



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

TESIS DOCTORAL

**“MODELO DE TRANSPORTE
POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.
APLICACIÓN CLÍNICA EN BIOMARCADORES NUTRIENTES”**

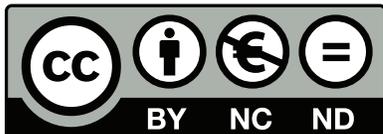
FRANCISCO SÁNCHEZ JIMÉNEZ
MÁLAGA 2014



Publicaciones y
Divulgación Científica

AUTOR: Francisco Sánchez Jiménez

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está sujeta a una licencia Creative Commons:

Reconocimiento - No comercial - SinObraDerivada (cc-by-nc-nd):

[Http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es)

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización

pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es

**MODELO DE TRANSPORTE
POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.
APLICACIÓN CLÍNICA EN
BIOMARCADORES NUTRIENTES.**

**Memoria presentada
para optar al Grado de Doctor**



**Departamento de Bioquímica,
Biología Molecular e Inmunología
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA**

Autor: Francisco Sánchez Jiménez

2014

**MODELO DE TRANSPORTE
POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.
APLICACIÓN CLÍNICA EN
BIOMARCADORES NUTRIENTES.**



*“Phase-transitions are triggered
by subtle shifts of environment”*

Tanaka et al. 1992

En Cells, Gels and the Engine of Life

Gerald H. Pollack, 2001



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Departamento de Bioquímica, Biología
Molecular e Inmunología

MAXIMILIANO RUIZ GALDÓN, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, BIOLOGÍA MOLECULAR E INMUNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

INFORMA

Que el trabajo titulado MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD. APLICACIÓN CLÍNICA EN BIOMARCADORES NUTRIENTES, realizado por D. Francisco Sánchez Jiménez y dirigido por la Prof^a. Macarena Perán Quesada, Profesora Titular del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad de Jaén, ha sido desarrollado en las instalaciones del Departamento de Bioquímica, Biología Molecular e Inmunología de la Universidad de Málaga.



En Málaga, 30 de junio de 2014



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Departamento de Ciencias de la Salud

Macarena Peran Quesada, profesora Titular de Anatomía Humana en la Universidad de Jaén

Certifica que el trabajo titulado MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD. APLICACIÓN CLÍNICA EN BIOMARCADORES NUTRIENTES realizado por D. Francisco Sánchez Jiménez ha sido realizado bajo mi dirección y reúne las condiciones necesarias para ser presentado como tesis doctoral para optar al grado de doctor.

Málaga a cinco de junio de 20124

Macarena Perán Quesada, PhD
E-mail: mperan@ujaen.es
+34 953212921



Agradecimientos

A todos los integrantes del
Grupo de Investigación Transporte de Membrana.
Departamento de Bioquímica,
Biología Molecular e inmunología (GIM).

A todos mis profesores y maestros
que abrieron las puertas al conocimiento.

A mi familia por su paciencia durante estos años.

ÍNDICE.-

Índice.-

ANTECEDENTES.....	6
Organización espontánea de lípidos.....	15
Reacción e información son inseparables.....	21
Integración funcional de los lípidos de membrana.....	28
Subcompartimentos y energía silenciosa (información).....	30
Estructuras disipativas.....	32
Paso de la testosterona.....	41
OBJETIVOS.....	46
APOYO EXPERIMENTAL.....	48
MATERIAL.....	48
METODOLOGÍAS.....	49
A) Aislamiento y cultivo de fibroblastos.....	49
B) Perfusión de fibroblastos cultivados en microesferas.....	49
C) Captación de testosterona tritiada por fibroblastos en experimentos de pulso.....	50
1. Captación inicial de testosterona.....	50
2. Autoinhibición de testosterona en experimentos de pulso.....	51
D) Captación de [³ H]T en fibroblastos perfundidos en experimentos de carga.....	52
1. Producción de dihidrotestosterona (DHT) por fibroblastos humanos perfundidos con T (Testosterona).....	52
2. Dependencia de la temperatura.....	53
3. Autoinhibición de la captación de testosterona dependiente del tiempo.....	54
4. Autoinhibición de la captación de [³ H]T durante el estado estacionario en experimentos de carga.....	55
RESULTADOS.....	57
A) Captación de β[³ H]Testosterona por fibroblastos humanos en experimentos de pulso.....	57
1. Captación inicial de testosterona por fibroblastos humanos.....	57
2. Inhibición de la captación de [³ H]T por concentraciones crecientes de testosterona no tritiada.....	59
B) Captación inicial y en el estado estacionario de [³ H]T en experimentos de carga.....	61
1) Dependencia de la temperatura.....	61
Biotermodinámica.....	63
Captación inicial unidireccional.....	65
Interpretación biotermodinámica del transporte.....	67
2) Tiempo-dependencia de la inhibición de la captación de [³ H]T por testosterona no tritiada.....	75

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

a) Efectos de una exposición corta de los fibroblastos a testosterona	76
b) Efectos de una exposición larga de los fibroblastos a testosterona	78
3. Inhibición de la captación de [³ H]T durante el estado estacionario por T 10 ⁻⁶ M en experimentos de carga.	81
DISCUSIÓN	86
La Geometría del Canal	97
Fisiología del Canal	99
Participación Activa de la Membrana	110
El carácter Pro-Inductivo de la Testosterona	110
El Modelo Conceptual	112
Los Lípidos comienzan a revelarse como posibles receptores, con capacidad de auto-organización y de organización de otras moléculas y de la membrana	113
Modelos de Referencia	130
Base experimental	138
Modelo Conceptual Propuesto	140
APLICACIÓN CLÍNICA. Interpretación Dinámica	150
CONCLUSIONES	157
BIBLIOGRAFIA	161
Hitos en la investigación del tráfico de lípidos transmembrana. Cronología	171
ANEXOS	174
Anexo I.- Algunas relaciones conceptuales seleccionadas entre parámetros fenomenológicos y magnitudes fisico-químicas.....	175
Anexo II.- Ecuaciones del apoyo experimental para el modelo conceptual de esta memoria.....	178
Anexo III.- Tratamiento avanzado del control metabólico michaeliano, ejemplo de Ciclo Límite.....	179
Anexo IV.- Composición porcentual molar de los lípidos en mamíferos	181
Anexo V.- Relación entre la entropía [S] como una función de variables extensivas (-α-) termodinámicas y las desviaciones del equilibrio (fluctuaciones): [$\xi_i = \alpha_i - \alpha_{i,0}$].....	182
DIAGRAMA ESTRUCTURAL-FUNCIONAL DEL MODELO CONCEPTUAL PROPUESTO	183

ANTECEDENTES

ANTECEDENTES

El precursor de las hormonas esteroideas es el colesterol, molécula excitante, no sólo por ser responsable de un elevado número de alteraciones metabólicas de mal pronóstico, ni siquiera porque, como recordaron Goldstein y Brown en el discurso de aceptación del Premio Nobel de Medicina, sea la molécula pequeña más galardonada en la historia de la biología, sino por su incorporación tardía a la cadena evolutiva, su procedencia, sus funciones, su metabolismo, su finalidad, y por su relación con moléculas de señalización (1).

Las células son extremadamente sensibles al exceso o modificación estructural de ciertos lípidos como el colesterol o los fosfolípidos. Dependiendo de las cadenas laterales, del grado de insaturación, de la estereoisomería, de los dobles enlaces y su número, conjugación o glicosilación, pueden adoptar una estructura funcional o hacerse tóxicos para la célula. La Diabetes Mellitus Tipo II muestra una alteración de la composición lipídica en las membranas celulares que disminuye la flexibilidad de la membrana, por lo que participaría en la patogenia de la microangiopatía (2).

La dieta moderna, con un contenido menor del 10% del total de ácidos Grasos Poli-Insaturados Ω -3, tiene un fiel reflejo en la composición de la membrana lipídica. Clínicamente se traduce en una posible modulación del estado de inflamación crónico propio de diversos síndromes como la depresión, patología cardiovascular, obesidad, resistencia a la insulina, Alzheimer, hipertensión, dislipidemias (3).

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

La homeostasis del colesterol y su desplazamiento en la membrana parece deberse a los oxisteroles, que controlarían la baja/alta actividad de los dos *pool* descritos para el colesterol intra-membranario (4).

El colesterol apareció en la biosfera después de que la atmósfera terrestre se hiciera aeróbica, alojado en las membranas a las que controla su fluidez y desde donde puede que ejerza funciones de control paracrino. Su ubicación en los Cinco Reinos se circunscribe al mundo animal, con las excepciones conocidas, del rango de trazas, como es el aceite de *Camelina*.

Los esteranos poseen una antigüedad de 2.700 millones de años, el lanosterol está presente en las bacterias eucariotas (5). La concentración de colesterol en la membrana guarda una relación directa con los niveles de Oxígeno (O₂) (6). La asociación de los esteroides con los vertebrados se remonta a unos 540 millones de años (7).

En cualquier caso, todos los lípidos no son equivalentes y su heterogeneidad química, por ejemplo, entre los dos lados de la membrana, es el resultado de un largo proceso evolutivo. En el caso de las hormonas esteroideas, su papel de mediadores queda bien patente.

Su precursor, el colesterol, una biomolécula que se incorporó a la cadena evolutiva para controlar la fluidez de las membranas, hace unos 2.500 millones de años, con el LECA - Last Eukaryotic Common Ancestor- (7,8). Resulta interesante destacar que el oxígeno del carbono 3 procede de la atmósfera y que en las células es organificado por la acción de complejas hidroxilasas u oxigenasas de acción mixta.

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

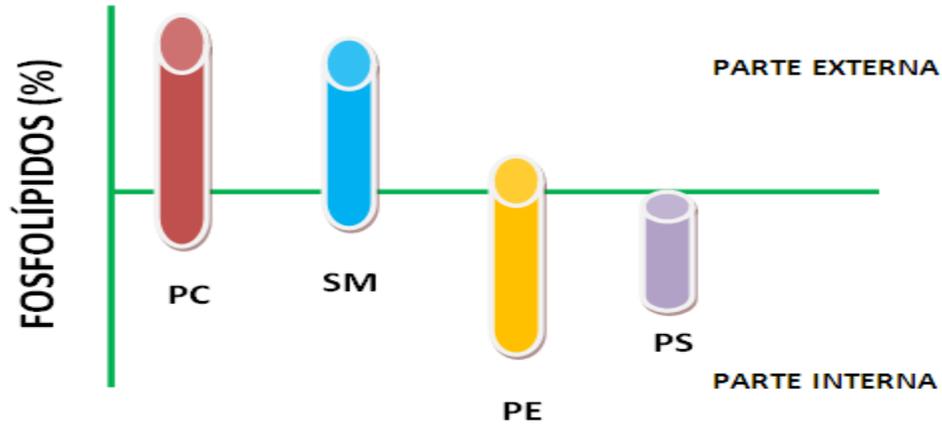


Ilustración I.- Asimetría Fundamental de la Membrana Biológica: Composición Fosfolipídica en la Cara Externa e Interna. (PC: Fosfatidil Colina, SM: Esfingomielina, PE: Fosfatidil Etanolamina, PS: Fosfatidil Serina) (9,10,11).

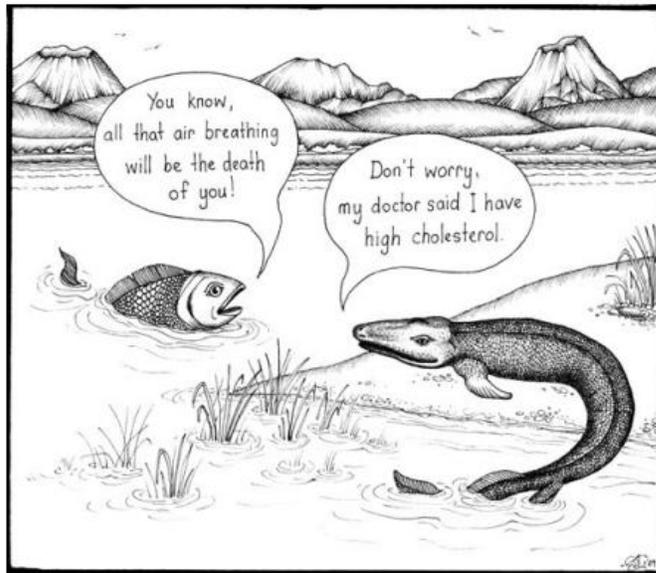


Figura 1.- El líquido surfactante pulmonar de los más antiguos respiradores de aire oxigenado, como el pez pulmonado, es particularmente rico en colesterol, en concordancia de la posible protección del colesterol contra la vida aeróbica. (Brown AJ, Galea AM. Cholesterol as an Evolutionary Response to Living with Oxygen. *Evolution*, 2010; 64(7): 2179–2183).

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

La mayor parte del colesterol que sintetiza el hígado se utiliza para fabricar los ácidos biliares destinados a emulsionar las grasas en el intestino desde donde se excretan o se reabsorben sin otros efectos más delicados que los puramente físicos de actuar como jabones.

En los animales se acumula en las glándulas suprarrenales, sistema nervioso, hígado y cálculos biliares (5). Por el contrario, como precursor de las hormonas esteroideas, es responsable del instinto de continuidad de la especie al aportar el núcleo de las hormonas sexuales.

Su carácter hormonal lo situaría en la parte alta de la jerarquía orgánica, su papel emulsionante en la baja. Sus acciones sobre las membranas le confieren un carácter de mediador local. Es alguien que conoce bien la estructura y la función de las membranas, que contribuye a su asimetría y en las que su presencia no resulta indiferente. La proporción molar entre el Colesterol y los Fosfolípidos en las membranas biológicas es de uno. Se encuentra asociado a las caveolas, a la esfingomielina.

Constituye el 25% o más del contenido lipídico de algunas membranas y es causa de enfermedades graves (12). Desde 1996, se sabe que puede unirse a una clase de polipéptidos, codificados por el gen *hedgehog*, implicado en el desarrollo de los Metazoos. Los transportadores intramembranarios ABC de los lípidos también se asocian a varias enfermedades (13). Aunque las células toleran cierta variabilidad en la composición lipídica en la especie humana, muchas enfermedades se han asociado con la incapacidad de las células para sintetizar lípidos específicos o para reciclar los lípidos particulares de los nutrientes o dirigir determinados lípidos específicos a su correcto destino.

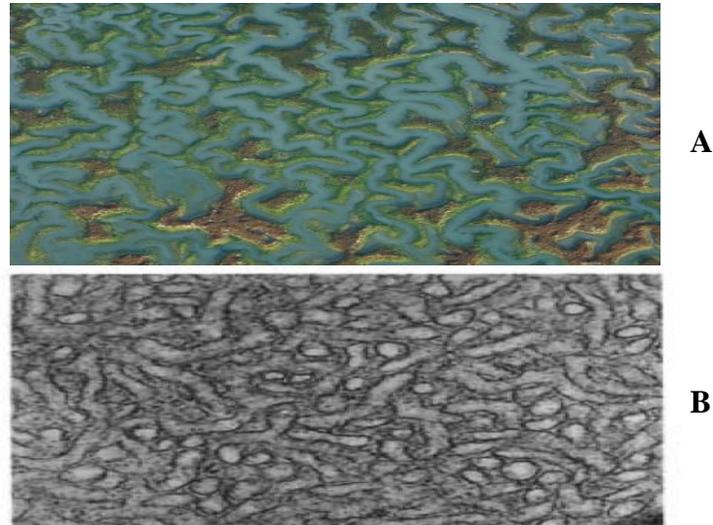


Ilustración II (A y B).- A: Armonía Fractal en Doñana¹. B: Retículo endoplásmico liso de la célula viva mostrando la estructura de una “esponja”, “*desordenada*”, lo común en las membranas naturales. (Don Fawcett. Chapter 5, Endoplasmic reticulum. In *The Cell*, W.B. Saunders Company. 1981. p. 349).

A pesar de que los derivados hormonales del colesterol no son estructuras sencillas, o bien son hidrófobas o son anfipáticas, necesitadas de transportadores para viajar por la sangre y que el propio colesterol utiliza un complicado sistema de transporte para entrar en las células, se acepta desde hace tiempo que los esteroides atraviesan la membrana plasmática por difusión simple, pasiva (14).

Sin embargo ciertos experimentos muestran que las características de su transporte se ajustan a otros procederes en el tráfico trans-membranario, como es el facilitado (entre otros, los aportados por el GIM). Por ejemplo, el cortisol, como hormona

¹ Isla del Trocadero. Último acceso, 14 de Junio 2014. Disponible en: <http://www.idi.mineco.gob.es/portal/site/MICINN/menuitem.c9edfa7c749973a95cb7dd10a14041a0/?vgnnextoid=415c9f434f07e210VgnVCM1000001d04140aRCRD&f1=1104534000000&f2=1735686#4>

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

esteroide, mostró en los estudios de captación un proceso saturable en determinadas condiciones, sugiriendo que es un proceso de transporte mediado (15).

En su camino hacia los receptores nucleares, las hormonas esteroideas deben atravesar un fluido en movimiento. Los diversos componentes de las membranas están sujetos a movimientos rápidos. Así, la difusión de los lípidos es del rango de 10^{-8} cm^2 / s , según qué tipo de movimiento [-véase Ilustración III y Figura 2 (Tiempos de Relación Molecular)-]. Las proteínas entre 10^{-10} y 10^{-12} cm^2 / s . Por otra parte, los movimientos del flip-flop través de la membrana son lentos, del orden de 10^{-5} cm^2 / s (14).

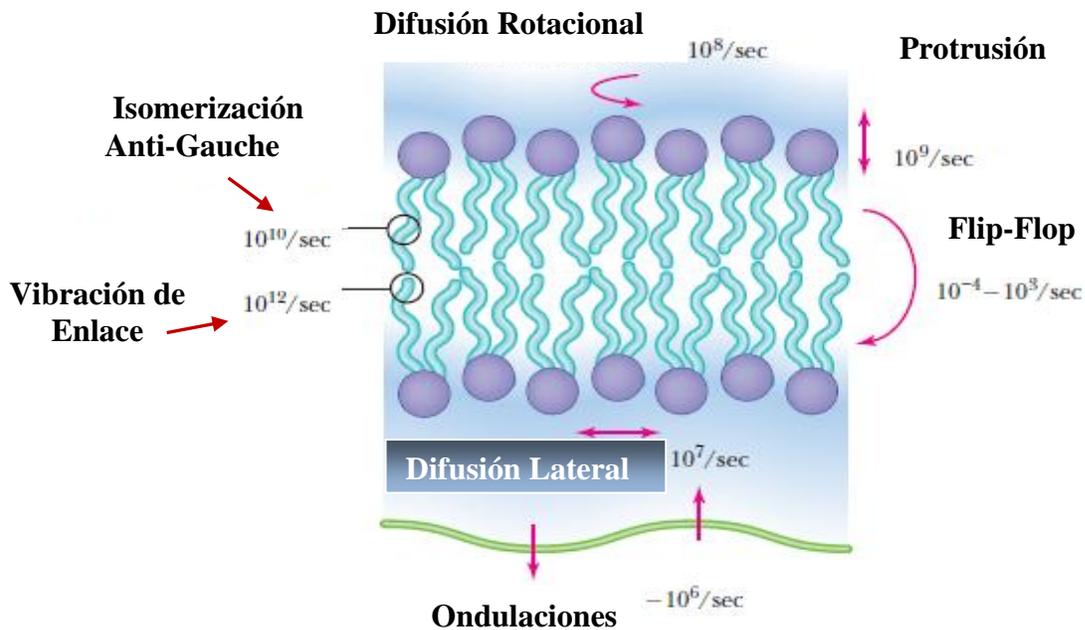


Ilustración III.- Lípidos en Movimiento con sus velocidades.

Esta membrana posee una densidad parecida a la del aceite de oliva, en la que no deben diluirse los lípidos que la atraviesan, sino que necesitan seguir una línea directa hacia el interior de acuerdo a un comportamiento cinético que se postula específico y saturable y por tanto con una intervención directa de

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

la membrana. Es muy probable que esta característica se asocie con la actividad de las proteínas y, en el modelo que se propone, a la configuración morfológica de lechos, atajos, conductos, canales, para el transporte de lípidos. Cuando se aportaron pruebas de la asimetría de los lípidos transmembrana en eritrocitos y poco después en las membranas plasmáticas de todos los animales, se asumió que esta característica es una propiedad general de los organismos vivos.

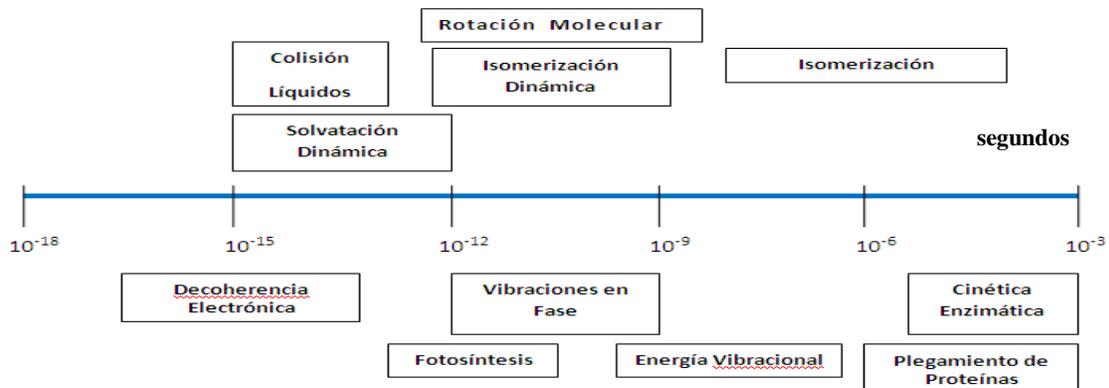


Figura 2.-Escalas temporales de diferentes procesos de relajación molecular en sistemas biológicos y químicos. En nuestro modelo interesan los Tiempos de Relación Molecular (τ) del orden de 10^{-15} s hasta los 10^{-3} s.

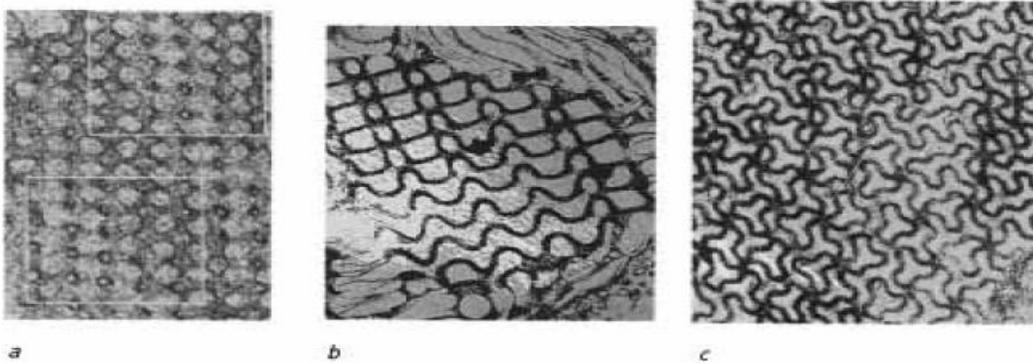
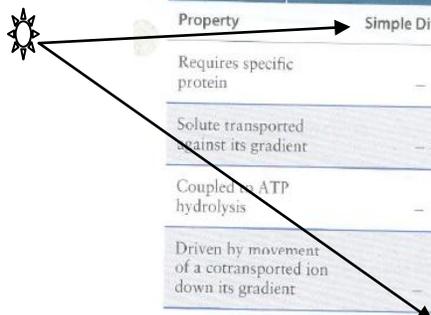


Ilustración IV.- Las estructuras periódicas en las membranas biológicas son comunes en las células vivas. Se relacionan con superficies mínimas periódicas: (a) Superficie de membrana de una hoja, (b) Superficie de membrana en algas y (c) Superficie de membrana en células epiteliales de lamprea. (Fotos: Tomas Landh, Lund University²).

² Ball P, Nature's Patterns. Oxford University Press, 2009.

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

En la última edición (7ª), año 2013, del monumental libro de texto Molecular Cell Biology, editado por Harvey Lodish (Ilustración V), se insiste en que las hormonas esteroideas son transportadas a través de la membrana celular por difusión simple (Ilustración V) (14). En otro artículo se representa didácticamente su paso a través de la membrana plasmática de las células diana con una flecha, de lo que parece deducirse que no entraña dificultad alguna (Figura 14)³.



Property	Simple Diffusion	Facilitated Transport	Active Transport	Cotransport*
Requires specific protein	-	+	+	+
Solute transported against its gradient	-	-	+	+
Coupled to ATP hydrolysis	-	-	+	-
Driven by movement of a cotransported ion down its gradient	-	-	-	+
Examples of molecules transported	O ₂ , CO ₂ , steroid hormones, many drugs	Glucose and amino acids (uniporters); ions and water (channels)	Ions, small hydrophilic molecules, lipids (ATP-powered pumps)	Glucose and amino acids (symporters); various ions and sucrose (antiporters)

*Also called secondary active transport.

Ilustración V.- En la comunidad científica es común aceptar que las hormonas esteroideas como mecanismo de transporte a través de las membranas biológicas se debe a la Difusión Simple.

No sólo las membranas eucariotas disponen de una variedad de lípidos químicamente diferentes si se considera la longitud de cadena, el grado de insaturación y el grupo funcional de la cabeza polar, sino que también los lípidos se distribuyen heterogéneamente dentro de las diversas organelas e incluso entre las dos caras de la membrana.

La segregación de los aminofosfolípidos parece ser debida a la topología de enzimas responsables de la síntesis de lípidos o de las interacciones del citoesqueleto de lípidos (11).

³ Matsumoto T et al. The Androgen receptor in health and disease. Annu Rev Physiology. 2013; 75: 201-224 (14).

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

Esta heterogeneidad lipídica es una "complicación de la Naturaleza". Se transmitió tras un millón de años a las células eucariotas y ha sobrevivido al filtro de la evolución, todo ello sugiere que la composición de los lípidos y la distribución dentro de una célula no es accidental, tampoco intrascendente, para la actividad de las células.

En experimentos con bicapas lipídicas puras, es decir, en membranas *sintéticas* sin proteínas, se observa que pequeñas moléculas se difunden pasivamente a través de la membrana, tal como se expresa en la ecuación (16). Extrapolar estos resultados a las estructuras complejas de la membrana puede resultar una simplificación arriesgada, o, al menos, sin fundamento.

La biofísica del transporte celular y a través de membrana, así como su compartimentación, se matematiza en tres ecuaciones.

Para los procesos de Difusión Pasiva:

$$\frac{\delta n}{\delta t} = PA \frac{\delta C}{\delta x}$$

A → es la superficie del área de membrana considerada,

$\frac{\delta n}{\delta t}$ → la tasa de difusión en moles/s,

P → coeficiente de permeabilidad soluto-dependiente,

$\frac{\delta C}{\delta x}$ → el gradiente de concentración

ORGANIZACIÓN ESPONTÁNEA DE LÍPIDOS

Los experimentos de Heinen y Lauwers (17) y Loison et al. (18) sugieren la posibilidad de un proceso reiterativo que podría generar compuestos de alquilo de cadena larga tales como ácidos grasos y tioles de alquilo graso por la adición progresiva de enlaces C-C⁴.

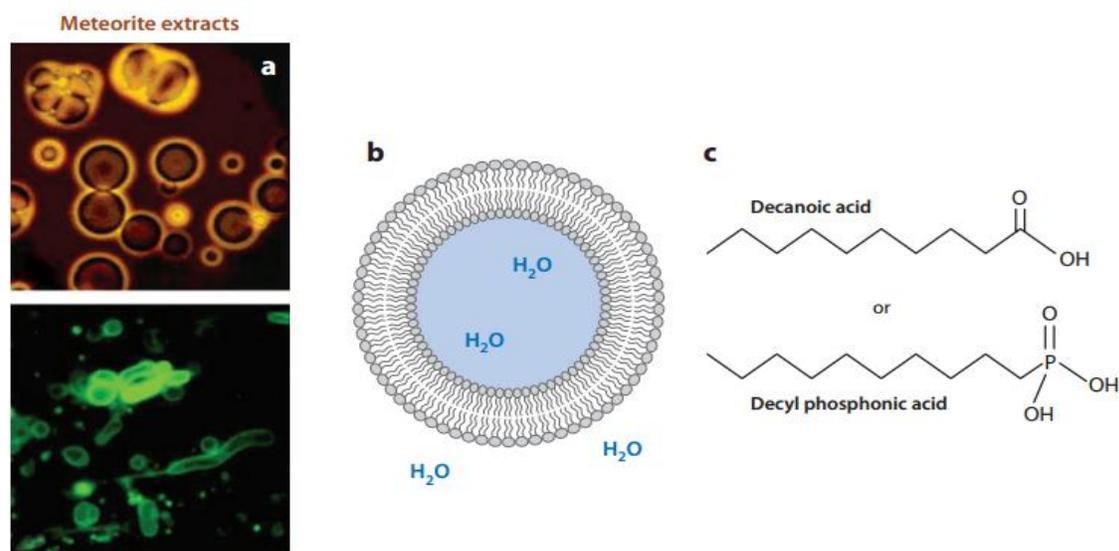


Ilustración VI.- Vesículas Lipídicas como posibles estructuras prebióticas de membrana. En a) Vesículas formadas de suspensiones acuosas de extractos de meteoritos y ácido decanoico (Dreamaer et al, 2002, Ed. Mary Ann Liebert), b) Esquema de la vesícula, en c) otra molécula candidata potencial en los albores de la vida: el ácido decil fosfónico. (McCollom TM. Miller-Urey and Beyond: What Have We Learned About Prebiotic Organic Synthesis Reactions in the Past 60 Years?. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* 2013; 41: 207–29).

Aunque solamente los compuestos cuya cadena es de 5 carbonos han sido identificados en los experimentos hasta

⁴ El ácido heptanoico es un prometedor tratamiento en la G1D (Glucose Transporter I-deficient).[Marin-Valencia I, Good LB, Ma Q, Mallow CR, Pascual JM. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2013, Feb;33(2): 175-82]

ahora, una reacción puede permitir el desarrollo de cadenas de carbono más largas.

Que las primeras vesículas, proto-membranas, aparecieran abióticamente, hallan un soporte en los experimentos llevados a cabo con extractos de meteoritos (Ilustración VI).

El mecanismo de reacción es claramente diferente del proceso de Fischer-Tropsch y se produciría bajo condiciones ricas en azufre (17), destructivas para los catalizadores de Fischer-Tropsch. Por lo tanto, esta vía podría haber proporcionado una ruta alternativa a la formación de compuestos formadores de membrana, en un ambiente que también podría haber sido propicio para el desarrollo de redes de reacciones proto-metabólicas (18).

Es decir, la primitiva membrana, podría originarse sin la ayuda de un genoma, ni siquiera basado en el ARN^{5,6}.

Los procesos de difusión pasiva, espontáneos, y debido a una concentración (gradiente) en el equilibrio termodinámico son, sobre todo, dependientes del tamaño de la molécula y del grado de polarización. Así, se admite que los iones son prácticamente incapaces de ajustarse a esta difusión pasiva a través de las membranas biológicas.

El proceso de transporte de lípidos esteroides a través de la membrana plasmática podría concebirse como autocatalítico. Nos brinda la posibilidad, avalada por los experimentos, de un “*extra*” en la disipación de energía (Figura 3).

⁵Del Bianco C, Mansy SS. Heterotrophic model protocells. In *Genesis, The Beginning: Precursors of Life, Chemical Models and Early Biological Evolution*. Springer, 2012. pp. 709-722.

⁶Segré D, Ben-Eli D, Deamer DW, Lancet D. The lipid world. *Origin Life Evolution Biosphere*. 2001; 31(1-2): 119-45.

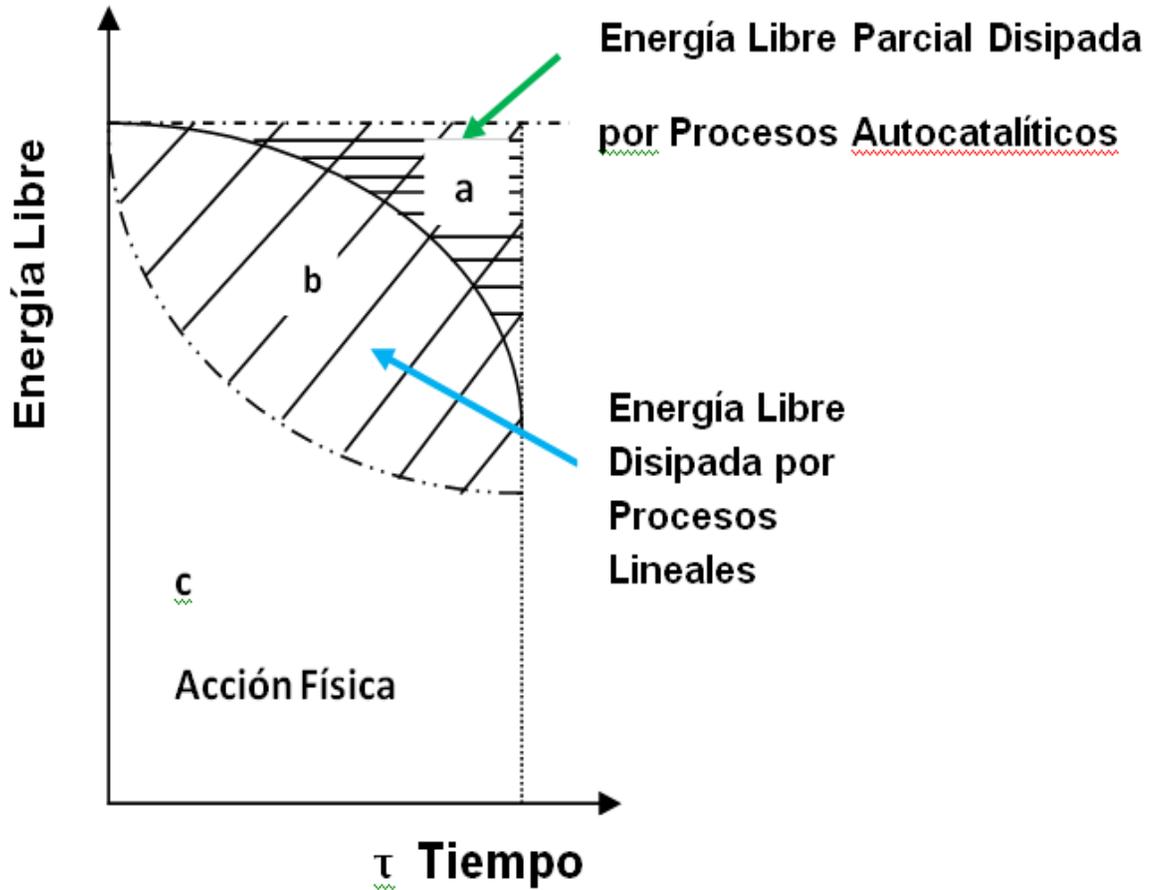


Figura 3.- Los procesos autocatalíticos, de naturaleza no lineal, cursan la acción física (movimiento) con una porción “extra” parcial de la Disipación de Energía Libre. Esta contribución para la verificación del fenómeno, sin fuentes ajenas de energía, asegura el proceso (19A).

La velocidad de difusión pasiva es proporcional al gradiente entre ambos lados de la membrana, por lo tanto, la difusión puede ser descrita por un coeficiente de permeabilidad soluto-dependiente, P [cm / s].

La existencia de Estados Estacionarios habla de una tasa, cambio, incremento de la función de Gibbs que *no* sea cero (Esquema I de esta memoria, página 64, sobre los Estados

Estacionarios). La Difusión Pasiva en la representación de Hanes-Woolf es rotunda, en tanto que el cambio de un incremento del Cociente $[S]/v$ respecto a la $[S]$ es cero, en la gráfica es una recta paralela al eje de las X (Figura 4).

Cuando la tasa de transporte no aumenta linealmente con el aumento de gradiente de concentración, pero alcanza una saturación (*estado estacionario*) a un nivel determinado por V_{max} con las dimensiones de $[\text{moles}] / [\text{cm}^3 \cdot \text{s}]$, sigue una ecuación hiperbólica, siendo la exhibida por los canales y la difusión facilitada (16):

$$\delta n / \delta t = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K}{\delta C / \delta x}}$$

En donde K, con dimensiones de $[\text{mol}] \times [\text{cm}^{-4}]$, está determinando la velocidad de saturación, y ocurre tras un tiempo hasta alcanzar, numéricamente, $\frac{1}{2} V_{max}$.

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

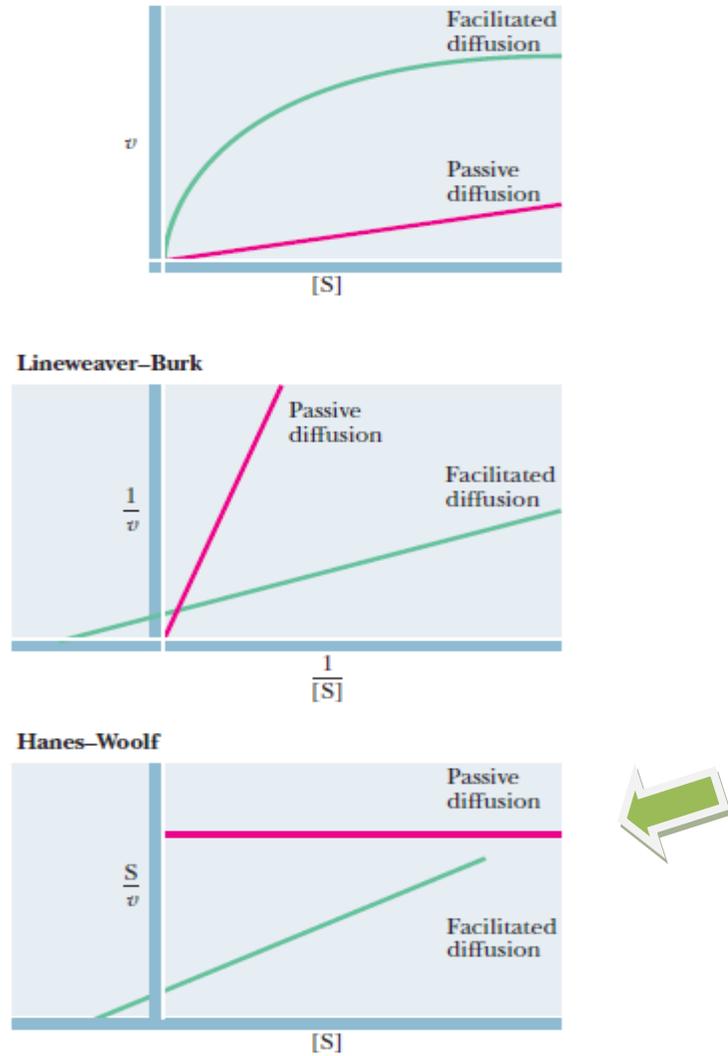


Figura 4.- Tres representaciones de los procesos de Permeación. La de Hanes-Woolf (\Rightarrow) es muy elocuente: la $\delta(S/v) / S$, es cero. En Biotermodinámica se interpreta como una tasa de incremento o de disipación de entropía igual a cero. (S : *Sustrato*; v : *velocidad de la reacción*). (Garrett & Grisham, 2013. Biochemistry, Fifth Edition) (9).

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

Las características esenciales de los canales y compuertas se asientan en la selectividad sobre los sustratos y sus propiedades de regulación, es decir, cómo se mantiene o se interrumpe el flujo dependiendo de las señales externas. Estas señales pueden ser mediadas por moléculas que tienen la categoría de bioseñales, tales como iones, la fosforilación/desfosforilación, las variaciones de tensión, etc.

Considerar a los lípidos moléculas pasivas formando sólo un cemento viscoso que contiene proteínas de membrana, filtrando las moléculas hidrófilas, supone alejarse de lo que es la bicapa lipídica. Hace tiempo que ha dejado de considerarse, aunque se sigue arrastrando algo de aquella concepción al mantener que atraviesan la membrana por difusión simple debido a la homogeneidad o a la solubilidad.

Los lípidos de la membrana plasmática conforman una estructura sofisticada capaz de un notable polimorfismo con el agua. De tal manera que el atajo morfológico, el lecho, incluso un Canal, como un agregado cooperativo, con dominios catalíticos, enzimáticos y de polímeros podrán intervenir de manera determinante en la capacidad irritativa, excitable, transmisora de la información biológica.

La expulsión de algunas moléculas de agua de estos agregados se ha podido comprobar. Corroborando la importancia de la transición Gel-Sol-Gel... como mecanismo princeps en la morfogénesis biológica. La característica física de una bicapa lipídica permite no sólo el movimiento de proteínas, también las deformaciones en su estructura que, junto con las del

citoesqueleto, proporcionan a la membrana de la célula sus propiedades mecánicas, elásticas.

REACCIÓN E INFORMACIÓN SON INSEPARABLES EN EL METABOLISMO, (¿EXISTE ALGÚN GESTO QUE CAREZCA DE INFORMACIÓN?)

La comunicación biológica se establece entre un efector o emisor y su correspondiente receptor encargado de interpretar el mensaje que se le transmite. Está claro que el principal responsable de la transmisión es el aparato receptor. En la transmisión biológica más compleja, como es el sistema visual, es la retina quien descifra la secuencia de fotones que recibe, lo mismo que es el oído interno quien traduce las ondas sonoras a potenciales de acción que interpreta el SNC.

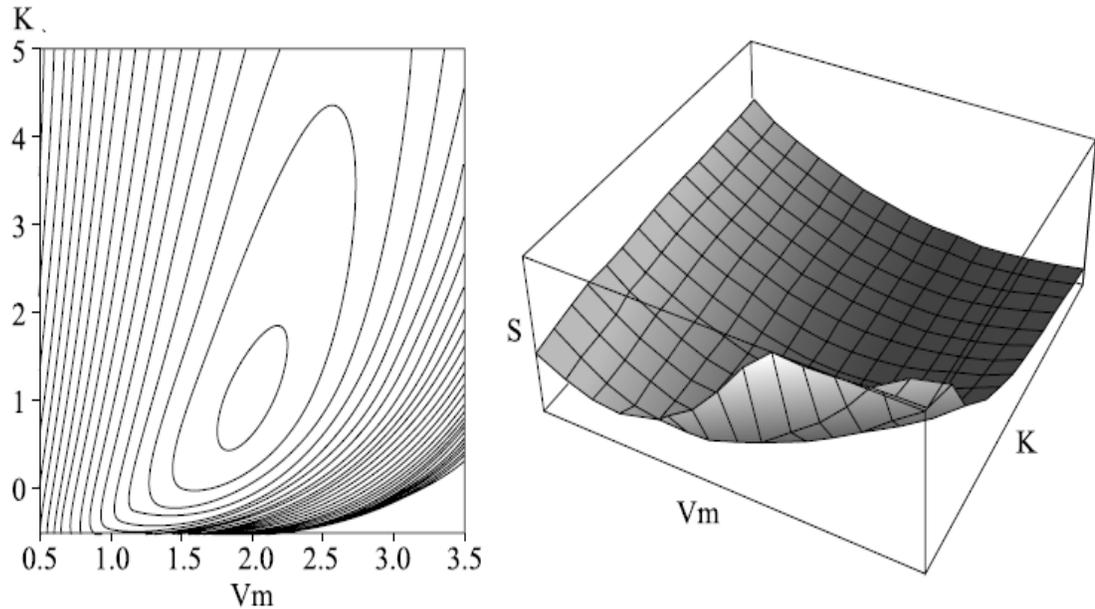
Además de la transmisión específica de mensajes que realizan los sistemas especializados como el nervioso o el endocrino, todas las moléculas orgánicas son portadoras de información, que interesa a todo aquello con lo que se relaciona para mantener una corriente de entendimiento (20).

Cualquier ruta metabólica conlleva un procesamiento de información que puede descomponerse siempre en dos partes: el efector y el receptor. Por ejemplo, la primera reacción de la glucólisis, en la que la glucosa se convierte en glucosa 6-Fosfato, puede ser interpretada como una secuencia informática (Tabla 1).

