad de la bicapa a aniones monovalentes, como el cloruro, es aproximadamente veinte veces mayor a la de cationes monovalentes, como

el sodio. Esto no se ve afectado en un intervalo de pH de 2.5-10.

Marty y Finkelstein (1975) encontraron que la nistatina a concentraciones que son efectivas en membranas biológicas (5-100 $\mu\text{g/ml}$) causan que la conductancia se incremente en varios órdenes de magnitud de 10^{-8} a $10^{-4} \Omega^{-1} \text{cm}^{-2}$. La conductancia aumenta supralinealmente con la concentración de antibiótico.

Cuantitativamente hablando, los efectos son extremadamente variables. Concentraciones similares de nistatina en diferentes membranas pueden dar conductancias que varían por un factor de cien. La conductancia es selectiva, pero no completamente a cationes. En presencia de ergosterol en la membrana se observan mayores efectos que con colesterol cuando el antibiótico se agrega por un solo lado de la bicapa.

Cuando se agrega la nistatina o la anfotericina B a ambos lados de la bicapa, la concentración necesaria para alcanzar una determinada conductancia es de diez a mil veces menor que la que se requiere para obtener esa misma conductancia cuando se agrega el antibiótico por un solo lado de la membrana (Marty y Finkelstein, 1975). La conductancia, cuando se agregan los antibióticos por ambos lados de la membrana es fuertemente, pero no totalmente, selectiva a aniones monovalentes, en contraste con la selectividad a cationes que se encuentra cuando se agregan por un solo lado de la bicapa. En este caso, también el ergosterol es más efectivo que el colesterol para aumentar la conductancia de la bicapa debido a nistatina o anfotericina B. Los resultados son más reproducibles con el antibiótico a ambos lados de la bicapa y la conductancia aumenta de $10^{-8} \Omega^{-1} \text{cm}^{-2}$ (membrana sin antibiótico) hasta más allá de $10^{-2} \Omega^{-1} \text{cm}^{-2}$ en 100 mM de cloruro de potasio (Cass et al., 1970). La conductancia fue proporcional a la concentración de antibiótico (agregado en iguales concentraciones a ambos lados) elevado

entre la cuarta y la duodécima potencia. Esto sugiere que la anfotericina B y la nistatina podrían formar poros con un número variable de moléculas. Al parecer la potencia que se obtiene depende de las condiciones y la composición de la membrana.

Cuando estos autores removieron el antibiótico del recipiente, la conductancia disminuyó hasta alcanzar aquella que presenta la membrana en ausencia del antibiótico. Es decir, el efecto es reversible, lo cual implica que existe un equilibrio dinámico entre las moléculas de antibiótico que se encuentran en la fase acuosa y la lipídica.

La permeabilidad al agua y a no electrolitos de las membranas tratadas con anfotericina B o nistatina fue determinada por Andreoli y colaboradores (1969) y por Holz y Finkelstein (1970), midiendo tanto el flujo de especies marcadas en ausencia de un gradiente osmótico, como midiendo el flujo de agua en presencia de un gradiente de concentraciones del material estudiado. Un resultado crucial de estos experimentos fue que dada una concentración salina, pH y temperatura, los valores de los coeficientes de permeabilidad (Pd) del agua y de los no electrolitos se incrementaban linealmente con la conductancia de la membrana. También se observa que las permeabilidades del agua, urea, etilenglicol eritritol, glicerol y la glucosa decrecen cuando se aumenta el tamaño de la molécula. Así, los coeficientes de permeabilidad son inversamente proporcionales al tamaño de la molécula. Por ejemplo, el glicerol fue solo un 1 % tan permeable como el agua y moléculas con un tamaño mayor como la sacarosa son virtualmente excluidas de la membrana.

La N-acetilación del grupo amino de la micosamina y la metilo esterificación del grupo carboxilo del carbono 16, no cambian apreciablemente los voltajes de corriente cero. La neutralización de uno o ambas cargas de la molécula de anfotericina B aumenta la probabilidad de que el canal se

encuentre en estado no conductor de iones a través de la membrana.

Los resultados obtenidos tanto en liposomas como en bicapas llevaron a Marty y Finkelstein (1975) y a DeKruijff y Demel (1974) a proponer que estos antibióticos forman un poro de aproximadamente 5 Å de diámetro, constituido por varios monómeros de antibiótico. El modelo presentado por separado por ambos autores presenta un canal formado por varios monómeros del antibiótico en posición perpendicular al plano de la membrana, los cuales muestran su parte hidrofílica orientada hacia el interior del canal, mientras que la porción hidrofóbica estaría en contacto con los fosfolípidos de la membrana. Ambos modelos presentan al colesterol formando parte intrínseca del canal de anfotericina B o nistatina, intercalando en las moléculas de antibiótico y de esterol (figura 2).

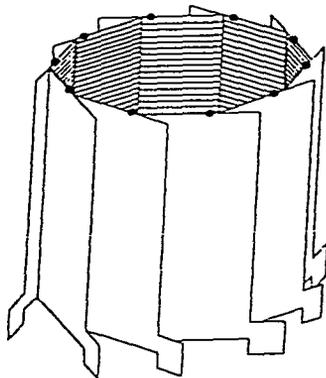


Figura 2. Modelo del poro formado por la anfotericina B. Tomado de Kleinberg y Filkelstein (1984).

Filkelstein (1975) también propone un modelo para explicar la diferencia de conductividades entre los casos en que se agrega el antibiótico a uno o ambos lados de la bicapa. Así, en el primer caso las moléculas de antibiótico formarían un poro, llamado canal sencillo, que es selectivo a cationes monovalentes, mientras que en el segundo, se produciría un nuevo canal, llamado doble, con la unión de dos poros sencillos provenientes de cada uno de los lados de la membrana y que sería selectivo a aniones monovalentes (figura 3).

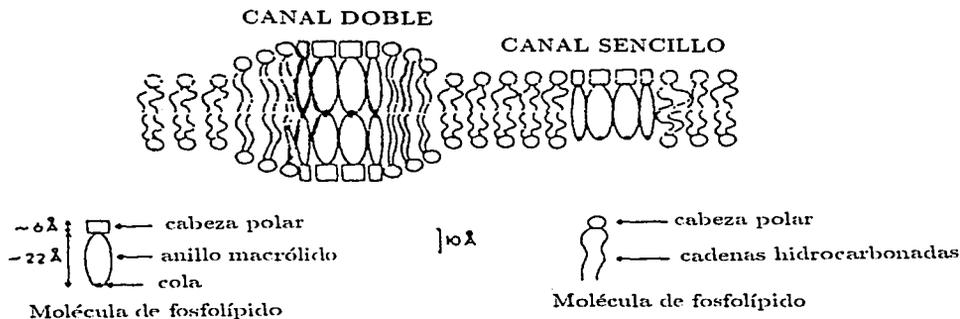


Figura 3. Canales sencillo y doble de la anfotericina B. Tomado de Kleinberg y Filkelstein (1984).

Sin embargo, este autor no logra explicar la diferencia de selectividades de los canales para ambos casos. Bonilla-Marín y colaboradores (1991) presentaron un modelo microscópico del canal de anfotericina B. En este modelo, la estructura del canal fue generada usando las coordenadas de la molécula

obtenidas por difracción de rayos X, calcularon las cargas netas de los átomos y obtuvieron el perfil de energía electrostática para un ión monovalente que pasa a través del canal (figuras 4 y 5). Estos autores proponen algunas explicaciones cualitativas de las observaciones experimentales, tales como son la selectividad y la conductancia del canal unitario de anfotericina B.

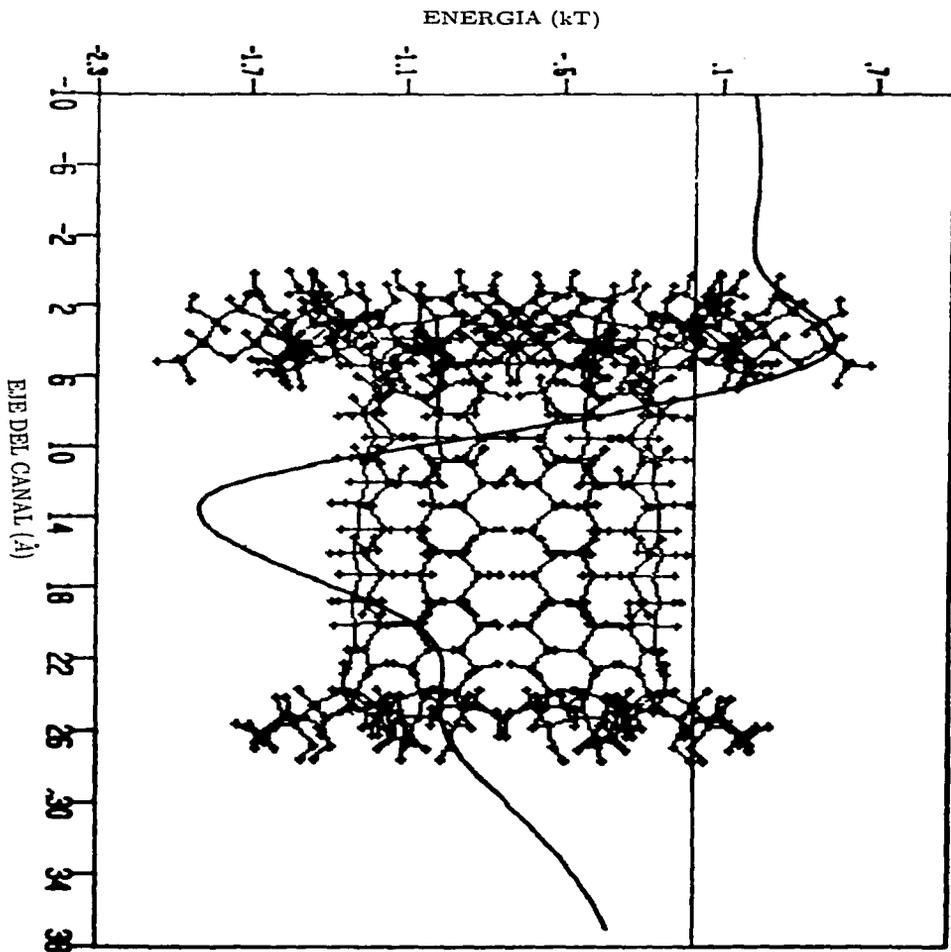


Figura 4. Modelo electrostático del canal sencillo de anfotericina B. k =constante de Boltzmann y T =temperatura absoluta. Tomado de Bonilla-Marín et al., 1991.

