

Modificación del contenido de colesterol en membranas de glóbulos rojos humanos mediante metil- β -ciclodextrina: Evolución temporal y cambios en la forma celular

Vázquez, Marcelo J.¹; Rivas María G.¹; Gennaro Ana M.^{1,2}

1- Departamento de Física, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral. Paraje El Pozo S/N, 3000 Santa Fe

2- INTEC (CONICET - UNL). Güemes 3450, 3000 Santa Fe

RESUMEN: Se estudió la evolución temporal de los procesos de reducción y enriquecimiento de colesterol en membranas de eritrocitos humanos utilizando metil- β -ciclodextrina (M β CD) como transportador. En ambos procesos el tiempo característico fue del orden de 1 minuto. En la situación de equilibrio se alcanzó un incremento del 16 % para el enriquecimiento y una remoción del 42 % para la reducción, respecto de la concentración original de colesterol en la membrana. La observación al microscopio óptico mostró formas estomatocíticas en las muestras reducidas, mientras que no se visualizaron cambios apreciables para las muestras enriquecidas. La rapidez en la evolución de estos procesos se explica por la comparación entre los tamaños promedio de los transportadores de colesterol. De esta manera, las moléculas de M β CD, con un tamaño mucho menor que otros transportadores, pueden atravesar más fácilmente el glicocálix, conduciendo a un flujo más eficiente de colesterol.

Palabras claves: colesterol, eritrocitos, metil- β -ciclodextrina.

SUMMARY: *Modification of cholesterol content in human red cell membranes by using methyl- β -cyclodextrin: time evolution and cell shape changes.* Vázquez, Marcelo J.¹; Rivas, María G.¹; Gennaro, Ana M.^{1,2}. The time evolution of cholesterol enrichment and depletion processes in human red cell membranes by using methyl- β -cyclodextrin (M β CD) as a carrier is studied. For both processes, the characteristic time is about one minute. In equilibrium, a 16% cholesterol increase for enrichment and a 42% decrease for depletion were achieved, related to the original cholesterol concentration in the membrane. Stomatocytic shapes were observed by optical microscopy in cholesterol depleted cells, while no significant shape changes were observed in enriched cells. The fast evolution of these processes may be explained through the comparison between the mean sizes of cholesterol carriers. Thus, M β CD molecules, much smaller in size in comparison to other carriers, are allowed to move easily through the glycocalyx, leading to a more efficient cholesterol efflux.

Keywords: cholesterol, erythrocytes, methyl- β -cyclodextrin.

Introducción

El colesterol es un constituyente esencial en las membranas biológicas de varias células eucariotas y ha sido ampliamente estudiado por ser necesario para la actividad funcional de muchas proteínas de membrana y por su efecto sobre el estado físico de las bicapas lipídicas (1). Recientemente ha sido demostrada la existencia de microdominios laterales ricos en colesterol donde se asocian proteínas de membrana posiblemente relacionadas a la trasducción de señales y comunicación celular (2).

Fisiológicamente, un exceso de colesterol es removido de las membranas celulares por lipo-proteínas plasmáticas según el transporte reverso de

Nota: Versiones preliminares de este trabajo fueron presentadas en la XXX Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica, 2001 y en la Reunión Anual de la Asociación Física Argentina, 2001.
agennaro@intec.unl.edu.ar

colesterol, y conducido al hígado para su eliminación (3). Existen métodos para manipular *in vitro* la concentración de colesterol en las membranas celulares, como la incubación con liposomas (4) o con moléculas sintéticas como las β -ciclodextrinas que lo mantienen en solución acuosa (5), por encapsulamiento en un centro hidrofóbico. Se ha demostrado que la metil- β -ciclodextrina (M β CD) resulta más apropiada que otros derivados para el enriquecimiento o reducción del colesterol de las membranas (6).