La hexoquinasa informa a la glucosa que hay fosfato disponible dispuesto a unirse a ella y que el flujo energético es favorable por lo que la reacción se puede realizar. En este caso la enzima se encarga de ejecutar la orden de la que saldrá un nuevo mensaje en forma de glucosa seis fosfato (Glucosa 6-P). Esta

fosforilación cambia radicalmente el contenido, la biosemiótica (21), significa otra cosa de lo que quería decir la glucosa sin fosforilar.

La cinética michaeliana con un tratamiento de regresión muestra más que una curva hiperbólica (Figura 5). En algunos tratamientos de modelos michaelianos, las soluciones numéricas muestran un sistema con la existencia de un torus-like estacionario conformando ciclos límite bidimensionales (19B) y (Anexo III).



S : [Sustrato]; V_m : Velocidad Máxima; K: Constante de Michaelis

Figura 5.- Izquierda: Líneas de nivel para la ecuación del modelo de Michaelis-Menten. Se puede apreciar la forma elipsoidal que se encuentra cerca del mínimo, además se acompaña de una fuerte asimetría. Derecha: Una visión en perspectiva de S en función de V_m , y de K. [Moroz A. Chapter 3, Variational and the Optimal Control Models in Biokinetics. p. 158. En The Common Extremalities in Biology and Physics. 2012].

El control llevado a cabo en este primer paso se ajusta a una tasa de entropía compatible con el principio de producción de mínima entropía de Prigogine o el de máxima disipación de Ziegler.

SISTEMAS DE INFORMACIÓN Y TERMODINÁMICOS

Fuentes de los Sistemas de Información	Potenciales Termodinámicos
Información	Energía Libre, Exergía
Flujo de Información al Interior (Replicación)	Flujo de Exergía al Interior
Flujo de Información al Exterior (Muerte)	Derroche de Energía
Intercambio de Información (Creación de Orden)	$d_e S$
Procesado Interno de la Información (Crecimiento)	$d_i S$



Tabla 1.- Los procesos donde está involucrado el Flujo de Información son equiparables con los Parámetros Termodinámicos y viceversa: Energía Libre, Entropía, Exergía (Obtención de un trabajo máximo con un consumo mínimo de energía). [$d_e S$: variación de la Entropía externa, $d_i S$: variación de la Entropía Interna]. (Sekulic DP. Chapter 2, Energy and exergy: does one need both concepts for a study of resources. In Thermodynamics and the destruction of resources. Cambridge University Press, 2011).

Cuando la información fluye entre dos compartimientos con relativa individualidad, como pueden ser el espacio extracelular y la membrana plasmática, la secuencia se parece

más a la trasmisión sináptica o a la información visual o acústica: un mensajero específico, un sistema de recepción y un tránsito de información vehiculada o no por la molécula efectora.

En el nudo gordiano de la cuestión se dirime el problema o, más bien, la solución: la multiplicidad de los lípidos de membrana es necesaria para el correcto funcionamiento de las enzimas unidas a la membrana, o, alzando las miras fisiológicas: es por esta variedad de lípidos de membrana que son utilizados para transmitir, portar, mensajes a las proteínas con mutua especificidad.

Los esteroides, como hormonas, con información tan sensible como es la que permite el mantenimiento de la especie, cuando atraviesan la membrana plasmática para llegar a sus receptores nucleares específicos, no pueden pasar desapercibidos y hacerlo en virtud de características físicas inexpresivas. Serán reconocidas, valoradas y acomodadas para su tránsito a través de la membrana.

Como siempre, quien debe modificar su estructura e interpretar el mensaje es el receptor, en este caso la membrana plasmática. Quesada MP mostró que es el receptor de GABA quien va al encuentro del efector y se organiza para interpretar el mensaje que es su responsabilidad, en relación al modelo conceptual propuesto (22).

Varios experimentos han mostrado que los esteroides interaccionan con el receptor del GABA: algunos esteroides, a bajas concentraciones (de 30 a 300 nM), mejoran la conductancia del cloruro por GABA-estimulado y en concentraciones más altas (1µM) producen una apertura directa del Canal del Cl^- que es inhibido por el antagonista de GABA_AR , la bicuculina (22).

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

Está ganando fuerza en la comunidad científica la propuesta de considerar a los Lípidos como organizadores de las membranas celulares (23), influyendo la bicapa lipídica sobre la Señalización Celular y la Difusión de proteínas y lípidos. Las diferencias locales en la composición de lípidos de la bicapa, que forman microdominios altamente viscosos, pueden también influir en el confinamiento de las proteínas (24). E incluso se pueden observar fenómenos de naturaleza cooperativa, de alosterismo. En alguna parte de la curva cinética (al establecerse el flujo inicial unidireccional, o con los experimentos de carga⁷, en el modelo postulado). Más patente cuando se demuestra que es un transporte activo y la curva cinética que describe altera su gráfica hiperbólica, denotando un grado positivo de cooperatividad. Entonces los flujos podrán estar acoplados y ofrecer también, aunque no es condición *sine qua non*, control a la célula y exhibirse como una estructura disipativa, en su máxima representación como una función sigmoideal, $h > 1$ (16).

$$\delta n/\delta t = \frac{V_{max}}{\left(1 + \frac{K}{\delta C/\delta x}\right)^h}$$

h ,
Coeficiente
de Hill

Todo proceso espontáneo tiende hacia un estado de equilibrio o lo que es lo mismo, hacia un estado de máxima entropía (absoluta). No sólo el Principio de Mínima Producción de Entropía de Prigogine (como una hipótesis de Equilibrio Local) rinde cuentas de la Estabilidad Estructural y Funcional, sino también el Principio de Ziegler de Máxima Disipación de la Energía como criterio más general (19C).

⁷ La cooperatividad, en parte, se debe a los lípidos de membrana al efectuar una transición de fase. (Qiang H. Cooperativity in cellular biochemical processes: noise-enhanced sensitivity, fluctuating enzyme, bistability with nonlinear feedback, and other mechanisms for sigmoidal responses. Annual Review Biophysics. 2012; 41: 179-204).

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

Durante un proceso de este tipo (espontáneo) se puede producir trabajo. El transporte de membrana puede ser o difusivo (pasivo) o mediado (facilitado), cuando no existe un aporte *ad hoc* evidente de energía (activo).

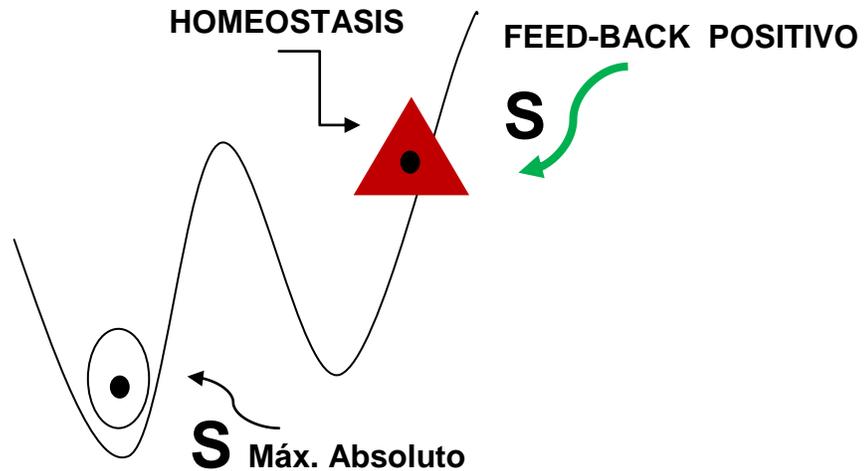


Figura 6.- Los procesos de regulación y adaptación, considerados en conjunto como “Homeostasis” manipulan la Entropía (S) de tal modo que evitan sistemáticamente que esta Función de Estado, también aceptada ahora como Potencial Armónico, alcance un máximo absoluto. El control homeostático cuenta, para su aseguramiento, con medidas de retroalimentación positivas (Feed-back positivo), es conocido como Alostasis, Heterostasis u Homeorresis.

La difusión simple, pasiva, sigue el sentido del aumento de la entropía, por lo que puede rendir energía. En contraposición, el transporte activo ordena, desequilibra, consume energía. Son los dos extremos fenomenológicos. Cuando se afirma que los esteroides atraviesan la membrana por difusión simple se está expresando que aumentan la entropía (hasta un máximo absoluto), por lo que este proceso podría utilizarse para realizar trabajo y, en

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

la lógica temporal, espontáneo. Pero las hormonas esteroides llevan en sí un mensaje de orden, favorecen el gasto de energía al incitar la actividad celular y actúan muy concertadamente.

Este transporte exige direccionalidad (uni-): rapidez y una ruta, algo así como un atajo que no distorsione la organización de la membrana. Para evitar que el lípido en su paso por la membrana se someta a las leyes de Fick y difunda libremente, necesita un conductor lipídico aunque sin excluir la participación de las proteínas. De lo contrario, el lípido (esteroide) en su travesía, cumpliría fielmente las leyes de Fick (*lineales*) para la Difusión, pero, eso sí, movilizándose en todas las direcciones posibles.

Para Gánti (2011) la mínima unidad de Vida (*chemoton*) está configurada por tres subsistemas autocatalíticos (25):

1. Membrana,
2. Metabolismo,
3. Redes de Información.

Los lípidos (esteroides, la testosterona) cumplen en demasía con todos los puntos del 1 al 3. E incluso con otras teorías sobre la Vida donde la autopoyesis es condición *sine qua non* para definir el hecho de la vida misma. Este carácter autocatalítico de la membrana como fundamento de la Vida implica estar alejado del equilibrio.

**INTEGRACIÓN FUNCIONAL DE LOS LÍPIDOS DE MEMBRANA:
ESTRUCTURA E INFORMACIÓN
(EL COLESTEROL Y LOS ESTEROIDES NO SON SUSTRATOS
ENERGÉTICOS)**

Con el postulado clásico (espontaneidad, equilibrio) se está aceptando que no hay otro mecanismo de control para su entrada en la célula más que la concentración extracelular. No obstante, hay datos que muestran la dependencia del consumo de oxígeno (26) y la existencia de factores de control en la propia membrana (27).

Los biofísicos han logrado la fabricación de membranas estables (liposomas) con solo un tipo de lípidos, en suspensión acuosa, por ejemplo, con fosfatidilcolina de huevo (PC). La realidad biológica es otra: las membranas vivas albergan varios cientos de diferentes lípidos.

¿Cuál es la razón de que haya tantos lípidos químicamente diferentes coexistiendo en la naturaleza ?. ¿Por qué la composición de los lípidos de varias membranas de eucariotas son diferentes y, a veces, incluso, los dos lados de las membranas biológicas son diferentes (asimétricos)?. Esto requiere numerosas enzimas específicas para la síntesis y, en última instancia, para el traslado al destino correcto de los lípidos recién formados.

Podría considerarse que la estructura asimétrica de la membrana plasmática se ha construido gracias a un aporte energético: a) en la biosíntesis de la propia membrana, b) en la síntesis de las moléculas de agua, de manera similar los glúcidos (funcionalmente activos en la dinámica de la membrana) y, c) en la construcción de las proteínas de membrana. Esta manera tan peculiar de transformar la energía en las membranas biológicas

lleva implícito que son **máquinas moleculares entálpicas**⁸. Gracias a los dispositivos de acoplamiento entre fenómenos (sus flujos y sus fuerzas, de forma recíproca, los potenciales termodinámicos traducen la energía (28).

Los lípidos desarrollan funciones diferentes según su localización. Su máxima actividad o rentabilidad biológica se alcanzaría cuando se encuentren en un medio hidrófobo, pero resulta que se asocian a otros lípidos formando el tejido lipídico para permanecer, en cierto modo, “inertes”.

Es, cuando al enfrentarse a moléculas polares, como las proteínas, destapan su dialéctica funcional como transportadoras de información. En ese contexto establecen asociaciones moleculares, se mueven con rapidez para defender su singularidad, como es palpable en la estructura fluida de la membrana, cuya asimetría responde a diferentes actividades locales.

Todavía es aceptado por algunos fisiólogos que los lípidos forman esa *tercera clase* de moléculas del organismo vivo, después de las proteínas y los ácidos nucleicos. Sin embargo, los lípidos no son probablemente “*tercerías*” en la estrategia evolutiva. El hecho es que los lípidos componen el armazón de las membranas biológicas, determinan el límite de todos los organismos vivos y la compartimentación de los orgánulos en los eucariotas.

Los lípidos soportan acciones hormonales y todas las actividades de los otros principios inmediatos que se les supone superiores en la jerarquía celular. De ahí que nunca se hayan considerado candidatas a contar con vehículo propio para atravesar las membranas, sobre todo si su peso molecular es bajo.

⁸ La Entalpía es el empuje natural en todo proceso. Su potencial complementario es la Entropía que la reconduce como una flecha direccional le confiere el sentido del tiempo.

SUBCOMPARTIMENTOS Y ENERGÍA SILENCIOSA (INFORMACIÓN)

El paso evolutivo de bicapa lipídica, homogénea, simétrica, hasta la membrana asimétrica, introdujo la condición de compartimentación dentro de la propia membrana, le hizo perder la unidad homogénea estructural y funcional. Obligó a mantener diferentes actividades locales en cada uno de los sistemas en los que se puede subdividir la membrana plasmática.

La compartimentación molecular en los sistemas de interfase agua-lípido acarrea siempre gasto de energía como sucede cuando actúan ATPasas o proteínas de compuerta. Los lípidos, como es bien sabido y se va a repetir a lo largo de esta Memoria, pueden organizarse y *organizar* sin gasto aparente de energía. Tales mecanismos son difíciles de imitar todavía en un modelo experimental.

El trasvase de esteroides desde las proteínas plasmáticas a la matriz lipídica de la membrana es un proceso favorable, pero no así su incorporación al medio intracelular donde deben asociarse de nuevo a las proteínas del citosol.

Termodinámicamente no es posible la secuencia orden-desorden-orden sin un aporte de energía (aunque aparentemente no pueda ser contabilizada).

Los sistemas dinámicos en el proceso de recepción y expresión de la información alcanzan la máxima capacidad de

información (I_{\max}) en función directa logarítmica de los posibles estados estacionarios (Ω_{estac}), según la ecuación:

$$I_{\max} = \log_2 \Omega_{\text{estac}}$$

La transmisión de información en el transporte a través de la membrana adquirirá su máximo a medida que el lípido esteroide (testosterona) vaya induciendo su propio canal⁹. Estos fenómenos se acompañan de una energía mecánica y una transferencia de calor (oscilaciones térmicas). A modo de ejemplo, si un proceso transcurre con una temperatura $T = 300 \text{ K}$, se calcula una Energía asociada de 89 kJ/mol para una hora.

El propio Van der Waals (1911) propuso la relación entre el cambio de entropía y la direccionalidad de los procesos físico-químicos. Un bit (mínima cantidad de información) se asocia al menor cambio posible de entropía ($k \cdot \ln 2$, k es la constante de Boltzmann con un valor de $1,38 \cdot 10^{-23} \text{ julios/K}$).

Robert T. Evans (1965) propone una nueva magnitud termodinámica, la Esergía. La Esergía está construida con los requisitos de Aditividad, Congruencia y Aumento Monótono con el tamaño del Sistema. Formalmente la Esergía de Evans es $T_0 \cdot I$.

Otra propuesta análoga es la Exergía, una función de disponibilidad de Keenan, es una razón entre una señal y el ruido asociado en un entorno con una temperatura T_0 . Esta Exergía se reconoce en la expresión $k \cdot T_0$, una energía determinada por el ruido térmico y los grados de libertad (29).

⁹ Los Estados Estacionarios no son un punto final en un proceso. La Cinética Michaeliana es el ejemplo.

ESTRUCTURAS DISIPATIVAS

Las relaciones recíprocas de Onsager¹⁰ (entre los Flujos, Fuerzas y sus Coeficientes Fenomenológicos) están aseguradas cuando la magnitud es pequeña (por ejemplo, 2.5 kJ/mol, resultado de $R \cdot T$, a una temperatura ambiente en condiciones normales).

Las afinidades de las transformaciones bioquímicas se sitúan en el rango numérico de 4-8 kJ/mol, que exceden a los 2,5 kJ/mol de la fenomenología termodinámica para el transporte y sujeto a las relaciones de Onsager, como el acoplamiento electro-cinético (mecano-sensitividad, efecto piezoeléctrico) (28,30).

Las relaciones recíprocas de Onsager no tienen que cumplirse si el sistema está muy alejado del equilibrio pues ya no está asegurado el Principio de Mínima Producción de Entropía como exclusivo criterio de evolución del sistema.

La búsqueda de un criterio general de evolución con validez en los estados alejados de equilibrio se torna en una tarea urgente. Así surgió el criterio de Glansdorf-Prigogine y el concepto de “estructura disipativa”.

Las estructuras disipativas son la expresión manifiesta de la capacidad de auto-organización tanto en sistemas abiogénicos como biogénicos. Este nuevo constructo biofísico dota de sentido la formación de estructuras espacio-temporales relativamente estables.

¹⁰ Esto se aplica a la Región Lineal, cerca del Equilibrio. En la Región Alejada del Equilibrio, No Lineal, se precisa una Extensión de las relaciones entre Fuerzas y Flujos.

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

Si los esteroides tuvieran las mismas características de polaridad que todos los componentes lipídicos de una membrana homogénea en movimiento, al incorporarse a la membrana por la parte externa no hay causa aparente para pensar que puedan atravesar linealmente el espacio interior de la membrana hacia la otra cara, como sugieren los esquemas que representan la difusión pasiva de los lípidos esteroides. De la misma forma que si se echa agua de un jarro en la corriente de un río, el agua vertida no lo atraviesa directamente hacia la otra orilla, sino que se diluye en el fluido con propiedades análogas (Ilustración VII).



Ilustración VII.- “Observad el movimiento de la superficie del agua, que se asemeja al del cabello, que tiene dos movimientos, de los cuales uno es causado por su propio peso y el otro por la dirección de los remolinos; por tanto el agua tiene movimientos rotatorios, una parte de los cuales se debe a la corriente principal, y la otra a un movimiento inverso y aleatorio”. Leonardo da Vinci, 1510.

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

Pero si los esteroides son añadidos a una corriente heterogénea de lípidos, deberán buscar una zona en la que acomodarse de acuerdo con sus propiedades de solubilidad, entre otros parámetros.

Los lípidos de membrana han sido considerados hasta ahora como simples aislantes eléctricos inertes, en consonancia con su funcionalidad en la membrana (nula, según esta visión), o ya sea como solutos al intentar atravesar la membrana.

Pero nada más lejos de la realidad. Los Lípidos son agentes determinantes de la topología de las membranas. Un ejemplo de génesis estereoespecífica puede ser la fosfatidiletanolamina, cardiolipina y el monoglucosilacilglicerol, los cuales, no forman bicapa, y, por el contrario, sí son generadoras de bicapa el fosfatidilglicerol, la fosfatidilcolina y el diglucosilglicerol (31).

Se van aportando pruebas experimentales de la existencia de canales lipídicos, como los de naturaleza iónica y soportados estructuralmente por moléculas lipídicas (32,33), equiparándolos a las proteínas.

Es importante mencionar que existen otras funciones en el transporte de los lípidos además de generar/preservar la asimetría fundamental lipídica transmembrana. Los lípidos pueden ser secretados al espacio extracelular transportados a través de la propia membrana.

Otra cualidad de la membrana y de los lípidos intramembranarios es la generación de *Flexiones* en la membrana

mediante la creación de una diferencia del área de superficie entre las dos monocapas de la membrana, este fenómeno reviste carácter cooperativo (Figura 7) (34).



Figura 7.- Las posibles curvaturas (alteraciones geométricas) en la membrana biológica están sometidas a un incremento de la función de Gibbs. Que sea nulo, o casi nulo, el incremento de G , (G es la función de Gibbs), se verificará por reacomodo a su estado inicial, por un balance de compensación entálpico-entrópico. El proceso, como fenómeno, *no* es típico del Equilibrio Absoluto Termodinámico.

Para no modificar el valor de la energía, para atravesarla al menor coste posible, sin alterar sustancialmente la estructura de la membrana, precisan asociarse a los componentes afines. Los contornos polares son compatibles y favorecen balances energéticos mínimos en cuanto a la producción de entropía o máximos en cuanto a la disipación de la Energía/Entropía.

Un modelo genuino de transporte facilitado, en el sentido clásico, debe cumplir con el balance entálpico-entrópico (Figura 8). Éste arroja un resultado global casi nulo, prácticamente, en el incremento de la función de Gibbs (denominada homeostasis termodinámica [$\Delta\Delta G \approx 0$]) (35).

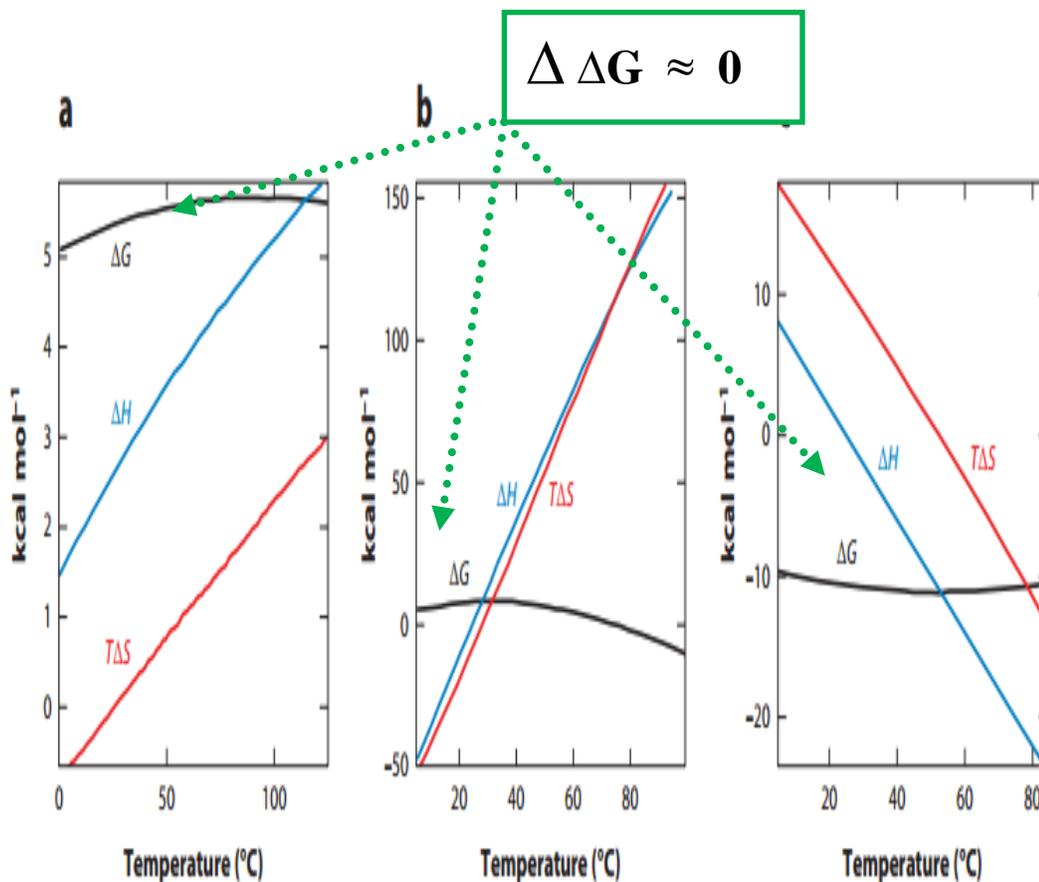


Figura 8.- Tres ejemplos de compensación Entrópico-Entálpica. En a) neopentano en agua, b) mioglobina desplegándose, c) asociación proteína-proteína (35). [Para $\Delta \Delta G \approx 0$, $\Delta \Delta H \approx T \cdot \Delta \Delta S$].

Cuadro I.- POSIBLES ORÍGENES DE LA COMPENSACIÓN ENTRÓPICO-ENTÁLPICA (35):

A. Reorganización del disolvente (en nuestro modelo, el Agua [Incluido en nuestro Diagrama del Modelo Conceptual, -Estrés Osmótico (EOS)-], es candidata y los propios lípidos transmembrana).

→[Soporte experimental en el trabajo de McGee MP]

EOS: CUANTIFICACIÓN TRANSFERENCIA AGUA
T, P, pH Y FUERZA IÓNICA BQ y R.COOP INDUCIDO

R. MACROMOLECULAR
TRANS. FASE

CON SOLUTOS LENTOS
EXCLUYEN AGUA
ESPACIOS PERMEABLES (60)

MECANISMOS DE MEMBRANA = T⇒T

B. Flexibilidad del receptor (la membrana, sus componentes actuando sinérgicamente).

→[Soporte experimental en el trabajo sobre el receptor del GABA, Perán M. → Pro-Inducción del Canal de Isopolaridad debido a la interacción de la Testosterona con la Membrana Plasmática y su Microentorno]

C. Restricciones conformacionales

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

Un mecanismo explicativo plausible para el transporte sin gasto de energía en el transporte de los lípidos esteroides, hormonas, la testosterona por ejemplo, es el motor Browniano (Figura 9).

La probabilidad de avanzar aumenta, y revestirá, bajo ciertos requisitos, un carácter unidireccional. La asimetría natural de la membrana determina la dirección del movimiento a través de la membrana. Este Movimiento Browniano reviste un carácter Gaussiano y Markoviano (Figuras 9 y 10).

Es el modelo general (Figura 9) propuesto por Astumian (36,37), y que no precisa un aporte de Energía (aparente). El mecanismo del Motor Browniano es imaginable conduciendo la partícula en una dirección definida, aunque pudiera darse en todas las direcciones, sobre todo si no es demasiado rápido.

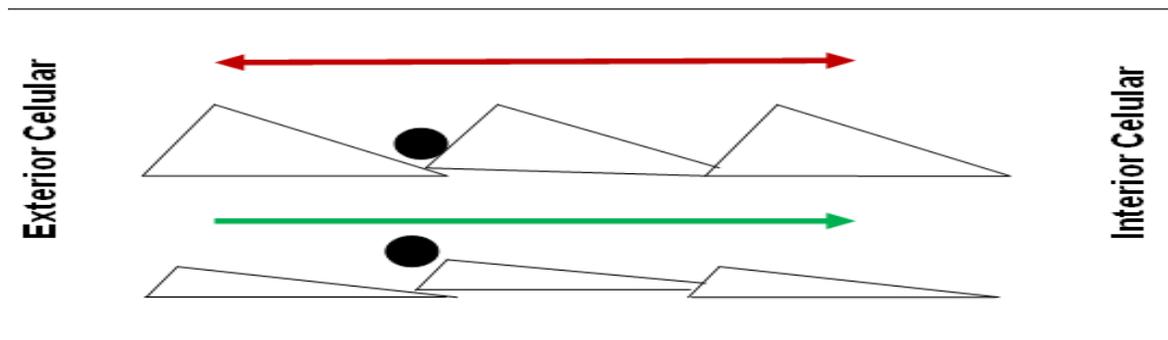


Figura 9.- El mecanismo del motor Browniano. Una partícula se mueve en un espacio asimétrico. Si los contornos son suficientemente grandes, la partícula permanecerá estacionada en un mínimo topológico. Si los contornos se reducen, la partícula podrá moverse (→).

En esta dinámica se podrán conformar poros, nanotubos¹¹, canales, gracias a la entropía que es un auténtico potencial armónico (Figura 11).¹²

¹¹ Kim Y, Li W, Shin S, Lee M. Development of Toroidal Nanostructures by Self-Assembly: Rational Designs and Applications. Accounts of Chemical Research, 2013; 46(12): 2888–2897.

¹² El Teorema de Fluctuación-Disipación de Einstein es el soporte teórico.

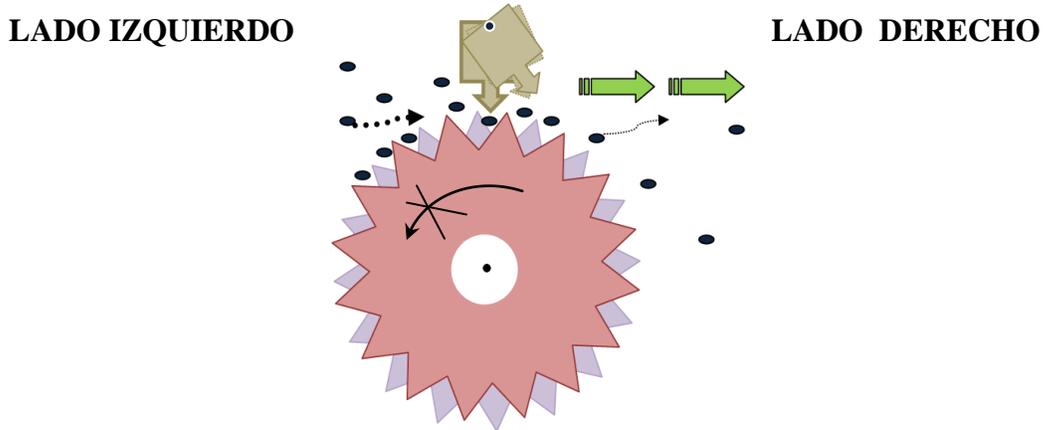


Figura 10.- El trinquete ideado por Feynman a partir de la lectura de los trabajos de Maria Smoluchowski.

De tamaño molecular, este trinquete tendría que tener un resorte lo suficientemente lábil para permitir la colisión con las moléculas. Sin embargo el dispositivo de enganche es a su vez tan débil que también permitiría el paso de las moléculas al azar a través de los mismos enganches del trinquete, al deslizarse suficientemente, como para que se produzca un reflujó, y el efecto neto de las moléculas entre el lado derecho e izquierdo se saldaría con un balance próximo a cero.¹³

El número de decisiones para separar las moléculas, de una en una de una mezcla, supone intervenir con una cantidad de información de 6×10^{23} bits (29). Como ejemplo de lo que representa, mecanografiar una página supone un contenido informativo en bits de 21.000. Como idea especulativa han sido invocados los Solitones. Matemáticamente resultan soluciones a

¹³ Peter M. Hoffmann. Chapter 5, Maxwell's Demon and Feynman's Ratchet . In Life's Ratchet, How Molecular machines extract order from the chaos. Basic Books. 2012.

determinadas ecuaciones diferenciales, y, en el nivel empírico, parecen cumplir los criterios de una partícula-onda. Los Solitones también han sido propuestos para explicar cómo se transmiten las señales en las moléculas biológicas. En las que, por ejemplo, existiría un acoplamiento entre las vibraciones de los átomos constituyentes de la molécula bioseñal y los grupos polares, de tal manera que se originarían ondas no lineales por las Fluctuaciones de la Entropía/Entalpía, las frecuencias son creadoras de forma (32,34,38).

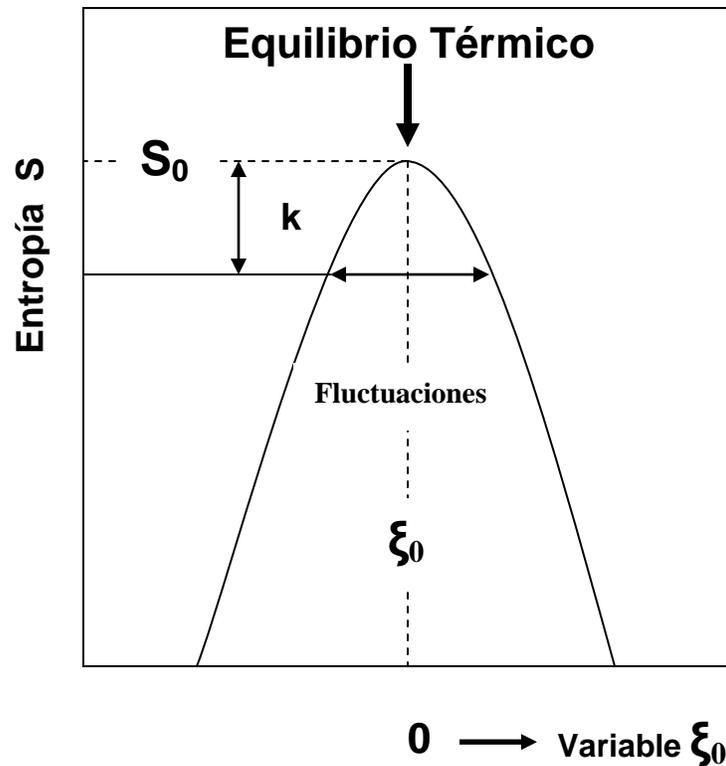


Figura 11.- En el Estado o Región, de NO Equilibrio la condición de estabilidad viene dada por

$$\delta(\delta^2 S) \frac{\delta(\delta^2 S)}{dt} = \delta^2 \left[\frac{dS}{dt} \right] = \delta^2 \Phi > 0$$

$\delta^2 S$, es la condición de estabilidad que opera como una función de Lyapunov y asegura la Estabilidad del Estado Estacionario. (ξ representa una variable como la energía interna, volumen, área, etc.) (30).

PASO DE LA TESTOSTERONA A TRAVÉS DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

El modelo conceptual propuesto en esta memoria, se apoya en datos experimentales del GIM (Grupo de Transporte de Membranas) obtenidos con una técnica original aplicada al transporte de testosterona en fibroblastos.

Se utilizó este tipo de células porque contienen 5 α -reductasa unida a la membrana. El enzima 5 α -reductasa convierte a la testosterona en 5-dihidrotestosterona nada más llegar al citosol (39). Así, el transporte puede considerarse no concentrativo, al menos en los primeros momentos (Figura 12).

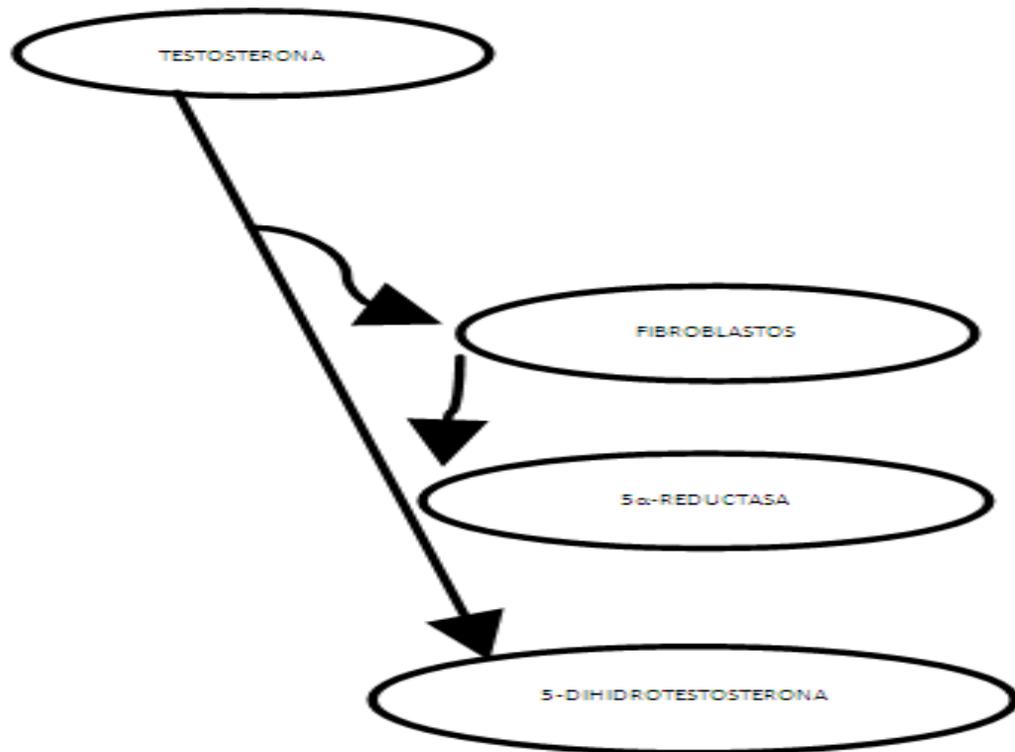


Figura 12.- Testosterona sometida en la membrana a la acción de la reductasa.

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

Los cálculos en los estudios experimentales (apartado *Apoyo Experimental*) han tenido en cuenta la hipótesis de la hormona libre, que defiende que es la fracción no ligada a las proteínas transportadoras la que atraviesa la membrana.

El transporte se ha medido utilizando la técnica de Perán y McGee (40) y una modificación de la misma, introducida a finales de la década de los noventa, para hacerla extensiva a células que no forman tejidos, es decir células sanguíneas o células de lento crecimiento como las neuronas.

En la siguiente figura (Figura 13) se muestran los posibles mecanismos, con los que se especula en la comunidad científica, gracias a los cuales las hormonas esteroides (la testosterona, estrógenos, progesterona) penetran al interior de las células a través de la membrana plasmática.

Así para los Andrógenos (Testosterona) (41):

- En **(A)**:

El esteroide difunde libremente a través de la membrana plasmática celular, para unirse posteriormente a un receptor intracelular y así atravesar la membrana nuclear, adentrándose en el núcleo para regular la expresión génica.

- En **(B)**:

Por medio de una endocitosis mediada por receptor conteniendo moléculas lipofílicas, podrían participar las LDL uniéndose a este receptor, a continuación se produciría una degradación a cargo de los lisosomas, de

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

tal manera que los esteroides y el colesterol se incorporarían a diferentes rutas metabólicas.

- La opción **(C)**:

Precisaría de una endocitosis mediada por receptor, pero la internalización se haría con el transportador extracelular de la hormona esteroide conjuntamente con el propio receptor, y en un momento posterior se liberaría la molécula de esteroide.

- La **(D)**: - ***(La que postula este Modelo Conceptual, implementado con el carácter Isopolar, Pro-Inductivo, Isoentrópico, con las características de un receptor) –***

Se propone la existencia de Transporte Mediado para los esteroides a través de la membrana plasmática. En la superficie externa, la membrana acepta al esteroide en una zona de similar afinidad en un proceso parecido al reconocimiento por parte de un receptor de membrana del complejo transportador-esteroide.

La penetración del esteroide en el lecho de isopolaridad-Isoentrópico generaría un Canal por el que avanza hacia el citosol con una cinética hiperbólica. En definitiva, este tipo de transporte resulta ser mediado, con necesidad de reconocimiento a nivel de membrana, impulsado por gradiente a través del canal específico de isopolaridad-isoentrópico, saturable e inhibible (características del transporte mediado).

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

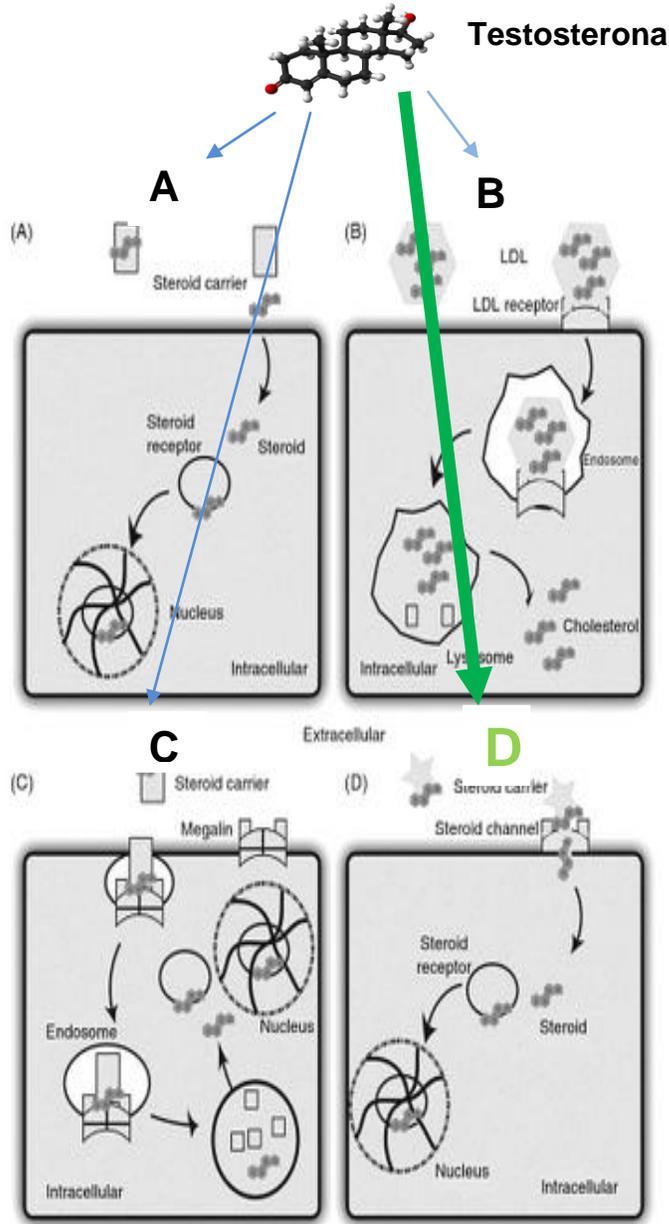


Figura 13.- Las cuatro hipótesis de transporte a través de la membrana plasmática de la hormona esteroide testosterona. La D (flecha más gruesa) es la que defiende esta memoria (41).

OBJETIVOS.-

OBJETIVOS.-

El objetivo principal de esta memoria es postular un *Modelo Conceptual* para el transporte de los lípidos esteroides, (ejemplificado particularmente en la testosterona). Proponer un modelo de transporte facilitado, mediado, sin aparente gasto de energía, integrando los principios termodinámicos y cinéticos con datos experimentales a favor de la hipótesis del transporte mediado de los esteroides (testosterona) a través de la membrana plasmática mediante Canales de Isopolaridad e Isoentrópicos.

El objetivo secundario es indagar en la relación de las hormonas esteroides, sexuales, con nutrientes como los aminoácidos en la promoción de tumores, para implementar, con técnicas de alta resolución, como la Doble Dilución Isotópica, el control de estos procesos y la interpretación dinámica del transporte de fármacos.

APOYO EXPERIMENTAL DEL MODELO CONCEPTUAL

MATERIAL Y METODOLOGÍAS

APOYO EXPERIMENTAL DEL MODELO CONCEPTUAL

MATERIAL Y METODOLOGÍAS

MATERIAL

La [1,26,7-³H]Testosterona (80-105 Ci/mmol) (³H]T) y el D-[1-¹⁴C]Manitol (50-60 mCi/mmol) fueron servidos por Amersham Internacional plc (UK). El MEM-Glasgow y el suero fetal de ternera por Gibco Lab (USA). La triptosa fosfato de Merck (Germany), la penicilina y la estreptomina de Antibióticos (España), la seroalbúmina bovina, Cohn fracción V y la testosterona de Sigma (USA).

Todas la manipulaciones celulares fueron llevadas a cabo en una cabina de flujo laminar (Gelair Twin 30, Flor Lab), siendo cultivadas las células a 37 °C en un atmósfera de aire humidificado conteniendo un 5% de CO₂ (Flor Lab, CO₂ 1500) en frascos de cultivo de 25 ml (Corning). Las microesferas (Biosilon microcarrier beds) se obtuvieron de Nunc, la bomba de perfusión y la columna termostatada de Pharmacia (Sweden). La concentración de 5-dihidrotestosterona en el perfumado y en el efluente de la columna fue medida por RIA utilizando reactivos de Diagnostics Biochem Canada Inc.

METODOLOGÍAS

A) Aislamiento y cultivo de fibroblastos

El aislamiento de los fibroblastos para cultivo primario se hizo en la campana de flujo laminar de acuerdo con el método descrito por Sly y Grubb¹⁴. Un biopsia de piel procedente de un donante se lava dos veces con una solución salina balanceada DB(+) suplementada con glucosa, albúmina y antibióticos y se divide en 4-5 trozos. Cada trozo se transfiere a la superficie de un frasco de cultivo de 25 ml, se cubre con suero fetal de ternera y se coloca en el incubador de CO² a 37°C durante 24 horas. Tras este tiempo el suero fetal de ternera se sustituye por 10 ml de MEM-Glasgow suplementado y el frasco se coloca en el incubador por otros 10 días. Cuando se observa crecimiento en las células periféricas, los trozos de tejido se sacan y se le cambia el medio dos veces por semana hasta que el crecimiento celular alcance la confluencia. Los cultivos en confluencia son divididos en varios frascos (2 ml de solución de células más 8 ml. de medio de cultivo).

B) Perfusión de fibroblastos cultivados en microesferas

Para la perfusión de fibroblastos cultivados sobre microesferas se utilizó la técnica de Perán y McGee. Se cultivan alrededor de $8-10 \times 10^6$ células en 2 ml de una suspensión de microesferas (25000 esferas/ml) en el medio descrito antes durante 24–48 horas en incubador de CO² al 5% y 37°C.