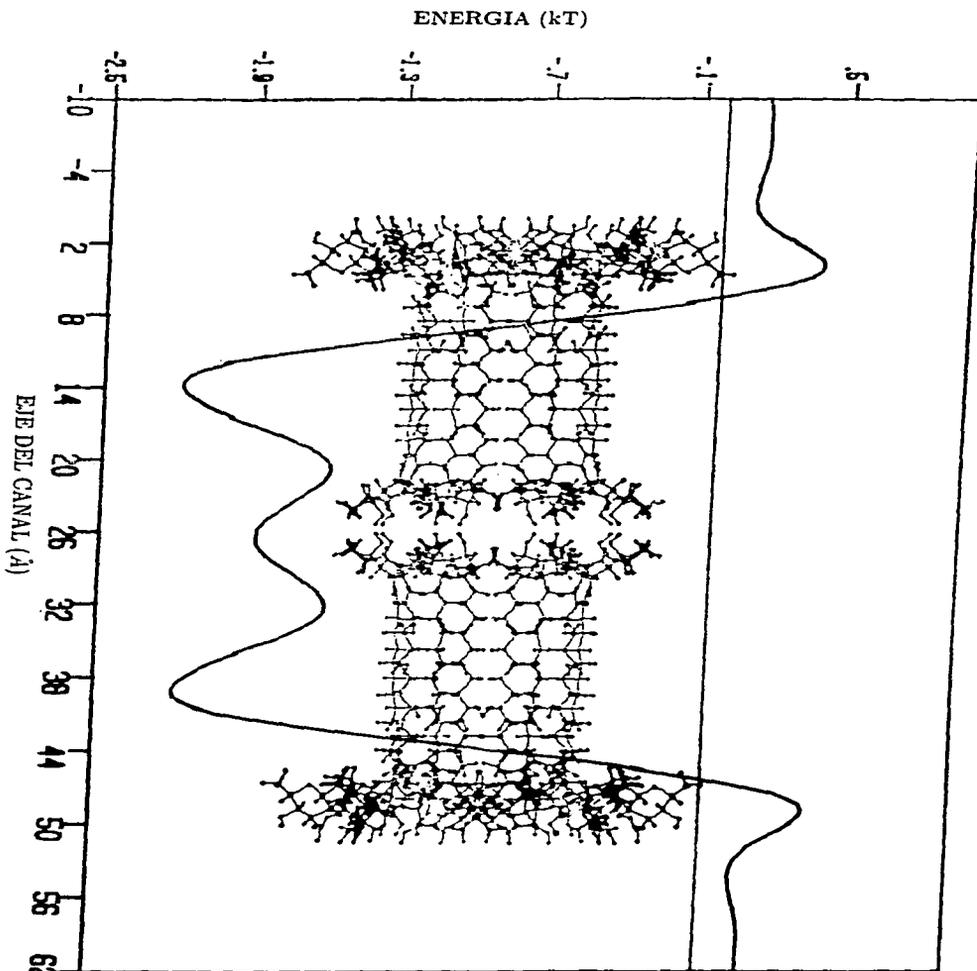


Figura 5. Modelo electrostático del canal doble de anfotericina B. k =constante de Boltzmann y T =temperatura absoluta. Tomado de Bonilla-Marín et al., 1991.

Mediciones de canal unitario.

Erminshkin y colaboradores (1976) han observado brinco discretos de conductancia de 2-8 pS (dependiendo de la concentración salina) inducidos por la presencia de 3×10^{-8} M de nistatina y anfotericina B en bicapas negras formadas por fosfolípidos de cerebro y colesterol cuando el antibiótico se agrega por ambos lados de la membrana. El valor de la conductancia de los canales unitarios abiertos es independiente de la concentración de colesterol, pero incrementa cuando se aumenta la concentración del electrolito. A partir del tamaño de estos saltos discretos se calcula que pasan a través del poro $2.5 \cdot 10^6$ iones por segundo. Esto es dos o tres órdenes de magnitud mayor que la máxima rapidez de transporte (número de recambio) del acarreador valinomicina (Lauger, 1972), cuya velocidad de transporte está cerca del límite teórico debido a las limitaciones de difusión a través de la membrana (Stein, 1968).

Posteriormente, Kleinberg y Finkelstein (1984) reportaron la presencia de canales unitarios de nistatina con una conductancia de 5 pS cuando agregaban el antibiótico a un solo lado de la bicapa y de 2 pS cuando agregaban el antibiótico por ambos lados. en membranas de asolectina formadas por la técnica de superposición de monocapas (Montal y Mueller, 1972). En este trabajo, estos autores encuentran la misma permeabilidad relativa para urea y glicerol, lo cual apoya el modelo propuesto por Marty y Finkelstein (1975) del canal sencillo y el canal doble. Estos autores dicen haber encontrado resultados similares para el caso de la anfotericina B.

Más tarde, Bolard y colaboradores (1991) obtuvieron canales unitarios, al parecer del tipo sencillo, de conductancia variable de 2 a 10 pS en membranas que contenían ergosterol, pero no en aquellas que presentaban colesterol. La aparición de canales unitarios con diferente conductancia favorece

la idea de que la anfotericina B podría formar canales con distinto número de monómeros.

Ninguno de los autores citados obtuvo canales de anfotericina B o de nistatina en ausencia de esteroides en la membrana. Este es un punto crucial que pretendemos abordar en el presente trabajo y que, como se hará notar más adelante, discrepa con lo anteriormente reportado en la literatura.

OBJETIVO DEL TRABAJO

Objetivo general.

Avanzar en el entendimiento a nivel molecular del mecanismo de acción de la anfotericina **B** sobre las membranas biológicas que le da sus propiedades antimicóticas y, a su vez, tomar a este antibiótico como un modelo sencillo de canal iónico, pero con un comportamiento similar aunque menos complejo que el de los canales biológicos.

Objetivos particulares.

1) Adquirir los conocimientos especializados en los procesos de transporte transmembranales, tanto en su concepción teórica como experimental. Obtener pericia en técnicas de canal unitario y a través del desarrollo de investigación, completar la formación del estudiante.

2) Valorar el papel del colesterol tanto en la formación del canal unitario de la anfotericina **B** como el efecto sobre sus propiedades.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

1) Fabricación de liposomas.

Los liposomas se hacen a partir de fosfolípidos de soya (asolectina) parcialmente purificados siguiendo el método descrito por Kagawa y Racker en 1971. La asolectina que se usó en el presente trabajo fue purificada y proporcionada por el Dr. Juan Santiago del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Tanto los fosfolípidos como el colesterol fueron almacenados en forma sólida a -20°C .

El método usado en este estudio para obtener liposomas fue mediante sonicación de baja intensidad (New, 1994). Mediante esta estrategia se forman principalmente vesículas unilamelares de diámetro pequeño, aunque la población de liposomas no es homogénea y sigue presentándose algunas vesículas multilamelares, las cuales podrían obstruir la punta de la micropipeta por sus dimensiones.

Ocasionalmente, se prepara un mililitro de una solución de asolectina disuelta en hexano a la concentración requerida para el experimento. Para el manejo de solventes apolares como el hexano y el cloroformo se utilizaron pipetas de vidrio en lugar de pipetas tipo Eppendorf para evitar una posible contaminación proveniente de las puntas de plástico (Pidgeon et al., 1989). Paralelamente se prepara un mililitro de una solución de colesterol (Merck-México) disuelto en hexano, también acorde al experimento.

Posteriormente, se mezclan las soluciones de asolectina y colesterol en un tubo de ensaye de vidrio que tiene que ser PYREX. Luego se evapora el hexano bajo flujo de nitrógeno girando el tubo de ensaye para que el lípido se

distribuya en forma homogénea en el fondo del tubo. Es importante que este proceso se lleve a cabo lentamente y sin producir oscilaciones en el nivel de la solución ya que de lo contrario se producen agregaciones del lípido, debido a la ineficiente eliminación del disolvente, conduciendo a la no formación de liposomas en la solución final. En ese momento se adiciona un mililitro de solución prueba previamente filtrada con un filtro millipore de $0.22 \mu\text{m}$ de diámetro de poro con el propósito de eliminar polvo y microorganismos contaminantes. Se burbujea la solución con nitrógeno y se tapa para conservar una atmósfera inerte en el interior del tubo y con ello evitar la oxidación y degradación de los lípidos. Se agita con cuidado la solución y se sonica en un sonicador de baño de 50/60 Hertz de frecuencia durante aproximadamente cinco minutos o hasta que la suspensión se pone transparente y azulada. Los liposomas se utilizaron en el experimento inmediatamente después de su preparación. Nunca se usaron liposomas que no hubiesen sido preparados el mismo día del experimento.

La concentración de lípido total (colesterol + asolectina) en la solución final fue de 4.0-4.5 mg/ml.

2) Preparación de la anfotericina B.

La anfotericina B tipo I de Squibb (São Paulo, Brasil) utilizada en el presente trabajo fue proporcionada por la Dra. Shirley Schreier de la Universidad de São Paulo. El antibiótico fue almacenado a -70°C y -20°C y, en este último caso, la anfotericina B fue desechada después de un mes de almacenamiento.

Se prepara una solución de anfotericina B a una concentración de 1-10 mg/ml en dimetilsulfóxido según lo requiera el experimento. Esta solución se utiliza el mismo día y después de la primera hora de su preparación, ya que su almacenamiento por tiempo prolongado provoca la pérdida de la

actividad del antibiótico, incluso a baja temperatura. Esta solución base se puede mezclar directamente con la solución prueba a la concentración adecuada al experimento. El procedimiento seguido en el presente trabajo fue el siguiente: Se adiciona la cantidad deseada de solución de anfotericina B en dimetilsulfóxido a la solución prueba que se adiciona a su vez al tubo de ensayo con la mezcla de lípidos adheridos a su pared inferior. Después se procede a burbujear la solución con nitrógeno y se sigue el procedimiento descrito para la formación de liposomas. Debido a que la anfotericina B se oxida rápidamente cuando está en solución acuosa, lo cual produce una pérdida en su actividad, es decir, disminuye la cantidad de antibiótico que genera un aumento en la conductancia de la bicapa fosfolipídica, la solución acuosa con el antibiótico se emplea en el experimento solo durante las tres primeras horas posteriores a su preparación (Levitan, 1991; Rae, 1991). La concentración de la anfotericina B fue determinada por su absorción a 416 nm en dimetilsulfóxido con un coeficiente de extinción de $1.214 \times 10^5 M^{-1}$ (Bolard, 1991).

3) Fabricación de microelectrodos de vidrio.

En la fabricación de microelectrodos para patch-clamp se parte de capilares de vidrio de borosilicato tipo 7740 de Wold Precision instruments de 1.5 mm de diámetro externo y 0.84 mm de diámetro interno y con filamento interno. Decidimos utilizar capilares de vidrio de borosilicato debido a sus buenas propiedades eléctricas. Este tipo de vidrio presenta una mayor resistividad específica, una menor constante dieléctrica y menor factor de disipación que el vidrio suave (Corey y Stevens, 1990). Estas características del vidrio de borosilicato son determinantes en que la contribución al ruido eléctrico de la capacitancia a través de la pared de vidrio sea menor a la de otros vidrios. Por la misma razón optamos por utilizar capilares de pared

gruesa, lo cual también disminuye el ruido eléctrico, aunque con la desventaja de que se obtienen microelectrodos más agudos con su consecuente aumento en la capacitancia parasítica. Otra ventaja que representa el empleo de este tipo de capilares es su gran reproducibilidad si se le compara con capilares de vidrio suave.