La forma discocítica de los eritrocitos y las alteraciones inducibles están influenciadas por la distribución de lípidos en la membrana (7,8). De acuerdo al modelo de bicapa, la forma equinocítica resulta de un incremento del área superficial de la hemicapa externa respecto a la interna, mientras que la forma estomatocítica resulta de un incremento del área superficial de la hemicapa interna respecto a la externa (9, 10).

En trabajos previos, se modificó el contenido de colesterol de la membrana de eritrocitos humanos utilizando M β CD y liposomas. Mediante un estudio por espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica con sondas que sensan distintas profundidades en la bicapa, se estimaron los cambios resultantes en el orden de las cadenas acílicas de los fosfolípidos (11). Durante la ejecución de este trabajo, se evidenció que la M β CD podía producir alteraciones importantes en el contenido de colesterol celular en tiempos menores a 30 minutos, mientras que los procesos que involucran liposomas necesitan tiempos del orden de 30 horas. Por lo tanto, resultó relevante estudiar con detalle la evolución temporal del contenido de colesterol en las membranas de eritrocitos durante los tratamientos con M β CD, monitoreando al mismo tiempo eventuales alteraciones de la morfología celular.

Materiales y Métodos

Materiales

El buffer utilizado para los lavados, para la preparación de las soluciones de M β CD y albúmina, fue PBS isotónico de pH 7.4 preparado a partir de 125 mM NaCl, 30 mM Na₂PO₄ y 6 mM KH₂PO₄ (todas las sales requeridas fueron de calidad analítica, Ciccarelli). Se utilizó heparina como anticoagulante (Rivero). La M β CD (PM 13311.4) y el colesterol (99% de pureza, PM 386.6) fueron adquiridos de Sigma

Chemical Co. (St. Louis, USA). Para la preparación del complejo M β CD /colesterol se utilizó cloroformo, etanol y 2-propanol (calidad analítica, Merck). La toma de fotografías se realizó sobre muestras resuspendidas en albúmina (Sigma, 2.5 g/l en PBS isotónico). El contenido de colesterol fue dosado utilizando un Kit enzimático comercial (Sociedad de Bioquímicos Santa Fe) adaptado mediante la incorporación de 0.5 % de Tritón X-100 (Sigma).

Obtención de las muestras de eritrocitos

Los eritrocitos se obtuvieron a partir de sangre entera de personal del grupo, extraída por punción venosa y anticoagulada con heparina, por centrifugación a 3000 rpm en centrifuga de mesa durante 5 minutos, eliminando el suero y la capa antedada ("buffy coat") y lavando con buffer PBS isotónico. Una mejor compactación del paquete globular se logró centrifugando a 3000 rpm durante 2 minutos. En todos los casos las muestras fueron procesadas en el mismo día de la extracción.

Manipulación del contenido de colesterol de membranas eritrocitarias con M β CD

La solución de M β CD 3 mM fue preparada en buffer PBS isotónico y conservada en frasco color caramelo a 4°C. El complejo M β CD/colesterol necesario para el enriquecimiento se obtuvo evaporando una solución madre de colesterol (50mg/ml en cloroformo/metanol 1:1) bajo corriente de nitrógeno de modo de obtener estructuras amorfas, dejándose luego en vacío durante 30 min. A continuación se agregó una solución de M β CD 3 mM, se sonicó 7.5 min a 37°C, se dejó en agitador aproximadamente 8 hs. a 37°C y se procedió al filtrado de la misma para eliminar el colesterol precipitado. La concentración de colesterol resultante fue de 25 mg de colesterol/g de M β CD. Esta solución se conservó en frasco color caramelo a temperatura ambiente.

Los eritrocitos lavados y compactados fueron incubados a 37 °C en M β CD 3 mM (para reducción) o M β CD/colesterol (para enriquecimiento), a un hematocrito (concentración en volumen) del 5% para reducción y del 3% para enriquecimiento, utilizando tubos de PVC. Al mismo tiempo se incubaron eritrocitos en PBS como controles. Una vez cumplido el tiempo de incubación correspondiente, los tubos se centrifugaron a 3000 rpm durante 2 minutos, el sobrenadante se reservó para la determinación del grado de hemólisis y el paquete celular fue lavado

una vez con PBS isotónico. Antes de continuar y para lograr un empaquetamiento óptimo, se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos, eliminándose el exceso de sobrenadante.