Una vez que las células alcanzan la confluencia sobre las microesferas (unas 30 células por esfera), se empaquetan dentro de una columna termostatada y se perfunden con MEM-Glasgow suplementado con 0.41 % de seroalbúmina bovina a un flujo de 10 $\mu\text{l}/\text{seg}$ producido por una bomba peristáltica. La integridad celular y su viabilidad se mantienen al menos durante cuatro horas, según se demostró en el primitivo trabajo de Perán y McGee. Tras cada experimento se sometió a las células a la prueba del azul Trypan, mostrando una viabilidad superior al 90%.

C) Captación de testosterona tritiada por fibroblastos en experimentos de pulso

1. Captación inicial de testosterona.

La captación secuencial de [^3H]T se midió utilizando una técnica de alta resolución de flujo continuo y doble dilución de parejas de trazadores, durante una sola pasada de las moléculas a través del entramado celular, previamente usada para medir la captación de aminoácidos por células perfundidas en columna. Tras equilibrar la columna durante 30 minutos con una solución de perfusión que contenía 10^{-7} M de T, se inyecta un bolo (300 μl en 30 seg.) de una mezcla de [^3H]T y manitol ^{14}C , en el afluente de la columna y se recogen 20 muestras de 60 μl del efluente de la columna durante un periodo de 120 segundos. A partir de entonces y durante un periodo de 5 segundos se recoge el efluente de la columna para calcular la recuperación de trazadores. La captación de [^3H]T en cada muestra recogida sucesivamente (%U) se calculó comparando su perfil de dilución con el de un trazador de

¹⁴ Sly WS, Grubb J. Isolation of fibroblasts from patients. *Method Enzymol.* 1979; 58: 439-443.

referencia extracelular, manitol ^{14}C , de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\%U = 1 - ([^3\text{H}] \text{T} / \text{Manitol } ^{14}\text{C}) \times 100, \quad (\text{Ec.1})$$

Donde la actividad de los trazadores recuperados se expresa en porcentaje de la dosis inyectada.

2. Autoinhibición de testosterona en experimentos de pulso

Se midió la captación de $[^3\text{H}]\text{T}$ por fibroblastos perfundidos en columna con MEM-Glasgow, puestos previamente en contacto, durante cinco minutos, es decir el flujo unidireccional, con concentraciones crecientes (10^{-10} a 10^{-5} M) de testosterona no tritiada. La captación inicial de $[^3\text{H}]\text{T}$ en relación al manitol ^{14}C , se calculó de acuerdo a la ec. 1 en cada una de las muestras recogidas secuencialmente del efluente de la columna. El flujo unidireccional (J , $\text{fmol}/\text{min} \cdot 10^6$ células) se calculó a partir de la captación fraccional máxima (U_{t0}) utilizando la expresión siguiente:

$$J = - F \times C_a \times (1-U_{t0}), \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde, F es el flujo de perfusión ($\text{ml}/\text{min} \cdot 10^6$ células), C_a la concentración (M) de testosterona no tritiada añadida al perfumado y U_{t0} la media de los valores máximos de U .

D) Captación de [³H]T en fibroblastos perfundidos en experimentos de carga

1. Producción de dihidrotestosterona (DHT) por fibroblastos humanos perfundidos con T (Testosterona)

Para valorar la conversión de T a DHT durante una sola pasada del sustrato a través de la columna y su posible interferencia con el reflujo de tritio procedente de la de [³H]T en forma de de [³H]DHT, se perfundieron los fibroblastos con una solución de T y se midió la concentración de DHT por RIA en el efluente de la columna.

Se perfundieron fibroblastos en confluencia sobre microesferas con MEM-Glasgow que contenía T a una concentración 10^{-9} M. Se midió la concentración de DHT en 60 muestras recogidas secuencialmente, a intervalos de 1 minuto, del efluente de la columna. La extracción de la DHT se realizó a partir de 0,5 ml del total del volumen recogido en cada muestra, con 0,5 ml de metanol.

Tras agitar vigorosamente la mezcla y centrifugar durante 5 minutos a 3000 rpm, se recoge cuidadosamente el sobrenadante en tubos de 16x150 mm. Se añaden 0,1 ml de reactivo oxidante y se extrae una vez con 10 ml de éter de petróleo: etil-éter (50:50) agitando vigorosamente durante 40 segundos y centrifugando durante 5 minutos. Se recoge cuidadosamente la capa orgánica y se seca bajo corriente de nitrógeno. El residuo se redisuelve en 0,5 ml de búfer fosfato de donde se cogen 100 μ l, por duplicado, para medir la DHT por RIA.

2. Dependencia de la temperatura

El método experimental utilizado para obtener las curvas de carga se basa en el modelo que Boyd y Parson¹⁵ aplican a los estudios del transporte intestinal de azúcares, modificado y adaptado para usar en preparaciones de cultivos en microesferas.

Los cultivos confluyente de fibroblastos en microesferas se empaquetaron en una columna termostatada y se perfundieron con MEM-Glasgow que contenía una solución de [³H]T y manitol ¹⁴C a una concentración de 5×10^{-9} M. Las células se saturaron con esta solución durante 20-25 minutos.

Durante los 3 primeros minutos de este periodo se recogieron 30 muestras secuenciales de 60 µl del efluente de la columna. A partir de entonces y durante los siguientes 20 minutos se recogió una muestra de 60 µl por minuto.

Las curvas de dilución se construyeron sobre la base del porcentaje de las actividades de ambos trazadores recogidos en cada muestra y comparados con sus respectivas actividades en una muestra de igual volumen extraída del frasco que contenía el líquido de perfusión.

La captación se calculó aplicando la **Ec.1** a cada una de las muestras sucesivas. “**Ut**” representa la captación neta obtenida de integrar la recuperación de trazador durante dos periodos de recogida de efluente, a los 3 (Ut3) y a los 23 min (Ut23). Ut0, que

¹⁵ Boyd CAR, Parsons DS. Movements of monosacharides between blood and tissue of vascularly perfused small intestine. J Physiol (London). 1979; 287: 371-391.

refleja la captación máxima, es la media aritmética de las cuatro o cinco captaciones máximas. El protocolo se realizó a 37°C y a 4 °C.

3. Autoinhibición de la captación de testosterona dependiente del tiempo.

Si el transporte de esteroides por la membrana es mediado deberá ser saturable. Para investigar la posibilidad de que la captación de T por fibroblastos se sature en relación al tiempo, se midió el efecto de tiempos largos y cortos de exposición de T sobre la captación de [³H]T, utilizando dos protocolos experimentales:

- a) Se midió la captación de [³H]T siguiendo el protocolo de carga después de perfundir los fibroblastos con 10⁻⁶ M de T durante 30 min. El flujo unidireccional se calculó de acuerdo con la **Ec. 2**.

- b) Una preparación idéntica de fibroblastos humanos fue expuesta durante 24 horas a la misma concentración de T y a continuación se midió la captación de [³H]T siguiendo el protocolo de carga.

4. Autoinhibición de la captación de [³H]T durante el estado-estacionario en experimentos de carga.

Se perfundieron fibroblastos humanos en confluencia sobre microesferas con MEM-Glasgow suplementado con 0,41% de suero bovino. Después de 30 min de pre-equilibrio, las células se perfundieron con [³H]T y D-Manitol¹⁴C y de acuerdo con el protocolo de carga se recogieron secuencialmente muestras a la salida de la columna. La captación de [³H]T se calculó en cada una de las muestras de acuerdo con la **Ec. 1**.

Bajo estas condiciones, mientras que las variables experimentales permanecen constantes, no se aprecia ninguna variación en el índice de captación de [³H]T. Pero si se incrementa súbitamente la concentración extracelular de Testosterona mediante una inyección de Testosterona en el compartimento extracelular, los cambios que se produzcan en el patrón de captación de [³H]T, podrán aportar datos acerca del transporte:

- si es mediado se producirá una inhibición,
- si se trata de difusión aumentará.

Para comprobar esta hipótesis se midió la captación de [³H]T durante 10 min, tras inyectar de Testosterona 10⁻⁶ M en el espacio extracelular.

Los datos se analizan a partir de las medias y su error estándar. Para las comparaciones de las medias se ha utilizado la **t** de Student de doble cola para datos no apareados.

RESULTADOS

RESULTADOS

A) Captación de β [^3H]Testosterona por fibroblastos humanos en experimentos de pulso.

1. Captación inicial de testosterona por fibroblastos humanos

En una columna de perfusión cargada con fibroblastos humanos cultivados hasta confluencia en microesferas, se inyectó un pulso de [^3H]T y D-manitol ^{14}C . A partir de la recuperación de ambos trazadores a la salida de la columna se construyeron las curvas de dilución que se muestran en la Figura AE1A. Como puede apreciarse, la recuperación de [^3H]T representada por la curva de dilución, es significativamente menor que la del D-manitol ^{14}C , debido a que esta molécula no penetra en las células y al tratarse de un sistema de dos compartimentos, se diluye sólo en el volumen extracelular. Por el contrario la curva de dilución de la testosterona indica su dilución tanto en el compartimiento extracelular como en el intracelular, por lo que su recuperación a la salida de la columna es menor.

Aplicando la **Ec. 1** a cada una de las muestras recogidas secuencialmente a la salida de la columna se obtiene el perfil temporal de la captación de [^3H]T, Figura AE1A y AE1B, en el que pueden apreciarse dos fases: A) Una primera fase ascendente durante la cual la captación aumenta hasta alcanzar un máximo a los 15 segundos aproximadamente, que representa la entrada unidireccional de testosterona a la célula y en donde se mantiene durante otros 10 segundos y B) Una segunda fase en donde la captación de [^3H]T declina lentamente. Esto sugiere la salida de [^3H]T desde el interior celular a donde había previamente entrado.

Captación Unidireccional de Testosterona de ^3H -Testosterona en fibroblastos humanos unidos a microesferas de Biosilon y perfundidos en columna termostataada con MEM-G conteniendo BSA 0,41%. (Figuras AE1, A y B)

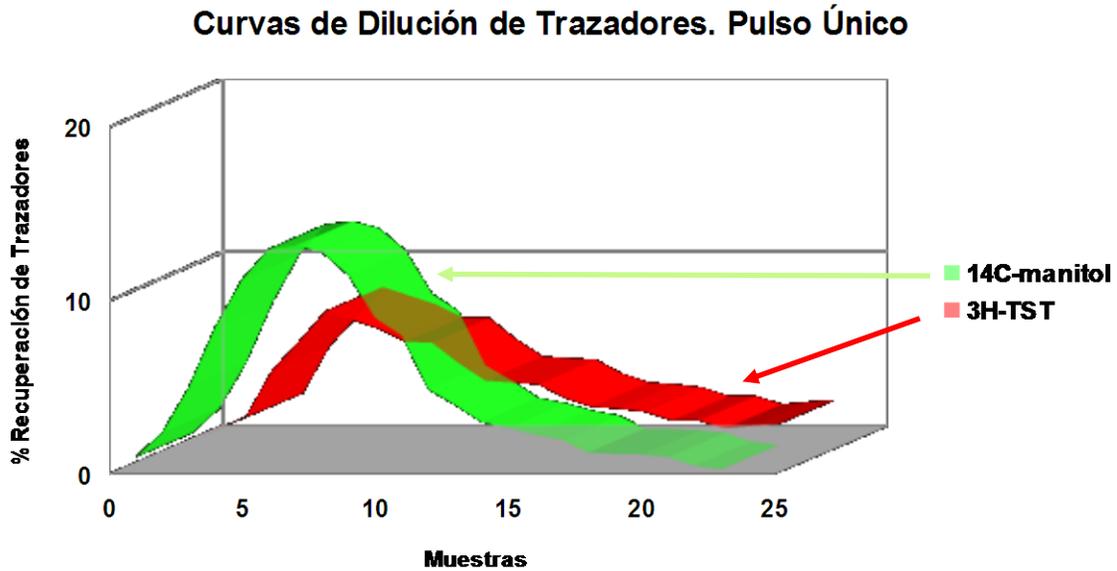


Figura AE1A.- Captación unidireccional de Testosterona de ^3H -Testosterona en fibroblastos humanos unidos a microesferas de Biosilon y perfundidos en columna termostataada con MEM-G conteniendo BSA 0,41%. Muestreo rápido del efluente (5 segundos/muestra).

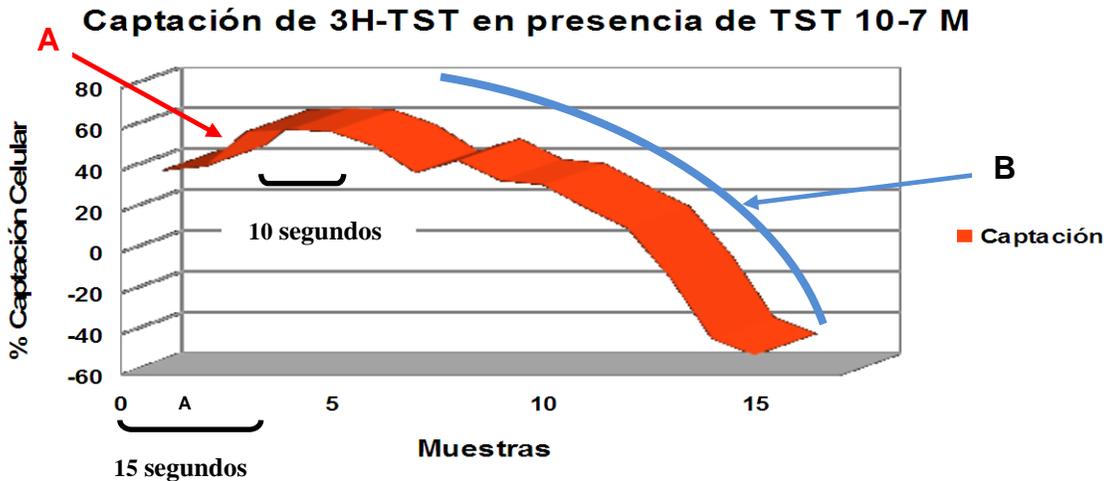


Figura AE1B.- Curso temporal de la captación temporal de la captación celular de ^3H -TST donde se aprecia cómo, tras alcanzar unos valores máximos (= 60%) [A], desciende rápidamente [B] debido a reflujos celulares.

2. Inhibición de la captación de [³H]T por concentraciones crecientes de testosterona no tritiada.

Si la captación de esteroides se realiza a través de un proceso mediado, concentraciones crecientes de sustrato añadidas al espacio extracelular saturarán el sistema de transporte, pero si se trata de una difusión, el aumento de la concentración extracelular no solo no inhibirá el transporte sino que, incluso, lo aumentará.

Para verificar si la captación de testosterona es un proceso saturable, se midió la captación de [³H]T en presencia de concentraciones crecientes de testosterona no tritiada añadida al compartimento extracelular 5 minutos antes de la medición de la captación.

Concentraciones extracelulares del orden de los valores de testosterona en plasma (10^{-10} a 10^{-8} M) no modifican significativamente la captación de [³H]T.

Pero al aumentar la concentración hasta 10^{-7} se produce una inhibición significativa de la captación de [³H]T que puede llegar a ser total con 10^{-5} M de testosterona (Figura AE2).

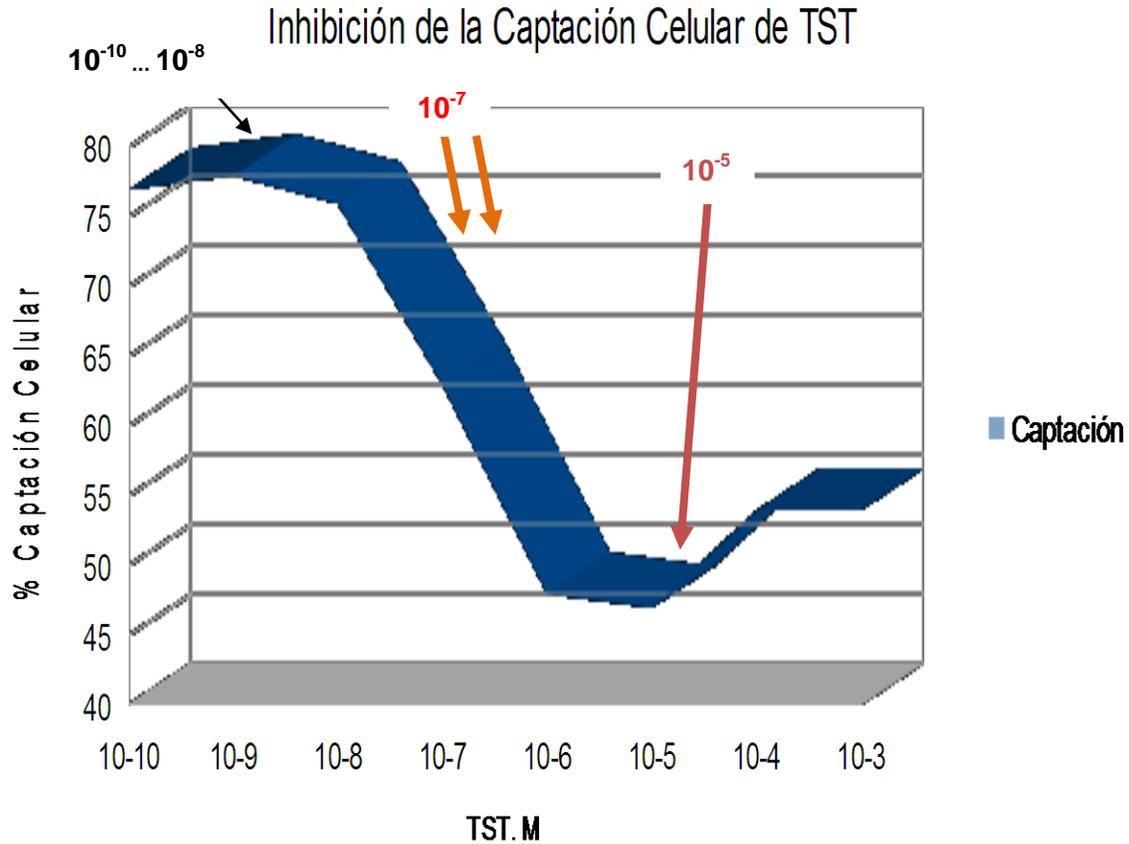


Figura AE2.- Inhibición de la captación unidireccional de ^3H -Testosterona. Se midió la captación unidireccional de ^3H -TST en fibroblastos humanos perfundidos con MEM-G conteniendo BSA al 0,41% y concentraciones crecientes de TST (desde 10^{-10} a 10^{-3} M). Las células fueron perfundidas durante 5 minutos con cada una de estas concentraciones antes de medir la captación de ^3H -TST mediante la aplicación de un protocolo de administración de isótopos en pulso único. (TST. M: Concentración de testosterona en moles).

B) Captación inicial y en el estado estacionario de [³H]T en experimentos de carga

1) Dependencia de la temperatura

La administración de un pulso de [³H]T a una población de fibroblastos retenidos en microesferas y perfundidos, remeda una subida súbita de testosterona y su posterior desaparición de la circulación, pero en condiciones fisiológicas los niveles circulantes de T se mantienen durante tiempo variable bañando continuamente a la células. Para acercarnos lo más posible a las condiciones fisiológicas utilizamos una modificación del protocolo desarrollado por Boyd y Parsons para estudiar al transporte de azúcares a través de la membrana basolateral del intestino, descrito en *Metodologías*. En estas condiciones experimentales las células son perfundidas con una solución de [³H]T y D-Manitol¹⁴C que se mantienen a una concentración de 5×10^{-9} M.

El índice de captación de [³H]T por fibroblastos humanos perfundidos a 37°C es muy alto desde el momento en que la hormona toma contacto con las células [326 fmol/min $\times 10^6$ cel. a los 5 seg y 629 fmol/min $\times 10^6$ cel a los 24 seg]. Durante esta fase los fibroblastos acumulan [163 fmol / 10^6 cel.] como resultado del flujo unidireccional. A partir de este momento el índice de captación disminuye progresivamente hasta alcanzar un valor estable de [70 fmol/min $\times 10^6$ cel.] que representa el estado estacionario. Estos perfiles reflejan el incremento del componente de reflujo celular el cual contrarresta el flujo de entrada y reduce progresivamente la captación neta de [³H]T (Figuras AE3A y AE3B).

Figuras AE3 (AE3A, AE3B).- Captación y recuperación de Testosterona a 4°C y 37°C, con un rango temporal desde el punto de partida, segundos iniciales, y cota final en el minuto treinta. En los primeros segundos se establece un Flujo Unidireccional de la Captación.

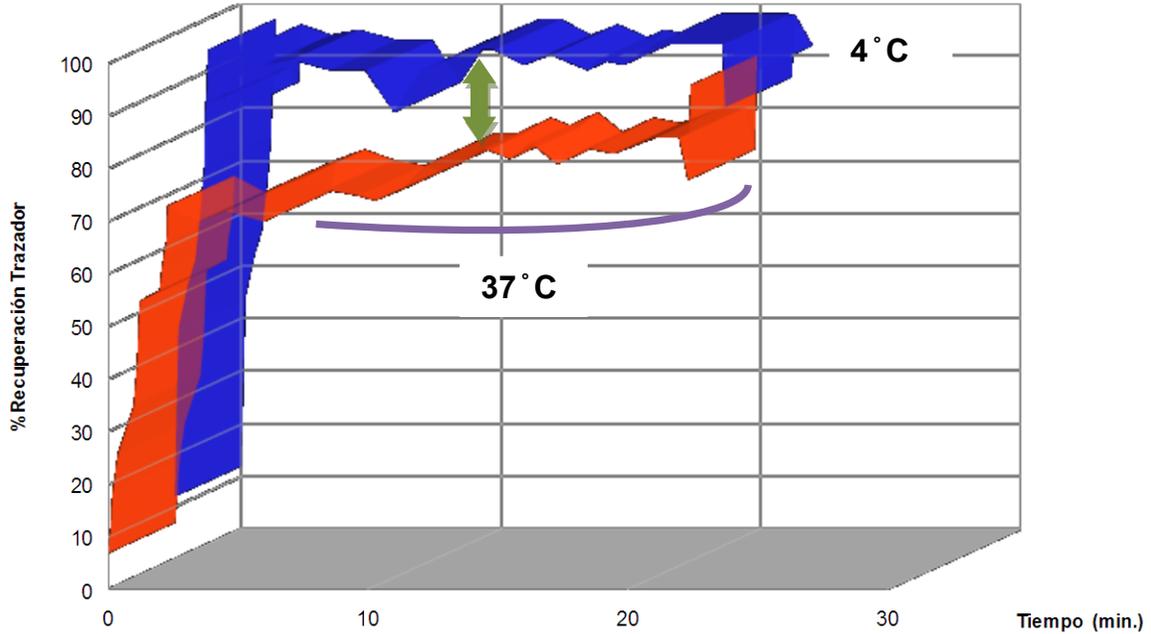


Figura AE3A.-

**FLUJO UNIDIRECCIONAL
(CAPTACIÓN CELULAR)**

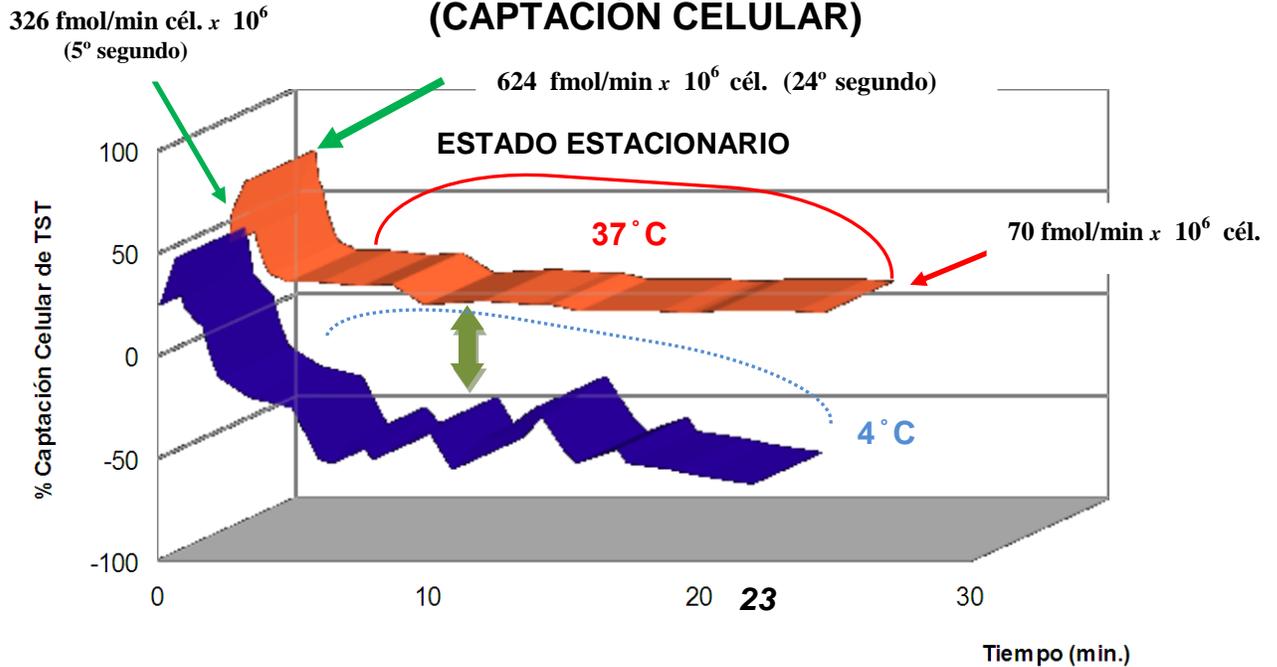


Figura AE3B.- El índice de captación celular de [³H]T a 37° C es muy alto, del orden de segundos. Después se torna estable.

BIOTERMODINÁMICA, CIENCIA Y METACIENCIA EN BIOLOGÍA

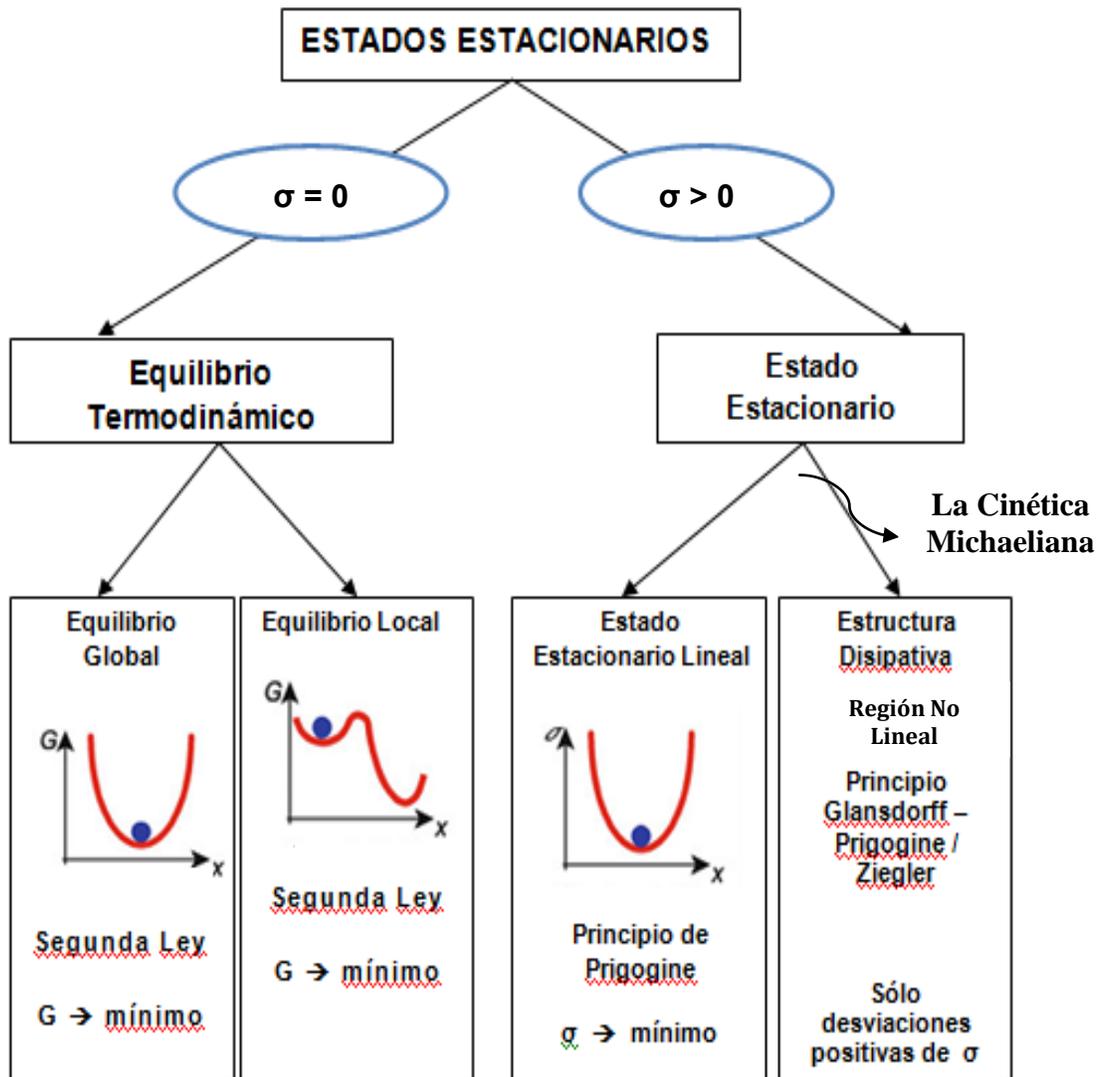
La termodinámica es una disciplina fundamental de la física que describe el comportamiento de conjuntos de moléculas. Se basa en dos principios básicos: la ley de la conservación de la energía (primera ley) y, la aparentemente tautológica, que parte del siguiente principio: un estado será más probable si se asume que existirá con los más altos grados de probabilidad (segunda ley).

Como tal ciencia fenomenológica, puede arrojar luz sobre los fenómenos del transporte entre ambas caras e intramembrana. Los Flujos de Sustancias y las Fuerzas Termodinámicas directoras están intrínsecamente imbricados. La propia Entalpía y la Entropía son consideradas como Potenciales homólogos a los químicos (μ). El segundo principio también se conoce como el principio de máxima entropía. Estos dos principios son tan generales y universales que las relaciones termodinámicas que se derivan de ellos gozarán del mismo grado de certeza.

En el caso de los sistemas biológicos, la variedad de proteínas, lípidos y de los propios iones, a nivel termodinámico se traducen por sus potenciales químicos que son una función de las concentraciones moleculares, así como de la temperatura, la presión, tensión, o de otras variables intensivas. El equilibrio térmico clásico consiste en un conjunto plurimolecular de la membrana que fluctúa alrededor del estado de máxima entropía. Si el sistema no está en equilibrio, la primera derivada de la entropía genera las fuerzas termodinámicas.

Éstas impulsan un sistema de resguardo hacia la proximidad del equilibrio clásico pero en lo que se conoce como estado estacionario cercano al equilibrio, donde la producción de entropía σ alcanza un mínimo -Teorema de Prigogine - (Prigogine I, 1945). Las segundas derivadas de la entropía (σ'') están relacionadas con parámetros relacionados con la susceptibilidad como la

capacidad calorífica o con las constantes elásticas de las membranas. Los criterios para encuadrar los Estados Estacionarios son: el Principio de Prigogine; de Ziegler; G en un mínimo relativo y G en un mínimo absoluto (30, 42) (Esquema I).



Esquema I.- Posibles tipos de estados estacionarios¹⁶. (σ , es la tasa de producción de Entropía; G , es la Función de Gibbs) (42).

¹⁶La Cinética Michaeliana es centenaria. Es un sello propio alcanzar un Estado Estacionario. Es el Estado Uniforme de Bertalanffy.

CAPTACIÓN INICIAL UNIDIRECCIONAL

La captación inicial unidireccional depende sólo de mecanismos de membrana, mientras que la captación neta durante el estado estacionario es el resultado tanto de la captación y del reflujo como de la retención celular y la participación de los componentes citosólicos y nucleares de la actividad esteroidea. Bresloff y Newby revisan la difusión en la membrana plasmática asociada a modelos de transporte intracelular incidiendo en la capacidad del movimiento browniano para sortear obstáculos geométricos cada uno con su nivel de potencial entrópico (43). El parámetro Ut_0 , que representa la captación inicial máxima coincide con la captación máxima unidireccional. La captación Ut_3 y Ut_{23} , medida a los minutos 3 y 23 respectivamente, refleja la captación neta, es decir, la diferencia entre la cantidad de hormona que entra en la célula y la que sale que definen el estado estacionario mantenido a los 23 minutos (Figura AE4).

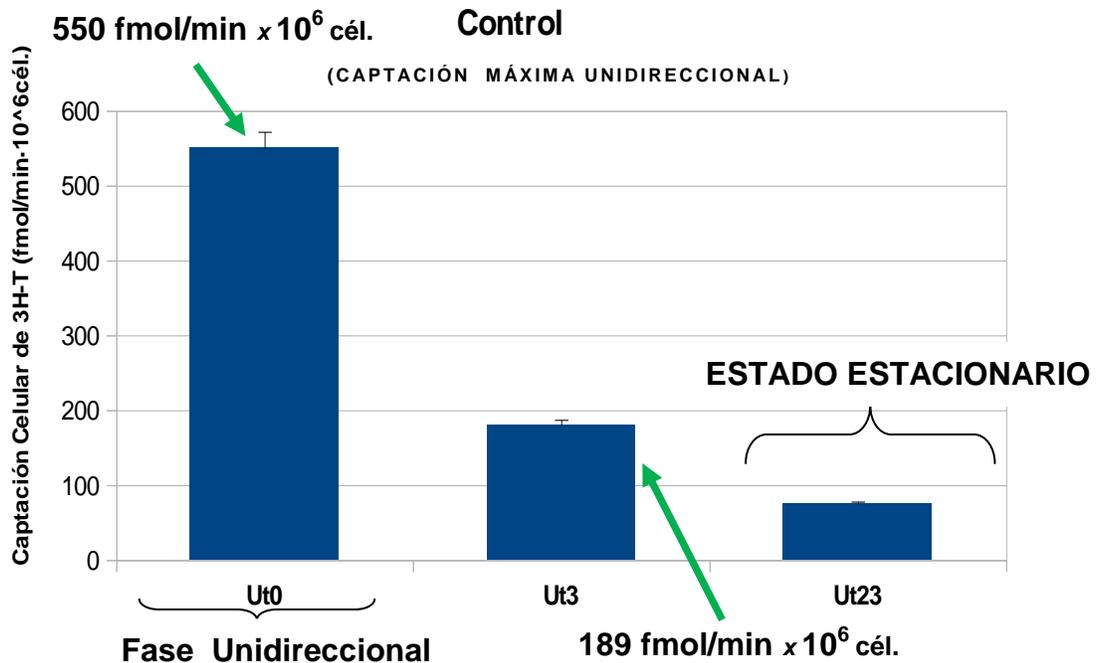


Figura AE4.- En Ut_0 , la captación inicial máxima coincide con la captación máxima de la fase unidireccional. La captación en Ut_3 y Ut_{23} es la captación neta: la diferencia entre la cantidad de hormona que entra en la célula y la que sale configura el estado estacionario mantenido a los 23 minutos.

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

El reflujo de [³H]DHT desde el interior de la célula procedente de la [³H]T perfundida no interfiere con la medida de la captación de [³H]T, ya que cuando se perfunde una columna con fibroblastos unidos a microesferas con T y se mide por RIA la concentración de DHT en el efluente, todos los valores fueron inferiores a 0,05 ng/ml que es el punto más bajo de la curva estándar.

La captación de [³H]T por fibroblastos humanos medida a 4°C, disminuye significativamente. En Ut0 [205 frente a 550 fmol/min x 10⁶ cel] y en Ut3 [50 vs 189 fmol/min x 10⁶ cel], mientras que en Ut23 se hace negativo (Figura AE5).

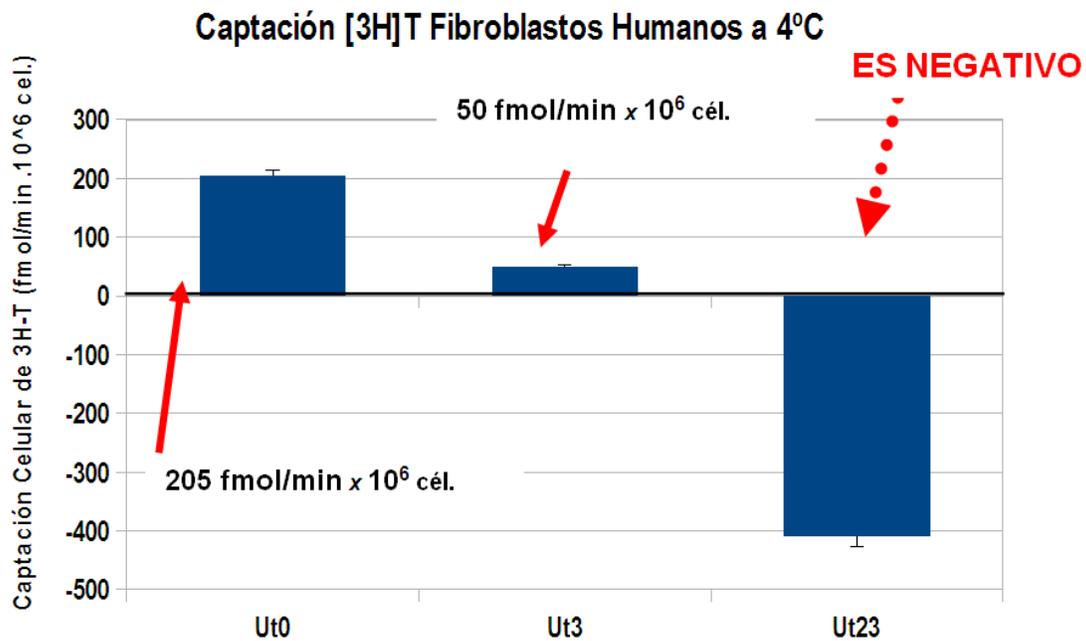
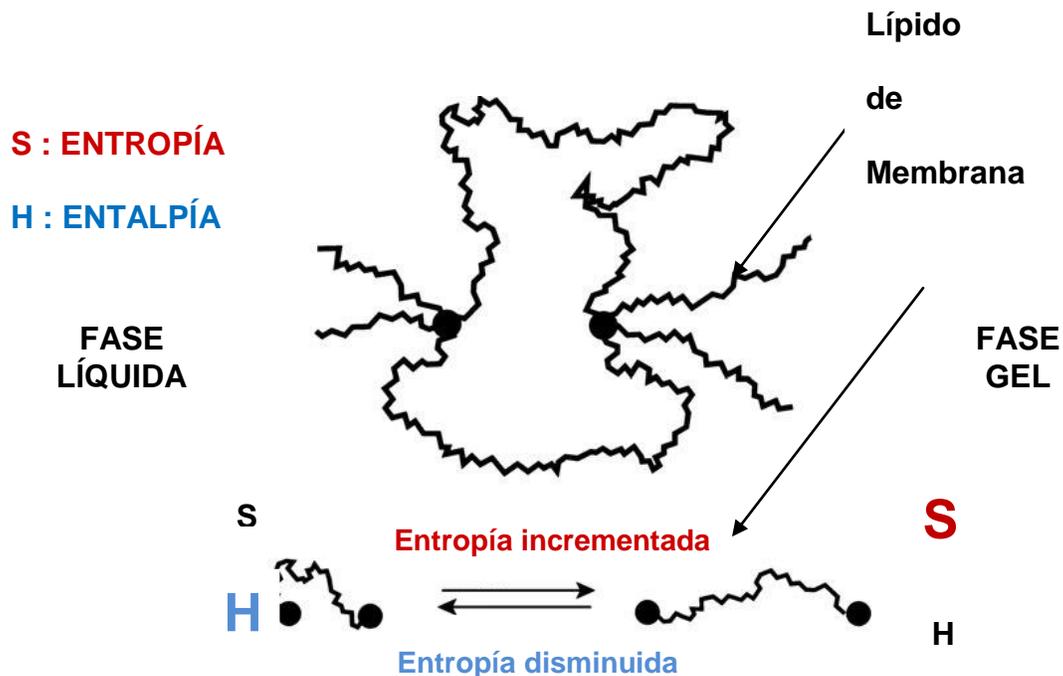


Figura AE5.-

INTERPRETACIÓN BIOTERMODINÁMICA del TRANSPORTE DE BIOMOLÉCULAS LÍPIDICAS (HORMONAS ESTEROIDES):

Se conoce desde hace tiempo (1979) que la transición sólido-líquido es dependiente de la temperatura (T_m , melting Temperature). Así, con bajas temperaturas, se observó que los lípidos se organizan en una red triangular. Sin embargo a altas temperaturas desaparece esta forma. De hecho se organizan adoptando el estado líquido. Lo que ocurre es una transición sólido \rightarrow líquido. Las cadenas lipídicas, al unísono, muestran estas transiciones de orden \leftrightarrow desorden. Se considera que las bajas temperaturas obligan a los lípidos a mostrar, sobre todo, configuraciones *todo-trans* (all-trans) Por el contrario, las altas temperaturas originan un “aparente” caos, que en la actualidad se interpreta como fuente de orden y origen de los procesos cargados de información. La clave está en conocer la secuencia o entramado que codifique el mensaje.



Esquema II.- El balance Entrópico-Entálpico parcialmente se debe al cambio de conformación de los lípidos de membrana.

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

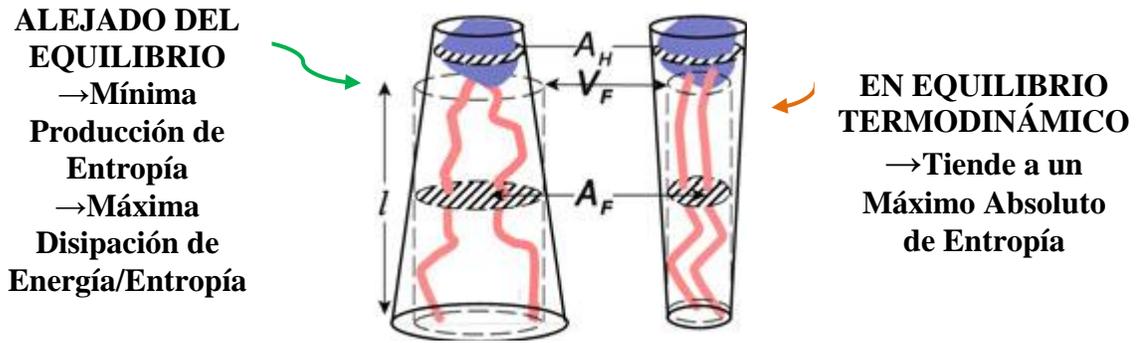


Ilustración VIII.- Dos posible moldes para un Fosfolípido de Membrana. (Glaser 2012, Biophysics) (42).