En lo fundamental, se sigue el procedimiento descrito por Hamill y colaboradores (1981) para la manufactura de microelectrodos de vidrio para patch-clamp, aunque con algunas modificaciones.

Primero se cortan los capilares a aproximadamente 7.5 cm de longitud y se limpian con metanol. Antes de usar el capilar, se seca el metanol bajo flujo de nitrógeno. Luego se procede a fabricar un microelectrodo utilizando un estirador de pipetas del tipo horizontal (Liévano, 1984). En nuestro caso utilizamos el estirador PN-3 de Narishige Scientific Instruments Laboratory. Primero se sujeta el capilar por ambos extremos, manteniendo uno de ellos fijo y el otro sujeto a una pieza móvil cuyo desplazamiento en dirección horizontal depende de la intensidad del campo magnético aplicado. En este dispositivo, el capilar pasa por el centro del arco formado por un filamento de calentamiento, el cual queda ubicado aproximadamente en la parte media del capilar. Posteriormente se aplica una corriente eléctrica a través del filamento del estirador, de tal forma que su incandescencia provoque el reblandecimiento del capilar y mientras tanto se aplica una tensión debida a la acción de un electroimán de intensidad variable pero regulable con un voltage de 1 a 10 voltios. Después de unos cuantos segundos, el movimiento del dispositivo provoca la activación de un segundo tirón de mayor intensidad ya que el imán se encuentra ahora sujeto a la acción de 10 a 100 voltios. Esto genera un tirón abrupto que dará fin al proceso. En este caso se pueden variar los distintos parámetros como la temperatura de calentamiento, la

intensidad de los tirones inicial y final, así como el tiempo que tarda en activarse el cambio en la intensidad del campo magnético. De este proceso se obtienen dos micropipetas cuyas puntas son casi iguales. Los parámetros del estirador se modificaron constantemente durante el presente estudio. Para los microelectrodos que serían utilizados en la formación de bicapas no se recurrió a ningún tratamiento adicional como pulir su punta por calentamiento o recubrirla con algún elastómero como Sylgard. La integridad de la punta de la micropipeta se verificó mediante su observación por medio de un microscopio óptico. Por lo regular, se buscó obtener microelectrodos de alta resistencia, es decir, con un pequeño orificio en su punta y lo menos agudos posible.

Las micropipetas deben usarse, de preferencia, durante las primeras cuatro horas del mismo día de su fabricación para evitar partículas de polvo.

4) Llenado de las micropipetas con solución.

Durante el presente trabajo la solución prueba con la que se llenaron las micropipetas consistió de 2 M de KCl, 1 mM de $CaCl_2$ y 10 mM de HEPES a pH 8.0. La solución prueba debe ser filtrada de antemano a través de un filtro millipore de $0.22 \mu\text{m}$ de diámetro de poro con el fin de evitar que alguna partícula presente bloquee la punta del microelectrodo. Para el llenado de las micropipetas con solución prueba se deben de tomar en cuenta principalmente dos factores: la capilaridad y la viscosidad de la solución. Mientras la capilaridad ayuda a llenar la micropipeta con solución, la viscosidad es el mayor impedimento para este propósito. Las interacciones moleculares entre el vidrio y el agua son propicios para que la micropipeta se llene por capilaridad. Por otro lado, para ocupar el interior de pipeta, el agua debe desplazar al aire, el cual es un fluido menos viscoso y que si es compresible, y gracias a ésto, le es más fácil pasar por un tubo angosto.

En la estrategia que seguimos para llenar la micropipeta con solución

fue utilizar un capilar de plástico conectado a una jeringa llena de solución prueba la cual se inyecta a la pipeta por el extremo posterior. El filamento interno fusionado a la pared del capilar de vidrio genera conductos hidráulicos por los que la solución avanza hasta la punta por capilaridad, desplazando al aire por el área disponible y en dirección contraria a la punta de la pipeta, produciendo pequeñas burbujas que son fácilmente liberadas mediante la aplicación de leves golpes al cuerpo de la micropipeta. La ausencia de burbujas se confirma mediante la observación de la punta de la micropipeta a través de un microscopio óptico. Por lo regular se evita llenar la micropipeta con demasiada solución para que el líquido no entre al portaelectrodos, lo cual aumenta considerablemente el ruido del registro.

5) Formación de monocapas.

Una observación importante para plantear esta estrategia es que vesículas lipídicas en una solución acuosa pueden formar una monocapa en la interfase aire-líquido. Este tipo de monocapa, llamada de Gibbs, es continuamente regenerada debido a que establece con las vesículas un recambio de lípidos dependiente de la concentración y el tamaño de los liposomas (Schindler, 1979).

A una cámara de teflón de aproximadamente 100 μ l se agrega la suspensión de liposomas en forma de gotas, cuidando que cada gota penetre la interfase. Hecho lo anterior se deja reposar la preparación durante unos diez minutos, tiempo necesario para que se forme una monocapa estable en la superficie a la concentración de lípido utilizada (Schindler 1979, 1980). Esta monocapa debe presentar una presión superficial mayor o igual a 30 dina*cm en presencia de Ca^{2+} para generar bicapas estables (Schindler, 1980; Nelson et al, 1980; Labarca et al., 1984). Esta presión superficial coincide con aquella que se esperaría en una bicapa al comparar estudios de la actividad

de fosfolipasa en monocapas con su actividad en estudios en membranas de eritrocito (Demel et al., 1975). Una desventaja de utilizar vesículas unilame-lares de diámetro pequeño para la formación de una monocapa en la inter-fase aire-agua podría derivarse si el diámetro de los liposomas es demasiado pequeño (< 50 nm) lo cual afectaría la generación de una monocapa estable (Schindler, 1980). Otro aspecto que se debe cuidar es la agregación de las vesículas y eliminar cualquier tipo de detergente que impida la generación de la monocapa; para ello seguimos un estricto protocolo para lavar el material de vidrio y el dispositivo experimental (Liévano, 1984). La limpieza del ambiente de trabajo es otro aspecto importante que se debe cuidar con el fin de obtener monocapas con condiciones similares (Rolando Castillo, comuni-cación personal).

Debido a que la monocapa está en equilibrio con la composición de los liposomas que se encuentran en la suspensión, se supone que la composición de lípidos y antibiótico en la monocapa está en relación directa con su dis-tribución en las vesículas (Labarca et al., 1984; Schindler, 1980).

6) Formación de una bicapa en la punta de un microelectrodo.

El proceso de formación de bicapas en la punta de un microelectrodo de patch-clamp a partir de monocapas en la interfase aire-agua es análogo al de la formación de bicapas lipídicas a partir del principio de aposición de monocapas en la interfase aire-agua a través de un orificio en una partición de teflón que separa dos compartimentos con soluciones acuosas (Montal y Mueller, 1972; Benz et al., 1975). En este caso, el soporte de la bicapa es la punta de un microelectrodo de patch clamp. Este procedimiento no requiere de ningún tipo de pretratamiento con solventes orgánicos que contaminen la membrana como en las bicapas negras y en las bicapas a partir de monocapas.

La metodología que se siguió fue básicamente la misma ya descrita por

varios autores para formar bicapas artificiales en la punta de microelectrodos de patch (Coronado y Latorre, 1983, Suárez-Isla et al., 1983; Hanke et al., 1984).

Una vez formada la monocapa de fosfolípidos en la superficie de la suspensión de liposomas, se introduce la punta de la micropipeta de patch, llena de solución prueba, en la suspensión de liposomas. A continuación se retira la punta de la pipeta de la suspensión de liposomas. De acuerdo con la interpretación más aceptada sobre como se generan estas bicapas se supone que en esta primera inmersión, la micropipeta toma una monocapa de lípidos cuyas moléculas reorientan su parte hidrofóbica hacia el aire, mientras su parte hidrofílica se mantiene en la solución de la pipeta o interactúa con el vidrio. En el siguiente paso se reintroduce la micropipeta en la suspensión. Con la segunda inmersión se interpreta que la monocapa unida a la pipeta se superpone a la presente en la superficie de la suspensión. De esta manera se forma una bicapa lipídica en la punta de un microelectrodo de patch-clamp (figura 6).

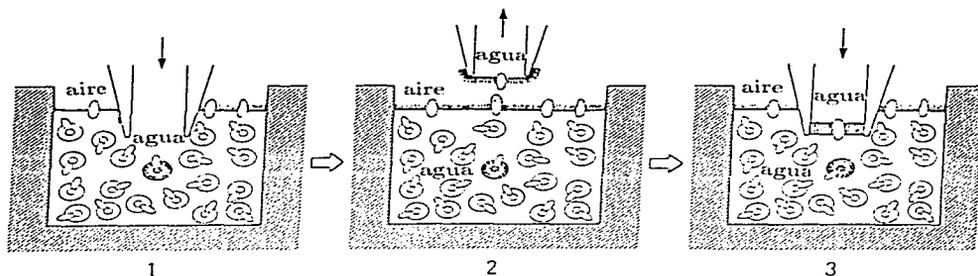


Figura 6. Formación de una bicapa en la punta de un microelectrodo de patch-clamp.

Por lo general fueron necesarias de 2 a 3 inmersiones para obtener sellos de alta resistencia (del orden gigaohms) llamados gigasellos. Las bicapas formadas de acuerdo a este procedimiento presentan una resistencia dentro un intervalo que va de $1\text{ G}\Omega$ a $50\text{ G}\Omega$. Se obtuvieron bicapas de alta resistencia en aproximadamente el 30% de los intentos realizados.

El área de bicapa en la punta del microelectrodo es muy pequeña por lo que presenta una menor capacitancia que las bicapas negras y las membranas obtenidas por la aposición de monocapas en un orificio de teflón, lo cual permite una mayor resolución temporal y una mayor razón de señal contra ruido eléctrico. Esto mismo también permite una mayor resolución temporal del registro. Sin embargo, este tipo de bicapas presenta la desventaja de que solo uno de los compartimentos que separa es fácilmente manipulable, ya que la solución del microelectrodo es prácticamente inaccesible una vez formada la bicapa.

La formación de la bicapa se sigue, midiendo el incremento de la resistencia eléctrica y de la capacitancia que lleva asociada, mediante la aplicación de un pulso cuadrado pequeño (20 mV) a una frecuencia de 100 Hertz. Este pulso de voltaje genera una corriente iónica proporcional al potencial del pulso. Esta corriente es directamente proporcional a la resistencia del microelectrodo. En ausencia de una monocapa en la superficie de la solución, al penetrar varias veces la punta de la micropipeta la interfase aire líquido, la resistencia del microelectrodo no cambia. A su vez, cuando esta interfase, en una suspensión de liposomas, es penetrada por primera ocasión, la corriente resultante es similar a la obtenida en ausencia de lípidos. Al penetrar la interfase por segunda o tercera vez, se produce un incremento de la resistencia de varios ordenes de magnitud. La apariencia de la corriente monitoreada es la de una línea basal de muy poco ruido sobre la que se observan espi-

gas capacitivas rápidas, coincidentes con el encendido y apagado del pulso actuando sobre la capacitancia intrínseca del microelectrodo y de la bicapa (figura 7).