Determinación de la concentración de colesterol en membranas

El contenido de colesterol de membranas eritrocitarias se determinó luego de una extracción lipídica (12), utilizando un método colorimétrico enzimático modificado. En primer lugar, se procedió a la lisis de 50 ml de eritrocitos con 70 ml de agua destilada, con vortex a 1500 rpm al comienzo y luego de 30 minutos de comenzado el proceso de hemólisis. A continuación, se extrajeron los lípidos de la membrana según el método de Rose y Oklander (13), adicionando 0.66 ml de 2-propanol y 0.42 ml de cloroformo. Se realizó agitación con vortex a 2000 rpm después de cada adición y cada 15 minutos. El tiempo de extracción para cada solvente fue de una hora. Una vez cumplido el tiempo para ambos, se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos, obteniéndose un sobrenadante limpio que fue separado por inversión directa en tubos de hemólisis. Luego se procedió a la evaporación, bajo corriente suave de aire comprimido, hasta sequedad. Todos estos pasos se realizaron a temperatura ambiente.

Para resuspender los lípidos se adicionó 75 ml de etanol absoluto (14) al depósito seco y se agitó en vortex suave a 1000 rpm tratando de lograr la mayor recuperación. Alicuotas de 10 ml de esta solución fueron incubadas con 1 ml de solución enzimática. Las lecturas de absorbancia fueron realizadas a 500 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 20, contra blanco de reactivo enzimático. Cada medición fue realizada por triplicado. Para cada tiempo se calcularon los porcentajes finales de colesterol en la membrana, considerando como 100% a la concentración promedio de los eritrocitos controles analizados en cada experiencia. Posteriormente se realizó un promedio de todos los datos (porcentajes finales) para cuatro experiencias compatibles en tiempo y se calculó el error estándar medio (SEM).

Microscopía óptica

Luego de cada tratamiento, se tomaron gotas de los tubos de incubación (tratados y controles), se resuspendieron en albúmina (para evitar el efecto

vidrio) sobre portaobjetos y se observaron a 400x. Se utilizó un microscopio binocular Zeiss con cámara de video Sony, conectada a una placa de adquisición que permitió la obtención de las fotos en el soporte original.

Resultados

En la figura 1 se muestra la variación temporal del porcentaje de colesterol en la membrana de eritrocitos para el proceso de reducción. En la misma puede verse que la curva exponencial decreciente, la cual se ajusta al proceso, tiende a un valor de equilibrio $[Col]_0$ que representa un $(57 \pm 1)\%$ del colesterol original en la membrana, y que la constante de tiempo característica (t_{extr}) es del orden de 1 minuto. Esto podría interpretarse considerando que existe en la membrana un porcentaje de colesterol lábil o "extraíble" $[Col]_{extr}$ que representa, según el ajuste realizado, el $(42 \pm 4)\%$ del colesterol inicialmente presente en la membrana. Para determinar si este valor corresponde a una propiedad intrínseca del eritrocito, o tiene como factor limitante la saturación del transportador, se realizaron experiencias posteriores en las que los eritrocitos reducidos se incubaron en una nueva solución de M β CD durante 30 minutos adicionales, en las mismas condiciones del proceso anterior. En este caso se logró una extracción de colesterol del 63%, para la situación de equilibrio.

Para el proceso de enriquecimiento, mostrado en la figura 2, la incorporación máxima de colesterol adicional ($[Col]_{incorp}$) fue del $(16 \pm 1)\%$, de acuerdo con un modelo de crecimiento del tipo $1 - e^{-t/t_{ent}}$. Al igual que el proceso de reducción, la constante de tiempo (t_{ent}) hallada fue del orden de 1 minuto.