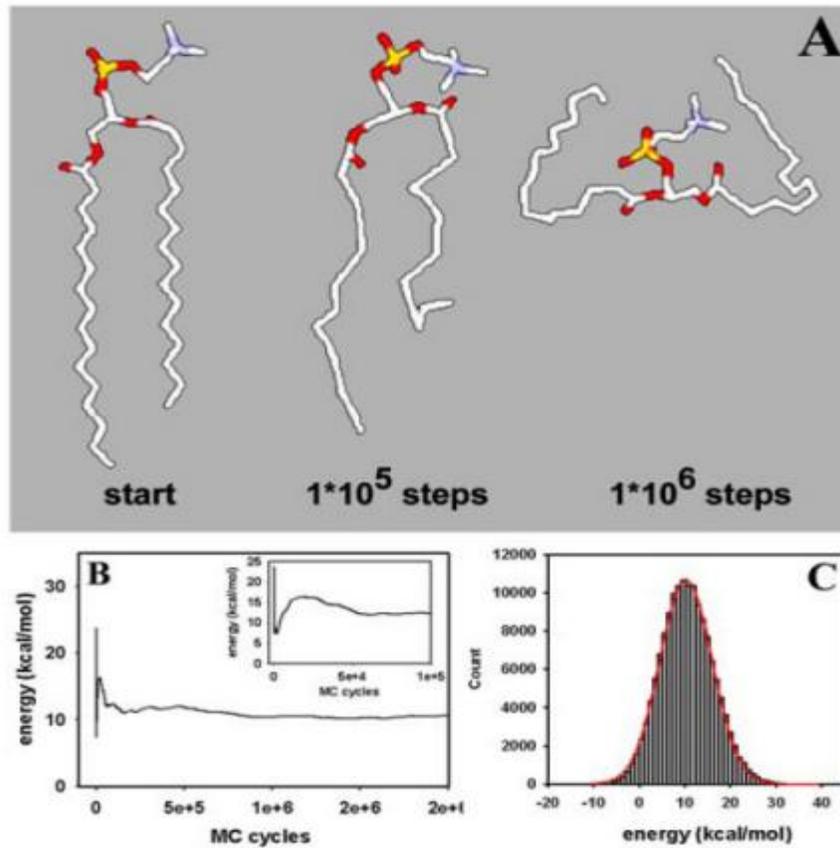


Ilustración IX.- Simulación por el Método de Monte Carlo de Lípidos de Membrana. Tras un millón de pasos se observa cómo el lípido adopta una forma entálpica. Puede colegirse la forma entálpica y la entrópica. (Int J Mol. 2014;15: 1767-1803. doi: 10.3390/ijms15021767).

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

Quizás se esté ahora en una encrucijada parecida a la que se planteó cuando se buscaba el soporte químico de la información genética. Había quien pensaba, con Linus Pauling a la cabeza, que las proteínas debían de ser las encargadas de almacenar y transmitir la información debido a las casi infinitas variaciones estructurales que presentaban.

Cuando se demostró, que en este caso, era la simplicidad de los ácidos nucleicos quien se responsabilizaba de la información genética, cambió el paradigma en la bio-información. El SNC por su parte, también utiliza un sistema sencillo, binario para procesar y transmitir la información.

Siguiendo esta línea de pensamiento, la diversidad en las cadenas lipídicas invita a que se trata de una ordenación más bien al azar. Los resultados del análisis termodinámico que tiene en cuenta la cantidad de información relevante y redundante se encaminan a una interpretación como un sistema de bio-información de tipo abierto-cerrado.

Se han encontrado isómeros trans, gauche-, gauche+, isomerizaciones en sus enlaces C-C en la cadena alquílica. Por lo tanto, las membranas lipídicas muestran al menos dos diferentes fases: la fase sólida *ordenada* llamada "fase de gel" y la fase *caótica* conocida como "fase líquida", que pueden ser el soporte de un sistema binario de información.

Estos términos describen los dos procesos de Orden↔Desorden inherentes a las membranas biológicas. Los

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

lípidos condicionan las reglas topológicas de la agregación de las proteínas de membrana (Ilustración X) (44).

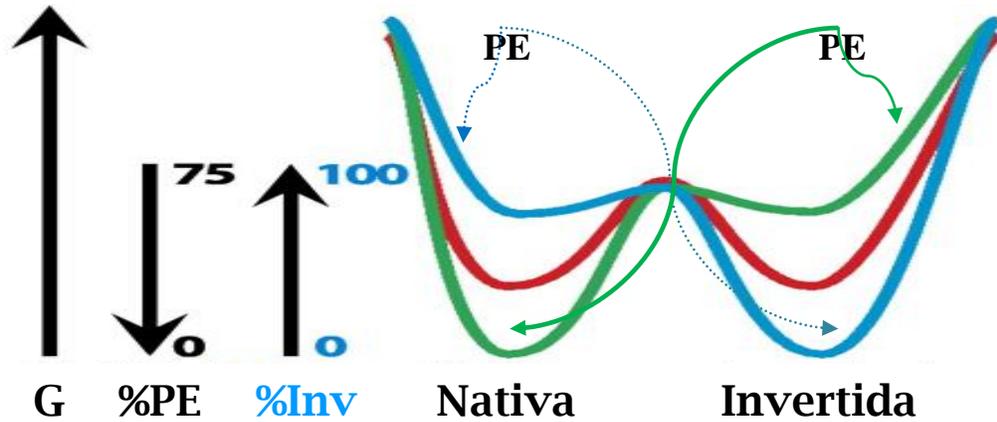


Ilustración X.- Expresión de la capacidad funcional de la membrana lipídica según el % de **PE**, Fosfatidil Etanolamina, para influenciar en el plegamiento de las proteínas y rebajar el Estado de Energía Libre **G**.

Se puede aventurar que la transición sólido→líquido en la ubicación del grupo de cabeza y la transición orden↔desorden de las cadenas no necesariamente tiene que ocurrir a la misma temperatura, y que posiblemente las fases sólida y líquida pueden domeñarse de forma controlada.

Mientras que las disfunciones de la fase sólida hasta ahora no han sido identificadas en las membranas lipídicas, la fase líquida (ordenada) sí se ha propuesto que existe en las membranas que contienen colesterol, posiblemente debido al tamaño de la molécula de colesterol que perturba la formación de entramados

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

laterales y su enlace de hidrógeno a átomos de oxígeno con función carbonilo.

La fase *ordenada* es una especie de fase de gel (es decir, con baja entalpía) sin el *des-orden* del empaquetamiento lateral (alta entalpía) (Ilustración XI).

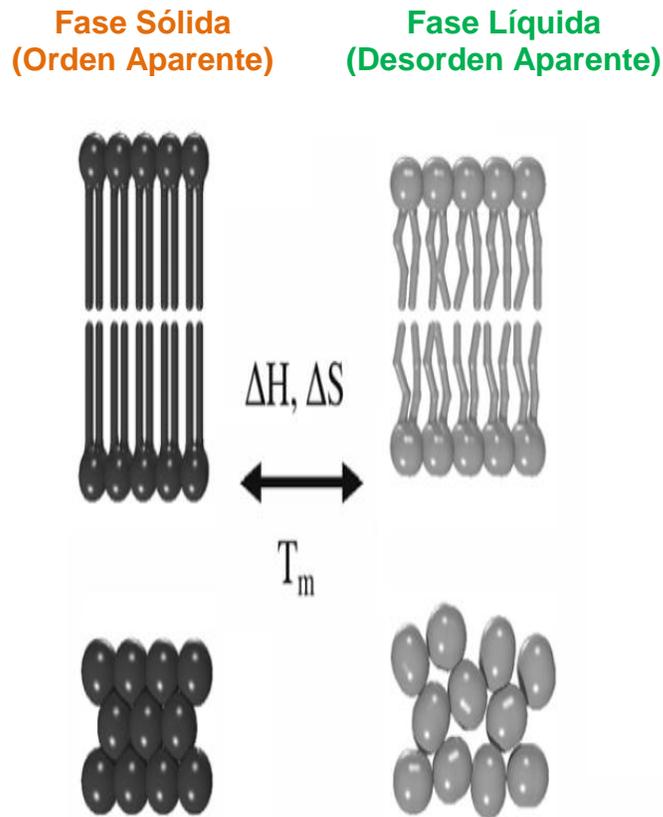


Ilustración XI.- Esquema de fusión de lípidos. De la fase sólida (aparente orden) a una fase líquida (aparente desorden). Arriba: El “orden” dentro de las cadenas de lípidos se pierde al fundirse. Conclusión: El orden cristalino de los grupos de cabeza de lípidos se desvanece y la matriz sufre una transición sólido→líquido. (ΔH : Incremento de Entalpía; ΔS : Incremento de Entropía; T_m : Temperatura de Fusión).

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

La pre-transición es una transición de baja cooperatividad que se manifiesta a unos pocos grados por debajo de la transición principal. Con imágenes de la microscopía electrónica y de la microscopía fuerza atómica se sabe que entre la pretransición y la transición principal, la superficie de la membrana aparecen ondulaciones periódicas con longitud entre 13 y 30 nm, compárese con el espesor de una membrana (~ 5 nm), y una sección transversal típica de los propios lípidos ($\sim 0,7$ nm).

Este hallazgo es compatible con la formación de nanotubos, canales, como se postula en el modelo propuesto (45). La distribución de cargas en la membrana ha sido investigada con el microscopio electrónico y el de fuerza atómica (Starke-Peterkovic et al., 2005; Heinz and Hoh, 1999; Dillon et al., 2006; McLaughlin and Murray, 2005).

La influencia de los grupos polares de los lípidos pueden inducir una presión intrínseca de la membrana y condicionar la fase de transición en las regiones hidrofóbicas: el mecanismo básico del acoplamiento electromecánico. Se ha postulado la Electrostricción¹⁷ como mecanismo de compactación para la membrana biológica, donde la fuerza mecánica resultaría de la atracción electrostática entre las placas de un condensador -las dos capas- (46).

En particular, se puede observar que la capacidad calorífica (en realidad, es la capacidad de exceso de calor) ΔC_p está asociada con el acontecimiento de la fusión cooperativa. La oscilación entre las dos transiciones no retornará completamente

¹⁷ La Electrostricción es un fenómeno que se observa al generar una fuerza mecánica sobre un condensador por atracción electrostática de las cargas sobre las dos placas (en nuestro caso, las dos capas lipídicas).

a la línea de base: el intervalo completo entre la pre-transición y la transición principal habrá de considerarse como una fusión.

De tal manera que ΔC_P es proporcional a la aparición de los fenómenos de cooperatividad en el punto de fusión:

$$\Delta C_P \propto \text{Fenómenos Cooperativos de Fusión}$$

Bajo tales condiciones es obviamente difícil de definir una temperatura de fusión. La capacidad calorífica viene dada por:

$$C_P = C_0^P + \Delta C_P,$$

donde ΔC_P se refiere a los eventos de fusión por cooperación.

En los trabajos publicados, la temperatura de fusión, generalmente, se define como el máximo de la ΔC_P en la curva principal de la transición.

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

Más exactamente, hay que considerar la temperatura donde el exceso de entalpía es del 50% (*el número de lípidos en estado de gel o estado de sol –fluido- es equivalente*) porque la diferencia de energía libre entre los dos estados adoptados por los lípidos es cero.

Dado que la transición de fase tiene mucho que ver con la solubilidad y ésta con la estructura, la labilidad del proceso resulta ser del mismo grado de incertidumbre, por ejemplo, que la apertura y cierre de los canales iónicos (34), lo que apoya la hipótesis de transporte facilitado para la testosterona ($\Delta G = 0$), aparentemente, o casi con valor nulo [≈ 0] en todo caso.

Es decir los lípidos se comunican, en este modelo propuesto, mediante un sistema binario de coherencia de fase: o son solubles (se entienden entre sí) o insolubles (no se entienden).

En el modelo propuesto, se postula que se trata de una especie de nanotubo con una geometría óptima desde el contenido entrópico, no obstante no se puede desdeñar el mecanismo autocrino, paracrino, en función de las demandas celulares de las hormonas esteroideas como es la testosterona e intercelulares.

La entalpía de la curva de fusión puede determinarse a partir del exceso capacidad calorífica a presión constante (c_p), tras la integración:

$$\Delta H = \int_{T_0}^{T_1} \Delta c_p dT$$

que puede simplificarse,

$$\Delta S = \frac{\Delta H}{T_m}$$

si además se cumple:

$$c_p/T \approx c_p/T_m$$

entonces,

$$\Delta H = \Delta S/T_m$$

Esta última expresión equipara el incremento de Entalpía con el incremento de Entropía por cada unidad de Temperatura a la que se produce la fusión y viceversa.

2) Tiempo-dependencia de la inhibición de la captación de [³H]T por testosterona no tritiada.

En los experimentos de pulso, la inhibición de [³H]T por concentraciones crecientes de T no marcada sugiere la presencia

de un sistema no saturable o de baja afinidad. Estos resultados se obtienen tras un corto periodo de exposición (5 min) de T antes de medir la captación de [³H]T.

Dado que las distintas células diana presentan diferentes tiempos de respuesta, se midieron los efectos sobre la captación de [³H]T de la exposición, durante cortos o largos periodos de tiempo, de fibroblastos humanos a T, con el objetivo de determinar si existe un factor temporal en la adaptación de los fibroblastos a la cantidad de testosterona que les llega.

a) Efectos de una exposición corta de los fibroblastos a testosterona

En primer lugar se midió la captación de [³H]T siguiendo el protocolo de carga, perfundiendo fibroblastos de humanos con T 10⁻⁶ M durante 30 minutos. Esta concentración de T se mantuvo durante todo el experimento. Como muestran las Figuras AE6(A y B), el mantenimiento de T no marcada en el medio de perfusión durante los 30 minutos anteriores a la medida de la captación de [³H]T, provoca una inhibición que sólo es significativa durante la fase estacionaria del periodo de carga.

Figura AE6A.-

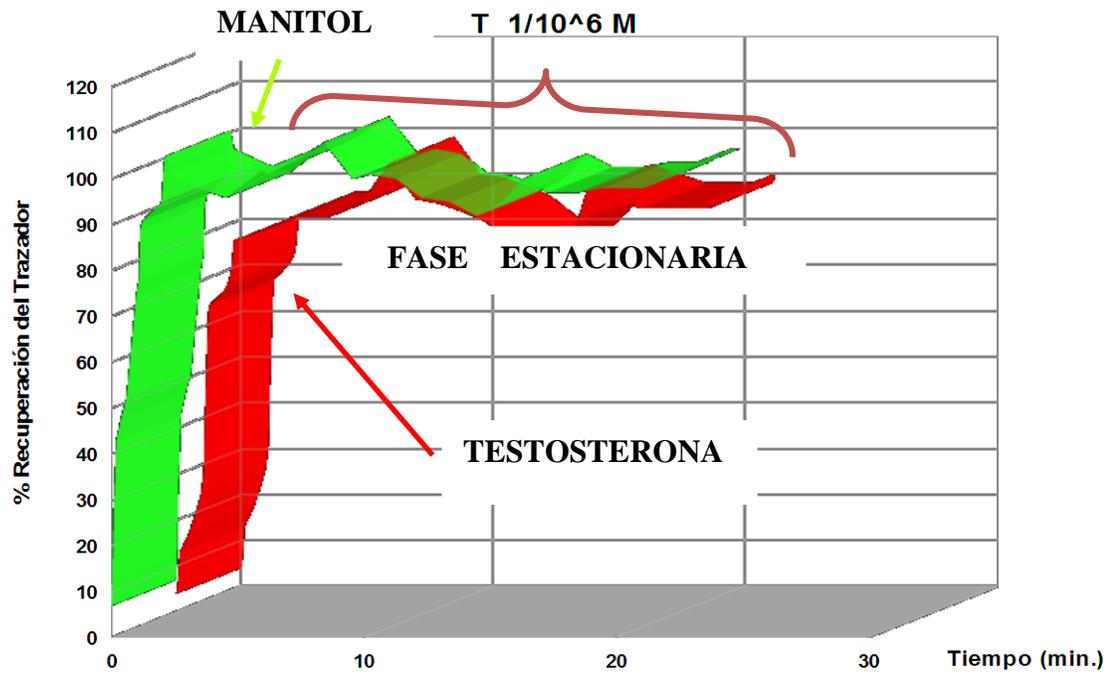
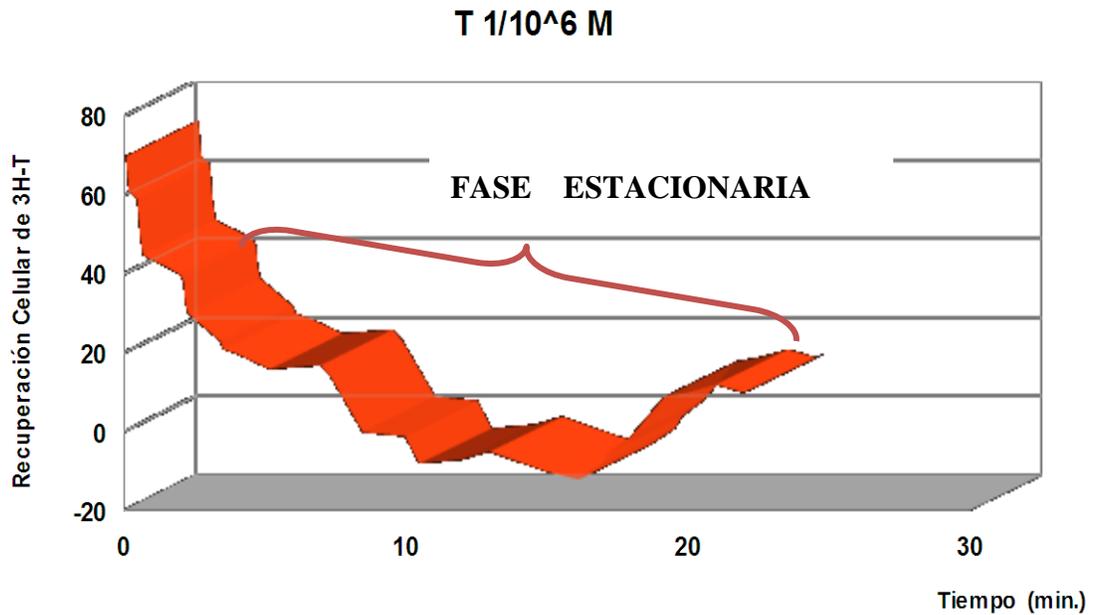


Figura AE6B.-



Figuras AE6, A y B.- La inhibición en la captación de Testosterona marcada es significativa en la Fase Estacionaria.

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

Esta respuesta parece indicar que la membrana de los fibroblastos y, en concreto, el sistema por donde penetra la hormona, puede saturarse con altas concentraciones de Testosterona (T) administradas de forma súbita o por una concentración mantenida de hormona. Para investigar esta posibilidad las células fueron incubadas con Testosterona a una concentración de 10^{-6} M durante un periodo largo de tiempo.

b) Efectos de una exposición larga de los fibroblastos a testosterona

Los fibroblastos fueron expuestos a Testosterona (T) 10^{-6} M, añadida al medio de cultivo 24 horas antes de medir la captación de [3 H]T, siguiendo el protocolo de carga. Esta concentración de T se mantuvo durante la medida de la captación inicial y en el estado estacionario.

La Figura AE7B muestra que la captación de [3 H]T fue inhibida en todas las fases, haciéndose negativa a partir del minuto tres -3- de perfusión. El flujo máximo de [3 H]T hacia el interior de fibroblastos humanos perfundidos en ausencia de Testosterona no marcada es de [550 fmol/min \times 10^6 cél.] (grupo control, Figura AE7A).

Este valor corresponde a la fase de captación unidireccional que dura de 10 a 20 segundos (Caja 1 y 2 -Tiempo de Relajación Molecular- (31,32): se corresponden con los tiempos de relajación de las transiciones por fusión y proporcionales a ΔC_P).

CAJA 1.-

TIEMPO de RELAJACIÓN MOLECULAR

Los tiempos de relajación, τ , en las transiciones por fusión son proporcionales a la capacidad calorífica ΔC_P

$$\tau \propto \Delta C_P$$

CAJA 2.-

Los procesos de relajación acotan muy despacio la capacidad calorífica máxima.

Este efecto es conocido como “desaceleración crítica descendente”

$$\tau \approx 1.2 \times 10^{-4} \text{ s} \cdot \text{m} / \text{J} \cdot \Delta C_P$$

Los tiempos de relajación de los procesos que se asientan en los dominios cooperativos en las biomembranas tienen un umbral del orden algunos milisegundos hasta el rango de algunas decenas de milisegundos:

Exactamente en la misma escala del horizonte temporal de la apertura y cierre de los canales iónicos

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

Durante el estado estacionario, la captación fue siempre inferior al 15% de la máxima [77 fmol/min x 10⁶ cél.]. Cuando se mantiene la concentración extracelular de T a 10⁻⁶ M durante 24 horas y las células se perfunden con una solución que contiene [³H]T a la misma concentración, la captación unidireccional máxima es significativamente inferior a la del grupo control [165 vs 550 fmol/min x 10⁶ cél.] (Figuras AE7A y AE7B).

Figuras AE7A y AE7B.-

Figura AE7A.- Captación Celular en Ut0 intensa, indicando la Unidireccionalidad del proceso.

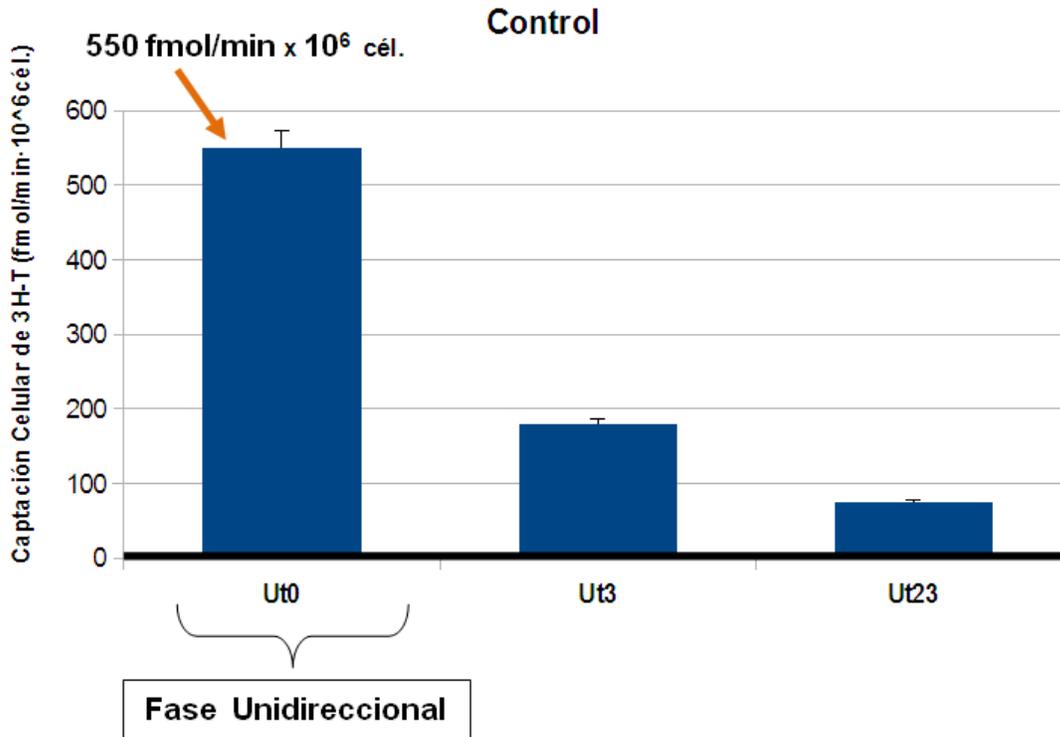
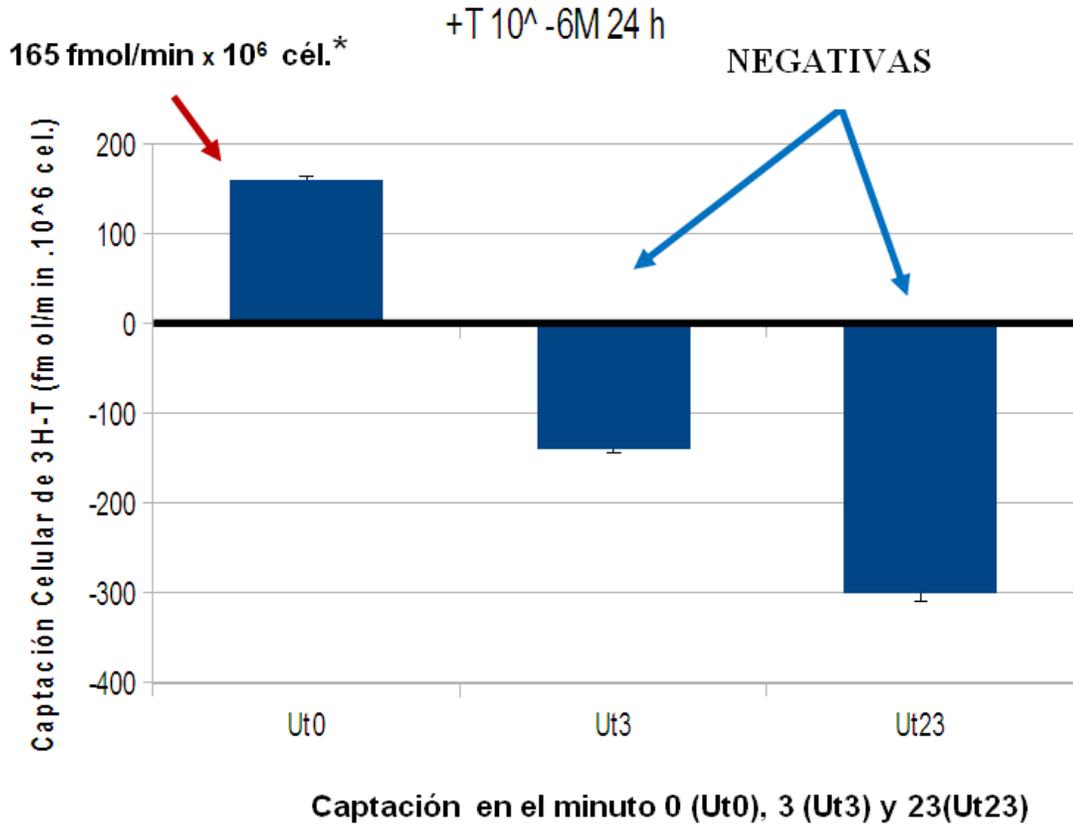


Figura AE7B.- Captación Negativa en Ut3 y Ut23, tras exposición de 24 horas.



3. Inhibición de la captación de [³H]T durante el estado estacionario por T 10⁻⁶ M en experimentos de carga.

Mientras no varíen las condiciones experimentales, la captación de [³H]T se mantiene constante en el estado estacionario. Bajo estas condiciones, si la captación responde a un proceso de difusión, un aumento brusco de la concentración extracelular de Testosterona deberá aumentar el valor de la captación.

Pero si la captación depende de un proceso mediado, el aumento de la concentración extracelular de Testosterona, provocará una inhibición de la captación de [³H]T. Por ello, la medida simultánea y secuencial de la captación de [³H]T durante el

estado estacionario, permite diferenciar si se trata de un proceso mediado o de una difusión simple.

Para explorar esta posibilidad se perfundieron fibroblastos humanos cultivados hasta confluencia en microesferas, con una solución que contenía 5×10^{-9} M de $[^3\text{H}]\text{T}$ ¹⁸.

El estado estacionario se alcanza a los 3 minutos. Tan pronto como se alcanza esta condición, las células se perfundieron durante 10 minutos con una solución que contenía T a una solución de 10^{-6} M. Simultáneamente se midió la captación de $[^3\text{H}]\text{T}$ durante todo el tiempo que duró el experimento.

Tras un periodo de latencia de 1 a 2 minutos (representa el espacio muerto) se observó una inhibición significativa de la captación de $[^3\text{H}]\text{T}$. El valor de la concentración en el estado estacionario disminuye hasta un 30%. Los valores de la captación disminuyen hasta hacerse negativos durante todo el periodo de exposición a T 10^{-6} M. Cuando se cambia la concentración de T a la primitiva de 5×10^{-9} M, los valores de captación de $[^3\text{H}]\text{T}$, vuelven a las cifras normales.

En otro experimento se observa que alrededor del minuto 3 decae la captación de forma patente. Se tuvieron en cuenta los pases 1, 5 y 12, a partir del minuto 20 aproximadamente. Los comportamientos de las células en la captación se aproximan al nivel cero (0) (Figura AE9).

Los procesos termodinámicos que dan cuenta de estos hechos se describen en la CAJA 3. Se establecen relaciones funcionales directas entre la Entalpía, Entropía, Transiciones de Fase y surge la cooperatividad.

¹⁸ Perán S, Muñoz M. Saiz MT. New approach to the study of transport of biomolecules by microcarrier cell cultures perfused in a column applying a high resolution paired-tracer technique. Edited by Yudilevitch D et al. Cell membrane Transport. Plenum Press, New York, 1991. pp. 143-16, Figure 6.

Curvas de Dilución de Trazadores

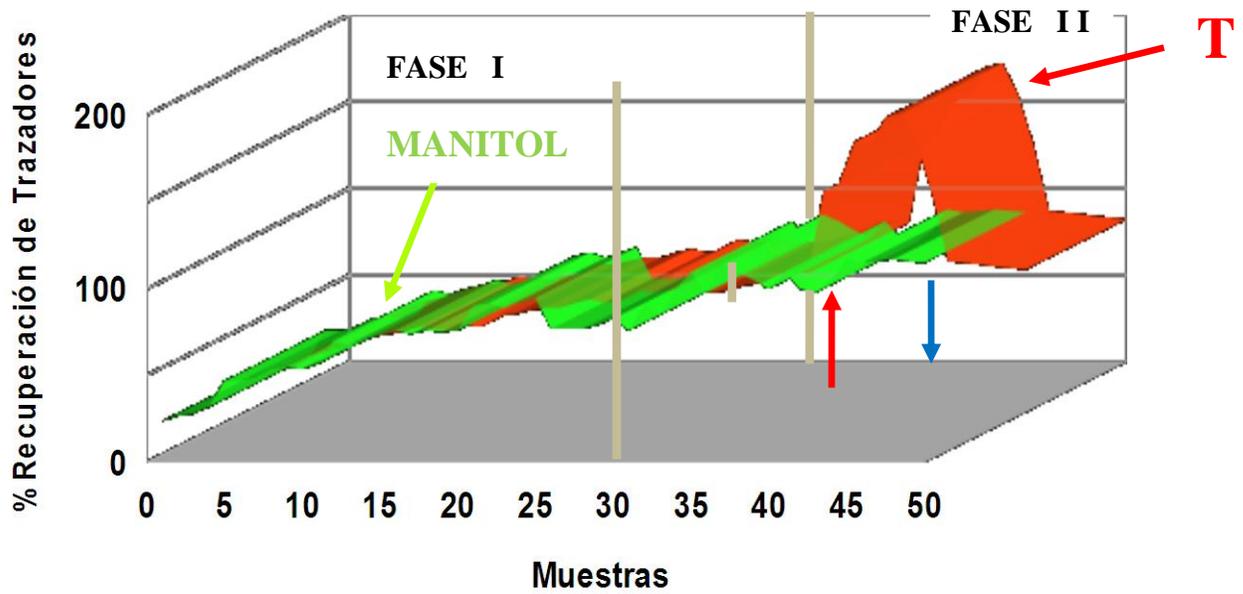


Figura AE8A.-

Captación Celular de 3H-TST

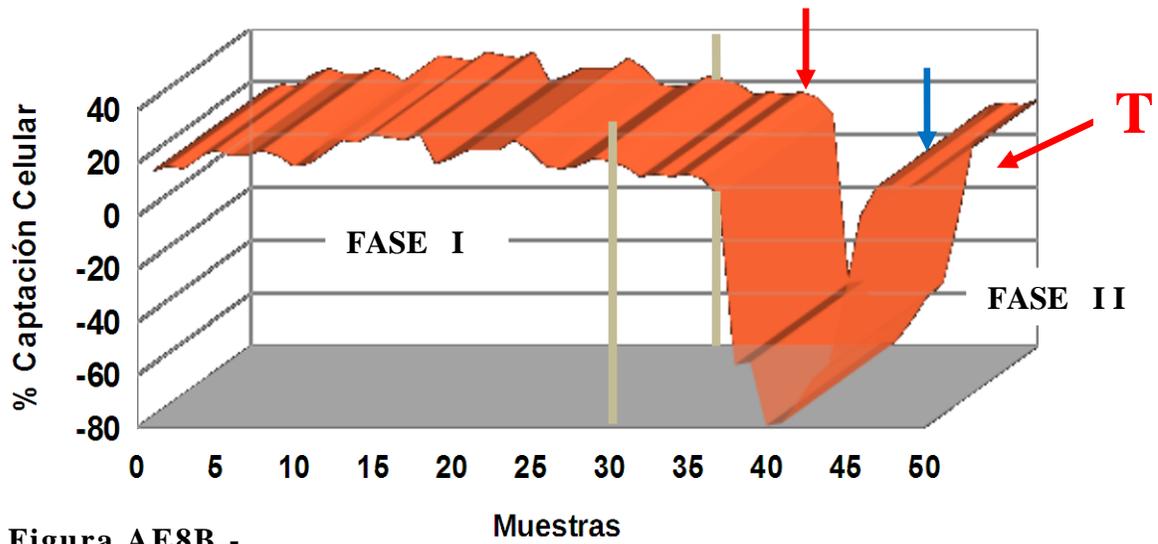


Figura AE8B.-

Figuras AE8, A y B.-

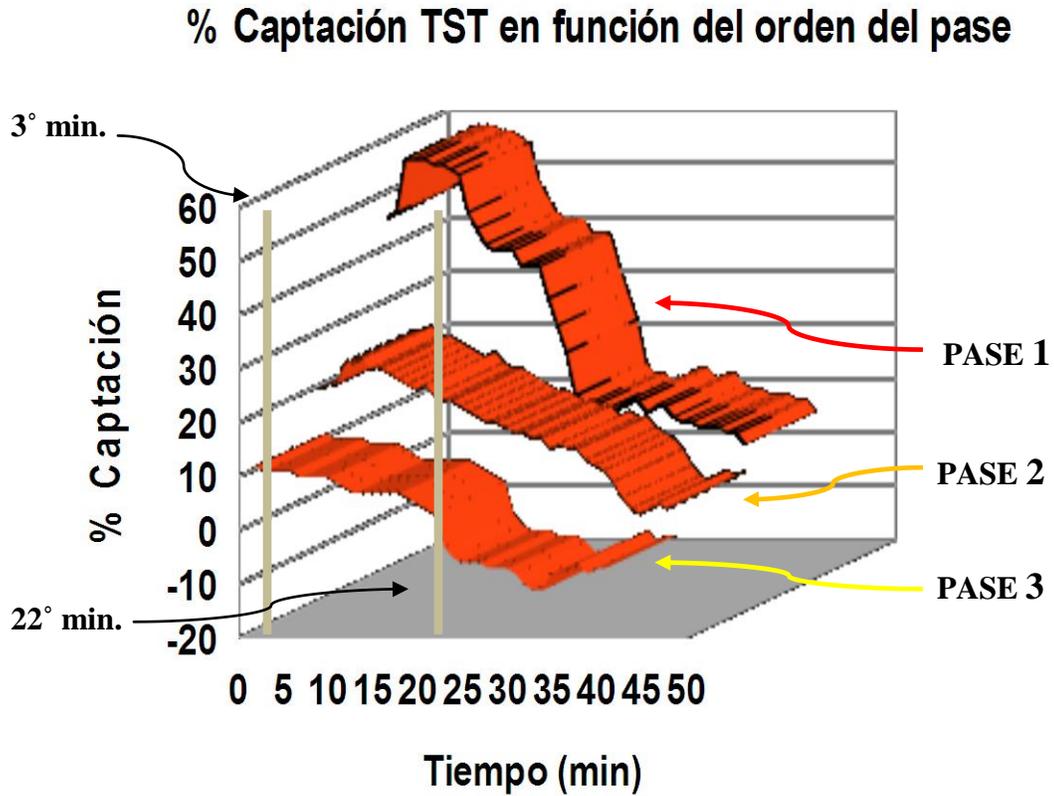
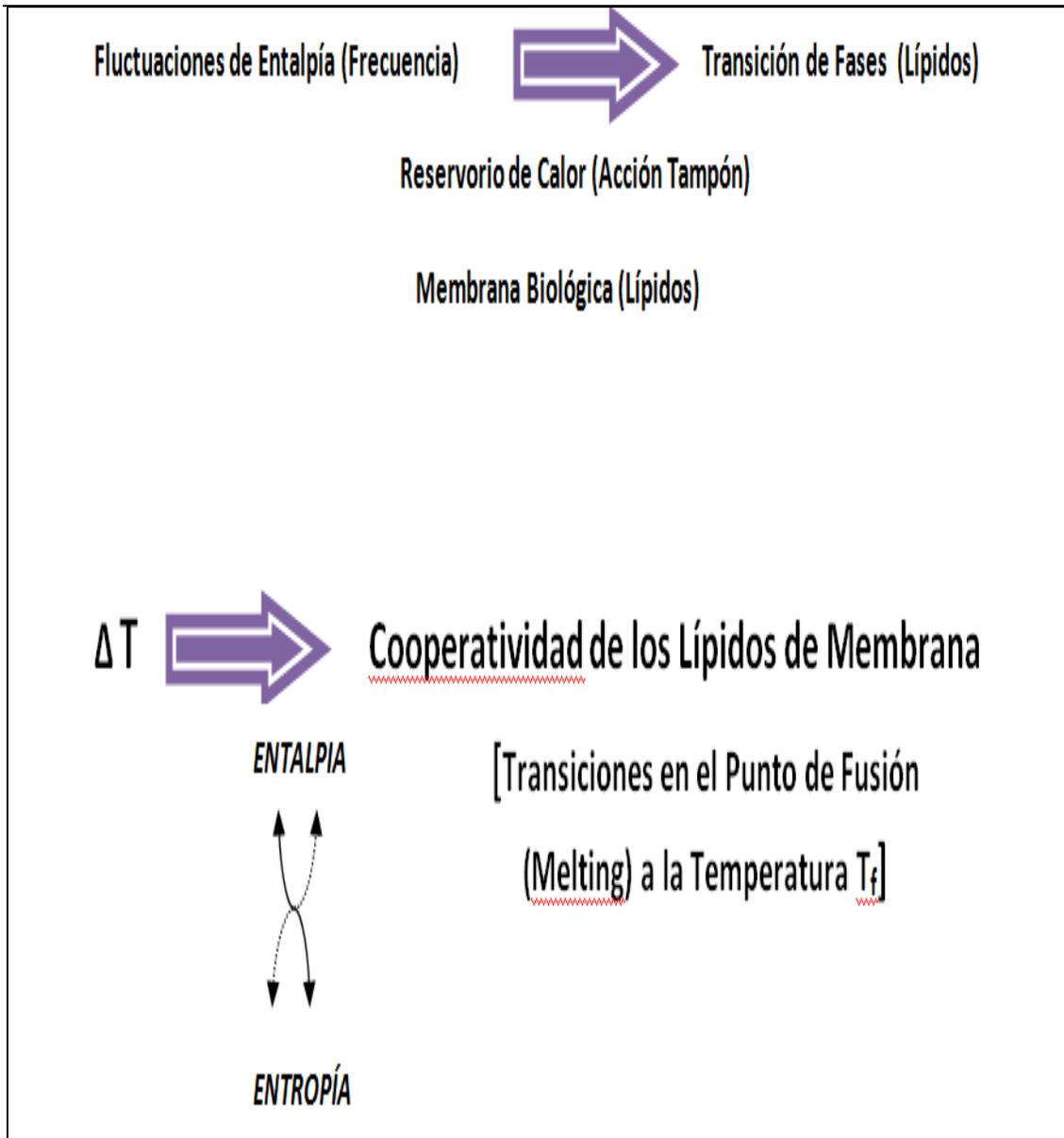


Figura AE9.- Transcurso temporal de la captación celular de $[H^3]$ Testosterona en fibroblastos humanos. Dos sucesos: a) a los tres ($\sim 3^{\text{er}}$ min.) minutos y b) a los veinte minutos ($\sim 22^{\circ}$ min.). El primero es la caída neta salvo en el pase 3, el segundo la aproximación al nivel cero, nula captación, salvo en el pase 3 que se hace negativo para acercarse al cero, y un tendencia similar menos acusada en el pase 2.

CAJA 3.-



DISCUSIÓN

Las hormonas esteroideas actúan intracelularmente. Sin embargo está en discusión el mecanismo o mecanismos por los cuales atraviesan la membrana plasmática de las células diana de sus efectos. El hecho de que sean de carácter lipídico sugiere (en una apreciación inmediata, desde un enfoque de la fisiología clásica en el que feedback negativo es la conducta habitual en los mecanismos de control de seres vivos) que puedan atravesar la membrana por difusión simple, pero hay evidencias de que otros tipos de transporte pueden intervenir.

La visión puesta en valor, aunque no sin dificultad, del feedback positivo, la ruptura de simetría, la auto-organización en sistemas fuera de equilibrio, es el sustento teórico de toda esta nueva constelación de operadores fisiológicos en la actualidad.

Todavía existen incógnitas respecto de los movimientos de los propios lípidos intramembrana y del transporte de lípidos entre los compartimentos externos e internos de la membrana, por lo que son materia de investigación, especulación y controversia.

Es actualmente inviable investigar todas las posibles interacciones, incluso si sólo unas pocas de estas interacciones pudieran explicar la dinámica funcional del transporte lipídico a través de las membranas, porque el genoma a su vez no siempre expresa todas las proteínas, ni en todos los tipos celulares.

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

Se impone lo que Stephen Hawking denomina una teoría efectiva: “En física, una teoría efectiva es un marco creado para modelizar algunos fenómenos observados, sin necesidad de describir con todo detalle sus procesos subyacentes”¹⁹. Además, la Vida también puede estar soportada, con bastante independencia de los genes, en biomoléculas lipídicas.

Por ejemplo, como mínimo se pueden listar en dos centenares las especies de lípidos conocidas. El número de combinaciones está más allá de cualquier rango analizable con los equipos actuales si se tienen en cuenta la variación en concentraciones y posibles conformaciones espaciales.

El mecanismo de transporte para la testosterona (externalización) en la célula de Leydig hacia la sangre o la linfa es desconocido. La distribución de esteroides lipofílicos en el interior de la célula, se considera regido por difusión pasiva.

El modelo que defiende la pasividad, la aleatoriedad, la libre difusión, del fenómeno del transporte de las hormonas esteroides a través de la membrana (11) muestra sus *limitaciones metodológicas*, que inducen a plantear “un punto de vista heurístico” para su interpretación²⁰:

- a)** no se tiene en cuenta la participación de las proteínas situadas tanto en la cara interna como externa de la membrana plasmática, como un factor activo,

¹⁹ Hawking S, Mlodinow L. El Gran Diseño. Ed. Crítica. Barcelona. 2010. pág. 40.

²⁰ El dispositivo experimental de Perán y McGee trata asumir estos inconvenientes, salvándolos, dadas las condiciones cuasi-fisiológicas en los que transcurre la experimentación y el tiempo de resolución.

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

- b)** tampoco se implica la albúmina sérica como transportador,

- c)** no se ha estudiado la constante de disociación de un posible transportador intramembranario. Los cálculos que se han realizado sobre el transporte del hexano como “representante orgánico”, se han atendido al modelo de difusión simple,

- d)** los posibles cambios conformacionales del colesterol y de las hormonas en su travesía por la membrana, se han dejado fuera de los cálculos,

- e)** el grado de solvatación y la generación de oligómeros, son igualmente ignorados.

Se reconoce en este trabajo, un esfuerzo notable para dilucidar los posibles mecanismos del transporte a través de las membranas plasmáticas de las hormonas esteroides y aporta datos interesantes como los estudios de la energía libre de Gibbs similares para Estrógenos, Andrógenos, algo distinto para los Progestágenos, y todos ellos alejados del Colesterol.

El coeficiente de difusión K calculado en este estudio es:

$$\mathbf{K \approx 3 \times 10^{-5} \text{ cm/s,}}$$

y en el orden temporal

$$\mathbf{\text{tiempo} \sim 0.01 \text{ s,}}$$

para una travesía de 30 Å (Angstroms) de longitud.

Pero diversos estudios en murinos aportan datos que sugieren un transporte activo de la testosterona en la espermatogénesis [Takamina, 1998 (41)]. La asociación de la testosterona a los gangliósidos de membrana parece ser necesaria para la espermatogénesis.

La pregnenolona, progesterona y la testosterona (esteroides) son admitidos en su paso a través de la membrana por un mecanismo rápido, pero también ligado a otro más lento, que equilibra pronto los diferentes compartimentos en el propio testículo [Rommers, 2004 (41)].