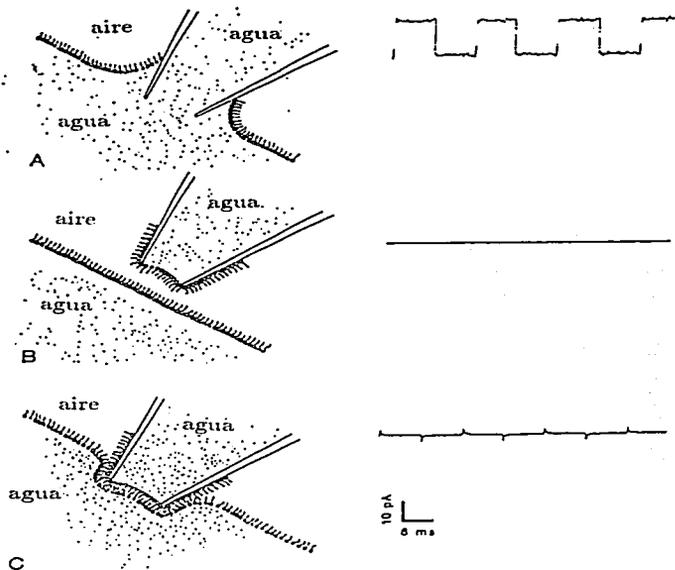


Figura 7. Seguimiento de la formación de una bicapa en la punta de un microelectrodo de patch-clamp.

Después de obtener una bicapa, ésta no se perturba durante unos cinco minutos para que se estabilice. Transcurrido este lapso se inicia el experimento.

Lo primero que procede es compensar la corriente de fuga de la bicapa. Una vez hecho lo anterior, se fija un voltaje a través de la bicapa dentro de un intervalo que va de +200 a -200 mV. Después de compensar la conductancia de la bicapa se inicia el registro de los cambios de la corriente por alrededor de dos minutos. La señal eléctrica se filtra a 500 Hertz y se graba en la computadora. A continuación se hace lo mismo cambiando la polaridad del potencial. Todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente (entre 20 y 26°C).

Al finalizar el experimento se procede al análisis de los resultados obtenidos.

7) Montaje experimental.

a) Cámara de registro.

El dispositivo en el cual se forman las bicapas artificiales en la punta de un microelectrodo consta básicamente de una cámara de teflón hecha en el laboratorio y que tiene un pozo de aproximadamente 100 microlitros de capacidad y 0.8 cm de diámetro en su superficie.

b) Electrodo.

Los dos compartimentos separados por la membrana están conectados por medio de dos electrodos de Ag/AgCl. Los electrodos llamados de interfase de plata/cloruro de plata consisten de un alambre de plata recubierto con cloruro de plata. Estos electrodos convierten la corriente iónica en la solución en corriente electrónica en los conductores metálicos. Esto se lleva a cabo cuando los iones cloruro de la solución reaccionan con la plata del electrodo para producir cloruro de plata más un electrón o a la inversa, un electrón reacciona con el cloruro de plata para producir plata e ión cloruro.

El electrodo activo, corresponde al electrodo de la pipeta y está conectado a un conector BNC del portaelectrodos. La micropipeta se coloca en el portaelectrodos de policarbonato del tipo HL-1-12 de Axon Instruments. A su vez, el portaelectrodos se conecta al headstage del sistema de patch-clamp, el cual está montado sobre un micromanipulador mecánico.

El electrodo de referencia está inmerso en la cámara de teflón y conectado a la conexión de tierra de alta calidad del headstage del sistema de patch-clamp.

c) Sistema de registro.

La forma de medir corrientes muy pequeñas es monitorear la caída de voltaje a través de una resistencia muy alta. Las resistencias utilizadas en los registros de canal unitario son del orden de $10^{-10}\Omega$. En nuestro caso, utilizamos el amplificador Axopatch-1D de Axon Instruments, Inc. Este sistema de patch-clamp tiene una headstage CV-4 1/100 con resistores de retroalimentación de $500\text{ M}\Omega$ y $5\text{ G}\Omega$ como standard, el cual es apropiado para el registro de canal unitario. La salida de la señal del amplificador se conecta a un osciloscopio 1741A Hewlett Packard de 100 MHz y al sistema de adquisición de datos Digidata 1200 de Axon Instruments, Inc., el cual convierte la señal de analógica a digital. Los registros se guardan en la memoria de la computadora PC o en computadoras de mayor capacidad tal como una Apollo para su posterior análisis.

8) Procesamiento de los datos experimentales.

En el análisis de los resultados obtenidos se empleó el software disponible de Axon Instruments conocido como pClamp. Dentro de este paquete, el análisis de los resultados se lleva a cabo primero seleccionando los eventos producidos durante el experimento utilizando el programa fetchan.exe. Una vez formado un archivo con los eventos del registro se empleó el programa

pStat para determinar la amplitud promedio de los eventos ajustando una gaussiana. por el método de Los coeficientes de relajación de los tiempos de apertura y cerradura se obtienen mediante el ajuste de una exponencial a una gráfica de la función de distribución acumulativa de probabilidad de apertura o cerradura del canal

$$P = \exp(-t/\tau) \text{ o } P = 1 - \exp(-t/\tau).$$

9) Cromatografía de capa fina.

Para la cromatografía de capa fina en una dimensión se preparó la mezcla de solventes el mismo día del ensayo. La mezcla de solventes utilizada fue acetato de etilo:ciclohexano (1:1 v/v). La muestra de lípidos se disolvió en cloroformo a una concentración de 20 mg/ml. Se agrega 1 μ l de muestra y de los compuestos control en uno de los extremos de la placa de sílica gel precalentada para cromatografía de capa fina. Cuidadosamente se coloca la placa en un frasco que contiene 100 ml de la mezcla de solventes y se espera aproximadamente 30 minutos para que el solvente ascienda hacia unos 3 o 4 cm por la placa de sílica gel. Se recoge la placa y se deja secar por unos 15 minutos. Para la visualización de los lípidos, se aplica ácido sulfúrico al 50% atomizado a la placa de sílica gel y se calenta por unos 10 minutos (New, 1994).

10) Formación de una bicapa en la punta de un microelectrodo.

Para poder registrar la actividad del canal unitario de anfotericina B, decidimos implementar la técnica de formar una bicapa en la punta de una micropipeta de vidrio. Como ya mencionamos en la sección de material y métodos, el fosfolípido utilizado para dicho propósito fue la asolectina de soya. La formación de la bicapa se detecta mediante la respuesta a la aplicación de un pequeño pulso cuadrado de voltaje al baño donde se autoensambla la monocapa a partir de los fosfolípidos de soya. Este pulso de voltaje permite

la generación de una corriente iónica proporcional al valor del potencial del pulso. La corriente es medida por medio un transductor corriente-voltaje, y es directamente proporcional a la resistencia del microelectrodo. En ausencia de bicapa en la punta, el microelectrodo tiene una resistencia de 1 a 10 $M\Omega$ en una solución de 2 M de cloruro de potasio, 1 mM de cloruro de calcio, 10 mM de HEPES a pH 8.0, y la forma del pulso respuesta es la corriente resultante, medida mediante el transductor corriente-voltaje, que muestra las características de un conductor óhmico.

Al penetrar varias veces de manera sucesiva la interfase aire-líquido de una solución libre de lípido, ésto es, en ausencia de una monocapa lipídica en la interfase aire-agua, la resistencia del microelectrodo no cambia, y es proporcional a la composición iónica del medio acuoso. Cuando la interfase aire-líquido de una suspensión de liposomas de asolectina (1 mg/ml en la solución prueba) es penetrada por primera vez con el microelectrodo de patch-clamp, la corriente resultante de la aplicación de un pulso cuadrado pequeño de voltaje es similar a la obtenida en ausencia de lípidos, ésto es, refleja la resistencia intrínseca del microelectrodo. Al penetrar la interfase dos o tres veces más, ocurre un aumento de varios órdenes de magnitud en la resistencia del microelectrodo. La forma del pulso, monitoreada por el transductor corriente-voltaje es casi la de una línea basal de muy poco ruido, sobre la que aparecen espigas capacitivas rápidas, correspondientes al encendido y apagado del pulso actuando sobre la capacitancia intrínseca del microelectrodo y de la bicapa. De tal manera mostrando que el camino eléctrico a través de la punta del microelectrodo se encuentra bloqueado por un dieléctrico.

Sin embargo, existe la posibilidad de que ocurra la formación de un complejo de monocapas que efectivamente obstruyan la punta del microelectrodo,

con el consiguiente incremento de la resistencia y la aparición de las espigas capacitivas; o bien, que el aumento de la resistencia se deba a la obstrucción de la punta del microelectrodo provocada por un liposoma multilamelar. En este último caso, podemos descartar esta posibilidad puesto que los liposomas obtenidos mediante sonicación son demasiado pequeños (25 nm de diámetro aproximadamente) comparados con el diámetro de la punta del microelectrodo de 540 nm, como para obstruir la punta del microelectrodo. En cuanto a la posibilidad de que se forme un tapón por un agregado de monocapas, la detección de canales de algún antibiótico como la gramicidina, que solo pueda aparecer en una bicapa, es una fuerte evidencia de que la agregación del lípido es unilamelar. Como nuestro modelo de estudio es la anfotericina B que cumple con los requisitos antes enunciados, la misma evidencia al encontrar canales del antibiótico nos sirve como control en este sentido, es más, en múltiples ocasiones no fue posible detectar la formación de canales en condiciones en las que normalmente ocurría, indicando que el fenómeno anterior ocurre.

En este punto, es conveniente aclarar que la irregularidad con que se obtienen bicapas en la punta de una micropipeta, posiblemente se deba a lo difícil que resulta mantener las mismas condiciones en la monocapa de fosfolípidos sin llevar a cabo un adecuado aislamiento del sistema, tales como los que se procuran en experimento de monocapas de tensoactivo para estudios de transiciones de fase (Rolando Castillo, comunicación personal).

En el presente trabajo se pudieron obtener bicapas a partir de asolectina y colesterol en la punta de un microelectrodo con resistencias de 10 a 50 $G\Omega$.

11) Incorporación de la anfotericina B a los liposomas

El siguiente paso en nuestro estudio fue incorporar la anfotericina B al interior de los liposomas formados por sonicación. Como ya expusimos de-

talladamente en la sección de material y métodos, la anfotericina **B** se incorporó a las vesículas sonicando nuevamente en presencia de la concentración de interés del antibiótico. Se prefirió este método ya que es, a nuestro entender, aquel que asegura que una mayor cantidad de anfotericina **B** entre a la membrana de las vesículas en un corto tiempo, ya que como algunos autores han propuesto, al parecer la partición de la anfotericina **B** en solución acuosa a un medio lipídico como el interior de la membrana, es un proceso cinéticamente lento.