El porcentaje de hemólisis durante las incubaciones no superó el 1%, salvo en el caso de la doble reducción. Este dato resulta útil para asegurar el mantenimiento de la integridad de la membrana celular ante la exposición a soluciones de M β CD.

La observación en gota fresca al microscopio óptico (Figuras 3 y 4) evidenció la presencia de formas estomatocíticas en las muestras reducidas en colesterol, mientras que no se visualizaron cambios apreciables en cuanto a la forma y tamaño para las muestras enriquecidas.

Figura 1: Evolución temporal del porcentaje de colesterol en membranas de glóbulos rojos para el proceso de reducción por incubación con M β CD 3mM. Hematocrito del 5%. Los resultados son el promedio de cuatro experiencias con muestras por duplicado.

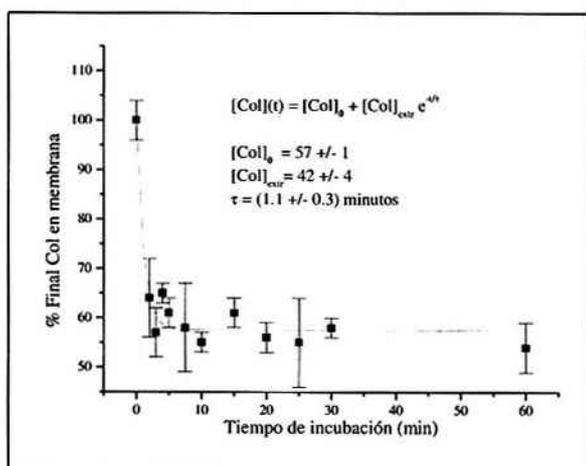


Figura 2: Evolución temporal del porcentaje de colesterol en membranas de glóbulos rojos para el proceso de enriquecimiento por incubación con M β CD 3mM. Hematocrito del 3%. Los resultados son el promedio de tres experiencias con muestras por duplicado.

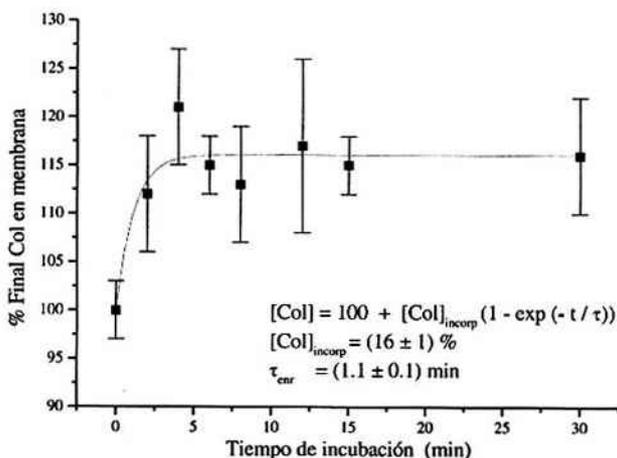


Figura 3: Fotografías de eritrocitos reducidos en colesterol, obtenidas luego de diferentes tiempos de incubación en M β CD. Microscopía óptica, gota fresca, aumento 400 x. Para evitar el "efecto vidrio" se utilizó solución de albúmina. Los eritrocitos reducidos presentan forma estomatocítica, ya desde los 5 minutos de incubación, que se corresponde con una disminución del área de la hemicapa externa. En la muestra control se puede observar la forma discocítica normal de estas células.