ANDRÓGENOS

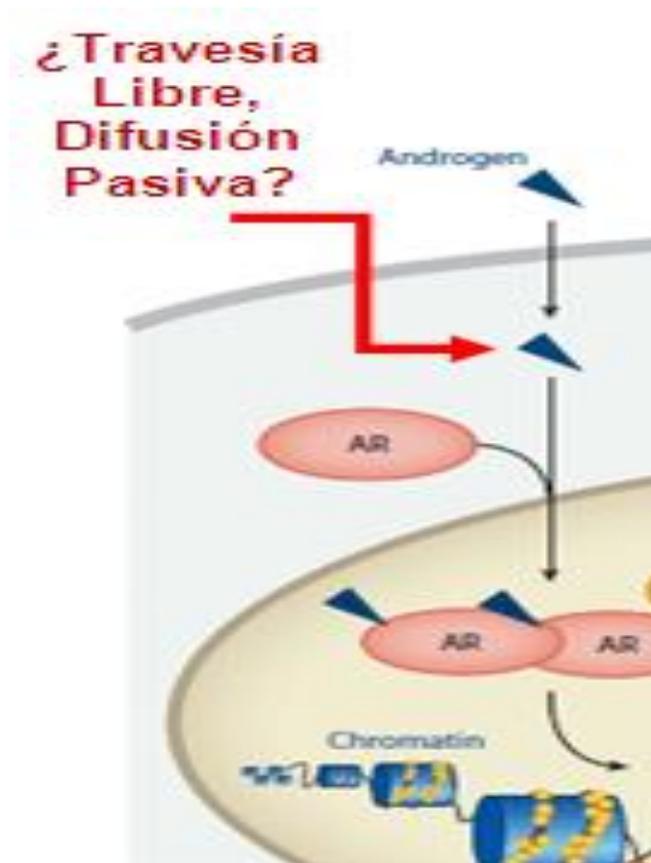


Figura 14.- El conocimiento actual sobre el paso de los andrógenos, a través de la membrana plasmática se generaliza hasta entenderlo como un simple mecanismo de difusión pasiva. Esta es la cuestión, ¿Travesía Libre, Difusión Pasiva frente a Facilitada, Mediada, o Activa?. (Matsumoto T et al. The Androgen receptor in health and disease. *Annu Rev Physiology*. 2013; 75: 201-224).

ESTRÓGENOS

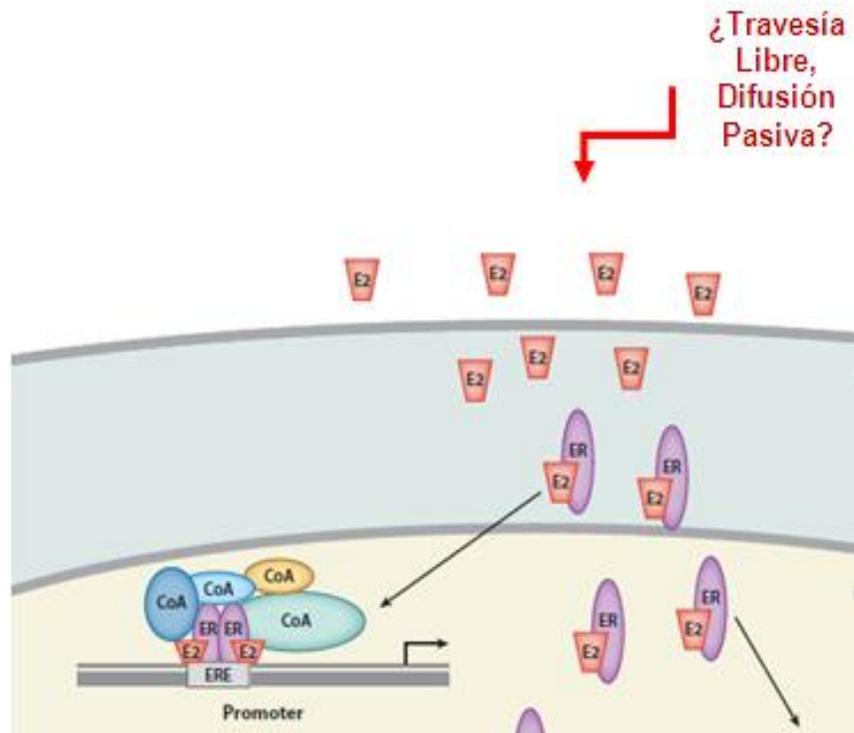


Figura 15.- Idem sobre el paso de los estrógenos, a través de la membrana plasmática se generaliza hasta entenderlo como un simple mecanismo de difusión pasiva, si acaso con alguna participación de receptores. Idéntica cuestión a dilucidar: ¿Travesía Libre, Difusión Pasiva frente a Facilitada, Mediada, o Activa?. (Liang J, Shang Y. Estrogen and cancer. *Annu Rev Physiology*. 2013; 75: 225-240).

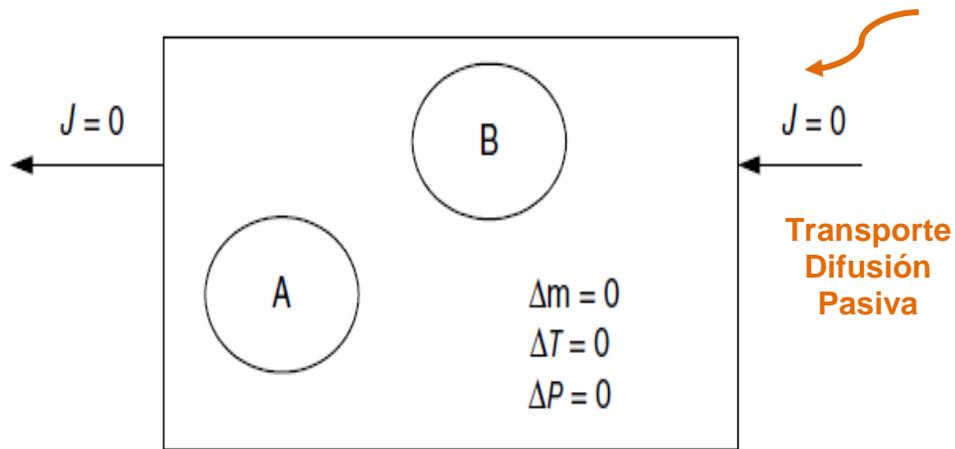
MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

Al tratarse de moléculas complejas, las hormonas esteroideas, que contienen una gran variedad de radicales diferentes que dan lugar a grupos y subgrupos con acciones diversas, que controlan desde la modulación homeostática y las adaptaciones al medio, hasta impulsos procreadores, hace pensar que deben entrar en las células por un medio más selectivo que la difusión simple, pasiva y la unidireccionalidad del proceso asegurarla gracias a un conductor, un canal.

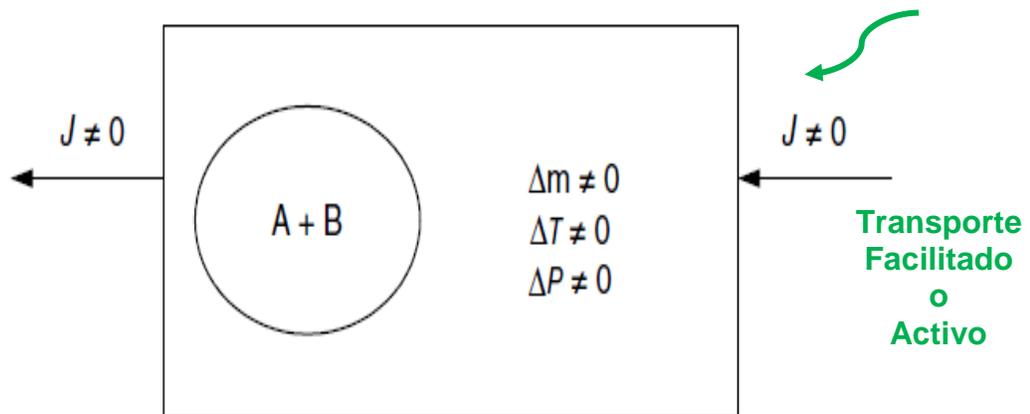
Los procesos sometidos a un control fino no son Sistemas en Equilibrio. En el Equilibrio Clásico Termodinámico el cambio no existe, es nulo. Un Sistema de Control en esta región carece de sentido, dado que el flujo y el incremento de flujo es cero (Ilustración XII):

- (Δ) del Flujo de la sustancia (ΔJ), es cero,
- Potencial químico ($\Delta\mu$), es cero
- Temperatura (ΔT), es cero
- Presión (ΔP) es cero.

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.



Sistema en Equilibrio



Sistema Alejado del Equilibrio

Ilustración XII.- Los Lípidos de Membrana forman parte de un Sistema Alejado del Equilibrio Termodinámico donde el Flujo de Sustancias es distinto de Cero ($J \neq 0$), al igual que el potencial químico, la temperatura o la presión. (J : Flujo de Sustancia; Δm : Incremento del potencial químico μ ; ΔT : Incremento de la temperatura; ΔP : Incremento de la Presión) (21).

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

El Modelo de Transporte postulado se basa en la dialéctica de la autoorganización espontánea de los lípidos (polimorfismo lipídico) y la necesidad inexcusable de todo sistema, que para mantenerse, debe ganar siempre en orden, con (o sin) gasto de energía.

A veces, esta inversión energética resulta encubierta por el acoplamiento entre fenómenos (p.e.: relaciones recíprocas de flujos y fuerzas de Onsager, o su equivalente en las regiones No Lineales).

La dependencia del consumo de oxígeno fue mostrada por Culos y Watanabe en 1982 para la Testosterona, así como de otros factores implicados²¹.

En sistemas con modelos experimentales, se encontró una segregación de lípidos de forma espontánea. Por ejemplo, la sonicación permite una clasificación de los lípidos entre las monocapas internas y externas en pequeñas vesículas unilamelares.

Pero las últimas estructuras no son fisiológicas debido a su pequeño tamaño en comparación con las dimensiones de vesículas producidas in vivo (~20 nm de diámetro de las vesículas experimentales, frente a ~ 200 nm para las vesículas endocíticas).

Así, la selección topográfica de los lípidos observados en las membranas biológicas, debe estar motivada por un proceso que no es el mismo por el que se originan las vesículas experimentales lipídicas, y no es un simple equilibrio termodinámico.

Tabla II.- CLASIFICACIÓN DE LAS ESTRUCTURAS DISIPATIVAS EN CUATRO GRUPOS SEGÚN EL PRINCIPIO DE COMPLEMENTARIEDAD CINEMÁTICA-DINÁMICA (47)

-Los Equilibrones *no* disipan energía libre [$dG/dt = 0$]-
 -Los Disipadores²² *sí* disipan energía libre [$dG/dt < 0$]-
 - dG es la tasa de cambio de la energía libre de Gibbs-

	Equilibrones (E)	Disipadores (D)
Dinámica	<i>Movimientos Aleatorios</i>	<i>Movimientos Direccionales</i>
Cinemática	$dG/dt = 0$	$dG/dt < 0$
Local(L) Movim.	EL[Equilibrones Local]	DL[Disipador Local]
	<i>Fluctuaciones térmicas de los enlaces</i>	<i>Motores Moleculares</i>
Global(G) Movim.	EG[Equilibrones Global]	GD[Disipador Global]
	<i>Movimiento browniano molecular</i>	<i>Complejos enzimáticos, Potenciales de acción</i>

²¹ Culos D, Watanabe M. Testosterone-dependent oxygen consumption in membrane vesicles of *Pseudomonas testosteroni*. *J Steroid Biochemistry*, 1982; 17(1):67-69.

²² La Cinética mostrada en los experimentos del GIM es compatible con un Mecanismo de la Región Termodinámica de los Disipadores, con un Balance Entrópico-Entálpico $dG/dt \approx 0$.

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

La hipótesis que se defiende en este Modelo Conceptual es que los esteroides (la testosterona, como ejemplo), al llegar a la cara externa de la membrana plasmática, provocan la aparición de Canales de Isopolaridad e Isoentrópicos, zonas hidrófobas o anfóteras, tapizadas por moléculas de polaridad semejante y superficies de energía potencial mínima que formarán un Canal por el que fluirán las moléculas esteroideas en su afán de atravesar la membrana. En estos Canales, que actuarían a modo de solventes, la Energía Libre de Gibbs seguirá una evolución como si de una reacción isopolar se tratara, donde se estabilizan los Estados de Transición.

De estos Canales Pro-Inducidos se postula que sus características más determinantes son la Iso-Polaridad y la Iso-Entropía. La propia Testosterona, lípido esteroide, como detonante, es la que provoca su conformación.

La causa del inicio de la formación del canal, en el Modelo Conceptual propuesto, es la presencia de testosterona libre (el esteroide), sin que ello suponga eliminar la participación activa de otras moléculas en este proceso de auto-organización. Una vez desencadenada la respuesta en la membrana, con la generación del canal, la condición experimental de “facilitado, mediado, sin aporte de energía para el proceso”, deberá asumir una cualidad análoga: la Isoentropía.

La Isoentropía, el carácter Isoentrópico del canal, asegura una manipulación del grado de orden-desorden. Crea una especie de onda, pulso de propagación, de propulsión, por un acoplamiento

electromecánico (mecano-sensitividad, de efecto piezoeléctrico) a modo de efecto cuántico pero observable macroscópicamente. Esta onda es conocida como solitón (38). La integral de la diferencia del calor, a su vez dependiente de las variaciones de entropía, sería, aproximadamente, cero (- 0 -) (34).

$$\oint dQ = \oint TdS \approx 0$$

La Geometría del Canal

Todo lo anterior invoca un “Imperativo Topológico” desde los niveles subcelulares a los supracelulares (flujo, campos eléctricos,...) como el eje de polaridad en un ovocito. La organización espacial de los campos morfogenéticos se realiza a través de la interpretación topológica y en teoremas matemáticos como el de Poincaré-Hopf, Brauer y de Gauss-Bonnet (48).

Los toroides son objetos topológicamente estables y una opción muy favorable para proponer la geometría del canal postulado en el modelo. Las estructuras espaciales, unidades de base, en su construcción, minimizan el coste energético. Por ello,

la fractalidad (self-similarity) es una observación habitual en biología.

De ahí que en su travesía, moléculas lipídicas como los esteroides (testosterona en los experimentos) y, atendiendo al modelo propuesto, se induzcan los canales configurados por componentes afines (*ISO*) tanto en la polaridad como entrópicamente.

Se acumulan pruebas sobre el papel regulador de la cooperatividad sobre la funcionalidad de la membrana de la curvatura geométrica de la membrana (49).

En la misma línea de pensamiento se proponen matrices espaciales conformacionales que producirían una cascada de “*prionización*”²³ (en cuanto a la capacidad pro-inductiva de formas bisemejantes -*ISO*-) a nivel celular, que sigue el eterno bucle de la Naturaleza: Reiteración por Analogía hasta el infinito.²⁴

Una vez constituido el canal, el paso de moléculas esteroides hacia el citosol se producirá al ritmo que la concentración de hormona libre empuje desde la cara externa: constituyendo un Estado Estacionario. Si el proceso, con el apoyo de los datos experimentales, es saturable, inhibible, específico, sin coste *aparente* de energía, responderá a las características del transporte mediado (facilitado) (Figura 18).

²³ Este proceso de “prionización” se aplica en fisiopatología cada vez más (síndrome de Parkinson, de Alzheimer, entre otros).

²⁴ En Wartofsky MW. Introducción a la Filosofía de la Ciencia. Alianza Editorial. 1976. Homologando el pensamiento científico y la naturaleza. Es la noción de circularidad “ $f(f) = f$ ” (Cabell KR, Valsiner Jaan. Chapter 1, Systematic Systemics: Causality, Catalysis, and Developmental Cybernetics. In The Catalyzing Mind Beyond Models of Causality. Springer, 2014; Cornish-Bowden A, Cárdenas ML, Letelier JC, Soto-Andrade J. Beyond reductionism: metabolic circularity as a guiding vision for a real biology of systems. Proteomics, 2007; 7: 839–845).

Fisiología del Canal

CANAL POSTULADO EN EL MODELO

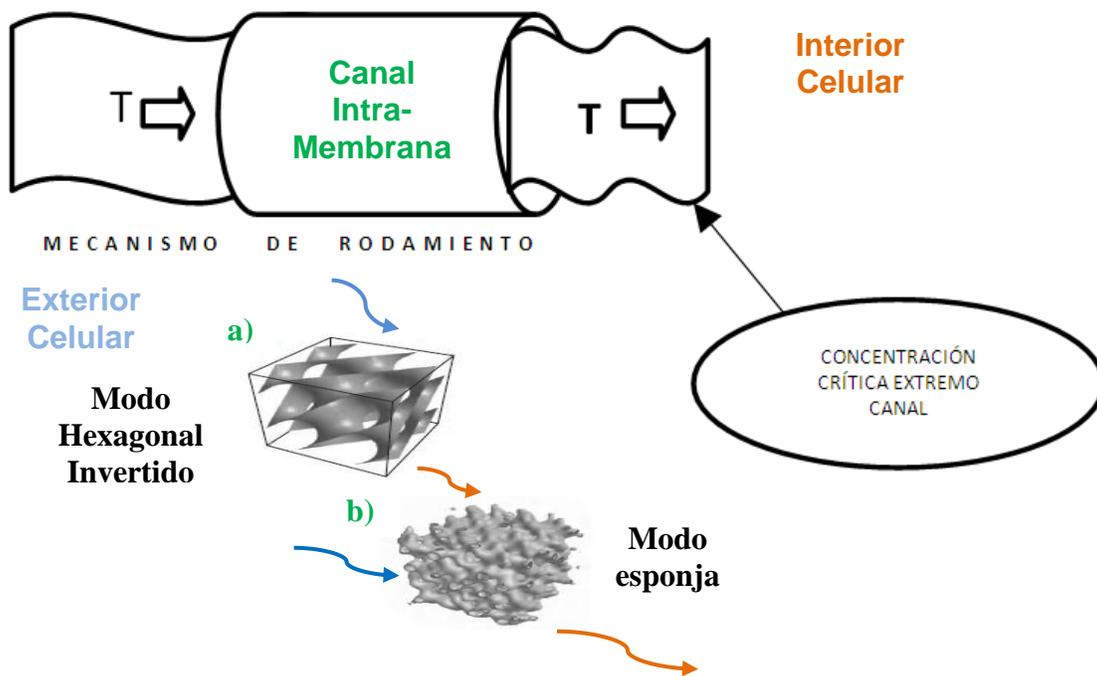


Figura 16.- Las agregaciones assemblearias de Agua-Lípido intra-membrana generadas por auto-organización son muy coherentes con nuestro modelo. La estereología lipídica más idónea para el rodamiento es: a) modo hexagonal invertido, y (b) modo esponja. Tanto a) como b) son compatibles con un toroide y/o un catenoide. (Garti N, Somasundaran P, Mezzenga R Ed.. Self-Assembled Supramolecular Architectures. Wiley. 2012. New Jersey, Canada).

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

El proceso se ajusta a una Estructura Disipativa (Disipatón), que contiene estructuras en equilibrio, Equilibrones, y se manifiesta a través de ciertos Procesos y Mecanismos como se muestra la relación Triádica en la figura 17 (47).

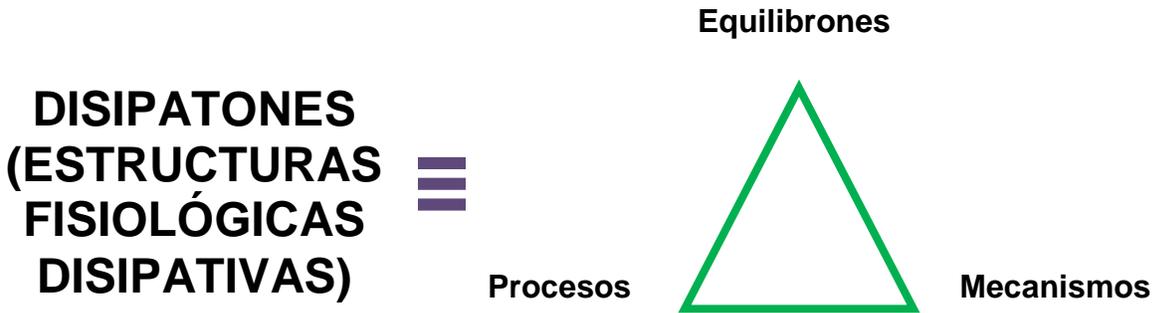


Figura 17.- Disipatones, las Estructuras Fisiológicas Disipativas.

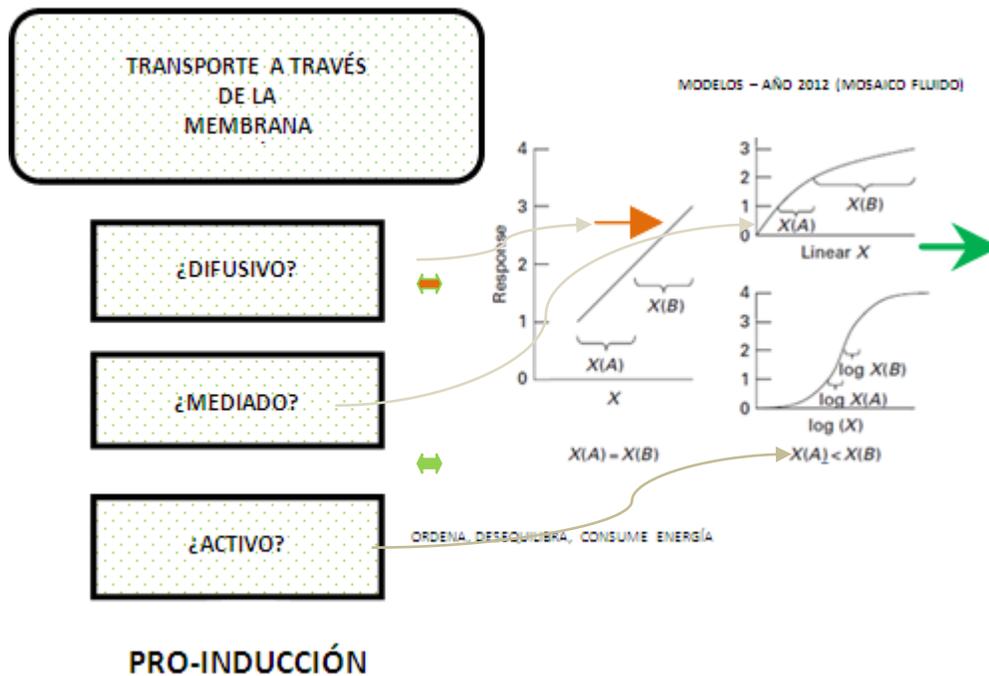


Figura 18.- En el Transporte Mediado, Facilitado, la cinética es hiperbólica. El arranque de la curva, en procesos donde la cooperatividad se exhibe en los segundos iniciales, con un análisis más detallado, podría acercarnos a una curva sigmoide.

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.



Figura 19.- El Transporte pasivo rinde energía, es un proceso favorable, sin embargo, el mediado y el activo es *no* favorable y precisa un aporte de energía en el instante o depositada con anterioridad.

Además, las hormonas esteroides viajan por la sangre unidas a proteínas transportadoras y funcionan interactuando con proteínas en el citosol y en el núcleo (Figuras 14 y 15).

Se sabe que el grado de polaridad de las moléculas esteroideas parece ser el mejor predictor de su permeabilidad a través de la membrana plasmática que su coeficiente de solubilidad lipídica. La carga eléctrica asociada a los fosfolípidos de membrana se ha sugerido para su aplicación en el diagnóstico o tratamiento, tras un estudio en humanos sobre tejidos cancerosos de riñón sin metástasis (50) y en células humanas de mama cancerosas (51).

Se ha propuesto por Wenz (52) un modelo de regresión logística. Es capaz de predecir la actividad de los esteroides sobre la membrana en función de sus características químicas. Adjundicándole a los esteroides una cibernética Promotora o Disruptora sobre la Dinámica de la Membrana en función del número de átomos de carbono, de si está presente el grupo ceto u hidroxilo en el C3, o de la existencia de grupos polares en el C17, o bien de

un doble enlace entre el C4 y C5, o de la longitud de la cola del núcleo del CPF (Ciclopentanoperhidrofenantreno) (Figuras 20, 21); Esquemas II y III).

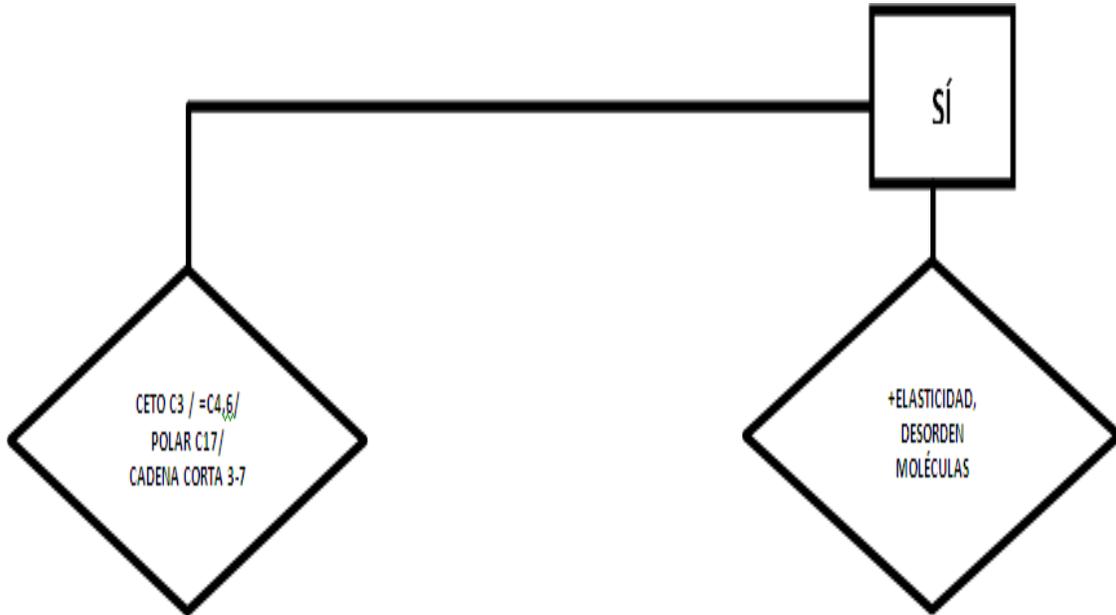


Figura 20.- Características de los esteroides y su capacidad morfológica sobre la membrana como Disruptores. Originando Elasticidad y un Caos como fuente de orden. [Diagrama (Parcela) del Modelo Conceptual].

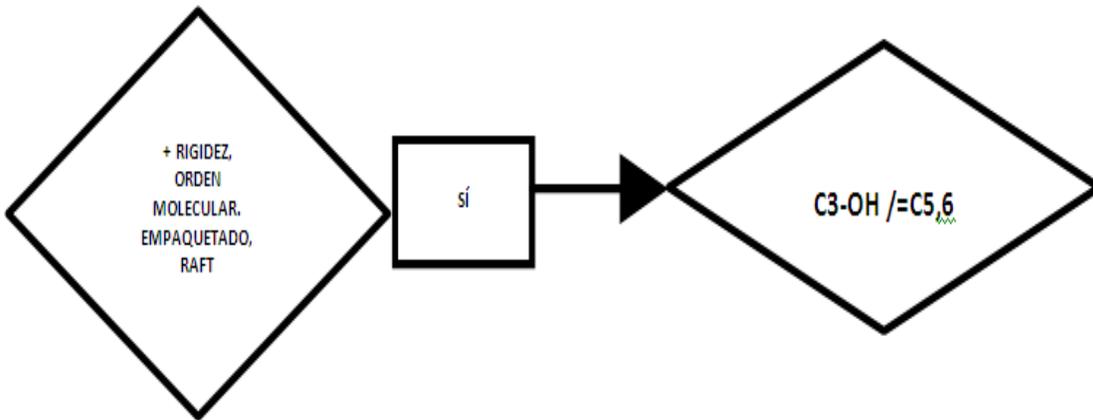
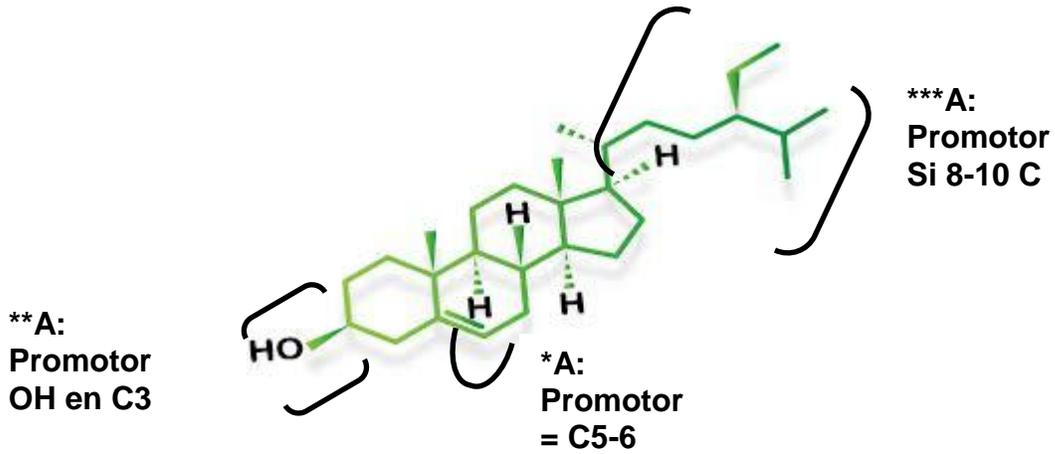


Figura 21.- Características de los esteroides y su capacidad morfológica sobre la membrana como Promotores: Originando una Mayor Rigidez y un Empaquetamiento. El “Orden” clásico como fuente de inmovilidad. [Diagrama (Parcela) del Modelo Conceptual].

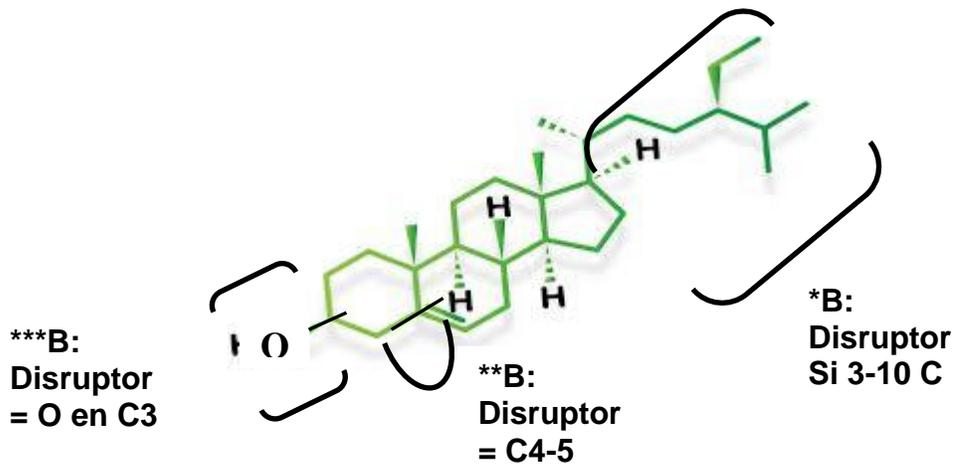
Esquema III.-

A: PROMOTORES DE LA RIGIDEZ, EMPAQUETAMIENTO, ESTABILIZACIÓN DE LAS BALSAS



Esquema IV.-

B: DISRUPTORES DE LA RIGIDEZ, EMPAQUETAMIENTO, ESTABILIZACIÓN DE LAS BALSAS



MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

Debido a que la captación de moléculas de medio o pequeño tamaño es un proceso secuencial extremadamente rápido, las tradicionales técnicas de incubación celular carecen²⁵ de la resolución temporal suficiente para definir la captación unidireccional, instantánea, de esteroides.

Aunque hasta hace poco en los estudios de transporte se manejaba, solamente, el concepto de transporte neto, hay que tener en cuenta que este término es el resultado de la suma aritmética de los vectores de entrada y de salida del substrato a la célula.

El que la vida se desarrolle en un ambiente acuoso, es decir, polar, determina que los lípidos, estructuralmente apolares, tengan que acomodarse a un medio hostil rentabilizando al máximo sus diferencias de polaridad. Por ello, las moléculas lipídicas parecen responder al instinto de supervivencia (situarse en mínimos de entropía, o de máxima disipación de energía y/o entropía) tendiendo a formar estructuras organizadas al menor coste energético posible.

Los lípidos, en los sistemas biológicos, como el resto de la materia viva, no están en equilibrio termodinámico, en el sentido de máxima entropía, ni estructural ni funcionalmente, ni en el plano local ni en el orgánico.

Así las separaciones de fase y los dominios transmembrana o laterales pueden diferir fundamentalmente en distintas situaciones fisiológicas (entendiéndose como tales,

²⁵ Con la Técnica de McGee-Perán se aportan datos complementarios de la captación unidireccional de gran valor sobre los procesos estudiados, pues se aproxima a las condiciones fisiológicas.

incluso las “patológicas”, en el sentido que son “naturales”, “reales”).

En la Figura 22 se muestra la gráfica obtenida del seguimiento lineal de Estado en relación a distintas variables termodinámicas y cinéticas. Se puede observar que en la Zona de Transición la correlación lineal se torna hiperbólica lo que implica la complicación del proceso. En los experimentos, y según el dispositivo, se puede vislumbrar la “Transición” desde un comportamiento Lineal a No Lineal, tanto en la Cinética como el Comportamiento Termodinámico (ΔX_c , representan los incrementos críticos a los Variables de Estado Termodinámicas, de la Constante de Michaelis, de h (coeficiente de Hill) y de la Velocidad Máxima).

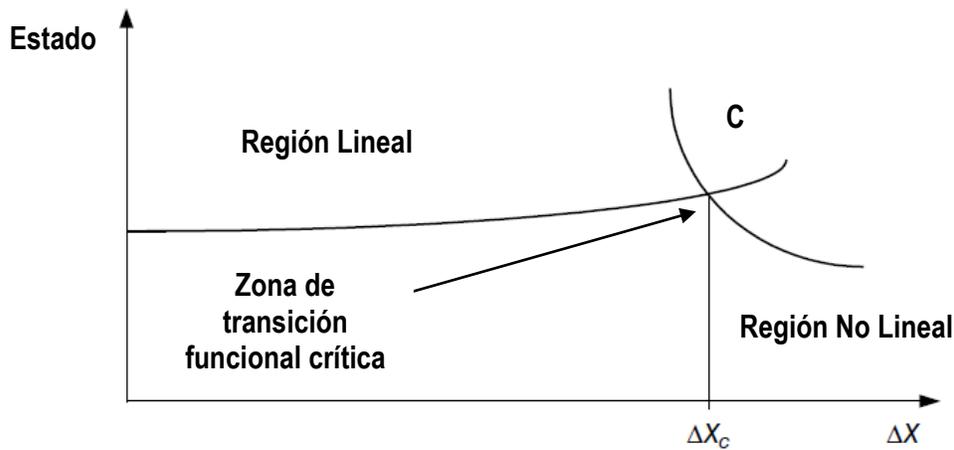


Figura 22.- La Asimetría Fundamental de la Membrana Biológica condiciona las respuestas fisiológicas No lineales.

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

En los experimentos aportados como apoyo empírico del modelo propuesto, la diferenciación de ambos vectores se ha podido conseguir utilizando una técnica de flujo continuo y doble dilución isotópica en células aisladas y perfundidas.

Además, las condiciones estáticas de los protocolos de incubación distorsionan bastante la situación dinámica del funcionamiento fisiológico. Así y, aparte de tener que romper las células para medir la cantidad de substrato acumulada en su interior, en cuanto los tiempos de incubación superen los 30 segundos, lo que se mide es el resultado de recaptaciones de substrato marcado que han vuelto a entrar en la célula después de salir, tras la primera captación.

El reflujo celular en los experimentos de incubación modifica continuamente la concentración del medio por lo que es difícil tener una referencia clara de la concentración de la que se parte.

La aplicación de una técnica de flujo continuo a una población homogénea de células ofrece la posibilidad de poder estudiar secuencialmente las sucesivas respuestas con una resolución temporal de segundos, en condiciones experimentales que se acercan a las fisiológicas y que pueden ser modificadas fácilmente.

Al tratarse de un sistema de dos compartimentos se pueden obtener, con manipulaciones sencillas, preparaciones experimentales que reproducen bastante fielmente los modelos naturales. Por ello los datos obtenidos con este método no pueden ser comparados con los obtenidos en experimentos de incubación en donde los comportamientos cinéticos son el resultado de la agregación de una serie de diferentes experimentos discretos realizados con

poblaciones distintas de células y en períodos de tiempo diferentes.

Es una tónica constante de las metodologías, en las técnicas asociadas, emular las condiciones “reales” fisiológicas o patológicas. La técnica desarrollada por el grupo de transporte a través de membranas descrita por Perán y McGee reúne condiciones para considerarla como fisiológica (o ampliamente entendido el término, en el sentido de interferir lo mínimo posible, si el experimento es sobre una masa biológica o una patológica).

Una ventaja esencial de la técnica es la resolución temporal para la captación instante a instante y unidireccional -requisitos indispensables para un modelo “real”, “natural”-. El uso de análogos de lípidos que llevan un resto indicador "podría introducir artefactos".

El propio Mouritsen sigue advirtiéndolo (Encyclopedia of Biophysics, 2013, Springer) (53):

" Most of the existing knowledge about lipid and membrane thermodynamics and its implications for membrane function has been obtained from physical chemical studies of simple membrane systems under mostly thermodynamic equilibrium conditions. The same is true of most experimental models that typically are carried out as test tube experiments. Many membrane systems studied in the laboratory are not considered in the full functional state, and the experimental measurements usually pertain to some kind of equilibrium or near-equilibrium state "

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

La captación unidireccional de testosterona medida durante los primeros 10 a 20 segundos, depende enteramente de mecanismos de membrana y no se ve influida significativamente por la conversión intracelular de testosterona en dihidrotestosterona durante ese periodo de tiempo. El uso de una técnica de doble dilución isotópica y flujo continuo, como se ha visto, permite diferenciar la captación unidireccional de la captación neta, individualizando los dos componentes del transporte neto. Ni para interpretar el mecanismo de entrada ni para realizar estudios cinéticos tiene valor el término captación neta.

Es de gran interés, por el contrario, profundizar en las interacciones que ocurren en los primeros segundos. Alléra y col. (54,55) utilizando una técnica de dilución, han calculado que la corticosterona tarda 8,3 segundos en alcanzar el transporte máximo, resultados del mismo orden que los que se muestran en este trabajo.

La captación de testosterona tritiada por fibroblastos humanos es un proceso dependiente de la temperatura y puede ser inhibida por altas concentraciones de testosterona libre en el fluido extracelular. Hay muchos trabajos que publican resultados sobre la modulación por la temperatura y por proteínas de transporte (56).

Cuando la captación de [³H]T es representada frente al incremento de la concentración extracelular de sustrato se puede apreciar una inhibición de la captación de [³H]T. El perfil de la inhibición sugiere que la captación puede tener dos componentes, uno de alta y otro de baja afinidad (no saturable).

Otros autores han mencionado la posibilidad de que pueda haber más de un modelo que explique la entrada de esteroides en las células (41). Autores que utilizan técnicas de incubación

postulan que la captación de estrógenos por células hepáticas de rata es un proceso saturable y dependiente de la temperatura (57).

Los resultados de los experimentos de carga en los cuales las células son expuestas a una concentración de testosterona 10^{-6} M durante 30 minutos, sugieren que los esteroides modifican la respuesta de membrana en función del tiempo (Figura AE6 (A y B), página 77 de esta memoria) (58).

La primera reacción de la célula al recibir la información que transmiten estas hormonas puede ser la adaptación a la calidad y cantidad de la molécula que recibe. La inhibición observada en la captación unidireccional y en el flujo neto de [3 H]T después de incubar las células con testosterona 10^{-6} M durante 24 horas, defiende la posibilidad de la existencia de una adaptación celular a los niveles extracelulares de testosterona que incluyen síntesis de proteínas.

Rao (59) encuentra que la sensibilidad a los cambios de temperatura en el hepatocito entero es mayor que la de la fracción citosólica, lo que puede interpretarse como que la membrana puede adaptarse a los cambios del medio. Su trabajo defiende la hipótesis de que es la membrana y no el citosol quien regula la entrada de esteroides. Este proceso de selección puede que se inicie con el reconocimiento de las proteínas que transportan a los esteroides por la sangre y que van a descargar a las hormonas en la zona de la membrana en donde exista capacidad de paso hacia el interior.

Participación Activa de la Membrana en el Transporte de Esteroides

Los experimentos en los cuales se inhibe la captación de [³H]T por un pulso de testosterona 10⁻⁶ M administrado durante la fase de estado estacionario en los protocolos de carga, parece proveer evidencia de que la membrana participa activamente en el transporte de esteroides a través de su estructura hacia la célula. Si el proceso se ajustase a una difusión simple, el aumento de la concentración extracelular de testosterona provocaría un aumento de la captación de [³H]T, pero la inhibición apreciada de la captación de [³H]T durante el pulso extracelular de testosterona, sugiere que el transporte de testosterona a través de la membrana de los fibroblastos es un proceso mediado (Figura AE8, (A y B), página 83 de esta memoria).

El carácter Pro-Inductivo de la Testosterona

Dado el carácter lipídico de los esteroides, se propuso hace tiempo, como se ha citado, que deberían entrar en la célula por un mecanismo de difusión simple. Pero también desde hace tiempo se mantiene que puede tratarse de un proceso mediado.

Como, por otra parte, se han podido detectar respuestas muy rápidas de los esteroides con latencias de hasta milisegundos, se puede deducir que no es necesario su paso a través de la membrana para iniciar alguna de sus acciones y que por lo tanto

debe existir algún mecanismo en la propia membrana capaz de interpretar el mensaje hormonal. Lo cual implica que la membrana no siempre se va a comportar de manera pasiva ofreciendo solamente su soporte lipídico como vehículo inerte para el paso de esteroides y otros compuestos apolares. En estos últimos años se acumula nuevas pruebas de que los esteroides activan receptores de la superficie celular para desencadenar señales rápidas (estrógenos, progestágenos, andrógenos y corticosteroides) (58).

Las hormonas esteroideas derivan químicamente del colesterol, una molécula que contiene un grupo OH cuyo oxígeno procede de la atmósfera. El colesterol apareció en la biosfera después de que la vida se hiciera aeróbica, cuando se coloniza la superficie de la tierra y surge la necesidad de mantener un medio interno substancialmente diferente del externo.

La función más importante del colesterol es la que realiza sobre la estabilidad de las membranas controlando su fluidez. Si la diversidad de las acciones de las hormonas esteroideas son el resultado de la especialización de unas funciones primitivas realizadas a nivel de membrana y que se iniciaron con el colesterol, no debería extrañar que sigan manteniendo su familiaridad con la misma y que las interrelaciones entre ambas sean más complejas que las que se refieren a la difusión simple.

Los esteroides son, por consiguiente, en primer lugar hormonas que participan en los mecanismos de control de funciones vitales muy importantes por lo que su paso por la membrana debe ser analizado no solo cuantitativamente, sino

también cualitativa y temporalmente. No hay que olvidar que estas hormonas son las responsables de actividades cíclicas a nivel del organismo en general y a nivel de tejidos y sistemas individuales.

Desde un punto de vista estrictamente químico el problema central de la biología moderna es tratar de entender la organización tridimensional de las células, especialmente las interacciones moleculares.

**El Modelo Conceptual con el Apoyo
de los Resultados Experimentales
sugiere un Transporte Facilitado
y la Conformación de un Canal**

Por eso es necesario intentar interpretar el paso de las hormonas esteroides como un mecanismo de interacción guiado y no solamente como un proceso de difusión simple. Para ello hay que tener en cuenta una serie de características de las membranas que pueden condicionar este tipo de interacciones.

Actualmente se utiliza el modelo de mosaico fluido para explicar la funcionalidad de las membranas, resultado de una intensa investigación morfo-funcional. La membrana plasmática se puede representar como un puzzle compuesto por una serie de paneles individuales que aunque están interrelacionados entre si,

desarrollan actividades distintas dependiendo de propiedades fisicoquímicas diferentes entre las que cabe destacar la variación de la polaridad que desde hace tiempo se conoce que puede ser muy amplia (46).

Los Lípidos comienzan a revelarse como posibles receptores, con capacidad de auto-organización y de organización de otras moléculas y de la membrana

Un primer requisito para el paso de las hormonas esteroideas a través de la membrana plasmática sería el reconocer y ser reconocidas por la zona de membrana con una polaridad compatible con el paso del esteroide a través de la misma.