RESULTADOS Y DISCUSION

Detección del canal unitario de anfotericina B.

Una vez incorporada la anfotericina B a los liposomas esperamos que ésta se transfiera a la monocapa formada en la interfase aire-líquido y que posteriormente, quede atrapada en la bicapa formada en la punta del microelectrodo. Teniendo esto en mente procedimos a registrar la posible actividad de un canal de anfotericina B fijando un potencial a través de la bicapa de +200 o -200 mV con el transductor corriente-voltaje.

Antes de pasar a discutir los resultados quisieramos presentar algunos argumentos que eliminan la posibilidad de estar observando alguno de los artificios que en esta técnica se han reportado.

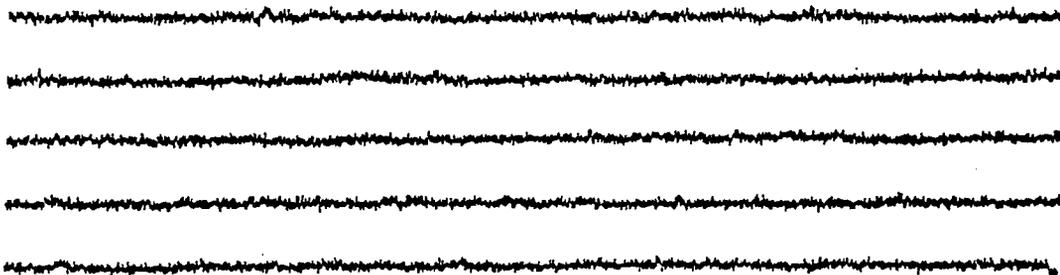
La detección de la corriente asignada a un canal puede tener su origen en otros dos fenómenos físicos. a) El rompimiento dieléctrico de la membrana o b) fallas intermitentes en el sello membrana-pared del microelectrodo.

En el primer caso, si bien la ocurrencia del rompimiento dieléctrico se espera que ocurra a potenciales mayores a los cuatrocientos milivoltios, lo cual efectivamente se verificó experimentalmente por nosotros, permanece la posibilidad de minirompimientos a bajo voltaje; sin embargo, ésto no ha sido reportado y no corresponde a la imagen del fenómeno de rompimiento dieléctrico como un fenómeno de umbral.

De cualquier manera, se repitieron experimentos a cien milivoltios para reducir la posibilidad de rompimiento dieléctrico y se observó lo mismo que a doscientos milivoltios; por supuesto, con el factor de escala correspondiente y la pérdida de canales muy pequeños.

Para el segundo caso, las corrientes de fuga intermitentes enfatizan el riesgo de asignar esta corriente a canales. Este artificio podría estar ocurriendo y la única manera de discriminarlo es mostrando la correlación entre la formación de canales y la presencia del antibiótico. Es más, en una ocasión se registraron aperturas en ausencia de anfotericina B, cuando se buscaba esta condición como un mecanismo de control para asegurar que la formación era debida al antibiótico. Hay que hacer notar que en presencia del antibiótico, el registro de canales ocurría en un 30% de los casos, mientras que en la condición de ausencia hubo registro en menos del 10%. Además, intentos posteriores por obtener este comportamiento no fueron fructíferos, por lo que resta la posibilidad de contaminación en este caso único (figura 8).

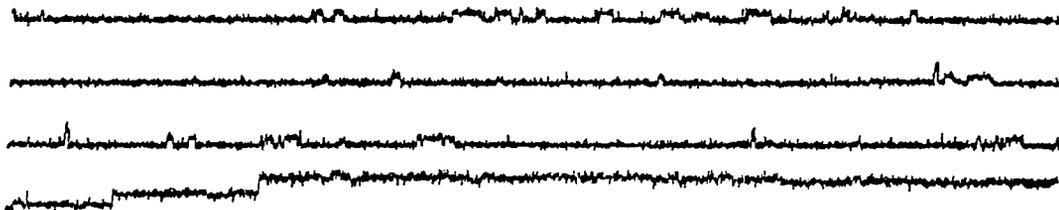
Un tercer posible artificio es la presencia de canales contaminantes provenientes de la preparación que tiene un origen biológico, a pesar del cuidado con el que se purificó como se discute en la sección de materiales y métodos. Nuevamente es la correlación anfotericina B-detección de canales la que da confiabilidad a los resultados; además, la caracterización del canal nos muestra que las conductividades son comparables a las de canales sencillos y dobles de anfotericina B reportadas con anterioridad en membranas artificiales y mucho menores que las que ocurren en canales biológicos en general.



A) Registro en ausencia de anfotericina B.

400.00 ms

3 pA



B) Registro en presencia de anfotericina B.

Figura 8.

ms=milisegundos y pA=picoamperes

Asimismo, se observaron otros dos fenómenos característicos de los canales de anfotericina B antes reportados en la literatura, los umbrales de concentración de anfotericina B y la distribución de los eventos de apertura como función de la razón colesterol/fosfolípido. Estos resultados se discutirán con detalle más adelante.

Los argumentos anteriores nos dan confianza de que los canales estudiados corresponden a los formados por la anfotericina B.

Comportamiento de los canales de anfotericina B.

Se hicieron experimentos en los que se aumentó progresivamente la concentración de anfotericina B. Se pretendía identificar los canales que aparecieran en los registros conforme se aumentaba la cantidad de anfotericina B. Estos experimentos se realizaron en las siguientes condiciones: Se formaron los liposomas por sonicación en una solución 2 M KCl, 10 mM HEPES, 1 mM $CaCl_2$ y pH 8.0, la proporción de asolectina/colesterol fue de 4/1 (w/w), la concentración de lípido total de 15 mg/ml, una temperatura de 20-25°C. Se varió la concentración de anfotericina de 10^{-8} M hasta 10^{-4} M. La solución con que se llenó la pipeta fue la solución prueba. No se observaron canales a altas concentraciones de antibiótico. Esto concuerda con el hecho de que a altas concentraciones la anfotericina B se agrega en solución acuosa y previene su incorporación a la membrana, como se mencionó anteriormente.

Los canales observados se pueden agrupar fácilmente por su valor de conductancia en tres grupos. El grupo I de 2 pS, el grupo II de 5 pS y el grupo III de 12 pS. (figura 9, 10, 11, 12).

Por lo tanto, los resultados se presentan agrupando la información estadística en estos tres grupos en la tabla I.

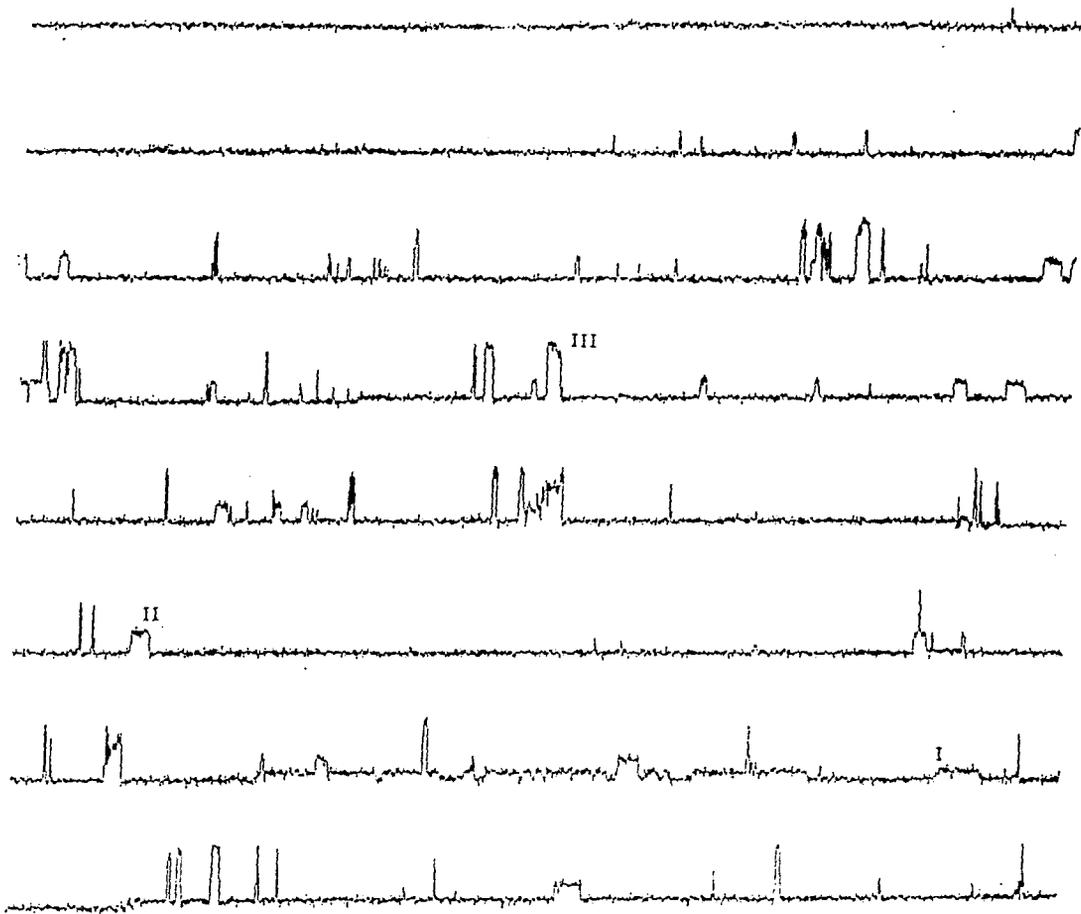


Figura 9. Registro en el que se observa la presencia de varios tipos (I, II y III) de canales de anfotericina B. Voltaje=+200 mV; concentración de antibiótico= $10^{-4}M$; razón Col/FL=0/1 (w/w); temperatura=25°C.