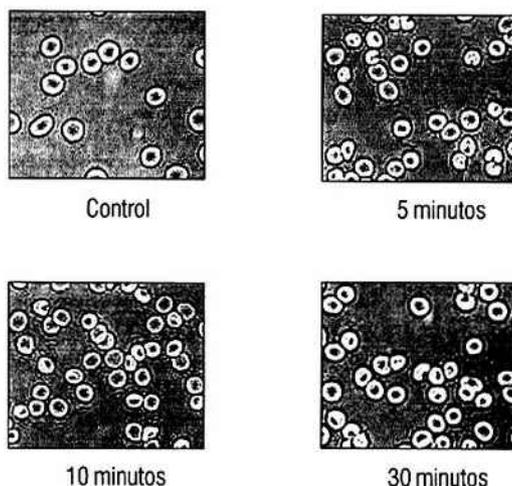
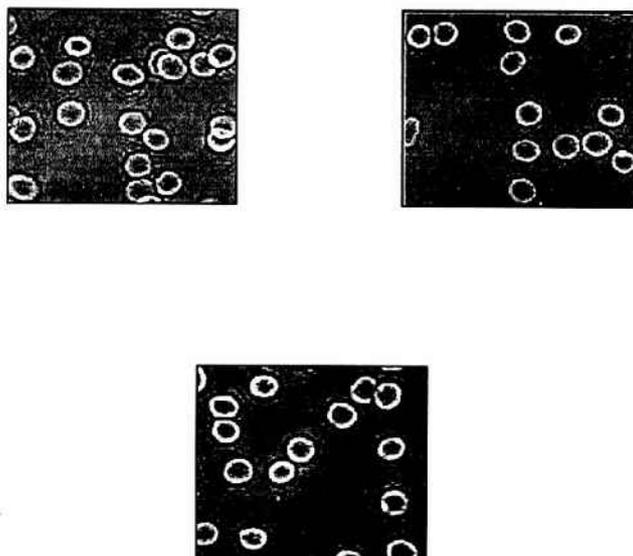


Figura 4: Fotografías de eritrocitos enriquecidos en colesterol, obtenidas luego de diferentes tiempos de incubación en M β CD/col. Microscopía óptica, gota fresca, aumento 400 x. Para evitar el "efecto vidrio" se utilizó solución de albúmina. Los eritrocitos tratados no presentan un cambio de forma apreciable con respecto a la forma discocítica normal de los controles.



Discusión

Se ha dado una descripción cuantitativa de los procesos de modulación del contenido de colesterol en membranas de eritrocitos mediante el uso de M β CD. Se ha confirmado que los procesos que involucran M β CD evolucionan muy rápidamente, con tiempos característicos del orden del minuto. En cambio, los métodos tradicionales de intercambio de colesterol que utilizan liposomas, requieren tiempos del orden de las 30 horas para producir alteraciones similares (11).

Una explicación de la rapidez de los procesos que involucran M β CD puede proponerse comparando los tamaños promedio de las estructuras involucradas. El acercamiento de una partícula a la superficie del eritrocito está necesariamente afectado por la presencia de las estructuras del glicocáliz, que tienen un espesor cercano a 100 nm. En este sentido, el diámetro promedio de 1 nm de las moléculas de M β CD resulta mucho más favorable que el de un liposoma (diámetros estimados entre 50 y 500 nm), lo cual les permitiría introducirse entre el glicocáliz con mayor facilidad. Este acercamiento del transportador a la superficie lipídica minimiza la exposición desfavorable de una molécula hidrofóbica, como es el colesterol, a un medio acuoso, facilitando su intercambio.

Los resultados indican que el factor limitante del porcentaje de colesterol extraíble es la saturación del transportador. Una segunda incubación permite extraer una mayor cantidad de colesterol, aunque el aumento en el grado de hemólisis sugiere alteraciones en la integridad de la membrana.