Es fácil sospechar que este reconocimiento mutuo puede depender de proteínas de membrana y de las proteínas transportadoras de esteroides (61). Sin descartar que los propios lípidos de membrana sean capaces de operar en el mismo sentido que las proteínas, contribuyendo significativamente, y con protagonismo.

La organización de la membrana plasmática de las células es el resultado de un conflicto entre moléculas que, a pesar de sus diferencias funcionales no tienen más remedio que entenderse.

En este contexto hay que situar la ironía con la que Ole Mouritsen resume la opinión de algunos biólogos sobre los lípidos (Transmembrane dynamics of lipids, Wiley, 2012) (31):

"Los lípidos parecen jugar un papel no muy específico, siendo su función más bien opaca y anónima en comparación con otras biomoléculas de moda como las proteínas que catalizan todas las reacciones bioquímicas y los genes que contienen la información necesaria para producir proteínas".

Trabajos a favor de una activa participación de los lípidos de membrana en la función celular se prodigan cada vez más. Los antipsicóticos interaccionan con los lípidos de la membrana plasmática induciéndoles a una reorganización, en particular sobre los esfingolípidos y el colesterol constitutivo de la membrana y condicionan una compartimentación modificando el receptor para la dopamina (62).

McGee ha aplicado el método de doble dilución en células perfundidas al estudio de la activación de factores de coagulación en la membrana plasmática. Analizando la cinética de las reacciones de coagulación que se inician por la interacción de los factores de coagulación con la superficie de la membrana, ha visto que aunque la adsorción de proteínas dependientes de la vitamina K por la superficie de membrana procoagulante se cree que es rápida y que correlaciona con el flujo de la fase acuosa, el índice de generación del factor Xa es independiente tanto de la densidad de enzima como del flujo.

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

Utilizando la técnica de dilución combinada con estudios bajo condiciones de estrés osmótico (63) se ha mostrado que la velocidad de flujo influye sobre la cantidad total de reactivo adsorbido por la membrana y sobre el rendimiento, pero no sobre el índice (ritmo) de producción. Los resultados experimentales aportan evidencias sobre un mecanismo cinético limitado por la transferencia lenta de substratos entre los lugares de adsorción inicial por la membrana y los lugares de reacción.

La hipótesis de un paso lento en la membrana fue probada resolviendo numéricamente una serie de ecuaciones cinéticas no lineales que describen la evolución de todas las especies reactivas de la membrana.

Los resultados experimentales fueron reproducidos cuando el paso limitante siguió a la adsorción de substrato por la membrana y precedió a la catálisis enzimática. Estos resultados pueden explicarse utilizando un modelo en el cual la concentración de enzima presenta un relativo exceso local, y sólo una fracción de la superficie enzimática participa efectivamente en la catálisis.

Si los complejos enzimáticos forman dominios en la superficie de la membrana, de hecho la reacción enzimática puede esperarse que ocurra solo cerca del perímetro de esos dominios enzimáticos en donde encontrarán los substratos a la enzima tras difundir una distancia determinada tras su adsorción por la membrana.

Estos resultados son sumamente interesantes, no solo porque extienden la utilidad de la técnica de perfusión, sino sobre todo, porque explican un caso concreto de compartimentación de la membrana. Este paso lento actúa a modo de cuello de botella que marca el ritmo de generación del producto.

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

La segregación de moléculas en la superficie de las membranas es un fenómeno común. Hay evidencias de que incluso pequeñas moléculas pueden formar dominios en las monocapas lipídicas y en las vesículas bicapa.

Hasta ahora se admitía de forma general que la difusión transmembrana espontánea de los lípidos era muy lenta en liposomas de cualquier tamaño, así como en las membranas biológicas. Pero algunas algunas excepciones a esta regla han sido descubiertas recientemente.

El colesterol (reconocido como mediador local con anterioridad), ceramidas, ácido fosfatídico, diacilglicerol y ácidos grasos libres o ésteres pueden presentar una rápida difusión espontánea ($t_{1/2}$, menos de 1 minuto). Se ha indicado que la ausencia de verdaderos grupos funcionales con cabezas polares de los lípidos en cuestión probablemente explica este resultado inusual. Todo ello acorde con el modelo propuesto.

Un amplio cuerpo experimental también aporta evidencias de que existen dominios proteicos y lipídicos en las membranas de las células vivas. Por ejemplo, las moléculas de adhesión localizadas en los lugares de contacto intercelular y en los receptores se encuentran a menudo concentrados en la punta de filopodia y lamelopodia de células movibles.

Así, un grupo de trabajo con participación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) ha desvelado nuevos datos sobre el modo en que las células epiteliales se comunican entre sí. El trabajo, llevado a cabo en epitelios de la mosca del vinagre (*Drosophila melanogaster*), revela cómo las células emiten unos filopodios muy finos, llamados citonemas, para

transportar la proteína Hedgehog hasta las células receptoras. La transmisión de esta señal es semejante al mecanismo que utilizan las neuronas para comunicarse (64).

Los receptores de los neurotransmisores también se encuentran localizados en agregados dinámicos. Quesada MP, en su trabajo de Tesis Doctoral realizado en la Universidad de Durham, ha demostrado que las subunidades del receptor de GABA que se encuentran agrupadas se desplazan individualmente a la zona en donde llega el mediador (Ilustración XIII²⁶). Es decir, la membrana postsináptica se adapta a la llegada del transmisor para realizar su función (22, 23).

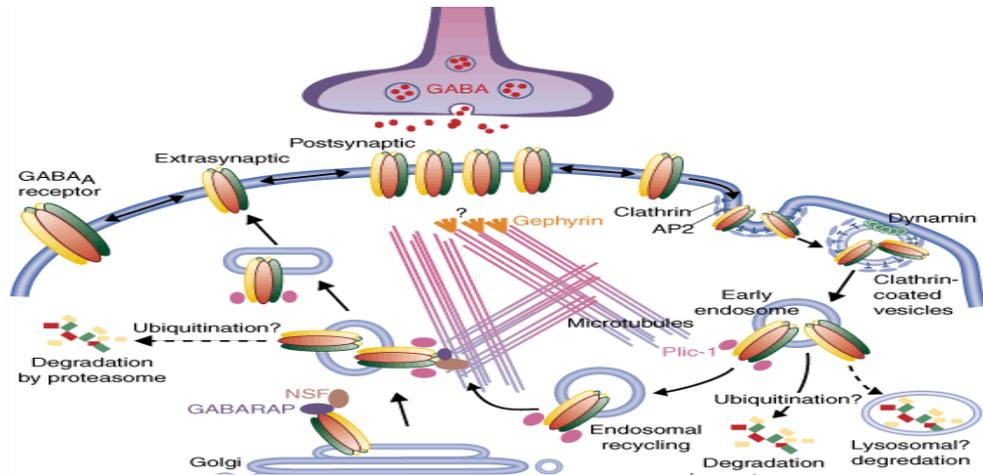


Ilustración XIII .- El Receptor del GABA navega sobre la Membrana Plasmática al encuentro del neurotransmisor GABA, para internalizarlo.

Cualquier membrana de una célula diana de la acción hormonal, puede considerarse como una membrana postsináptica pues tiene que interpretar y ejecutar un mensaje molecular que le llega por vía humoral.

²⁶ Disponible en : http://www.nature.com/ncb/journal/v3/n10/fig_tab/ncb1001-e232_F1.html

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

La visualización directa con métodos inmunoquímicos revela la localización de ciertas proteínas en áreas de alta o baja curvatura en vesículas artificiales. Utilizando estas técnicas en células fijas tras exposiciones cortas al fVIIa, McGee ha localizado las enzimas en el borde de una hendidura de la superficie de la membrana. Análisis de distancias muy cercanas indican una distribución no fortuita de las enzimas.

Aunque los mecanismos de la formación de dominios son desconocidos, es posible que puedan deberse a una transición de fase inducida por fuerzas electrostática, por dipolos, por cambios de elasticidad provocados por interacciones proteína-proteína o por interacciones hidrófobas.

Se especula acerca de los residuos con carga positiva de aquellas proteínas que interactúan sobre todo con lípidos que llevan grupos de cabeza polar de cargas opuestas, tales como PS (Fosfatidil Serina), o cargados negativamente con residuos de aminoácidos con PS a través del ión calcio divalente, y así induzcan la disposición asimétrica de estos lípidos.

Hoy se sabe que, al igual que ocurre en el interior hidrófobo de las proteínas globulares, existen unas pocas moléculas de agua entre las moléculas estructurales de las membranas. La transferencia de agua durante las reacciones bioquímicas y en los acoplamientos cooperativos, puede ser cuantificada mediante el estrés osmótico (EOS) inducido por cosolutos inertes que excluyen al agua de los espacios permeables (65).

El incremento de energía libre, ΔE , entre dos fases sucesivas contiene los siguientes aportes energéticos importantes, donde el Agua juega un papel relevante - $\Delta E_{\text{hidratación}}$ -, todos los sumandos participan en la conformación del Canal Isopolar-Isoentrópico propuesto en esta memoria:

$$\Delta E = \Delta E_{\text{elástica}} + \Delta E_{\text{hidratación}} + \Delta E_{\text{van der Waals}} + \Delta E_{\text{electrostática}}$$

La participación del Agua puede resultar decisiva en la creación del canal y en el empuje de la molécula de esteroide hacia el interior celular. La formación de Clatratos de Agua de distinto nivel (y grado asociado de Entropía) permiten un mejor y afinado Balance Entrópico-Entálpico (Ilustración XII) (13,14). No ha de olvidarse que la fuerza de cohesión de las membranas procede de la interacción polar y no polar entre moléculas. El carácter polar tiene como referencia la molécula de agua.

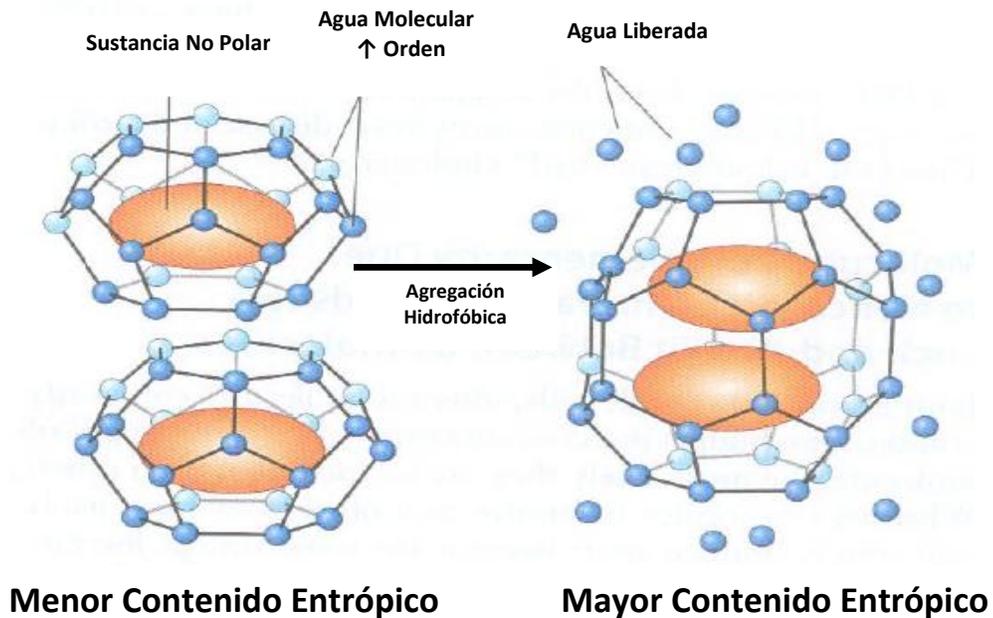


Ilustración XIV.- Contenido Entrópico de los agregados acuosos.

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

Aunque las macromoléculas se encuentran estrechamente empaquetadas por fuerzas débiles, solutos inertes pueden desplazar las escasas moléculas de agua que se encuentran acopladas entre las proteínas, entre las bicapas, entre hemoproteínas y en general entre todo tipo de macromoléculas.

La medida del EOS (Estrés Osmótico) ha revelado una amplia y sorprendente influencia de la actividad del agua sobre las reacciones macromoleculares y las transiciones de fase. En su forma más simple, el estrés osmótico representa el potencial químico del agua en unas determinadas condiciones de temperatura, presión, pH y fuerza iónica. Su valor aporta una información muy interesante y puede ser calculado fácilmente.

McGee ha realizado estudios cinéticos en condiciones de estrés osmótico en combinación con análisis estructurales en las interfases de una solución de esfingomiélin, colesterol y proteínas-esteroides, utilizando un método geometría computacional (66).

En el laboratorio, McGee, para medir la transferencia de agua durante la agregación de testosterona unida a proteína transportadora a la solución de lípidos, equilibró la reacción de mezcla en presencia de cosolutos inertes cuyos pesos moleculares oscilaban entre 98 a 500.000:

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

- Glicerol
- Manitol
- PEG de peso molecular de 300 a 8000
- Polivinilpirrolidina (PVP) PM 40000
- Dextrano (DT) 10000 y 500000.

La presión osmótica de las soluciones de DT500 y PVP40 fue determinada directamente por osmometría de membrana (Wescor 4420 colloid osmometer; Wescor, Logan, UT). La presión generada por los otros solutos fue extrapolada de la relación empírica publicada (65). La viscosidad del PVP, PEG y DX fue medida con un viscosímetro de dos brazos (Internal Research Glassware, Charlotte, NC).

Los datos experimentales obtenidos fueron analizados utilizando un programa previamente descrito (63). Los resultados teóricos que resultan de estos experimentos visualizan agrupaciones zonales de las distintas moléculas combinadas, lo que puede interpretarse como la formación de dominios moleculares que no contradicen la posibilidad de formación de canales de isopolaridad/isoentrópicos cuando estas agrupaciones se realicen en la superficie de la membrana plasmática (Figura 23).

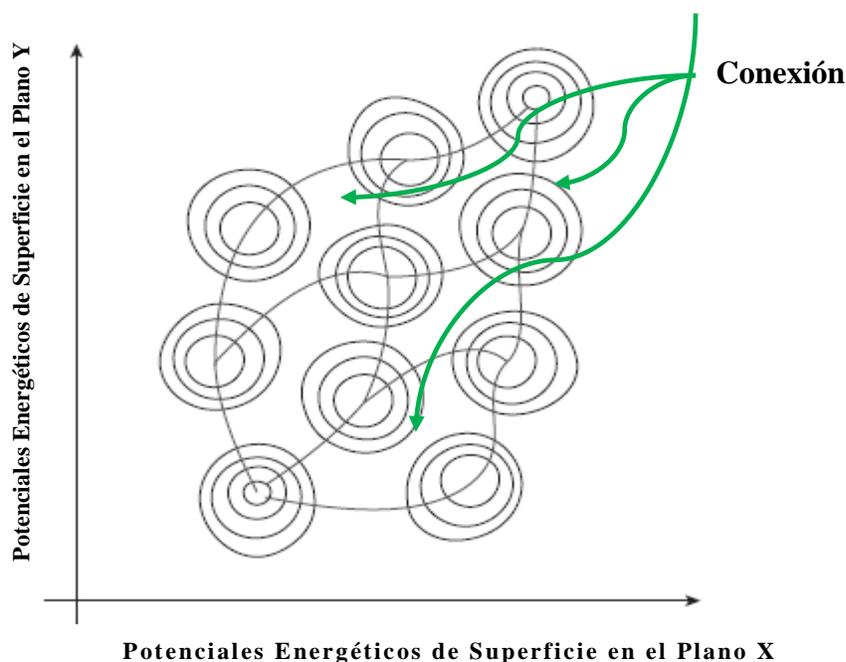


Figura 23.- Ilustración esquemática de las diferentes vías que conectan potenciales energéticos mínimos distintos. De esta manera la solvatación, por ejemplo con moléculas de agua, de lípidos o mixtas (lípidos-agua, lípidos-proteína, lípidos-mineral-agua,...), contribuirá al más óptimo de los Balances Entálpico-Entrópico. Y causando la Acción, el Movimiento, la Morfogénesis del Canal y el Impulso en su interior de la Hormona Esteroide. [Biman Bagchi, Molecular Relaxation in Liquids. Oxford University Press, 2012. p. 147].

El proceso de solvatación de una carga de nueva creación que rodea moléculas dipolares implica principalmente:

- a)** el movimiento de rotación,
- b)** el desplazamiento traslacional, y
- c)** el movimiento de libración de las moléculas del disolvente dipolar.

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

De este modo, los tres pueden contribuir a la estructura polarizada definitiva. En realidad, la diferencia en el grupo de cabeza de los lípidos desde ambos lados de la membrana no es la única diferencia entre los lípidos más externos o internos.

Una diferencia en la insaturación está asociada con variaciones en la viscosidad de membrana, como se observa en los eritrocitos con lípidos spín-marcados y con los lípidos fluorescentes: la monocapa interna es más fluida, la exterior es más rígida.

Las relaciones entre la longitud de cadena lipídica, la Presión Osmótica, la Fracción de Agua hidratando a los Lípidos y la Temperatura se muestran en las figuras siguientes (Figuras 24, 25 y 26). En las distintas fases se observan las disposiciones de los lípidos en Lamelar, α o β , no Lamelar, Hexagonal, o mezclas.

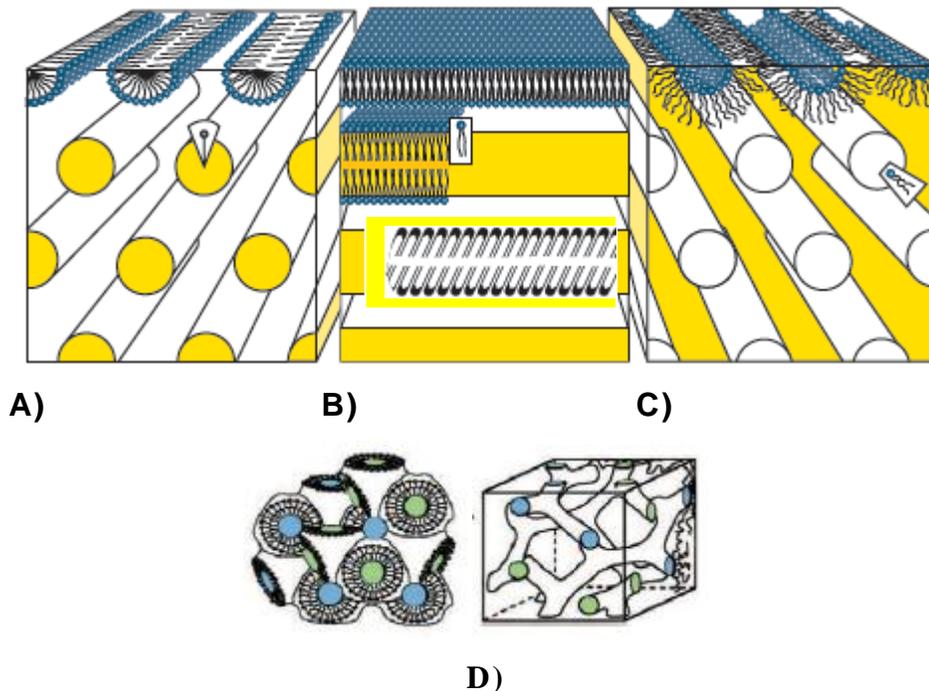


Ilustración XV.- Recreación de la Fase Hexagonal I [A)], Lamelar [B)], Hexagonal II [C)] y Cúbica [D)]. (Mary Luckey. Membrane Structural Biology, Second Edition. Cambridge University Press, 2014).

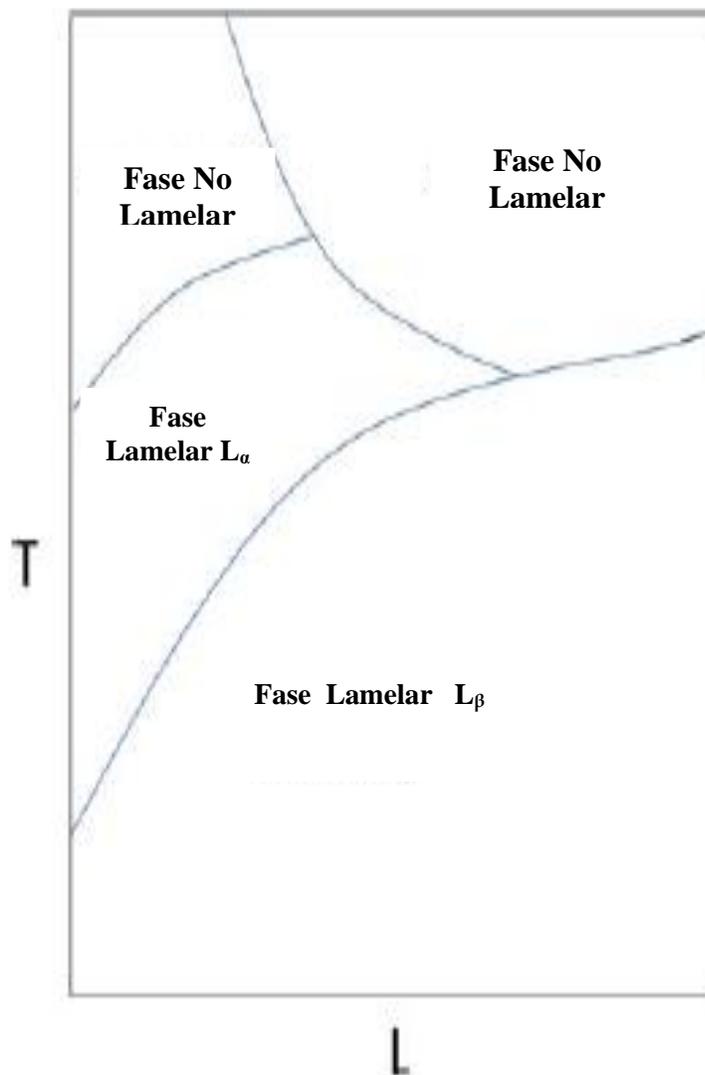


Figura 24.- Diagrama de fases²⁷ que muestra las diferentes fases de lípidos y la dependencia de la temperatura en la transición de fase (**T**, temperatura) en relación al cambio de longitud de la cadena de hidrocarburos (**L**).

²⁷ Ashrafuzzaman M, Tuszyński J. Chapter 3, Lipids in membranes. In Membrane Biophysics. Springer-Verlag. 2012. Berlin Heidelberg.

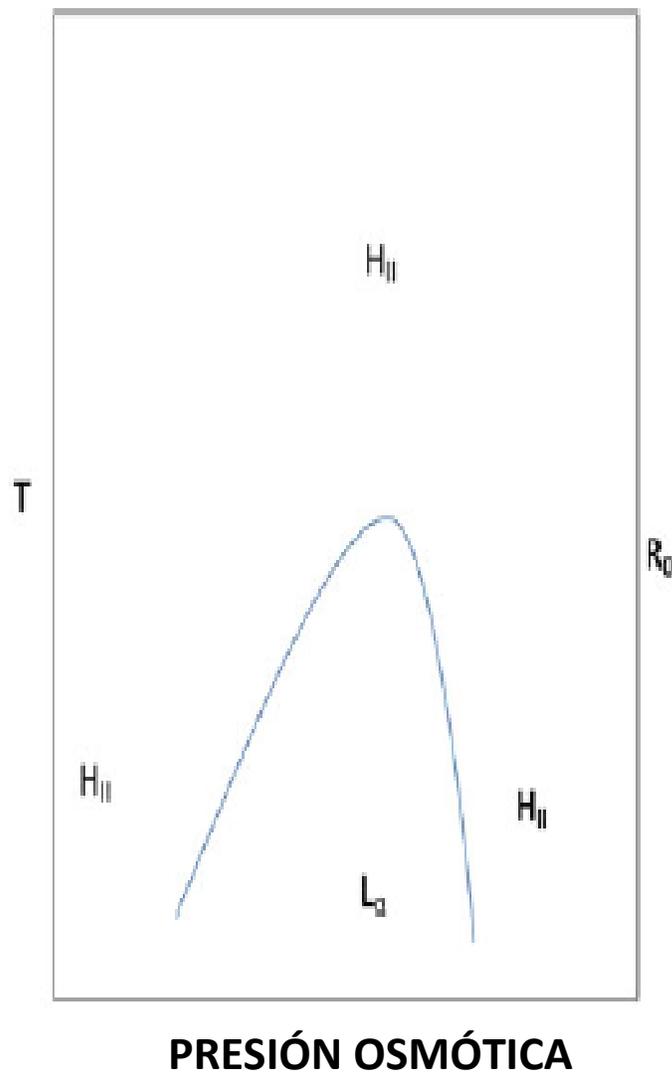
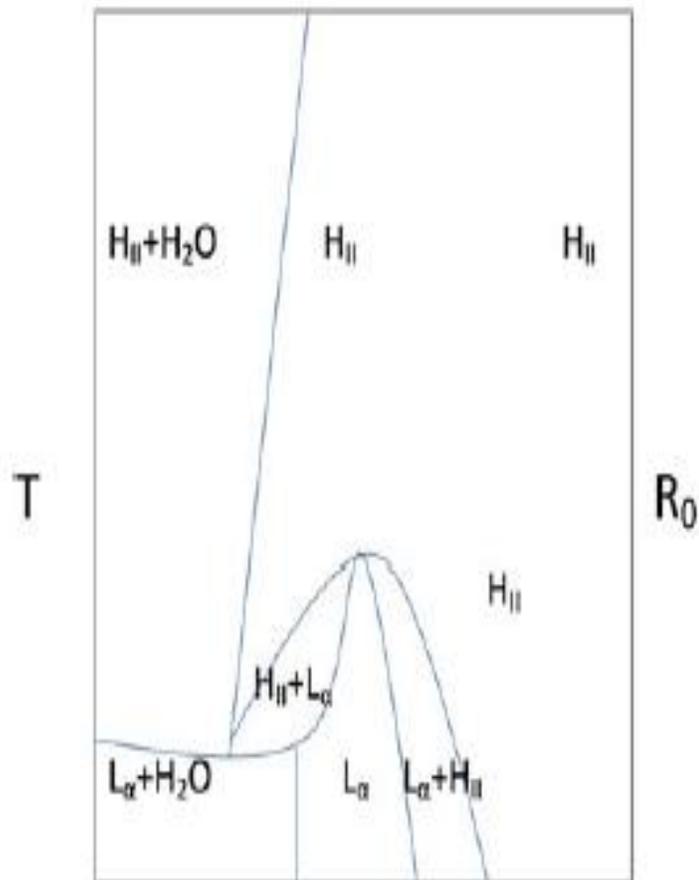


Figura 25.- Diagrama de fase²⁴ mostrando la relación de la Temperatura con la Presión Osmótica. La pendiente y la forma de la curva de separación de fases lamelar (L) y hexagonal (H), pueden cambiar drásticamente entre los diferentes lípidos, a pesar del hecho de que pueden sufrir el mismo tipo de transición de fase. R_0 (dado en Å) representa la curvatura intrínseca de los lípidos.



FRACCIÓN de H₂O HIDRATANDO LÍPIDOS

Figura 26.- Diagrama de Fases²⁴ que representa la relación de la Temperatura (T) con la proporción del grado de hidratación de los lípidos. El eje horizontal representa los valores crecientes en peso de la fracción hidratada del lípido. El eje de la derecha representa la curvatura intrínseca de los lípidos R_0 , en Å. Se observa la coexistencia de diferentes fases. La pendiente y la forma de la curva de separación de las fases lamelar y hexagonal inversa pueden cambiar drásticamente entre los diferentes lípidos a pesar del hecho de que pueden sufrir el mismo tipo de transición de fase. En algunas muestras se observa también la fase cúbica.

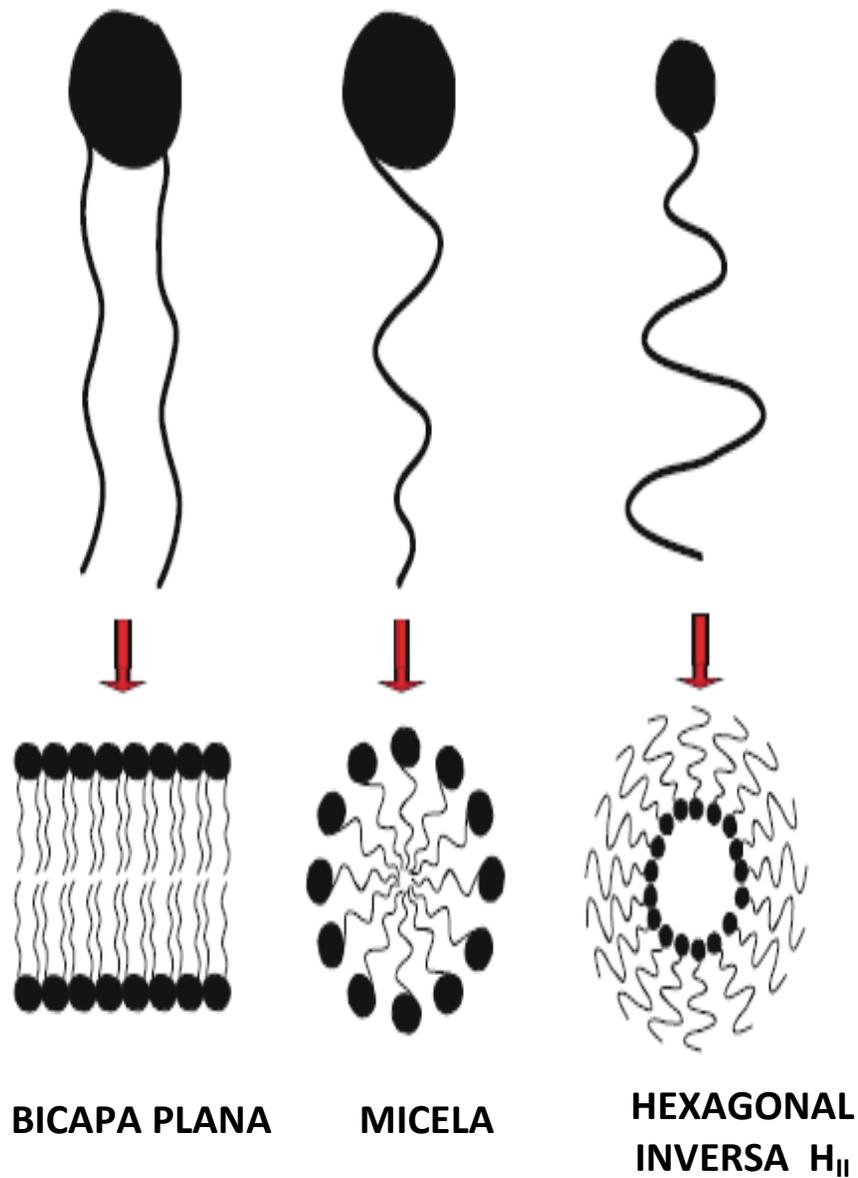


Figura 27.- Modelo esquemático de la alteración de las propiedades físicas de la bicapa por lípidos o pequeñas moléculas anfífilas. Se muestran tres formas moleculares básicas teniendo en cuenta la geometría del grupo de cola de la cabeza (se corresponden con el tipo cilíndrico, cónico y cónico invertido), panel superior. En el panel inferior, se presentan las estructuras inducidas resultantes, que son bicapa plana, en micelas, y fases hexagonales inversas.

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

Al ser capaz la membrana plasmática de formar dominios enzimáticos o de polímeros, incluyendo movilizaciones de lípidos, es plausible que se produzcan agregaciones que tiendan a facilitar la acción de las hormonas. Estos agregados que se ha visto provocan la liberación de algunas moléculas de agua, conformarían un lecho por el que pueden pasar selectivamente ciertas moléculas de carácter lipídico. Se traducirá en un cambio del incremento de la Entalpía H.

La organización de las membranas a partir de formas cristalinas líquidas-sólidas en forma de ensamblas entre los lípidos y las proteínas gracias a un acoplamiento, es la originaria concepción del modelo en mosaico fluido. De tal manera que el coeficiente de Permeabilidad P se ajusta en función del balance Entálpico-Entrópico.

Por eso y siguiendo el esquema tradicional, una vez que los esteroides han entrado en contacto con la fase lipídica de la membrana pueden plantearse varios problemas que no se resuelven enteramente postulando un mecanismo de difusión simple, y tampoco si se acepta un transporte mediado, es preciso un dispositivo que evite la aleatoriedad inherente al fenómeno por el que se disuelve un lípido en una masa lipídica.

En primer lugar existe el problema de la direccionalidad del transporte cuyo objetivo debe ser conseguir lo más rápidamente posible, y por la vía más corta, más económica y favorable, la cara citosólica de la membrana plasmática.

Pero si no existe una línea conductora, del tipo que sea, es posible que, dado su carácter lipídico, el esteroide tienda a

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

difundir en todas las direcciones y no solamente de manera lineal hacia el interior de la célula (Figura 28).

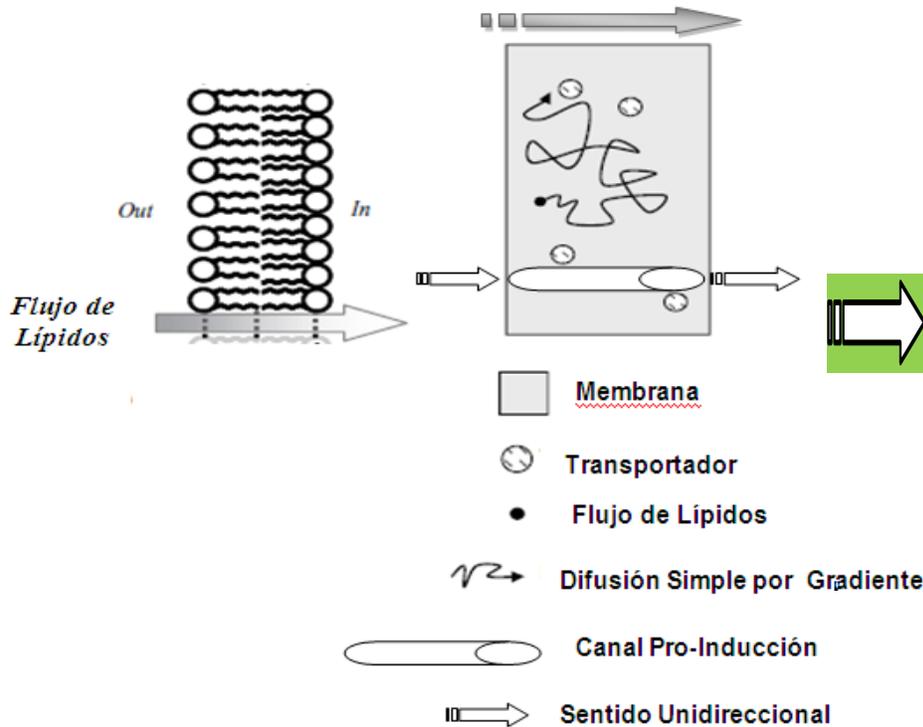


Figura 28.- La Difusión Simple a favor de Gradiente generaría aleatoriedad en la dispersión de los Lípidos en su travesía por el espesor de la Membrana Biológica (↻→). Un Modelo Conceptual que atienda a los datos experimentales, cinéticos y termodinámicos es compatible con la formación de un Canal Unidireccional en la Membrana Biológica (→).

Por otra parte existiría el problema, nada fácil de resolver, de separar dos lípidos previamente mezclados y, precisamente, en una zona en la que el esteroide debe enfrentarse al ambiente polar del citosol. La experiencia muestra que mientras es muy fácil mezclar dos lípidos, es imposible desmezclarlos. Después de todo, el objetivo del proceso de una mezcla es crear aleatoriedad. El paso de lípidos a través de la membrana es un proceso que debe tratar de evitar la aleatoriedad, es decir,

disminuir la entropía del sistema para lo que necesita consumir energía. Por eso, el transporte de lípidos exógenos a través de la membrana debe cumplir el requisito de disminuir la entropía del microentorno [hipótesis del equilibrio local basado en el teorema de mínima producción de entropía (si se está cerca del Equilibrio) y en el Principio de Ziegler de Máxima Disipación de la Energía como criterio más general (si se está alejado del Equilibrio)].

Modelos de Referencia

Hay datos recientes que apoyan la existencia de modelos distintos a los clásicos sobre el transporte de sustancias a través de las membranas biológicas. Así, está cada vez más extendido el proceso de endocitosis mediada por receptor que también ha sido invocado por algunos para explicar el mecanismo de entrada de hormonas esteroideas a la célula junto con las proteínas que las transportan.

Así, parte de la investigación se ha centrado en los canales de Ceramida. Eso significa que la membrana lipídica se ajusta con el complejo de moléculas de ceramida en la interfaz de membrana del canal, y sin afectar el espesor de la membrana, en contraste con lo que se propone en el caso de poros toroidales.

La comprensión detallada del mecanismo de los canales lipídicos está por lograrse, pero algunas ideas se han vertido en varios trabajos de investigación publicados por varios grupos. Por lo tanto, es de gran interés el estudio de las ceramidas pues pueden desempeñar un papel crucial en ciertos estados

patológicos, incluyendo el cáncer, la obesidad, la diabetes, la inflamación, etc (Figura 29).

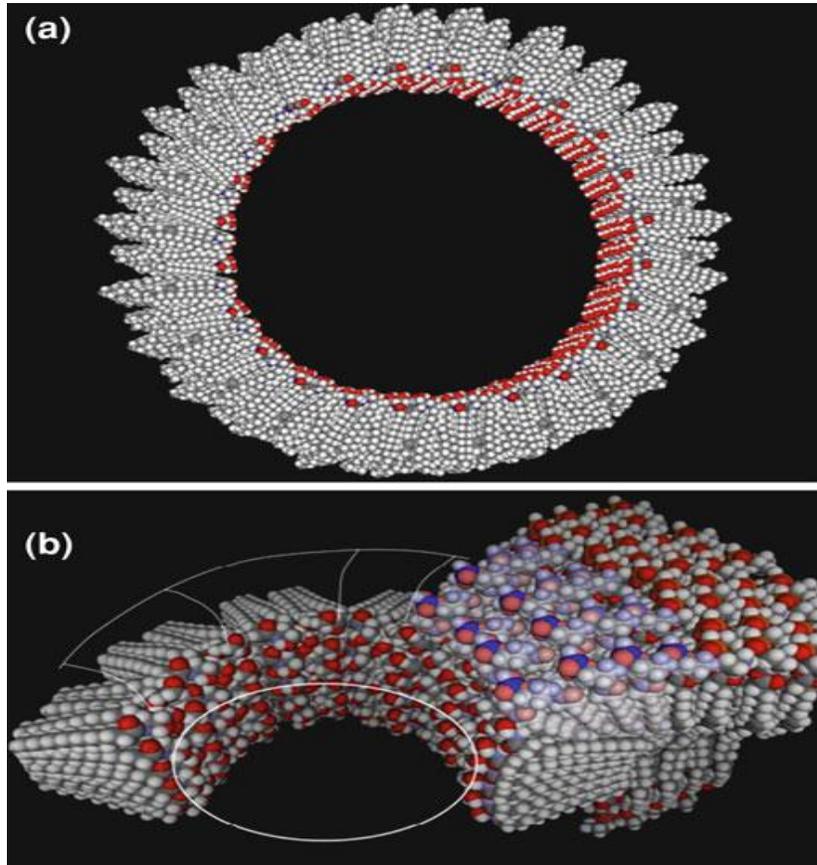


Figura 29.- Diagramas del modelo de los C16-ceramidas en las membranas (canal de ceramida) del grupo del profesor Marco Colombini. La estructura es una ilustración de los resultados aportados a partir de simulaciones de dinámica molecular por el mismo grupo. (Ashrafuzzaman M, Tuszyński J. Chapter 3, Lipids in membranes. In Membrane Biophysics. Springer-Verlag. 2012. Berlin Heidelberg).

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

Se ha descrito una proteína presuntamente implicada en el transporte saturable y relativamente específico de ácidos grasos de cadena larga a través de la membrana plasmática de adipocitos (67).

Para lípidos cargados como los fosfolípidos se ha propuesto el mecanismo de flipasa mediante el cual una proteína trasladaría de una hoja de la bicapa lipídica a la otra las voluminosas moléculas de fosfolípidos orientándolas adecuadamente de acuerdo con su polaridad (68).

Bretscher tuvo la intuición notable de postular la existencia de enzimas específicas de lípidos denominada "fosfolípido-lipasa", que serían responsables de la creación de la organización asimétrica de los lípidos con el coste energético de la hidrólisis del ATP.

Este detalle puede explicar que el transporte de ciertas moléculas como es el caso de los esteroides a través de la membrana plasmática en el fenómeno de difusión atravesando la membrana, al menos en parte, es de forma conjugada y se impulsa irreversiblemente.

Posteriormente se ha encontrado necesario especificar la orientación del vehículo lipídico postulado y el requisito o la ausencia de requerimiento de la hidrólisis de ATP. Esto explica ahora la diferencia funcional entre flipasa, flopasa y escramblasa.

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

Las flipasas estabilizan la asimetría de los lípidos transmembranarios (Figura 30), guían para forjar la curvatura de membrana (31).

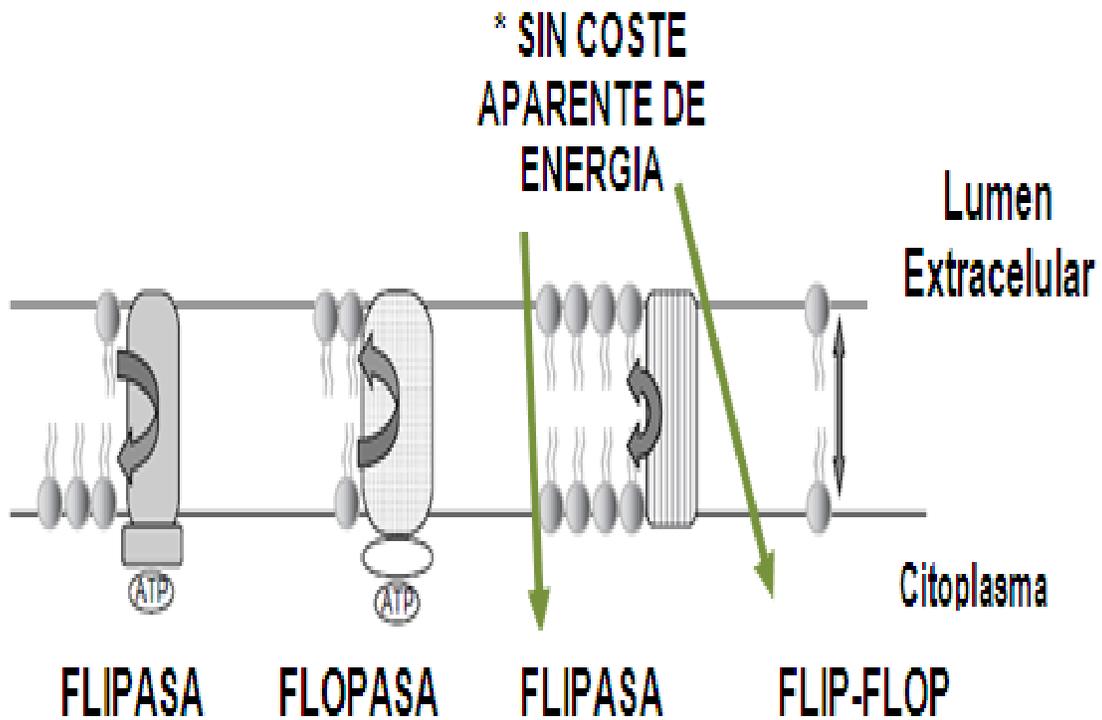


Figura 30.- La Asimetría fundamental de las Membranas Biológicas es promovida enzimáticamente con hidrólisis del ATP y de otra por Autocatálisis. La capacidad Autoorganizativa por Acoplamiento Bioenergético y sin *Coste Aparente de Energía, tanto de naturaleza enzimática como motivados por la propia energía estructural intrínseca de las moléculas o por Acoplamiento Bioenergético con otros sucesos intramembrana, ad-membrana o ligados a los acontecimientos citosólicos o intranucleares (31).