200.00 ms

2 pA

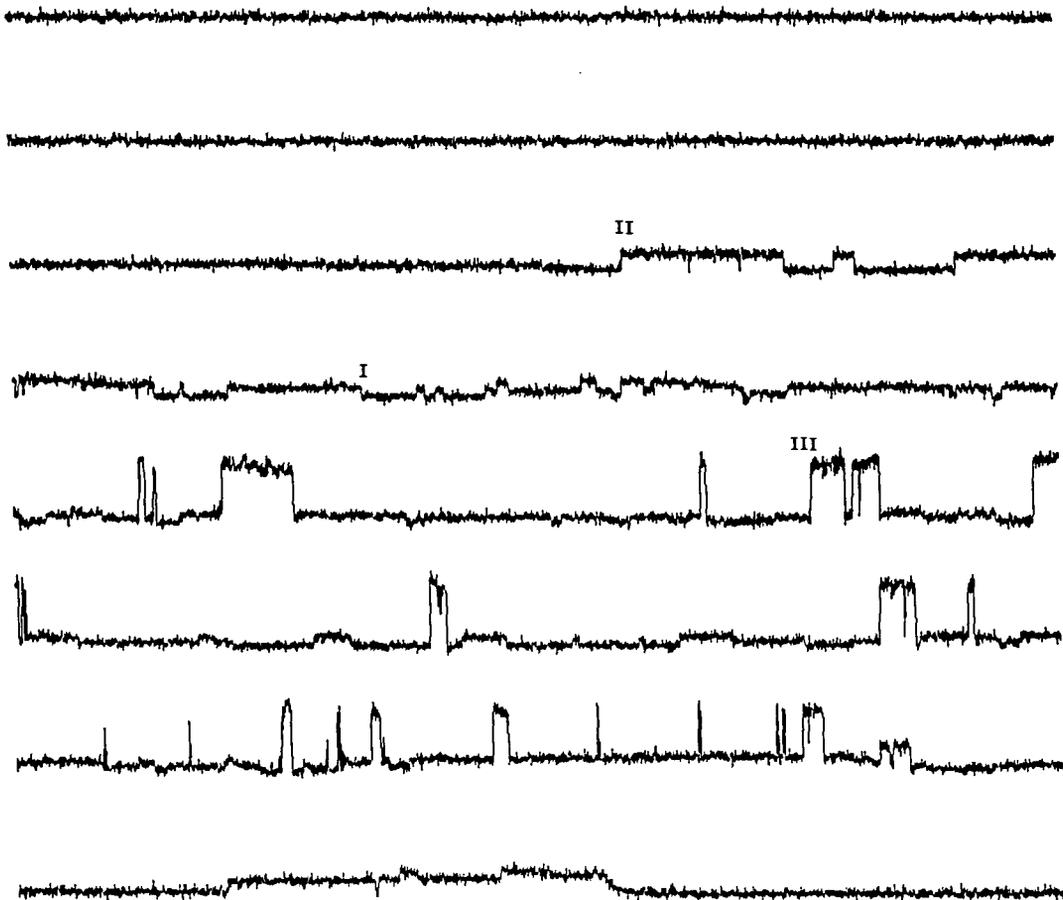


Figura 10. Registro en el que se observa la presencia de varios tipos (I, II y III) de canales de anfotericina B. Voltaje=+200 mV; concentración de antibiótico= $10^{-6}M$; razón Col/FL=1/20 (w/w); temperatura=26°C.

200.00 ms
2 pA

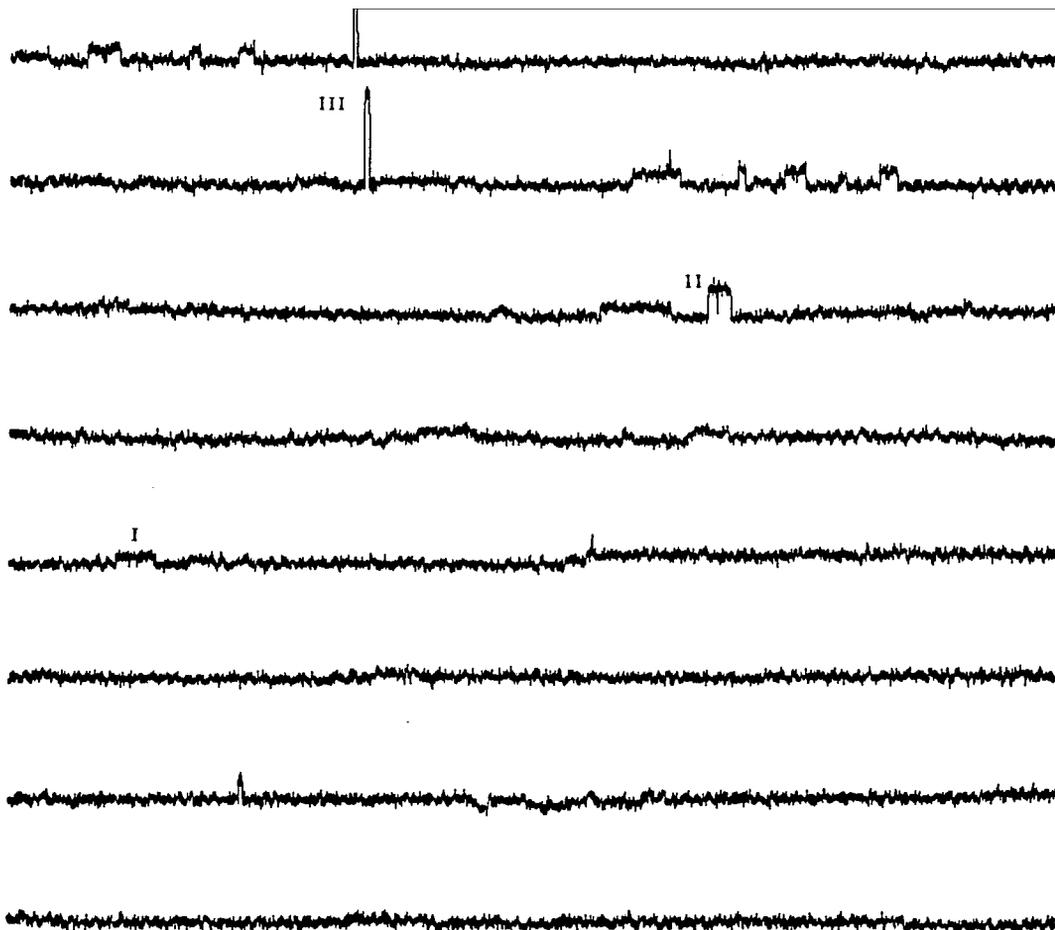


Figura 11. Registro en el que se observa la presencia de varios tipos (I, II y III) de canales de anfotericina B. Voltaje=-200 mV; concentración de antibiótico= $10^{-6} M$; razón Col/FL=1/10 (w/w); temperatura=23°C.

200.00 ms

2 pA

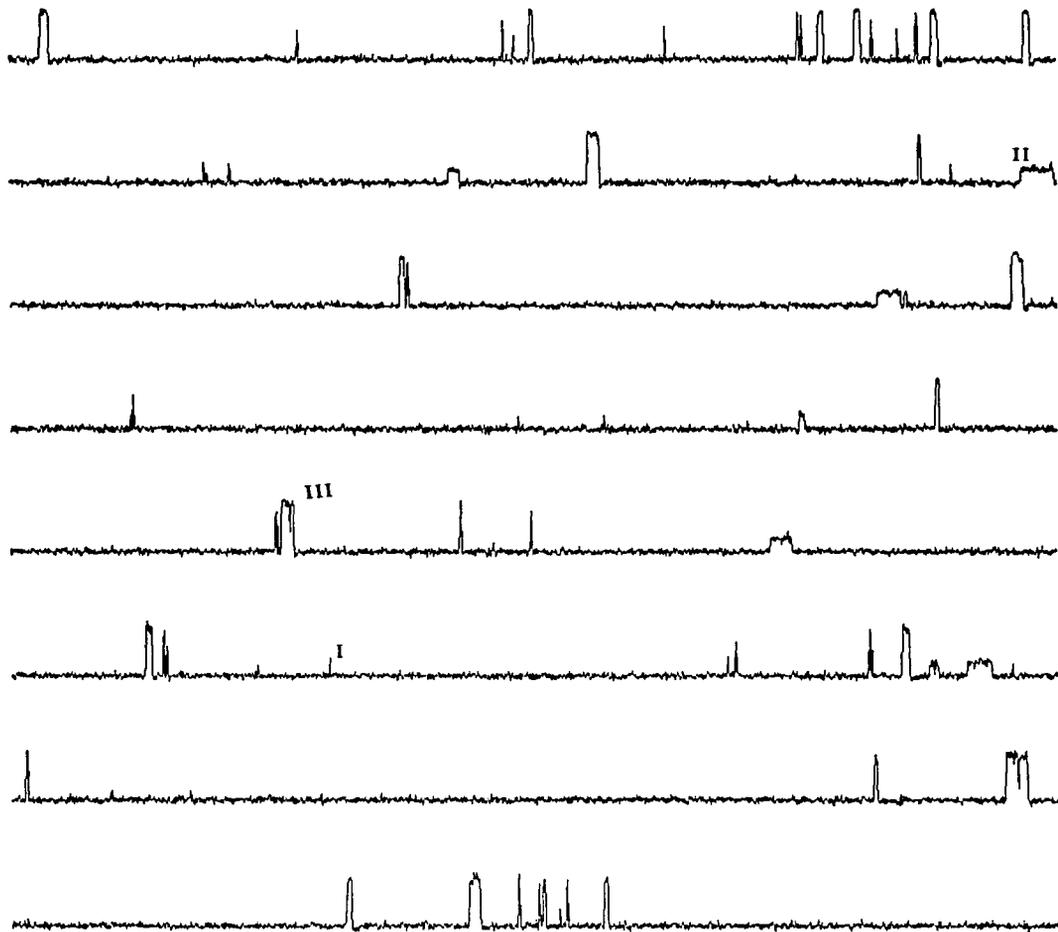


Figura 12. Registro en el que se observa la presencia de varios tipos (I, II y III) de canales de anfotericina B. Voltaje=+200 mV; concentración de antibiótico= $10^{-8} M$; razón Col/FL=1/4 (w/w); temperatura=22°C.

200.00 ms

2 pA

Molécula de fosfolípido

agua

aire

corriente

tiempo

cabeza polar

agua

aire

corriente

tiempo

CANAL DOBLE

EJE DEL CANAL (Å)

I

II

III

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

Tabla I.

Conductancia y tiempos de apertura y cierre del canal de anfotericina B a diferentes concentraciones de colesterol en la membrana. Col/FL: Razón peso a peso de las concentraciones de colesterol y fosfolípido en la bicapa. [anfB]: Concentración umbral de anfotericina B en la solución prueba para detectar canales. τ_c : Constante de tiempo de cierre del canal. τ_a : Constante tiempo de apertura del canal.

| Col/FL (w/w) | [anfB] M | Tipo | Conductancia (DS) ^a [n] ^b pS | τ_c ms^{-1} | τ_a ms^{-1} |
|-----------------|-------------|------|---|-----------------------|-----------------------|
| 0/1 | 10^{-4} | I | 2.06 (0.76) [9] | 14.23 | 4.98 |
| | | II | 5.22 (0.75) [8] | | .16 |
| | | III | 8.44 (1.03) [5] | | 7.09 |
| 1/20 | 10^{-6} | I | 1.84 (0.9) [15] | 15.58 | 4.99 |
| | | II | 4.9 (0.57) [8] | | 3.19 |
| | | III | 11.1 (1.79) [3] | | 9.51 |
| 1/10 | 10^{-6} | I | 1.63 (0.52) [4] | 40.89 | 55.5 |
| | | II | 4.56 (1.05) [2] | | 4.74 |
| | | III | 14.7 (4.12) [2] | | 8.16 |
| 1/4 | 10^{-8} | I | 2.1 (0.8) [7] | 17.78 | 4.85 |
| | | II | 5.51 (1.64) [4] | | 4.7 |
| | | III | 14.36 (4.84) [2] | | 10.48 |

^a Desviación standard.