La presencia de estomatocitos entre los eritrocitos reducidos es consistente con la reducción del área de la hemicapa externa de la membrana debida a la extracción de colesterol. Sin embargo, entre los eritrocitos enriquecidos no se observa la aparición de equinocitos, característica de un aumento en la hemicapa externa (7,8), por lo que se concluye que el colesterol incorporado no produce un aumento sensible del área de la misma. En experiencias adicionales (no mostradas), las muestras fueron tratadas con M β CD/colesterol de baja concentración (13 mg colesterol/g de M β CD), que no produce modificación del contenido de colesterol en la membrana. En estos casos, no se manifestaron cambios en la forma celular. Esto sugiere que las modificaciones en la morfología de las muestras

sometidas a reducción, se deben únicamente a la variación del contenido de colesterol y no a la pérdida de otros componentes de membrana. Mas aún, experiencias preliminares (no mostradas) en las que se realizó un enriquecimiento posterior a una reducción, mostraron un pasaje desde una forma estomatocítica en los eritrocitos reducidos hacia una forma discocítica normal al enriquecerlos, confirmando la influencia del contenido de colesterol en los cambios de forma observados.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por la Universidad Nacional del Litoral (Proyecto CAI + D 53/96) y por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET, PIP 4807). Agradecemos al Bioq. Alberto Rizzi por su colaboración en la extracción de las muestras. AMG es miembro de la Carrera del Investigador de CONICET.

Bibliografía

- 1- Shmeeda, H. R.; Golden, E. B. and Barenholz, Y., 1994. Membrane Lipids and Aging, en "Biomembranes - Structural and functional aspects". Ed. M. Shinitzky, VCH (Weinheim). 1-82.
- 2- Brown, D. A., and London, E., 2000. Structure and function of sphingolipid and cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* 275: 17221-17224.
- 3- Fielding, C. J., and Fielding, P. E., 1995. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J. Lipid Res.* 36: 211-228.
- 4- Cooper, R. A., 1978. Influence of increased membrane cholesterol on membrane fluidity and cell function in human red blood cells, *J. Supramol. Struct.* 8: 413-430.
- 5- Yancey, P. G., Rodriguez, W. V., Kilsdonk E. P. C., Stoudt, G. W., Johnson, W. J., Phillips M. C., and Rothblat G. H., 1996. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. *J. Biol. Chem.* 271: 16026-16034.
- 6- Y. Ohtani, T. Irie, K. Uekama, K. Fukunaga, J. Pitha, 1989. Differential effects of α -, β - and γ - cyclodextrins on human erythrocytes. *Europ. J. Biochem.* 186: 17-22.
- 7- Zachowski, A. and P. F. Devaux. 1990. Transmembrane movements of lipids. *Experientia.* 46: 644-656.
- 8- Mohandas N., and J. A. Chasis. 1993. Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. *Sem. Haematol.* 30:171-192.

- 9-** Kuypers, F. A.; Roelofsen, B.; Berendsen, W.; Opdenkamp, J. A. F. and Van Deenen, L. M., 1984. Shape changes in human erythrocytes induced by replacement of the native phosphatidylcholine with species containing various fatty acids. *J. Cell Biol.* **99**: 2260-2267.
- 10-** Fisher, T. M., 1993. Bending stiffness of lipid bilayers: IV. Interpretation of red cell shape changes. *Biophys. J.* **65**: 687-692.
- 11-** Cassera, M. B.; Silber, A. M. and Gennaro, A. M., 2002. Differential effects of cholesterol on acyl chain order in erythrocyte membranes as a function of depth from the surface. An electron paramagnetic resonance (EPR) spin label study. *Biophys. Chem.* **99**: 117-127.
- 12-** Brito, M. A., Silva, M. R., Matos, D. C., da Silva A. T., Brites, D. T. 1996. Alterations of erythrocyte morphology and lipid composition by hyperbilirubinemia, *Clin. Chimica Acta* **249**: 149-165.
- 13-** Rose, H. G., Oklander, M. 1965. Improved procedure for the extraction of lipids from human erythrocytes, *J. Lipid Res.* **6**: 428-431.
- 14-** Ahmed, H. A., 1993. Measurement of cholesterol in membranes, en: *Methods in Molecular Biology*, vol. 19. Eds. J.M. Graham y J.A. Higgins, Humana Press Inc.(Totowa, NJ.)