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

Muy interesantes resultan las proteínas de canal propuestas para la extrusión de polipéptidos nacientes (69). Una alternativa a la idea de canales proteínicos es la hipótesis de que la traslocación de proteínas en las membranas del retículo endoplásmico pueda ocurrir a través del núcleo hidrofóbico de la bicapa lipídica, un proceso conducido por un ácido graso (70).

No menos sorprendente es la capacidad de la doble capa para dividirse en dos compartimentos durante la división celular sin perder moléculas en el plasma debido a sus eficientes capacidades de auto-sellado.

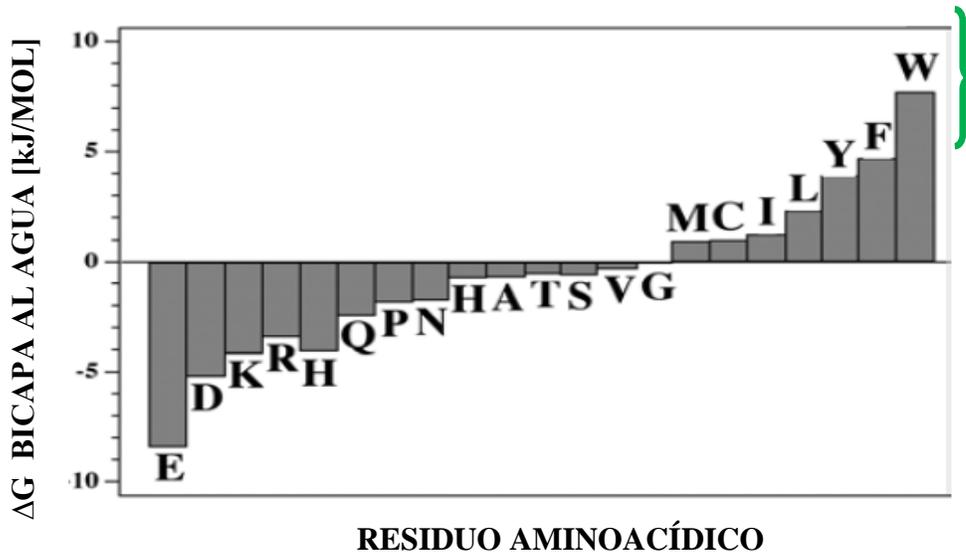
Finalmente un modelo muy sugerente para explicar la difusión específica de maltosa y maltodextrinas a través de la membrana del *Escherichia coli* consiste en un canal proteico denominado maltoporina que estructuralmente se trata de un trímero constituido por tres monómeros de 18 filamentos ensamblados, cada uno de los cuales constituye un canal independiente aunque es necesario la estructura completa del trímero para su correcta funcionalidad.

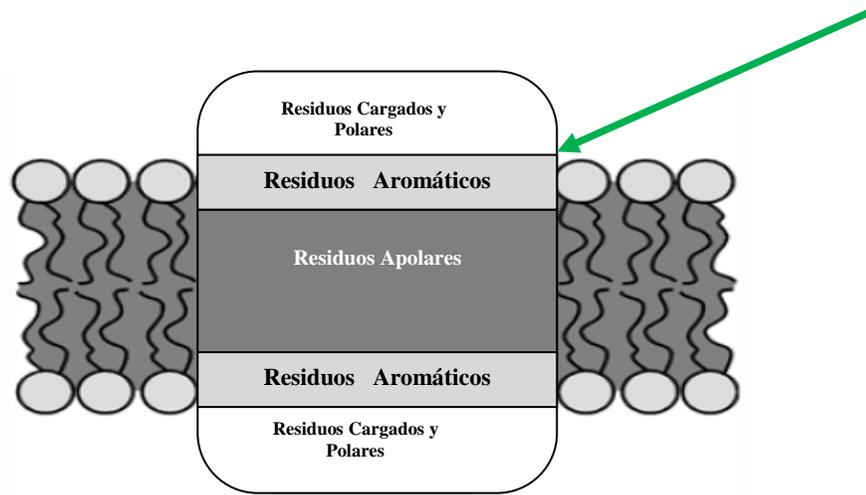
Hay una serie de seis residuos aromáticos colocados estratégicamente a lo largo del canal que constituyen una capa lipídica que sirven de guía al sustrato de manera que este atraviesa la membrana resbalando estrechamente en un movimiento serpenteante (71). En los trabajos del GIM también se constató la dependencia del Na^+ . La fluidez de los ácidos grasos determina la transferencia de energía y por tanto la conformación del canal (ver Caja 4, apartado 1, 2 y 3).

CAJA 4.-

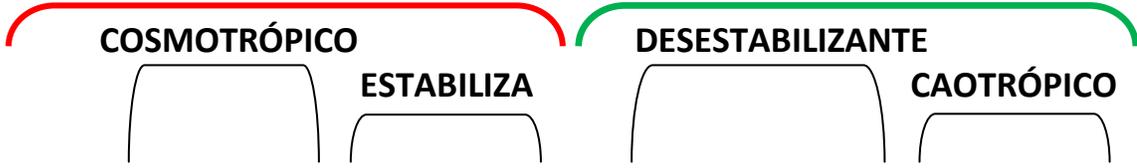
**APORTACIÓN DE LOS
COMPONENTES DE MEMBRANA
AL CONTORNO INTERIOR DEL
CANAL ISOPOLARIDAD-
ISOENTRÓPICO ⁽³⁴⁾
[Transferencia de ΔG al Agua (kJ/Mol)]**

**1.- PROTEÍNAS (RESTOS
AMINOACÍDICOS)**



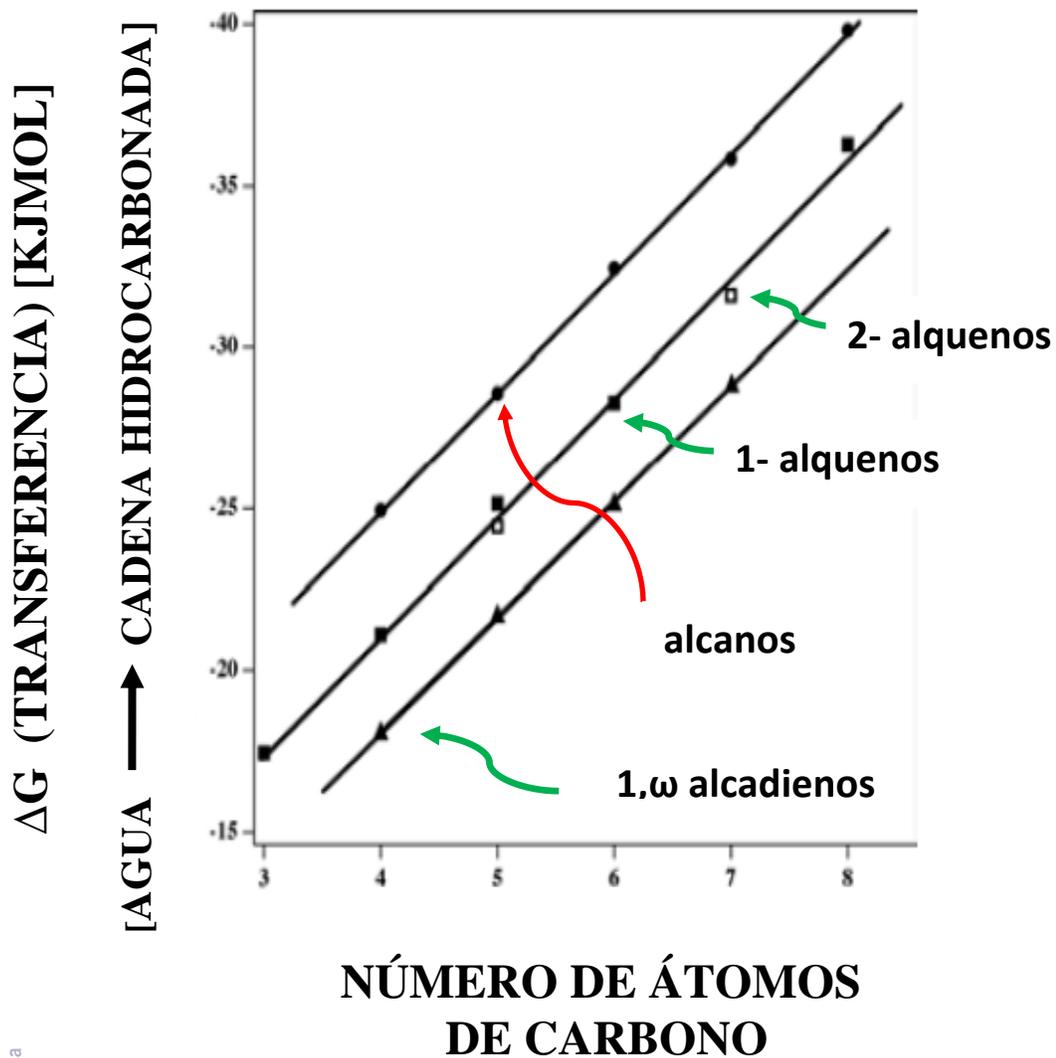


2.- CATIONES Y ANIONES



- ANIONES** F^- PO_4^{3-} SO_4^{2-} CH_3COO^- Cl^- Br^- I^- SCN^-
- CATIONES** $(CH_3)_4N^+$ $(CH_3)_2NH_2^+$ NH_4^+ K^+ Na^+ Cs^+ Li^+ Mg^{2+} Ca^{2+} Ba^{2+}

3.- HIDROCARBUROS



BASE EXPERIMENTAL DEL TRANSPORTE UNIDIRECCIONAL

El antecedente de la metodología experimental partió de Van Wezel²⁸ ideó un medio para aumentar la superficie de contacto sobre la que las células pudieran crecer.

En la metodología experimental del GIM se adaptó la técnica de Wezel, pero sólo puede ser utilizada con células que formen tejidos, es decir, que tengan capacidad de adherirse a las microesferas.

También se ensayaron variantes que admitan la perfusión de células que carezcan de la capacidad de adhesión a superficies, en especial, las poblaciones celulares sanguíneas. Esta limitación ha podido ser superada gracias a los microfiltros utilizados para la diálisis infantil al sistema de perfusión con parejas de trazadores.

Desde hace tiempo se viene postulando una participación activa de los eritrocitos en el transporte de esteroides (72,73) sin que hasta ahora se haya podido definir claramente su participación. La imposibilidad de medir el transporte en tiempo real puede que haya sido la causa de esta indefinición.

Las curvas de dilución de esteroides en eritrocitos perfundidos en la columna de diálisis muestran una gran captación de [³H]T tras el pulso de este trazador a la entrada de la columna, asimismo esta captación es inhibible y saturable. Esto abre una interesante línea de investigación dirigida a estudiar la

²⁸ Van Wezel AL. Growth of cell strains and primary cells on microcarriers in homogeneous cultures. *Nature* 216:64-65; 1967.

participación de los eritrocitos en el transporte de hormonas (Figura AE10).

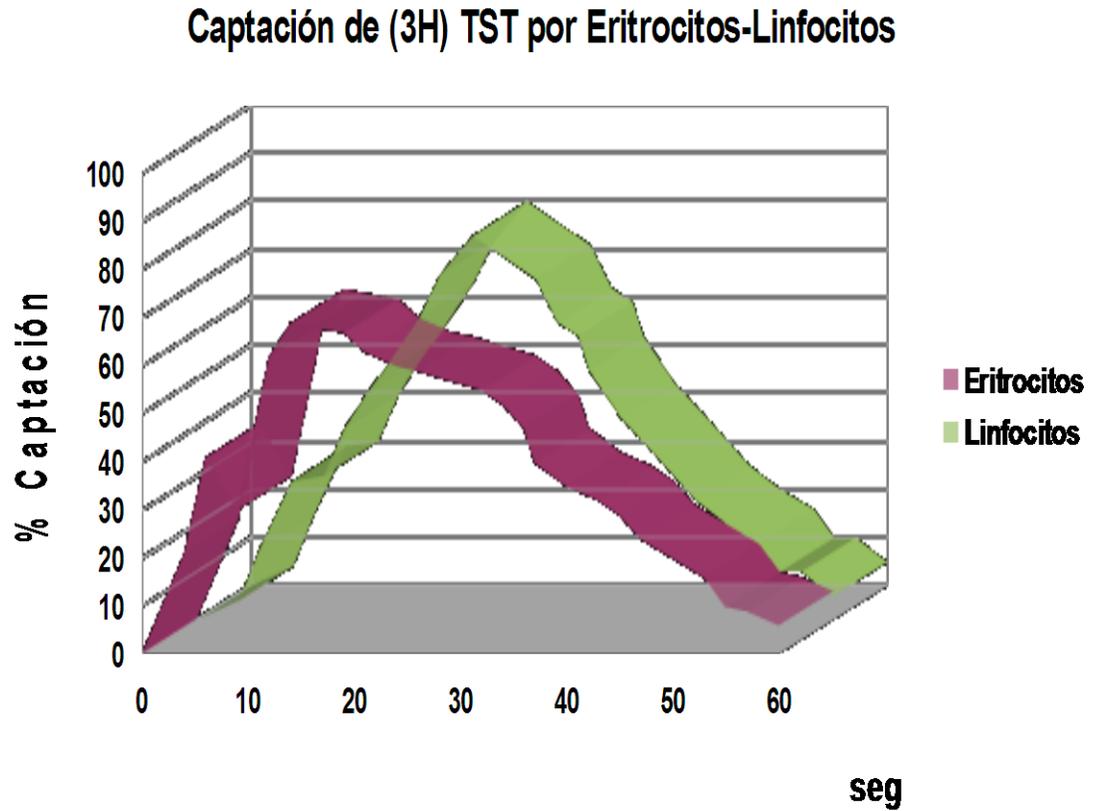


Figura AE10.-

Modelo Conceptual Propuesto

El análisis del transporte de esteroides a través de la membrana plasmática hay que hacerlo bajo la perspectiva de su carácter hormonal, aceptando que, como moléculas reguladoras, van a ejercer acciones sobre la propia membrana nada más contactar con ella. Por lo tanto no debe ser tratado de la misma forma que el transporte de sustratos metabólicos energéticos, como la glucosa o los aminoácidos.

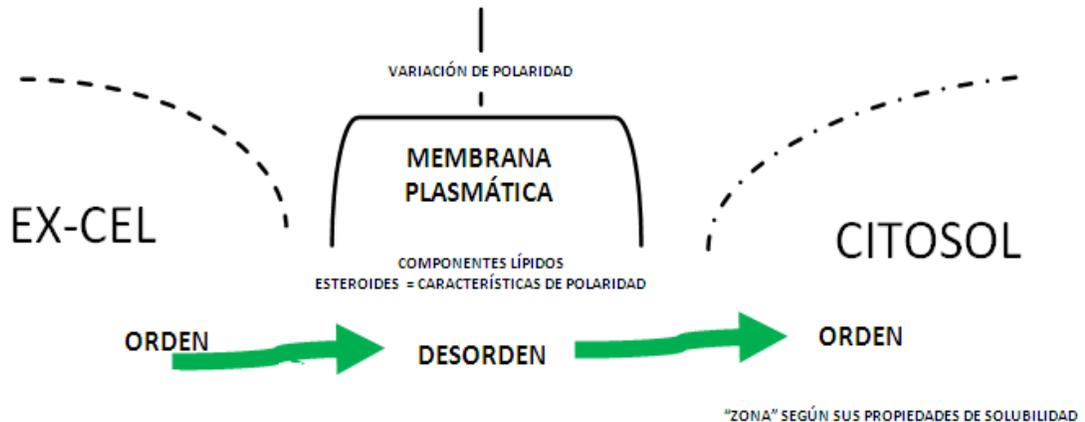


Figura 31.- Diagrama del Modelo Conceptual (Parcela Central y Superior).

El modelo que se postula ha de responder en esencia a la paradoja de los modelos comúnmente aceptados del transporte de lípidos a través de la membrana, en los que sin reservas se admite la secuencia termodinámica orden \rightarrow desorden \rightarrow orden, sin aporte de energía o de un mecanismo acorde con las leyes de la termodinámica (Figura 31). Por otra parte, y, desde un punto de vista fisicoquímico, los esteroides, dado su carácter lipídico, deben interactuar a su paso por la membrana con estructuras de distinta polaridad a la suya propia para evitar mezclarse en la fase lipídica de la membrana.

El modelo que se propone contempla la posibilidad de la existencia de un canal de isopolaridad/isoentrópico relleno del

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

esteroide que sería el conductor por el que penetraría hasta el citosol de acuerdo con las demandas celulares. El tráfico de esteroides (la testosterona), como ejemplo de biomolécula lipídica, se ajusta a esta secuencia. La existencia de carbonos asimétricos dota de un poder rotatorio a las moléculas, facilitando un mecanismo de movimiento por rodamiento (Figura 32,33).

Con los datos obtenidos y los descritos en la literatura se articula el modelo conceptual (ver el Diagrama del Modelo Conceptual Completo en la carpeta de proyectos adjunta y también disponible en pdf/word).

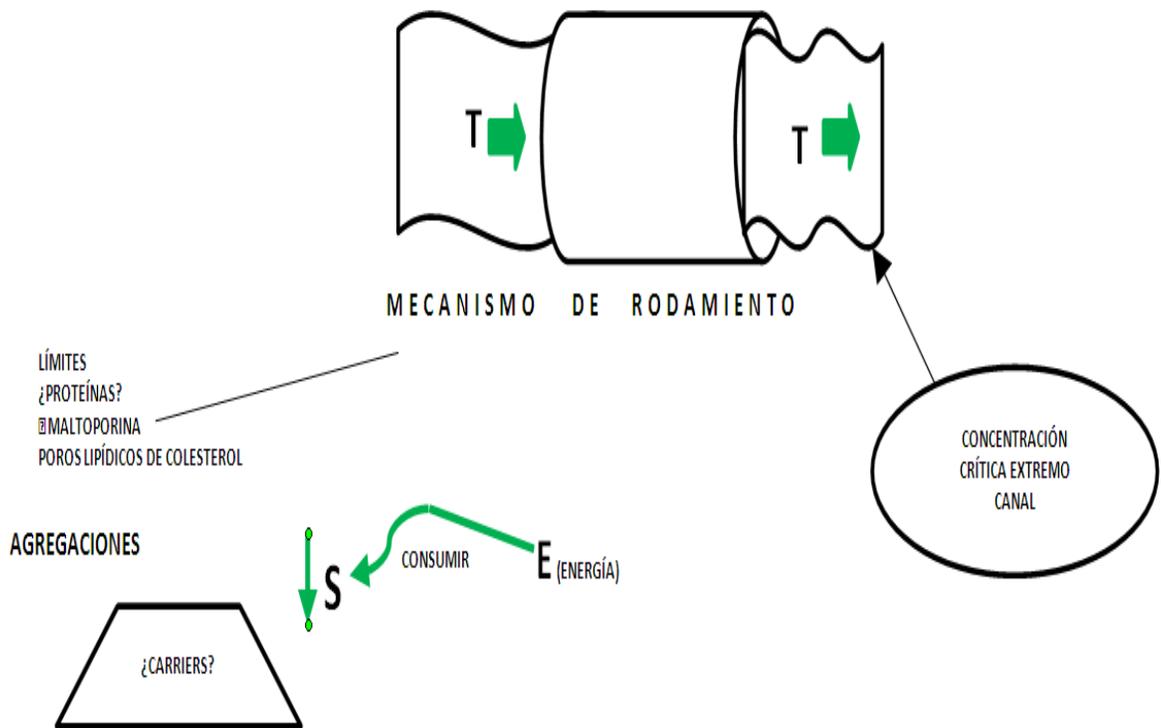


Figura 32.- Diagrama del Modelo Conceptual, Parcela (2º tercio inferior). Canal transportando la Testosterona.(S: Entropía).

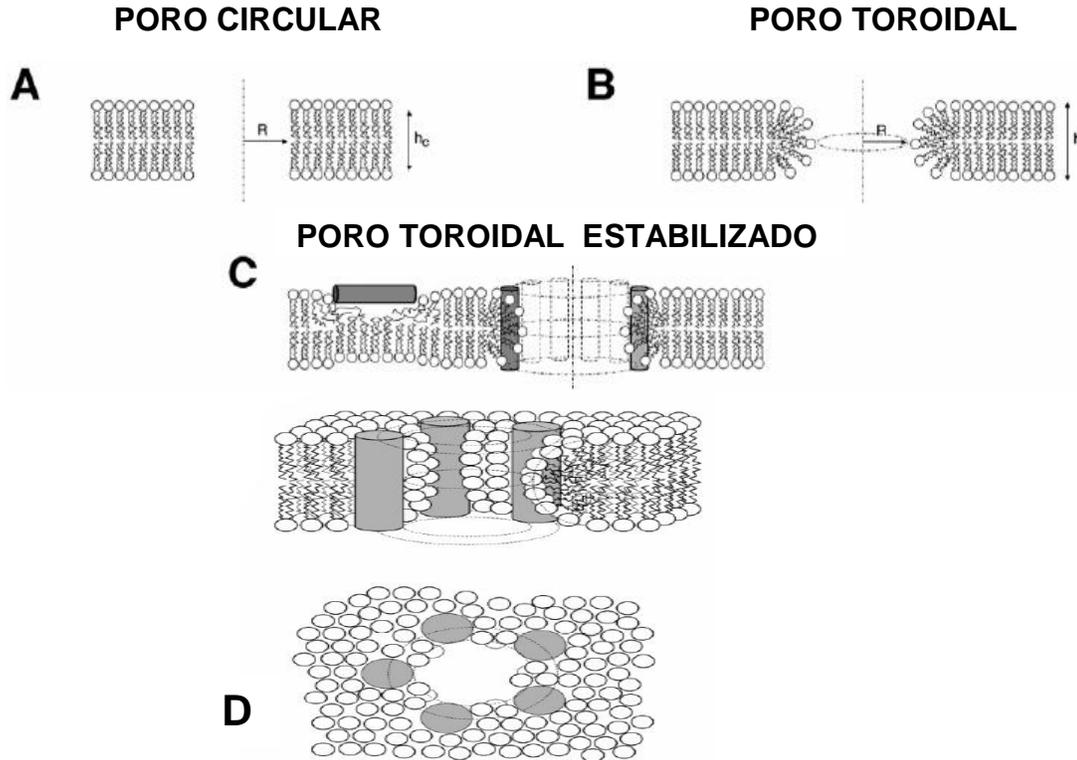


Figura 33.- Diferentes modelos de poros de la membrana para el cálculo de la energía. (A) Poro circular formado sin cualquier reordenación de las moléculas de lípidos. (B) Poro toroidal. (C) Poro toroidal estabilizado por proteínas conformadoras de poros. (D) Corte de un Poro Lipídico. Las proteínas están presentes tanto como monómeros insertados en el exterior y como oligómeros que recubren a los poros. (Jue T, Risbud H, Longo ML, Faller R. Biomembrane Frontiers, vol.2. Springer Humana Press. 2009; Fuertes G, Giménez D, Esteban-Martín S, Sánchez-Muñoz OL, Salgado J. A lipocentric view of peptide-induced pores. Eur Biophys J. 2011;40: 399-415).

La actividad del canal estaría regulada por la propia hormona (Figura 34) y por mecanismos autocrinos con principio y final en la membrana. Los límites del canal posiblemente estén definidos por una proteína de canal semejante a la maltoporina aunque también podrían entrar a través de poros lipídicos de

colesterol, como ejemplo de promotor de la dinámica de la membrana celular, a la par de otros lípidos con carácter disruptor como han sido clasificados por Wenz, de manera que les fuera posible avanzar mediante un mecanismo de rodamiento sobre las superficies de un toroide, catenoide (Figuras 37 y 38), en donde la llegada de una molécula a la cara externa de la membrana provocara la salida de otra en la cara citosólica. En las Figura 35 y 36 se muestra tal posibilidad morfogenésica.

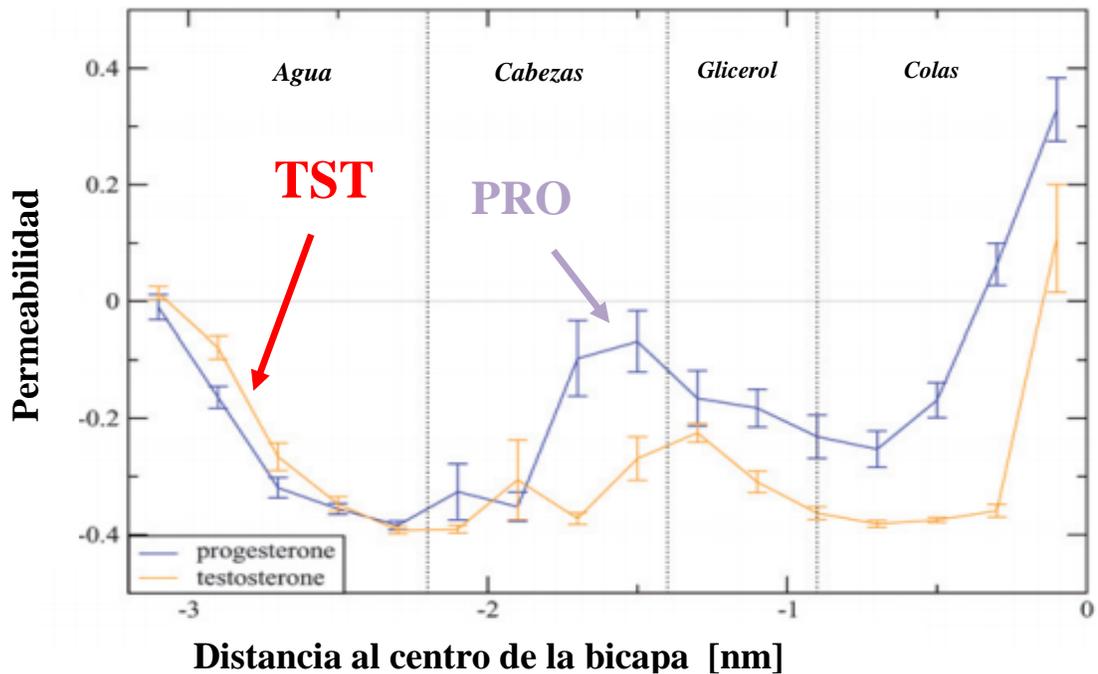


Figura 34.- Comportamiento comparativo de la testosterona (TST) y la progesterona (PRO) frente a varios factores (Agua, Cabezas de Ácido Grasos, Glicerol y las Colas de Ácidos Grasos) en una doble capa. (Orsi M, Essex JW. Permeability of drugs and hormones through a lipid bilayer: insights from dual-resolution molecular dynamics. *Soft Matter*. 2010; 6: 3797–3808).

El modelo que se propone aporta una nueva vía explicativa, por Pro-Inducción, con la siguiente base experimental (en parte, generada por el Grupo de Investigación en Transporte de Membranas -GIM- y también de la fértil literatura publicada al respecto):

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

1. La Cinética mostrada en los ensayos (del Grupo de Transporte Membranas),
2. El Balance Bio-Termodinámico. Ambos compatibles con un flujo de transporte a través de la membrana que no es el debido a una Difusión Simple a favor de Gradiente, y
3. De manera análoga a un proceso de auto-organización, el fundamento originario de la propuesta, incluido en el nuevo modelo de transporte de lípidos a través de la membrana biológica. Consiste en homologarlo a la conducta de una membrana postsináptica, partiendo de la observación descrita para las subunidades del receptor de GABA, éstas en forma de agregados, se conducen, con un desplazamiento a título individual, hacia el entorno de membrana, al cual se aproxima, en sincronía, el efector. En este receptor de GABA, la membrana sináptica se somete a un proceso de morfogénesis molecular recíproca frente a la llegada del transmisor.

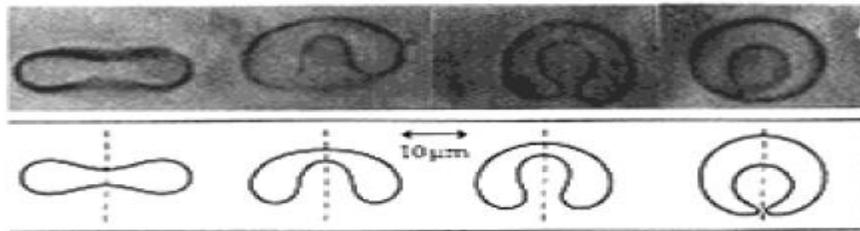
Los fenómenos químicos en la región no-lineal pueden suceder con afinidades que varían en el rango de los 10 a los 100 kJ/mol. Los procesos de transporte sin embargo pueden observarse en la región de la rama termodinámica lineal, cerca del Equilibrio con valores que rondan los 2,5 kJ/mol.²⁹

Los procesos que suceden en la Región del No Equilibrio tienen su origen en los cambios interiores del sistema o entre el sistema y su entorno: el estrés local, la tensión, presión, temperatura, concentración y densidad energética y varían en el tiempo y el espacio.

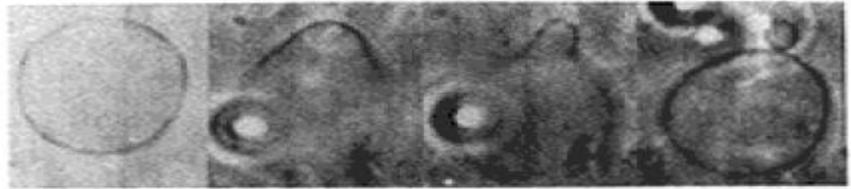
²⁹ En esta Región Lineal de No Equilibrio, se aplica el Principio de Mínima Producción de Entropía y las Relaciones Clásicas de Onsager.

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

Alcanzar el estado estacionario presupone satisfacer el principio de Mínima producción de entropía y/o el de Máxima Disipación de Energía (Entropía).



a)



b)

y

Figura 35.- Las vesículas son membranas bicapa, similares a células cerradas. Adoptan una gama de diferentes formas a diferentes temperaturas, que son determinadas por las influencias sutiles de la elasticidad y la energía asociada a la curvatura. En (a) una vesícula aplanada con una forma de glóbulo rojo desarrolla una concavidad que se convierte en una vesícula interna separada. En (b) una vesícula alargada desarrolla un brote, que con el tiempo se separa del cuerpo principal. Ambas secuencias se han visualizado experimentalmente bajo un microscopio (cuadros superiores). Pueden ser reproducidas por cálculos las formas armónicas con el criterio de reducción máxima de la energía total (cuadros inferiores). (Imágenes: Reinhard Lipowsky, Max Planck de Ciencias de los Coloides, Teltow-Seehof, Alemania. Lipowsky R. The morphology of lipid membranes. Curr. Opi. Struct Biol. 5: 531-540).

Un proceso semejante se ha descrito para la agregación y desagregación de los microtúbulos citoplasmáticos³⁰ (74). Utilizando los mismos razonamientos que en este caso se puede decir que la concentración crítica de un extremo del canal puede ser definida como la concentración de esteroide libre a la que la velocidad total de agregación y desagregación se encuentran equilibradas.

La velocidad de agregación en el extremo extracelular está condicionada por la velocidad de desagregación en el extremo citosólico. Un aumento de la concentración externa de esteroide va a inducir la desagregación intracelular, siempre y cuando existan proteínas citosólicas transportadoras de esteroides disponibles.

Si el canal no puede ser descargado en su vertiente citosólica y continua aumentando la presión de carga, podrán aumentar sus dimensiones o rebosar hacia el exterior en forma de hormona libre.

En el estado estacionario³¹ la velocidad de agregación en un extremo es equivalente a la velocidad de desagregación en el otro, pudiéndose mantener el flujo de entrada o de salida bien por un canal bidireccional o mediante canales unidireccionales en uno y otro sentido.

³⁰ Tabony J. Chapter 5, Biological self-organisation by way of the dynamics of reactive processes. In Morphogenesis, Bourguin P, Lesne A, Edit. Springer, 2011.

³¹ El concepto de estado estacionario arraiga con Ludwig Von Bertalanffy. En alemán, *Fließgleichgewicht*. Forma parte de la Teoría General de Sistemas. Muchos otros sistemas naturalistas lo incorporan.

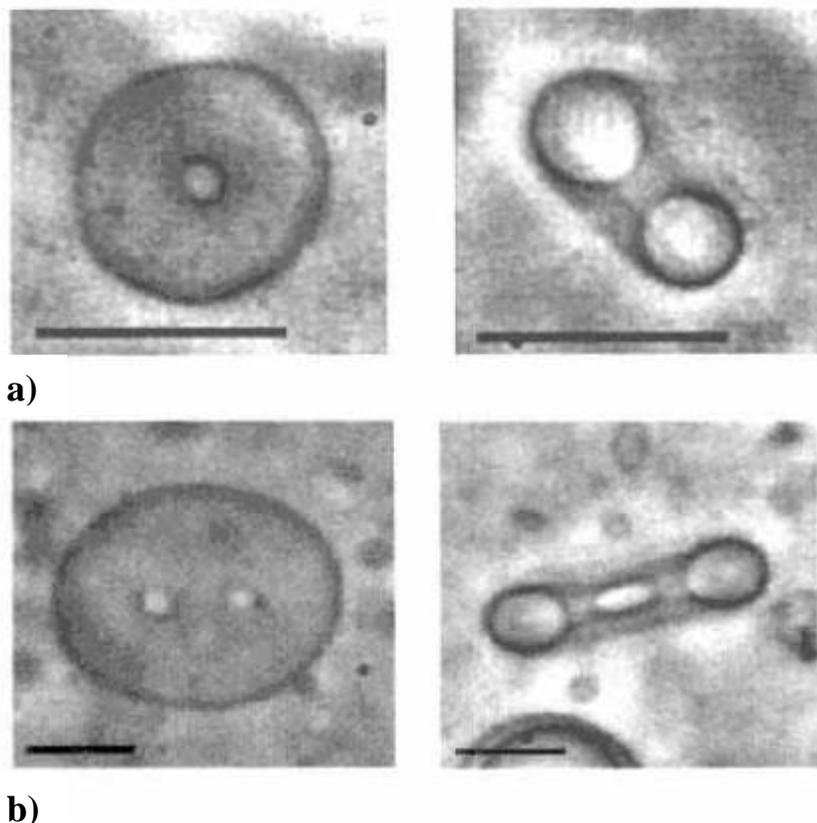


Figura 36.- Las vesículas con agujeros: un buñuelo o toro [en a), que muestra vistas superior y lateral y un doble toro en (b)]. Incluso estas formas topológicamente complejas se corresponden con estructuras armónicas que representan los mínimos energéticos. La escala (barra —) indica 10 micrómetros³². (Fotos: Xavier Michalet and David Bensimon, Ecole Normale Supérieure, Paris.)

Un mecanismo de este tipo permite interpretar la gran variedad de respuestas obtenidas sobre el transporte de esteroides. Así, sería compatible con los datos que indican la coexistencia de un proceso saturable a bajas concentraciones con otro insaturable a altas, con el efecto de inhibidores de grupos sulfhidrilo característico de la intervención de proteínas (75), con las relativamente laxas especificidades, con el efecto de la temperatura y de los inhibidores metabólicos, así como con la dependencia del sodio y con la posibilidad de compartir estos

³² Michalet X, Bensimon D. Observation of stable shapes and conformal diffusion in genus 2 vesicles. *Science*. 1995; 269: 666-668.

mismos canales otros compuestos lipídicos extraños a las células tales como fármacos liposolubles (76).

La existencia de canales proteicos como soporte para el paso de los esteroides hacia el interior de las células, podría explicar, además, el desencadenamiento de las acciones extragenómicas de estas hormonas de latencias del orden de minutos (77), algunas de las cuales podrían estar mediadas por el sistema de los inositol-fosfato activado mediante proteínas de membrana durante el paso del esteroide. Las proteínas podrían jugar un papel catalítico en la formación de los canales lipídicos pues se ha comprobado que membranas sintéticas lipídicas muestran fenómenos de conducción iónica indistinguibles de los canales proteicos, similares a los receptores (60).

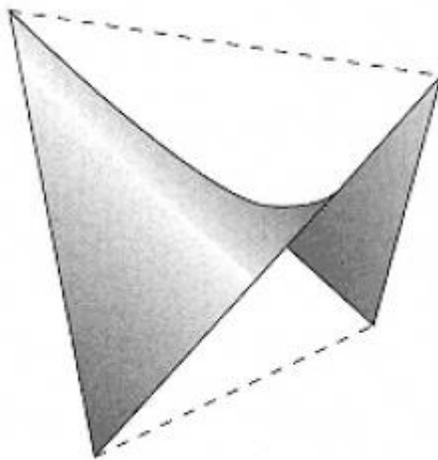


Figura 37.- El catenoide, una superficie mínima delimitada por dos círculos coaxiales (Matthias Weber, Indiana University. In Chapter 2, Lessons of the Beehive Building with Bubbles. In Ball P, Nature's Patterns. Oxford University Press, 2009).

Este modelo de transporte avanza varias líneas de investigación. Por una parte hay que continuar los primeros estudios llevados a cabo por McGee sobre estrés osmótico y formación de canales de isopolaridad-isoentrópicos. Aunque esta experimentación no requiere una metodología complicada es necesario conocer las técnicas y aplicar los programas teóricos computacionales que se aplican para la interpretación de los resultados.

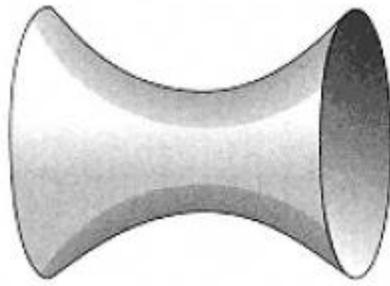


Figura 38.- La superficie mínima que abarca los cuatro vértices de un tetraedro. Esta superficie, primero descubierto por Schwarz en el siglo XIX, se puede utilizar como el bloque de construcción de varias superficies mínimas periódicas³³.

³³ Ros A. Properly embedded minimal surfaces with finite topology. Proceedings of the International Congress of mathematicians, Madrid, Spain, 2006. European Mathematical Society. pp. 907-926.

APLICACIÓN CLÍNICA en BIOMARCADORES NUTRIENTES

Una vez desarrollada la memoria con el objeto principal que es el Modelo de Transporte, señalaremos la posibilidad de proyectar la técnica de Perán-McGee, a la captación de Aminoácidos en los experimentos del GIM, a la búsqueda de biomarcadores para su uso en la detección ultratemprana de neoplasias dependientes de hormonas esteroides sexuales, con una alteración en la captación del perfil metabólico de los aminoácidos (40, 78).

Las acciones conjuntas entre hormonas esteroides sexuales y nutrientes como los aminoácidos cada vez son más conocidas, así, el incremento de testosterona materna puede suprimir el crecimiento fetal por alteración del transporte de ciertos aminoácidos (79).

Una patente registrada en los EE.UU. consiste en una diana de transportadores de aminoácidos para el tratamiento del cáncer de mama positivo a los receptores de estrógeno (80).

Un perfil de aminoácidos específico en plasma se ha asociado al riesgo de cáncer de mama en mujeres premenopáusicas. La arginina, leucina, tirosina y asparragina

directamente se correlacionaron con los niveles de hormonas sexuales (81). En otro estudio que contó con mujeres afectadas de cáncer de mama, próximas a iniciar las sesiones de quimioterapia, el análisis de datos constató concentraciones más altas de glutamato, y más bajas de histidina (82). Poschke et al. Proponen, como un instrumento diagnóstico en el cáncer de mama, la medición de los niveles de algunos aminoácidos entre los que se encuentran los de cadena ramificada (83).

En el cáncer de próstata, se ha visto que los transportadores LAT1 y LAT3 median la captación de aminoácidos esenciales. Éstos mantienen niveles suficientes de leucina precisos para la bioseñalización mTORC1 y el crecimiento celular. Los estudios llevados a cabo con Espectroscopía de Resonancia Magnética proporcionan datos con bajos niveles de BCAT–aminotransferasa de cadena ramificada (84).

En la Ilustración XVI se representa en A) El receptor de andrógenos (AR) de señalización activa la transcripción en LAT3 en el cáncer de próstata primario, dando lugar a la captación de leucina, la señalización mTORC1, y por tanto el crecimiento celular y en B) La disminución de la señalización por andrógenos y LAT3 debido a la terapia por ablación condiciona la traducción de ATF4, que inicia la transcripción de LAT1. La expresión de LAT1 puede posteriormente mediar en la captación de leucina, vía mTORC1 de señalización, y en consecuencia el crecimiento celular.

LEUCINA

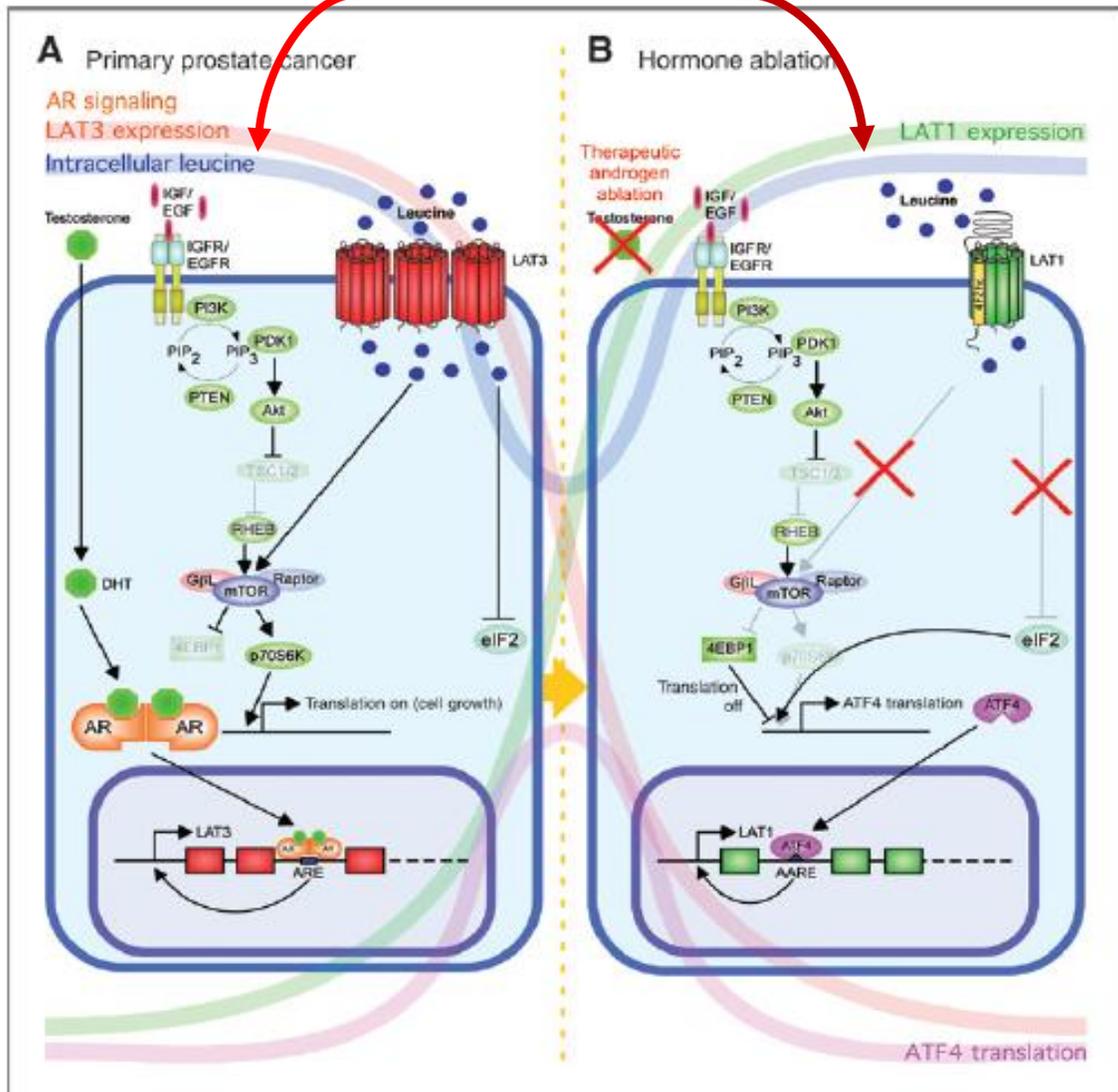


Ilustración XVI.- Modelo LAT3 y LAT1 de regulación en el cáncer de próstata (84). La leucina mostrando su intenso poder anabolizante.