^b número de ensayos.

Lo primero que se observa es la necesidad de incrementar considerablemente la concentración de anfotericina B para poder obtener canales a razones bajas de colesterol/fosfolípido. Es decir, mientras que para obtener canales en una membrana compuesta por asolectina y colesterol en una razón de 4/1 (w/w) se requiere una concentración de 10^{-8} M de anfotericina B, en membranas que carecen de colesterol es necesario aumentar esta concentración cuatro órdenes de magnitud. Esto concuerda con los experimentos de Ermishkin y colaboradores (1977). Sin embargo, es importante hacer notar que en este caso aún en ausencia de colesterol se observaron canales, lo cual no ocurrió en los experimentos en membranas negras de Ermishkin y sus colaboradores (1977). Esta discrepancia puede deberse a que en nuestro caso, la sonicación de los fosfolípidos en presencia de anfotericina B facilita considerablemente su incorporación a los liposomas en ausencia de colesterol, hay que recordar que nuestros intentos de formar canales por medio de la adición de anfotericina B al baño de la bicapa ya formada fueron mucho menos fructíferos.

Las conductancias observadas concuerdan con las asociadas al canal doble de anfotericina B reportado por Ermishkin y colaboradores (1977), así como a una estimación de este valor a partir de lo observado por Filkenstein (1984) para el canal doble de nistatina y aplicar el factor conocido de potencia relativa anfotericina B/nistatina de aproximadamente dos punto cinco. Es decir, si Ermishkin y colaboradores (1977) encontraron una conductancia de 6.5 pS para el canal doble de anfotericina B y Filkenstein (1984) encontró una conductancia de 5 y de 2 pS para el canal doble y sencillo de nistatina, respectivamente; cabe suponer que la conductancia esperada del canal sencillo de anfotericina B debe ser aproximadamente de 15 pS.

De la misma manera, la conductividad del canal sencillo puede estimarse

en aproximadamente 12 pS, o sea, el grupo III de nuestros experimentos. La conductividad baja del grupo I fue reportada por Bolard y colaboradores, quienes también observaron las conductividades de 5 pS y de 10 pS. Sin embargo, Bolard (1991) propone que las tres conductividades corresponden al canal sencillo ya que existe evidencia que sugiere que no puede darse el flip-flop de la molécula de antibiótico en la bicapa (van Hoogevest y DeKruijff, 1978) y ellos agregaron éste por un solo lado de la membrana en sus experimentos. Hay que hacer notar que los resultados anteriores fueron obtenidos utilizando ergosterol y no les fue posible a Bolard y colaboradores (1991) reproducirlos utilizando colesterol. Es interesante que nosotros si hayamos obtenido estos canales con colesterol. Nuevamente, ésto puede deberse al proceso de incorporación del antibiótico a las membranas por sonicación.

Resta la duda de si nuestra asignación del grupo II al canal doble es adecuada o, como proponen Bolard y colaboradores (1991) se trata de una conductividad asociada al canal sencillo.

Por supuesto, la presencia de múltiples conductividades puede deberse a subestados del canal abierto o a la idea generalizada de que el antibiótico puede formar canales de distinta molaridad y, por ende, con distintas propiedades estructurales.

Hay que hacer notar que si bien el comportamiento observado, en relación al efecto del colesterol, es similar al reportado por Ermishkin, et al. (1977), los tiempos de apertura son marcadamente distintos, en nuestro caso, los tiempos de apertura máxima registrados son de 55 ms, mientras que estos autores reportan tiempos de apertura de hasta segundos (figura 10). Esta discrepancia puede deberse a distintas condiciones termodinámicas.

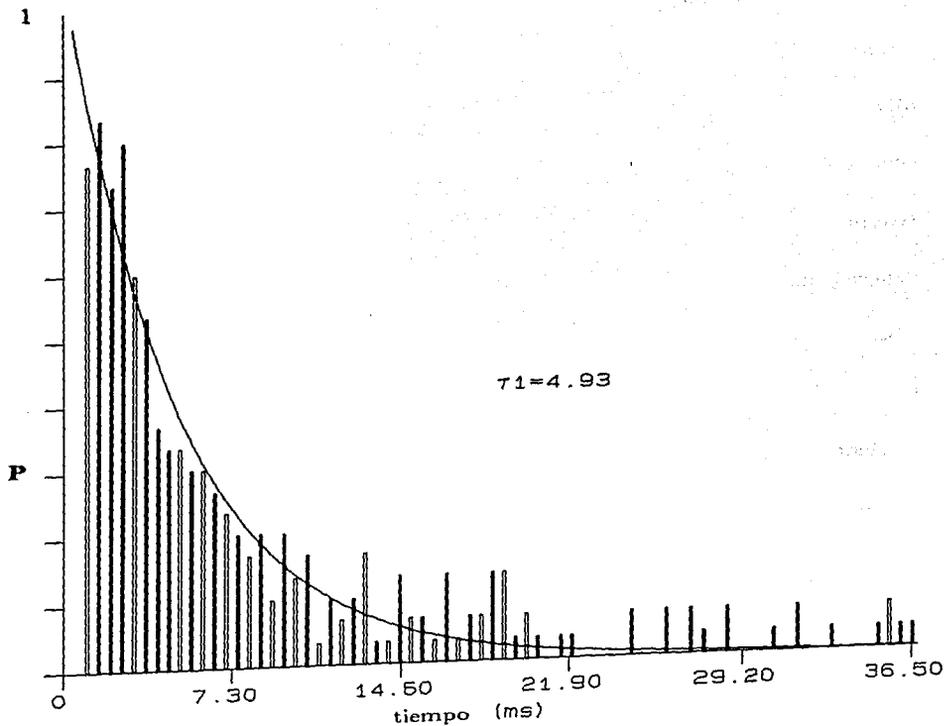


Figura 13. Distribución acumulativa de probabilidad de apertura $P = \exp(-t/\tau_1)$ de una canal tipo I de anfotericina B a: voltaje = +200 mV; concentración de antibiótico = $10^{-6} M$; razón Col/FL = 10/1 (w/w); temperatura = 23°C.

Molécula de fosfolípido

agua

aire

corriente

tiempo

cabeza polar

agua

aire

corriente

tiempo

CANAL DOBLE

EJE DEL CANAL (Å)

I

II

III

Habiendo establecido la confiabilidad de nuestro enfoque, podemos ahora resaltar la importancia de los resultados.

El resultado más importante es la presencia de canales de anfotericina B en ausencia de colesterol. Si bien ya se había reportado la existencia de canales de anfotericina B en ausencia de colesterol, éstos se presentan en realidad como protocanales (Cohen, et al., 1990), no equivalentes al canal iónico con efecto farmacológico. En nuestro caso, hemos mostrado que es exactamente el mismo canal, infiriendo ésto por la independencia de las conductividades con respecto a la concentración de colesterol.

Un resultado que es también importante es la formación de estos canales en presencia de colesterol en lugar de ergosterol, ya que Bolard asigna una diferencia molecular a la interacción entre ambos esteroides con el antibiótico, diferencia que tiene importantes implicaciones farmacológicas. Desde luego que nosotros no estamos eliminando esta posibilidad porque el papel del colesterol puede haber sido facilitado por el proceso de sonicación, pero de cualquier manera, el ergosterol y el colesterol tendrían, en todo caso, solo una diferencia de grado.

CONCLUSIONES

En este trabajo se ha mostrado que un problema de gran interés tanto desde el punto de vista estructural como de su aplicación médica puede ser abordado a nivel molecular conduciendo a una visión mucho más detallada del proceso de la que normalmente se tiene con los estudios farmacológicos.

Si bien es cierto que la técnica de canal unitario en bicapas artificiales formadas en la punta de un microelectrodo de patch-clamp tiene riesgos por la producción de artificios, así como la utilización de muestras de origen biológico, las ventajas en la descripción puntual utilizando preparaciones cercanas al material fisiológico, justifican su utilización. Como hemos mostrado es posible desarrollar diversas pruebas para asegurar que las observaciones corresponden al sistema que se pretende estudiar y que los resultados son confiables.

También hemos visto que nuestros resultados están de acuerdo con los reportados en la literatura utilizando la técnica de bicapas negras, que de alguna manera se ha tomado como más segura.

El efecto mostrado en la dinámica del canal, así como el efecto del colesterol sobre las concentraciones umbrales del antibiótico para la formación de canales y la ausencia de efecto sobre las conductividades proponen que el colesterol tiene un efecto sobre las propiedades estructurales de la membrana y no del canal. Es claro que el canal responde fuertemente a las condiciones del medio ambiente. Esta puede ser la razón de los tiempos de apertura tan grandes observados por Kasumov y sus colaboradores, aunque existe la posibilidad de que estos tiempos sean artificios provocado por el fuerte filtraje que muestran sus trazos.

La conclusión del trabajo es que el esterol, contra la idea generalizada

de que está involucrado en la formación intrínseca del poro de anfotericina B, está determinando las propiedades termodinámicas de la membrana y así, participando en la incorporación del antibiótico a la bicapa y en los tiempos de apertura, ya que como se sabe, el colesterol cambia la fluidez de la membrana de acuerdo al estado en que esta se encuentra. Se podría poner a prueba esta hipótesis al tratar de obtener canales unitarios de anfotericina B en membranas con distinta composición de lípidos y a diferentes temperaturas, buscando imitar el efecto del colesterol sobre la membrana. Por lo tanto, el diseño molecular de análogos debiera considerar esta hipótesis.

Como corolario al trabajo, uno puede pensar en diversos experimentos que ayudarían a obtener el conocimiento estructural del sistema. Por ejemplo, el tan discutido punto de la posible existencia de canales de anfotericina B con distinta molaridad, ésta podría ser determinada en forma directa utilizando mezclas a distintas razones de nistatina/anfotericina B y ver si éstas producen conductividades híbridas. El espectro de estas conductividades dará directamente la molaridad correspondiente, además, permitiría determinar si los grupos de canales corresponden a distintas molaridades. También sería posible resolver este problema mediante el empleo de la microscopía de fuerza atómica para intentar visualizar el canal.

Por supuesto, una vez establecido el procedimiento experimental es muy útil para el análisis de análogos del antibiótico, pudiendo determinar si las variaciones han afectado la conductividad, la agregación, la sensibilidad al medio y su incorporación a la bicapa o la dinámica de apertura y cierre del canal.

BIBLIOGRAFIA

- Andreoli, T. E., Dennis, V. W., y Weigl, A. M. *J. Gen. Physiol.* **53**:133 (1969).
- Andrews, F. A., Beggs, W. H. y Sarosi, G. A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **11**:615 (1977).
- Andrews, F. A., Sarosi, G. A. y Beggs, W. H. *J. Antimicrob. Chemother.* **5**:173 (1979).
- Athar, M. A., y Winner, H. L. *J. Med. Microbiol.* **4**:505 (1971).
- Balakrishnan, A. R. y Easwaran, K. R. K. *Biochim. Biophys. Acta* **1148**:269 (1993).
- Beggs, W. H. *Curr. Microbiol.* **1**: 301 (1978)
- Benz, R., Frohlin, O., Lauger, P., y Montal, M. *Biochim. Biophys. Acta* **394**:323 ((1975).
- Berman, J. D., Ksionski, G, Chapman, W. L., Waits, B. y Hanson, W. L. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**:1978 (1992).
- Bolard, J., Seigneuret, M. y Boudet, G. *Biochim. Biophys. Acta* **599**:280 (1980).
- Bolard, J., Legrand, P., Heitz, F. y Cybulska, B. *Biochemistry* **30**: 5705 (1991).
- Bonilla-Marín, M., et. al. *Biochim. Biophys. Acta* **1061** :65-77 (1991).
- Borowski, E., Zieliński, J., Zimiński, T., Falkowski, L., Kolodziejczyk, P., Golik, J., Jereczek, E. y Adlercreutz, H. *Tetrahedron Lett.* **45**:3909 (1970).
- Brajtburg, J., Powderly, W. G., Kobayashi, G. S., Medoff, G. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**:381 (1990).
- Capuozzo, E., y Bolard, J. *Biochim. Biophys. Acta* **820**:63 (1985).
- Cass, A., Finkelstein, A., y Krespi, V. *J. Gen. Physiol.* **56**:100 (1970).

- Chen, W. C., Sud, I. J., Chou, D. L. y Feingold, D. S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **74**:480 (1977).
- Cohen, B. E. *Biochim. Biophys. Acta* **857**:117 (1986).
- Cohen, B. E., Benaim, G., Ruiz, M. C. y Michelangeli, F. *FEBS Lett.* **259**:286 (1990).
- Corey, D. P. y Stevens, C. F. Science and technology of patch-recording electrodes, in *Single-Channel Recording* (Ed. B. Sackmann y E. Neher), Plenum Press, New York, U. S. A. (1990).
- Coronado, R., Latorre, R. *Biophys. J.* **43**:231 (1983).
- Cybulska, B., Borowski, E., Prigent, Y. y Gary-Bobo, C. M. *J. Antibiotics* **34**:884 (1981).
- Dekker, J. y Ark, P. A. *Antibiot. Chemother.* **9**:327 (1959).
- DeKruijff, B., y Demel, R. A. *Biochim. Biophys. Acta* **339**:57 (1974)
- DeKruijff, B., Gerritsen, W. J., Oerlemans, A., Demel, R. A. y Van Deenen, L. L. M. *Biochim. Biophys. Acta* **339**:30 (1974a)
- DeKruijff, B., Gerritsen, W. J., Oerlemans, A., Demel, R. A. Van Deenen, L. L. M. *Biochim. Biophys. Acta* **339**:44 (1974b)
- Demel, R. A., van Kessel, W. S. M. G., y van Deenen, L. L. M. *Biochim. Biophys. Acta* **266**:26 (1972).
- Ermishkin, L. N., Kasumov, Kh. M. y Potseluyev, V. M. *Nature* **262**:698 (1976).
- Ermishkin, L. N., Kasumov, Kh. M. y Potseluyev, V. M. *Biochim. Biophys. Acta* **470**:357 (1977).
- Ernst, C., Grange, J., Rinnert, Dupont, G., Lemaitre, J. *Biopolymers* **20**:1575 (1981).
- Fields, B. T., Bates, J. H., y Abernathy, R. S. *Appl. Microbiol.* **19**:955 (1970).

- Ganis, P., Avitabile, G., Mechlinnski, W. y Schaffner, C. P. *J. Amer. Chem. Soc.* **93**:4560 (1971).
- Gold, W., Stout, H. A., Pagano, J. F., Donovan, R. *Antibiot. Annu.* **1955-1956**:579 (1956).
- Gooday, G. W. *J. Gen. Microbiol.* **99**:1 (1977).
- Gottlieb, D., Carter, H. E., Sloneker, J. H., y Amman, A. *Science* **128**:361 (1958).
- Gottlieb, D., Carter, H. E., Sloneker, J. H., Wu, L. C. y Gaudy, E. *Phytopathology* **51**:321 (1961).
- Grindle, M. y Farrow, R. *Molec. gen. Genet.* **165**:305 (1978).
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sackman, B. and Sigworth, F. J. *Pfluegers Arch. Eur. J. Physiol.* **391**:85 (1981).
- Hamilton-Miller, J. M. T. *Bacteriol. Rev.* **37**:168 (1973).
- Hazen, E. L. y Brown, R. *Science* **112**:423 (1950).
- Hazen, E. L. y Brown, R. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **76**:93 (1951).
- Hebeke, E. K., y Solotorovsky, M. *J. Bacteriol.* **89**:1533 (1965).
- Hemenger, R. P., Kaplan, T. y Dennis, E. A. *Biopolymers* **22**:911 (1983).
- Hervé, M., et. al. *Biochim. Biophys. Acta* **980**:261 (1989).
- Hoepflich, P. D. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **18**:205 (1978).
- Holz, R., Finkelstein, A. *J. Gen. Physiol.* **56**:125 (1970).
- Hostetler, J. S. Clemons, K. V., Hanson, L. H. y Stevens, D. A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**:2656 (1992).
- HsuChen, C. C., Feingold, D. S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **51**:972 (1973).
- Kagawa, Y. y Racker, E. *J. Biol. Chem.* **246**:5477 (1971).
- Kerridge, D. The plasma membrane of *Candida albicans* and its role in the action of antifungal drugs, in *The Eukaryotic microbial cell* (Ed. G. W.

- Gooday, D. Lloyd and A. P. J. Trinci), Cambridge University Press, Bristol, U. K. (1980).
- Kinsky, S. C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **4**:353 (1961a).
 - Kinsky, S. C. *J. Bacteriol.* **82**:889 (1961b).
 - Kinsky, S. C., Luse, S. A., y van Deenen, L. L. M. *Fed. Proc.* **25**:1503 (1966).
 - Kleinberg, M. E., Finkelstein, A. J. *Membrane Biol.* **80**: 257 (1984).
 - Kotler-Brajtburg, J., et. al. *Antimicrob. Agents Chemother.* **5**:377 (1974).
 - Labarca, P., Lindtrom, J., Montal, M. *J. Gen. Physiol.* **83**:473 (1984)
 - Lauger, P. *Science* **178**:24 (1972).
 - Lamy-Freund, M. T., Ferreira, V. F. N., y Schreier, S. J. *Antibiotics* **38**:753 (1985).
 - Levitan, E. S. *AzoBits* **8**:8 (1991).
 - Liévano, A. *Tesis de maestría*. CINVESTAV (1984).
 - Liras, P y Lampen, J. O. *Biochim. Biophys. Acta* **374**:159 (1974)
 - Marty, A., Finkelstein, A. J. *J. Gen. Physiol.* **65**:515 (1975).
 - Mechliniski, W., Schaffner, C. P., Ganis, P., y Avitabile, G. *Tetrahedron Lett.* **44**:3873 (1970).
 - Medoff, G., Comfort, M., Kobayashi, G. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **138**:571 (1971).
 - Montal, M., Mueller, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **69**:3561 (1972).
 - Neher, E. y Sackamann, B. *Nature* **260**:799 (1976)
 - Nelson, N., Arnholt, R. y Montal, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**:3057 (1980).
 - New, R. R. C. In *Liposomes*. New, R. R. C. (ed), Oxford University Press, Oxford (1994).
 - Norman, A. W., Demel, R. A., DeKruijff, B., y Van Deenen, L. L. M. *J.*

Biol. Chem. **247**:1918 (1972a)

- Norman, A. W., Demel, R. A., DeKruiff, B., Guersts-van-Kessel, W. S. M. y Van Deenen, L. L. M. *Biochim. Biophys. Acta* **290**:1 (1972b)
- Norman, A. W., et. al. In *Advances in Lipid Research*, **14**: 127 (1976).
- Oku, N., Nojima, S. e Inoue, K. *Biochim. Biophys. Acta* **595**:277 (1980)
- Oroshnik, W., Vining, L. C., Mebane, A. D., y Taber, W. A. *Science* **121**:147 (1955).
- Osteux, R., Tran-van-ki, Biquet, P. *C. r. Séanc. Acad. Sci.* **247**:2475 (1958).
- Peña, A. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **167**:397 (1975)
- Peterson, R. P., Benz, S. K., Whyte, B. S. y Hartsel, S. C. *Biochim. Biophys. Acta* **1064**:165 (1991).
- Pidgeon, C., Apostol, G. y Markovich, R. *Analytical Biochemistry* **181**: 28 (1989).
- Rae, J. L. *AzoBits* **8**:6 (1991).
- Rickards, R. W., Smith, R. M. y Golding, B. T. *J. Antibiotics* **23**:603 (1970).
- Rinnert, H., Thirion, C., Dupont, G. y Lematre, J. *Biopolymers* **16**:2419 (1977).
- Rinnert, H. y Maigret, B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **101**:853 (1981).
- Saint-Julien, L., Joly, V., Seman, M., Carbon, C. y Yeni, P. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**:2722 (1992).
- Schiffman, F. J. y Klein, I. *Nature* **269**:65 (1977).
- Schindler, H. *FEBS Lett.* **122**:77 (1980).
- Scholz, R., Schmitz, H., Bucher, T., y Lampen, J. O. *Biochem. Z.* **331**:71 (1959).
- Schreier, S., Lamy-Freund, M. T. *Química Nova* **16**:343 (1993).

- Stein, W. D. *Nature* **218**:570 (1968).
- Suárez-Isla, B., et. al. *Biochemistry* **22**:2319 (1983).
- Teerlink, T., DeKruiff, B. y Demel, R. A. *Biochim. Biophys. Acta* **599**:484 (1980).
- van Hoogevest, P., y DeKruiff, B. *Biochim. Biophys. Acta* **511**:397 (1978).
- Vandeputte, J., Wachtel, J. L. y Stiller, E. T. *Antibiot. Annu.* **1955-1956**:587 (1956).
- Vertut-Croquin, A., Bolard, J., Chabbert, M. y Gary-Bobo, C. M. *Biochemistry* **22**:2939 (1983).
- Witzke, N. M. y Bittman, R. *Biochemistry* **23**:1668 (1984).
- Woods, R. A. *J. Bacteriol.* **108**:69 (1971).
- Woods, R. A., Bard, M., Jackson, I. E., y Drutz, D. J. *J. Infect. Dis.* **129**:53 (1974).
- Zygmunt, W. A. *Appl. Microbiol.* **14**:953 (1966).