El papel de la nutrición en los procesos tumorales es ambivalente pues debe nutrirse el tumor y el huésped (el enfermo). Existe una alta producción de entropía por parte de las células tumorales que no es compensada ni en calidad ni en cantidad por la neguentropía del medioambiente en forma de alimento, produciendo una movilización extraordinaria de los compartimentos corporales lípido-proteína por factores específicos del tumor.

Para revertir este flujo perverso de entropía, se proponen diversos métodos que van desde la hipertermia, a campos magnéticos, campos electromagnéticos de baja frecuencia, la modificación artificial de la acidez relativa y especialmente el control del metabolismo de la glucosa (85).

En consonancia con los anteriores trabajos, Fontana et al., prueban que la reducción en la ingesta de la proteína dietética es altamente efectiva para inhibir el crecimiento tumoral en modelos de cáncer en humanos (de próstata y de mama), a través de la vía IGF/AKT/mTOR y de las modificaciones epigenéticas (86).

Singh G et al. Estudian el papel de la privación de leucina, para ello somete a un test líneas celulares de cáncer de mama y concluye que no es suficiente la restricción de leucina para inhibir la vía mTOR pero sí para activar la molécula Akt (87).

Los trabajos experimentales del GIM, en fase de prepublicación³⁴, ratifican esta nueva perspectiva de los nutrientes como biomarcadores y dianas terapéuticas. En la Figura AE11, la tendencia en la captación por linfocitos de [3H]L-Leucina tras exponerlos a la Concanavalina A. Se observa que conforme pasan las horas, la demanda interna celular aumenta casi duplicándose en la hora veinte -20-. Como control, en la Figura AE12, se utilizó la Timidina tritiada (como indicador de la diferenciación celular).

La captación de este nucleósido sigue la misma tendencia que la L-Leucina en la parte ascendente. Lo que puede traducirse como que la L-Leucina es un factor decisivo para la diferenciación de los linfocitos.

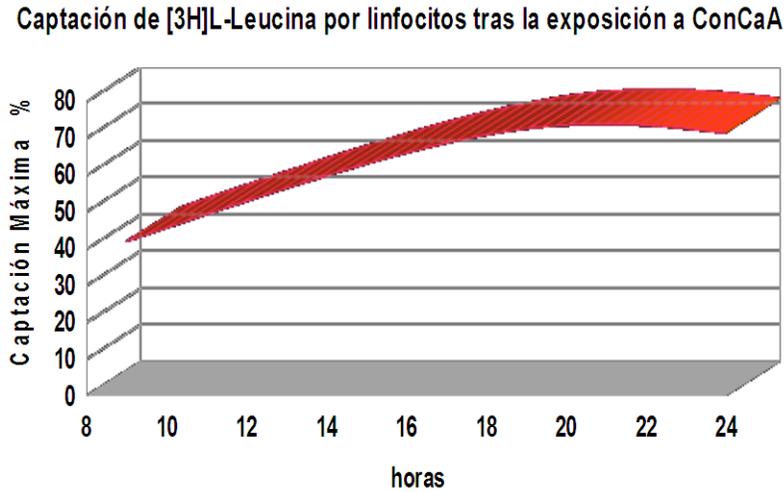


Figura AE11.- Intensa demanda de leucina por parte de Linfocitos, tras estar expuestos a la Concanavalina A.

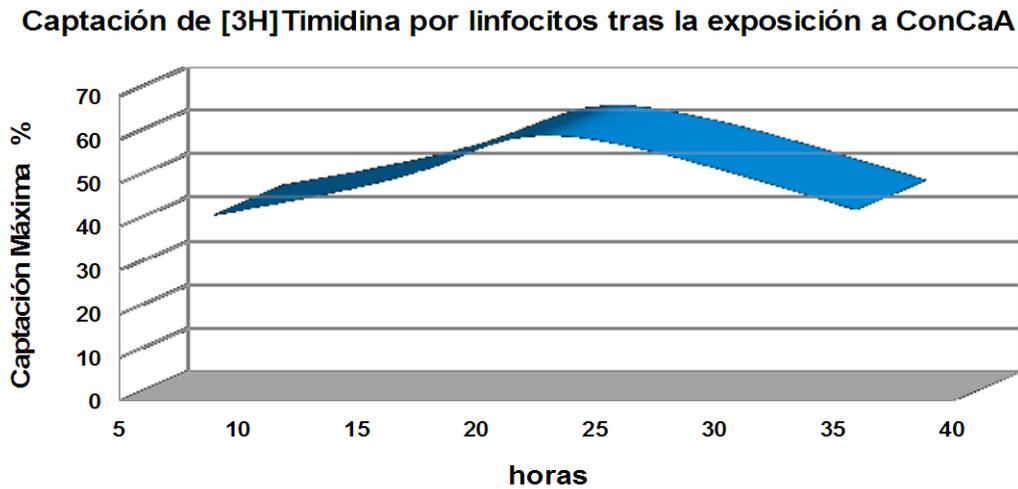


Figura AE12.- Captación de Timidina por linfocitos tras exponerlos a la ConCaA. La parte ascendente de la curva sigue la misma tendencia que en la L-Leucina por parte de Linfocitos.

³⁴ Otros aminoácidos también se someten a estos tests siguiendo el fundamento de la técnica original de Perán y McGee.

INTERPRETACIÓN DINÁMICA DEL TRANSPORTE DE FÁRMACOS

De la misma manera, la metodología de alta resolución de la técnica de doble dilución de trazadores isotópicos (Perán-McGee) puede implementar la interpretación de la dinámica de fármacos, como por ejemplo en la absorción cutánea. Desde la membrana inerte a la membrana “asamblearia”, es el cambio conceptual adonde dirige nuestro modelo, en relación al transporte de lípidos a través de las membranas biológicas (88).

La piel, como “paso” para los fármacos de uso tópico ha sido interpretada como una membrana inerte hasta hace poco. En la Figura 39, en la parte superior, la permeabilidad P_i , membrana “inerte”, es constante y fijada linealmente por la relación entre el flujo, J_i , y el gradiente, Δc_i .

De manera contraria, en la parte inferior, la membrana “asamblearia”, donde P_i depende de los gradientes de i y de otras variables que actúan a través de la membrana, exhibiendo una gráfica de comportamiento no lineal en el transporte.

La Piel, como órgano, complejo, se acomoda a este concepto de no linealidad, de membrana asamblearia. Este modelo es extrapolable a otros órganos y tejidos. La biodisponibilidad de los fármacos depende de la comprensión y aplicación en el desarrollo de diseños efectivos de sistemas de liberación y dosificación.

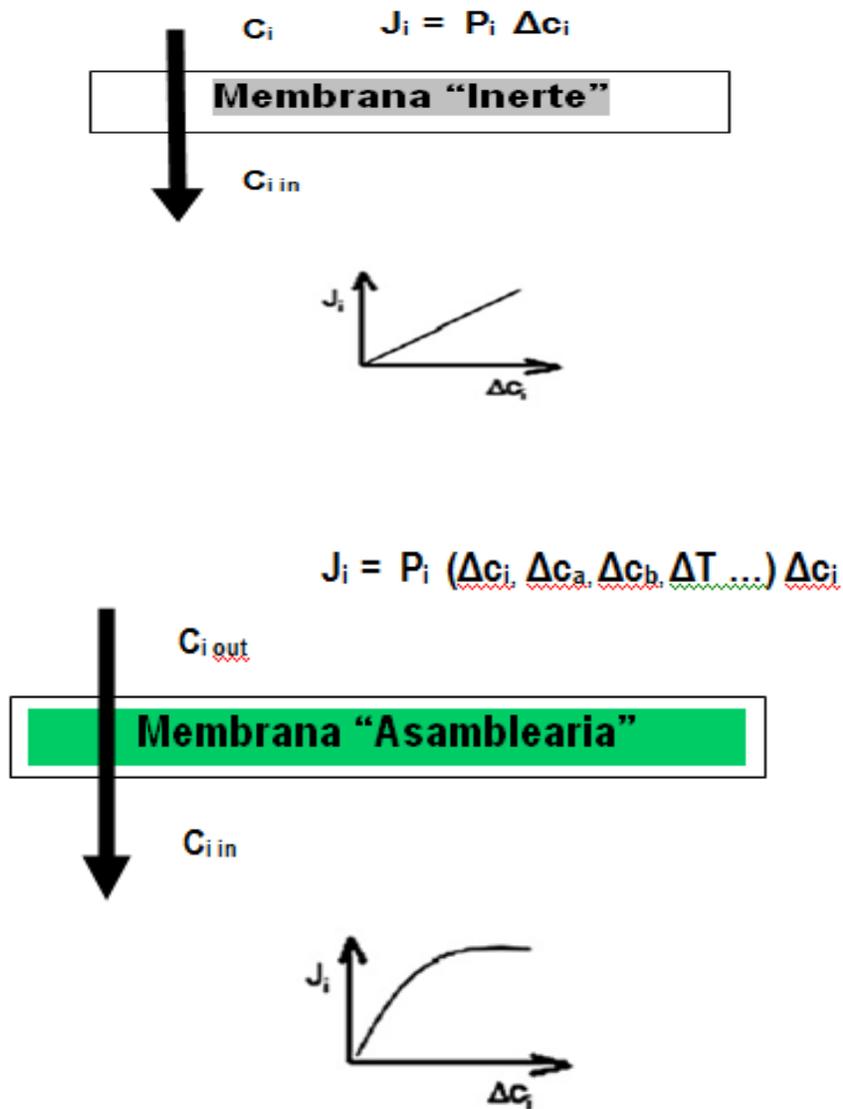


Figura 39.- De la Membrana Inerte a la Membrana Asamblearia (88). [J: Flujo, ΔC : Incremento de la Concentración de un soluto (fármaco), P: Permeabilidad, $C_{i\ out}$: Concentración del soluto i en la parte externa de una membrana, $C_{i\ in}$: Concentración del soluto i en la parte interna de la membrana].

CONCLUSIONES

1.- A pesar de que la comunidad científica acepta que los lípidos atraviesan las membranas plasmáticas por difusión simple, evidencias vulgares contradicen este supuesto. Si los esteroides, por poner un ejemplo de lípidos, atravesaran la membrana plasmática por difusión simple, al penetrar en el seno de la misma se diluirían al contactar con un ambiente lipídico de iguales propiedades que el sustrato. No existen razones plausibles para pensar que ocurra algo distinto a lo que sucede cuando un líquido hidrosoluble se añade a una corriente de agua, en donde se diluye sin atravesarla linealmente.

2.- La membrana plasmática es una organela cuya principal misión es seleccionar las sustancias que el metabolismo celular necesita en las cantidades adecuadas. Se han propuesto varios modelos, con su soporte experimental, para explicar el transporte de testosterona, molécula de la que depende la continuidad de la especie.

Si el agua entra en la célula de manera controlada, la hormona testosterona habrá de ajustarse a un cierto control fisiológico. Atravesar libremente todo tipo de membrana y penetrar en cualquier tipo de células escaparía de un ajuste fino de la homeostasis. Conviene también recordar que las hormonas, al ser agentes directivos, actúan y condicionan respuestas. So sola presencia en la superficie externa de la membrana puede despertar algo parecido a la alarma que se desencadena en un ministerio al solo paso del titular por la conserjería.

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

3.- El sustrato a transportar (la testosterona) interviene en procesos concretos, (no continuos, aleatorios, gaussianos) dirigidos a activar una o varias rutas metabólicas y a inhibir otras. Debido a sus acciones se generan moléculas cargadas de información singular, dirigida a controlar ciertos procesos.

Para explicar la saturación e inhibición del transporte de testosterona en células perfundidas que se muestra en la parte experimental de este trabajo, se propone la existencia de interacciones moleculares que satisfagan estados estacionarios (saturación) y que impliquen, además, la creación de gradientes y acciones alostéricas y cooperativas (inhibición).

4.- Al no encontrar explicaciones satisfactorias en los modelos propuestos en la literatura científica y que se discuten en la memoria, se plantea la propuesta de la formación inducida de canales de isopolaridad-isoentrópicos.

Al igual que ocurre en la membrana postsináptica que es quien se moviliza para reconocer, interpretar y trasladar el mensaje de los efectores nerviosos, los esteroides, al interactuar con las células diana, como efector de la propia membrana plasmática inducen a ésta a que se movilice y organice para reconocer y favorecer el paso de estas hormonas hasta el segundo receptor, pues el primero, es, siempre, la propia membrana celular.

La mecánica secuencial es: en una zona concreta de la membrana se agrupan, se agregan, moléculas de polaridad semejante al efector para ofrecerle un lecho o canal por el que penetra de manera concreta (no aleatoria).

Como todo proceso mediado, facilitado, la velocidad de entrada aumentará conforme se acumule el sustrato en el polo

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

externo, alcanzando la saturación e, incluso, se obturará cuando se logre la saturación de los receptores intracelulares que transmiten el siguiente mensaje hormonal.

5.- Como se discute en la Memoria, este modelo cumple las condiciones termodinámicas y cinéticas del transporte mediado y no violenta ninguna ley de la física, antes al contrario, satisface las condiciones dinámicas del funcionamiento celular, por ello el canal exhibe dos características esenciales: la Isopolaridad y la Isoentropía.

Las células mantienen su coherencia estructural y funcional rodeadas por la membrana plasmática, una organela con fluidez parecida a la del aceite de oliva. Se trata de un sistema dinámico, abierto, cohesionado por una corriente de lípidos en movimiento con una velocidad que imprime individualidad a la célula.

Atravesar ese flujo lipídico con otro flujo lipídico transversal (transmembrana) eludiendo el reconocimiento, el acoplamiento, la interpretación de moléculas cargadas de información y todo eso en un proceso no aleatorio, con la intencionalidad propia de los regiones termodinámicas donde son aplicables el principio de mínima producción o máxima disipación de energía/entropía, con un balance entálpico-entrópico casi nulo, requiere mecanismos muy distantes de la difusión simple (aleatorio, máxima producción de entropía).

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Fan J, Papadopoulos V. Evolutionary origin of the mitochondrial cholesterol transport machinery reveals a universal mechanism of steroid hormone biosynthesis in animals. *PLoS ONE*. 2013, 8(10): e76701. doi:10.1371/journal.pone.0076701.
2. Weijers RNM. Lipid composition of cell membranes and its relevance in type 2 Diabetes mellitus. *Current Diabetes Review*. 2012; 8: 390- 400.
3. Abbott SK, Else PL, Atkins TA, Hulbert AJ. Fatty acid composition of membrane bilayers: importance of diet polyunsaturated fat balance. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2012. 1818: 1309-1317.
4. Olsen BN, Schlesinger PH, Ory, DS, Baker, NA. Side-chain oxysterols: From cells to membranes to molecules. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2012.1818: 330-336.
5. Leray C. Introduction to Lipidomics, from Bacteria to Man. CRC Press 2013. pp. 122-114.
6. Brown AJ, Galea AM. Cholesterol as an Evolutionary Response to Living with Oxygen. *Evolution*, 2010; 64-7: 2179–2183.
7. Lednicher D. Steroid Chemistry at a Glance. Jhon Wiley & Sons Ltd. 2011.
8. Desmond E, Gribaldo S. Phylogenomics of sterol synthesis: Insights into the origin, evolution, and diversity of a key eukaryotic feature. *Genome Biol. Evol.* 2009; 1: 364-81.

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

9. Vance JE, Voelker DR. Cellular lipid transport processes and their role in human disease. *Biochimica et biophysica Acta*. 2009; 1791: 561-562.
10. Tarling EJ, de Aquiar Vallim TQ, Edwards PA. Role of ABC transporters in lipid transport and human disease. *Trends Endocrinol Metab*. 2013; 24(7): 342-50.
11. Oren I, Fleishman SJ, Kessel A, Ben-Tal N. Free diffusion of steroid hormones across biomembranes: a simple search with implicit solvent model calculations. *Biophys*. 2004; 87(2): 768-79.
12. Yam K et al. Is transport of cortisol in liver cells carrier-mediated?. *Erasmus Journal of Medicine*. 2012; 3(1): 8-12.
13. Garrett RH, Grisham CM. Membranes and Membrane Transport. In *Biochemistry, Fifth Edition*. 2013. Brooks/Cole, Cengage Learning. p. 278.
14. Lodish et al. *Molecular Cell Biology, Seventh Edition*. W. H. Freeman and Company. 2013. Chapter 11. p. 477.
15. Op den Kamp JAF. In *Transmembrane dynamics of lipids*. Wiley. 2012. Preface. p. XV.
16. Jandt U, An-Ping Z. Modeling of intracellular transport and compartmentation. *Adv Biochem Engin/Biotechnol*. 2012; 127: 221-249.
17. Heinen W, Lauwers AM. Organic sulphur compounds resulting from the interaction of iron sulphide and carbon dioxide in an anaerobic aqueous environment. *Origins of life and Evolution of the Biosphere*. 1996; 26: 131-150.
18. Loison JC, Bergeat A. Rate constants and the H atom branching ratio of the reactions of the methylidene $\text{CH}(\text{X}^2\text{II})$ radical with C_2H_2 , C_2H_4 , C_3H_2

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

(methylacetylene and allene), C₃H₆ (propene) and C₄H₈ (trans-butene). Physical Chemistry Chemical Physics. 2009; 11: 655-664.

19. A) Moroz A. Chapter 4, Extreme character of evolution and the maximum energy dissipation, in The Common Extremalities in Biology and Physics. 2012. p. 189.
B) Chapter 3, Variational and the Optimal Control Models in Biokinetics. p. 158.
C) Chapter 1, Extreme Energy Dissipation. p. 19.
20. Marcos, A. Chapter 3, Bioinformation as a triadic relation. In Information and Living Systems. Massachusetts Institute of Technology. 2011.
21. Queiroz J, Emmeche C, Kull K, El-Hani. Chapter 4, The biosemiotic approach in biology: theoretical bases and applied models. In Information and Living Systems, Terzis G, Arp R (Ed.). The MIT Press. 2011.
22. Quesada, MP. Cellular distribution and immobilisation of GABA(A) receptors. Durham theses, Durham University. 2000. Available at Durham E-These Online: <http://etheses.dur.ac.uk/4611/>.
23. Peran M, Hicks BW, Peterson NL, Hooper H, Salas R. Lateral mobility and anchoring of recombinant GABAA receptor depend on subunit composition. Cell Mot. Cyt 50: 89-100; 2001.
24. Kormam B, Roux A. Lipid as organizers of cell membranes. Embo Reports. 2012; 13(8): 667.
25. Griesemer J, Szathmáry E. Chapter 22, Gánti's chemoton model and Life criteria in Protocells Bridging Nonliving and Living Matter. The MIT Press. 2009. pp. 481-512.
26. Culos D, Watanabe M. Testosterone-dependent oxygen consumption in membrane vesicles of Pseudomonas testosterone. J Steroid Biochem 17: 67-69; 1982.

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

27. Daufeldt S, Klein R, Wildt L, Alléra A. Membrane initiated steroid signaling (MISS): computational, in vitro and in vivo evidence for a plasma membrane initially involved in genomic steroid hormone effects. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 2416(1-2): 42-52.
28. Demirel Y. Nonequilibrium thermodynamics: transport and rate processes in physical and biological systems. Elsevier Science. 2002. p. 389.
29. Tribus M, McIrvine EC. Energy and information (thermodynamics and information theory. *Scientific American*. 1971 (3) (September); 225: 179-188.
30. Demirel Y. Chapter 12, Stability analysis, in *Non-equilibrium thermodynamics*, Third edition. Elsevier. 2014.
31. Devaux P (editor), Herrmann A. *Transmembrane Dynamics of lipids*. Wiley & Sons. 2012. Hoboken, New Jersey; Canada.
32. Heimburg T. Lipid Ion Channels (Review). *Biophys. Chem*. 2010; 150: 2-22.
33. Mosgaard LD, Heimburg T. Lipid ion channels and the role of proteins. *Accounts of Chemical Research*. 2013; 46: 2966-2976.
34. Heimburg T. *Thermal Biophysics of membranes*. Wiley-VCH. 2007.
35. Chodera JD, Mobley D. Entropy-Enthalpy compensation: role and ramifications in biomolecular ligand recognition and design. *Annu Rev of Biophysics*. 2013; 42: 121-142.
36. Astumian RD. Thermodynamics and kinetics of a brownian motor. *Science*. 1997; 276: 917-922.
37. Astumian RD. Thermodynamics and kinetics of molecular motors. *Biophysical Journal*. 2010; 98: 2401-2409.

38. Lautrup B, Appali R, Jackson AD, Heimburg T. The stability of solitons in biomembranes and nerves. *Eur Phys J E*. 2011; 34: 57-66.
39. Wilson JD, Walker J. The conversion of testosterone to 5 μ -androstano-17 β -ol-3-one (dihydrotestosterone) by skin slices of man. *J Clin Invest* 48:371-378: 1969.
40. Peran S, McGee MP. Unidirectional flux of phenylalanine into Vero cells. Measurements using paired tracers in perfused cultures. *Biochim Biophys Acta* 856: 231-236; 1986.
41. Nieschlag E, Behre HM. Testosterone, action, deficiency, substitution, 4th edition. Cambridge University. 2012.
42. Glaser R. Biophysics, Second Edition. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. 2012.
43. Bresloff PC, Newby JM. Stochastic models of intracellular transport. *Reviews of Modern Physics*. 2013; 85(1): 137-196.
44. Dowhan W, Bogdanov M. Lipid-dependent membrane protein topogenesis. *Annu Rev Biochem*. 2009; 78: 515-40.
45. Suhail Y et al. Modeling intercellular transfer of biomolecules through tunnelling nanotubes. *Bull Math Biol*. 2013; 75: 1400-1416.
46. Heimburg T. The capacitance and electromechanical coupling of lipid membranes close to transitions: the effect of electrostriction. *Biophysical Journal*. 2012; 103: 918-929.
47. Sungchul J. Molecular theory of the living cell. Springer. 2012. p. 79.
48. Petitot J. The morphogenetic models of René Thom, chapter 15. *Morphogenesis*. 2011. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg.

49. Tonnensen A, Christensen SM, Tkach V, Stamou D. Geometrical membrane curvature as an allosteric regulator of membrane protein structure and function. *Biophysical Journal*. 2014; 106(1): 201-9.
50. Szachowicz-Petelska B, Dobrzynska I, Skrodzka M, Darewicz B, Figaszewski ZA, Kudelski J. Phospholipid composition and electric change in healthy and cancerous parts of human kidneys. *J Membrane Biol*. 2013; 246: 421-425.
51. Dobrzynska I, Skrzydlewska E, Figaszewski ZA. Changes in electric properties of human breast cancer cells. *J Membrane Biol*. 2013; 246: 161-166.
52. Wenz JJ. Predicting effect of steroids on membrane biophysical properties based on the molecular structure. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2012; 1818: 896-906.
53. Gordon R (Editor). *Encyclopedia of Biophysics*. Springer. 2013. pp. 2610-11.
54. Alléra A. Wildt L. Glucocorticoid-recognizing and –effector sites in rat liver membrane. Kinetics of corticosterone uptake by isolated membrane vesicles- II. Comparative influx and efflux. *J Steroid Biochem Mol Biol* 42: 757-771; 1992.
55. Lackner C. Daufeldt S. Wildt L. Alléra A. Glucocorticoid-recognizing and –effector sites in rat liver plasma membrane vesicles. III. Specificity and stereospecificity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 64:69-82; 1998.
56. Watanabe S. Tani T. Watanabe S. Seno M. Transport of steroid hormones facilitated by serum proteins. *Biochem Biophys Acta* 1073: 275-284; 1991.
57. Vore M. Hoffman T. Carrier-mediated electrogenic transport of estradio-17 beta-glucuronide in rat liver *BMV Am J Physiol* 267: 546-551; 1994.

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

58. Thomas P. Rapid steroid hormone actions initiated at the cell surface and the receptors that mediate them with an emphasis on recent progress in fish models. 2012; 175(3): 367-83.
59. Rao G. Schulze-Hagen K. Rao M. Brener H. Kinetics of steroid transport through cell membranes: comparison of the uptake of cortisol by isolated rat liver cells with binding of cortisol to rat liver cytosol. *J Steroid Biochem* 7: 1123-1129; 1976.
60. Heimburg T. The capacitance and electromechanical coupling of lipid membranes close to transitions. The effect of electrostriction. *Biophysical Journal*. 2012. 103; 918-029.
61. Bogdanov M, Dowhan, Vitrac H. Lipids and topological rules governing membrane protein assembly. *Biochimica et Biophysica Acta BBA Molecular Cell Research*. 2013.
62. Alves I, Staneva G, Tesiier C, Salgado GF, Nuss P. The interaction of antipsychotic drugs with lipids and subsequent lipids reorganization investigated using biophysical methods. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011; 1808: 2009-2018.
63. Liang J. McGee MP. Hydratation Structure of Anthitrombin Conformes and Water Transfer during Reactive Loop Insertion. *Biophys J* 75: 573-582; 1998.
64. Bischoff M, Gradilla AC, Seijo I, Andrés G, Rodríguez-Navas C, González-Méndez L, Guerrero I. Cytonemes are required for the establishment of a normal Hedgehog morphogen gradient in *Drosophila* epithelia. *Nature Cell Biology*. 2013; 15(11): 1269-1281. doi: 10.1038/ncb2856.

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

65. Parsegian VA. Rand RP. Ran DC. Macromolecules and water: probing with osmotic stress. *Methods Enzymol* 259: 43-94; 1995.
66. Eldesbruner H, Mucke E. Three-dimensional alpha shapes. *ACM Trans Graph.* 1994; 13: 43-72.
67. Higgins CF Flip-Flop: The transmembrane translocation of lipids. *Cell* 79: 393-395; 1994.
68. Boon JM. Smith BD. Facilitated phosphatidylcholine flip-flop across erythrocyte membranes using low molecular weight synthetic translocases. *J Am Chem Soc* 123: 6221-6226; 2001.
69. Simon SM. Blobel G. A protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum. *Cell* 65: 371-380; 1991.
70. Killian JA. De Jong AM. Bijvelt J. Verkleij AJ & De Kruijff B. Induction of non-bilayer lipid structures by functional signal peptides. *EMBO J.* 9: 815-819; 1990.
71. Hofnung M. An intelligent channel (and more). *Science* 267: 473-474; 1995.
72. Fonzo D. Bajardi P. Lauro R. Dogliotti L. De Martinis C. Importance of the erythrocytes for the transport of steroid hormones in the circulating blood: experiments with estrone, estradiol and cortisol. *Boll Soc Ital Sper* 43: 1586-1590; 1967.
73. Brinkmann AQ. Mulder E. Van der Molen H. Model studies with erythrocytes on the initial steps of cellular uptake and binding of steroids. *J Steroid Biochem* 3: 601-615; 1972.
74. Tabony J. Biological self-organization by way of the dynamics of reactive processes, chapter 5. In *Morphogenesis*, Bourguin P, Lesne A. Ed. Springer-Verlag. 2011. Berlin Heidelberg.

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

75. Reuter S. Mayer D. Transport of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulphate into rat hepatocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 54: 227-235; 1995.
76. del Moral RG. Olmo A. Aguilar M. O'Valle F. P glycoprotein a new mechanism to control drug-induced nephrotoxicity. *Exp Nephrol* 6: 89-97:1998.
77. Duval D. Durant S. Delarche U. Non-genomic effects of steroids. Interactions of steroids molecules with membrane structures and functions. *Biochem Biophys Acta* 737: 409-442; 1983.
78. Perán S, Muñoz M. Saiz MT. New approach to the study of transport of biomolecules by microcarrier cell cultures perfused in a column applying a high resolution paired-tracer technique. Edited by Yudilevitch D et al. *Cell membrane Transport*. Plenum Press, New York, 1991. pp. 143-161.
79. Sathiskumar et al. Prenatal testosterone-induced fetal growth restriction is associated with down-regulation of rat placental amino acid transport. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2011; 9: 110.
80. ATB(0,+) Amino acid transporter as a drug target for treatment of estrogen receptor-positive breast cancer. United States Patent Application 20140024663. Kind Code: A1. Disponible en Internet: <file:///F:/US20140024663A1.pdf>.
81. Nagata C, Wada K, Tsuji M, Hayashi M, Takeda N, Yasuda K. Plasma aminoacids profiles are associated with biomarkers of breast cancer risk in premenopausal Japanese women. *Cancer Causes Control*. 2014. 25(2): 143-9. doi: 10.1007/s10552-013-0316-8.
82. Barnes T et al. Plasma aminoacid profiles of breast cancer patients early in the trajectory of the disease differ from healthy comparison groups. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2014. 39(6): 740-4. doi: 10.1139/apnm-2013-0526.

83. Poschke I, Mao Y, Kiessling R, Boniface J. Tumor-dependent increase of serum amino acid levels in breast cancer patients has diagnostic potential and correlates with molecular tumor subtypes. *Journal of Translational Medicine*. 2013, 11:290.
84. Qiang Q et al. Androgen receptor and nutrient signaling pathways coordinate the demand for increased aminoacid transport during prostate cancer progression. *Cancer Research*. 2011; 71(24):7525-36. doi: 10.1158/0008-5472. *BioMedCentral Proceedings*. 2012; 6(Suppl 3): P23.
85. Molnar J, Varga ZG, Thorton-Benko E, Thorton B. Chapter 7, The second law of thermodynamics and host-tumour relationships: concepts and opportunities. In *Application of Thermodynamics to Biological and Materials Science*, Ed. Tadashi M. Intech. Croatia. 2011.
86. Fontana L. Dietary protein restriction inhibits tumor growth in human xenograft models. *Oncotarget*. 2013; 4(12):2451-61.
87. Singh G, Akcakanat A, Sharma C, Luyinbazi D, Naff KA, Meric-Bernstam F. The effect of leucine restriction on Akt/mTor signaling in breast cancer cell lines in vitro and in vivo. *Nutr Cancer*. 2011; 63(2): 264-71.
88. Sparr E, Aberg C, Nilsson P, Wenneström. Diffusional transport in responding lipid membranes. *Soft Matter*. 2009; 5: 3225-3233.

HITOS EN LA INVESTIGACIÓN DEL FLUJO DE LÍPIDOS TRANSMEMBRANA

- CRONOLOGÍA- (1960/2010)

Autor	Aportación	Año
Luzzati V.	<i>Lípidos extraídos de las membranas biológicas forman en agua fases lamelares, dando lugar espontáneamente a una gran multilamela</i>	1960
Singer SJ, Nicolson GL	<i>Modelo fluido de membrana (Implica heterogeneidad de dominios laterales)-McConnell-</i>	1970
Bretscher M.	<i>Asimetría fundamental de los fosfolípidos en la membrana plasmática de eritrocitos humanos</i>	1970
Kornberg RD, McConnell HM	<i>Segregación estable de lípidos entre las dos monocapas de una membrana muestran una difusión transmembrana lenta. El "flip-flop". Ultralento, entre las dos monocapa. Se encontró que requiere varias horas a 30°C.</i>	1971
Seigneuret Devaux M. y P. F.	<i>Existencia de una flipasa de fosfolípido en la membrana de eritrocitos humanos</i>	1984
Daleke DL y Huestis WH	<i>Existencia de una flipasa de fosfolípido en la membrana de eritrocitos humanos</i>	1985
Schroit A et al.	<i>Señal hemocaterética: Presencia porcentual pequeña de Fosfatidilserina</i>	1983 1985

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

Autor	Aportación	Año
Bishop WR y Bell RM	<i>Sugieren existencia de Flipasa (independiente de ATP) →Movimiento Flip-Flop de los Lípidos para Facilitar la Permeación de Lípidos</i>	1985
Perán S y McGee M	<i>Uso de Pareja de Trazadores</i>	1985
Zachowoshy	<i>La actividad flipasa ATP-dependiente en gránulos cromafines de la médula adrenal bovina</i>	1987
Williamson P, Schlegel RA	<i>La Flipasa (Zachowoshy) era homóloga a una ATPasa de levadura (llamado Drs2p), y se analiza un mutante de DRS2 que no pudo dar la vuelta a los aminofosfolípidos</i>	1996
Simons K. E. Ikonen	<i>Importancia de los dominios Laterales</i>	1997
Graham T, Van Meer G Y Holtuis J	<i>Muestran Drs2p en trans-Golgi</i>	1999-2003
Natarajan P y Graham T	<i>Actividad flipasa en las membranas del A. de Golgi</i>	2006
Suzuki	<i>Identifica la proteína TMEM16F (Ca⁺⁺ dependiente de la PS)</i>	2010

MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.

ANEXOS

ANEXO I.- ALGUNAS RELACIONES CONCEPTUALES SELECCIONADAS ENTRE PARÁMETROS FENOMENÓLOGICOS Y MAGNITUDES FÍSICO-QUÍMICAS.

1.- ENTROPÍA CONFIGURACIONAL y CONSTANTE de ELASTICIDAD

$$S(h) = k \ln P = s(0) - 3kh^2/2Na^2$$

$$F(h) = E(h) - TS(h) - TS(h)$$

$$F(h) = F(=) + 3kTh^2/2Na^2$$

$$dF = -SdT - f \cdot dh$$

La Fuerza F es proporcional a la Elongación

Ley de Hooke

$$f = -k' \cdot h$$

$$\underline{k'} = 3kT/Na^2$$

La Elasticidad es debida a factores Entrópicos

(Na: Número de Avogadro)

2.- OSCILADOR ARMÓNICO EN LA MEMBRANA SI $\xi \ll L$ [para ξ , Elasticidad y L, Longitud]

$$F = - k \xi$$

y

$$U = \frac{1}{2} k \xi^2$$

La Elasticidad bajo ciertas condiciones modifica la Energía Interna del Sistema (U) provocando Fluctuaciones Entálpicas de una determinada frecuencia

3.- ELECTROSTRICCIÓN: PRESIÓN MECÁNICA Π y DIFERENCIA DE POTENCIAL ELÉCTRICO V

$$d\underline{V}_m = \left[(\delta q / \delta \Pi)_{vm} / (\delta q / \delta V)_{\Pi} \right] d\Pi \equiv \beta_q d\Pi$$

$$\beta_q = \left(\delta V_m / \delta \Pi \right)_q$$

β_q es la constante de acoplamiento entre la Presión y la Capacidad Condensadora como Diferencia de Potencial (de aplicación a los lípidos de la membrana)

4.- BALANCE ENTRÓPICO-ENTÁLPICO: TEMPERATURA DE TRANSICIÓN DE FASE (T_m), ENTROPÍA (S) Y ENTALPÍA (H)

$$\Delta \underline{S} = \Delta H / \underline{T}_m$$

→

$$\Delta \underline{G} = \Delta H \left(T_m - T / T_m \right)$$

Un cambio de temperatura provoca un cambio, diferencia de G (ΔG), y por tanto la transición de Gel→Sol→Gel

--

ΔG se hace cero cuando T alcanza a T_m

--

Si $\Delta G > 0$ el cambio se conduce a la fase de gel,
Si $\Delta G < 0$, la membrana adopta una fase más fluida

--

- El ruido térmico no es suficiente para promover la transición de fases, precisa que ΔG (Incremento de la Función de Gibbs) sea distinto de cero

--

El orden por fluctuaciones generado siempre que no sea $\Delta G = 0$, permite la conformación del poro y del canal lipídico

5.- PERMEABILIDAD Y CAPACIDAD CALORÍFICA A PRESIÓN CONSTANTE

$$P = P_0 + \alpha \cdot \Delta C_P$$

La Energía Libre de un Poro está ligada fuertemente al

Área (ΔA)

ANEXO II.- ECUACIONES DEL APOYO EXPERIMENTAL PARA EL MODELO CONCEPTUAL DE ESTA MEMORIA

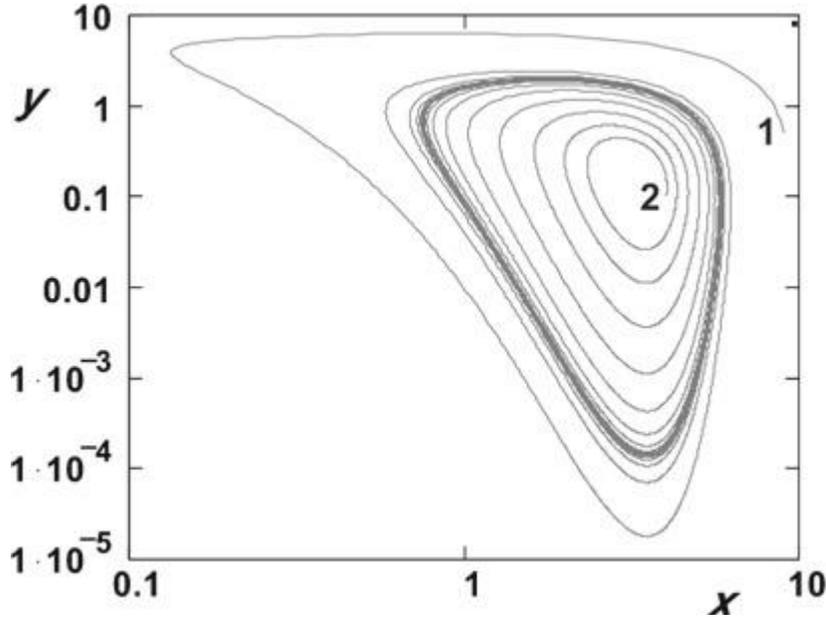
1.- Ecuación 1.

$$\%U = 1 - ([^3\text{H}] \text{ T} / \text{Manitol } ^{14}\text{C}) \times 100, \quad (\text{Ec.1})$$

2.- Ecuación 2.

$$J = - F \times Ca \times (1-Ut0), \quad (\text{Ec. 2})$$

ANEXO III.- TRATAMIENTO AVANZADO DEL CONTROL METABÓLICO MICHAELIANO³⁵. Ejemplo de Ciclo Límite.



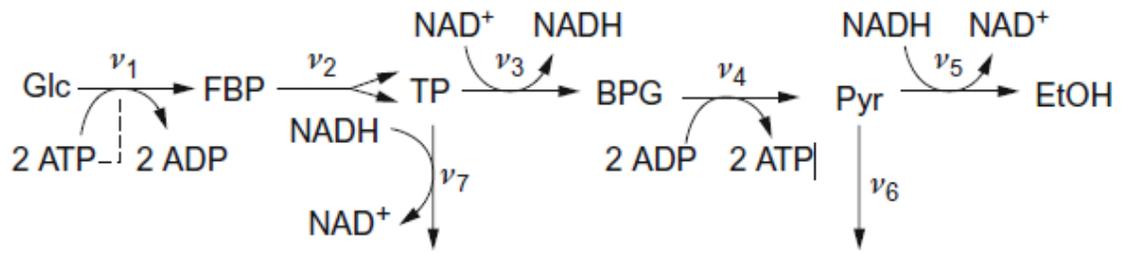
$$\begin{aligned} \dot{x} &= V_{in} - k_1xy, \\ \dot{y} &= \nu k_1xy - k_p \frac{y}{K_M + y} \end{aligned}$$

Donde x es la concentración de glucosa (fructosa-6-fosfato), e y es la concentración de ATP.

- V_{in} , representa la constante (inflow) de glucosa.
- k_1 , representa la actividad de la fosfofructoquinasa.
- K_M , es la constante de Michaelis para la piruvato quinasa (PK).
- ν , es la ratio estequiométrica.

³⁵ Moroz A. Chapter 3, Variational and the Optimal Control Models in Biokinetics. p. 156-7.

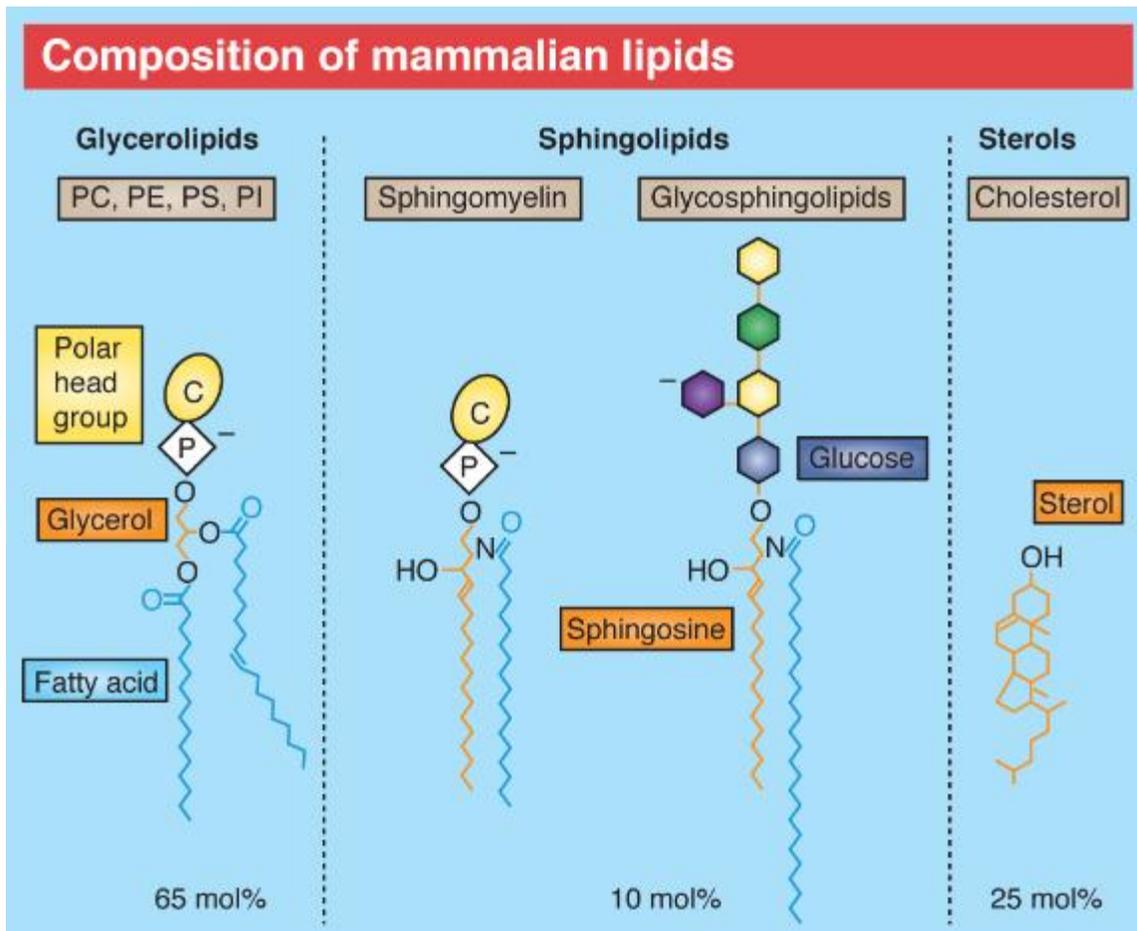
MODELO DE TRANSPORTE POR CANALES DE ISOPOLARIDAD.



ANEXO IV.- COMPOSICIÓN PORCENTUAL MOLAR DE LOS LÍPIDOS EN MAMÍFEROS

De: Van Meer G, de Kroon AIPM. Lipid map of the cell.

Journal of Cell Science. 2011; 124:5-8.



ANEXO V.- RELACIÓN entre LA ENTROPÍA [S] como una FUNCIÓN de VARIABLES EXTENSIVAS (- α -) TERMODINÁMICAS (ENERGÍA, VOLUMEN, ÁREA, CARGA ELÉCTRICA, ...) y las DESVIACIONES del EQUILIBRIO (FLUCTUACIONES)³⁶ : [$\xi_i = \alpha_i - \alpha_{i,0}$]

$$S = S_0 + \sum_i \left(\frac{\delta S}{\delta \xi_i} \right)_0 \xi_i + \frac{1}{2} \sum_{ij} \left(\frac{\delta^2 S}{\delta \xi_i \delta \xi_j} \right)_0 \xi_i \xi_j + \dots$$

³⁶ Cerca del Equilibrio las fluctuaciones son pequeñas y se lineariza quedando S como la suma de S₀ y el segundo término +1/2 \sum . Es la base de la termodinámica del no equilibrio en la región lineal, desarrollada por Onsager y Prigogine.

DIAGRAMA ESTRUCTURAL-FUNCIONAL DEL MODELO CONCEPTUAL PROPUESTO.-

DIAGRAMA del MODELO CONCEPTUAL de TRANSPORTE por CANALES de ISOPOLARIDAD/ISOENTRÓPICOS DE LÍPIDOS ESTEROIDES (*TESTOSTERONA)

