

Estructura y función de La Membrana Plasmática

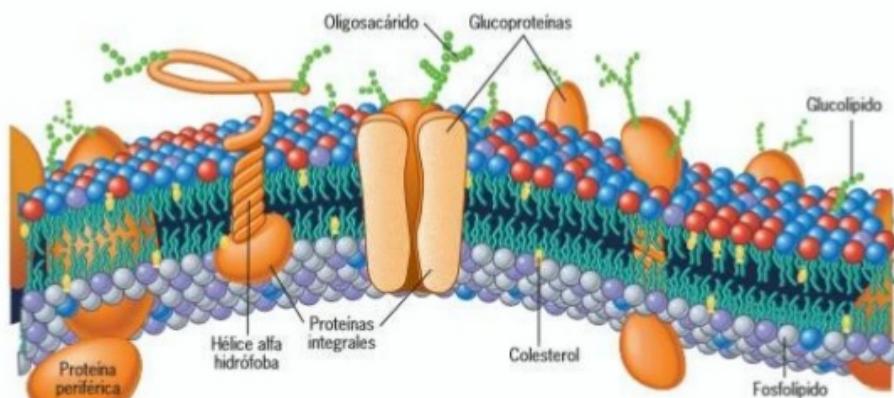


Imagen tomada de <http://es.slideshare.net/>

Las paredes externas de una casa o de un automóvil constituyen una barrera fuerte y rígida que protege a los habitantes de un mundo externo impredecible y áspero. Se podría esperar que el límite exterior de una célula viva consistiera igualmente de una barrera dura e impenetrable, puesto que también debe proteger al delicado contenido interno contra los rigores de un inhóspito mundo no viviente. Aun así, las células están separadas del ambiente externo por una estructura denominada **membrana plasmática**, que sólo tiene unas cuantas moléculas de espesor (5 a 10 nm). Se necesitarían 1 000 membranas plasmáticas apiladas una sobre otra para igualar el espesor de una sola página de este libro.

Debido a su delgadez, cuando se examina un corte de la célula con microscopio de luz no se descubre signo alguno de la membrana plasmática. En realidad, no fue sino hasta finales del decenio de 1950 que las técnicas para preparar y teñir tejidos habían progresado hasta el punto que permitieron observar con claridad la membrana plasmática mediante microscopio electrónico. Las primeras micrografías electrónicas, como las logradas por J.D. Robertson, de la Universidad Duke, mostraron la membrana plasmática como una estructura de tres capas compuesta por dos capas de color oscuro orientadas hacia afuera y en medio una capa de color claro (fig. 4-1, a). Todas las membranas que se examinaron con detalle, ya fueran plasmáticas, nucleares o citoplásmicas (fig. 4-1, b), o las tomadas de plantas, animales o microorganismos, mostraron esta misma ultraestructura. Además de suministrar una imagen visible de esta importante y vital estructura celular, esas micrografías electrónicas generaron un acalorado debate respecto de la composición molecular de las diferentes capas de una membra-

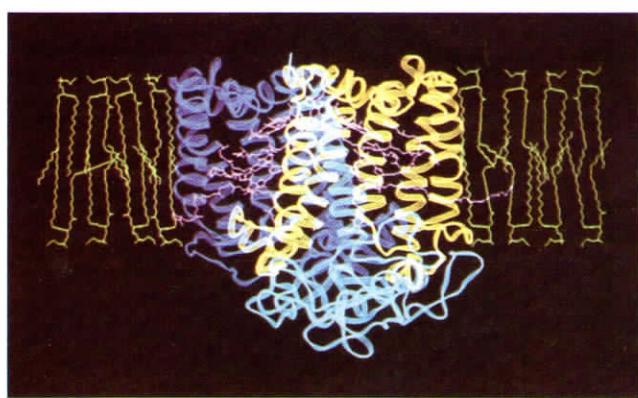


FIGURA 4-A. Disposición tridimensional de los polipéptidos que constituyen el centro de reacción fotosintética residente en la membrana plasmática de una bacteria. Se muestran en amarillo, azul y verde los diferentes polipéptidos situados en el centro de reacción. (Tomado de G. Feher, J.P. Allen, M.Y. Okamura y D.C. Rees. Reimpreso, con permiso, de Nature 339:113, 1989. Copyright 1989, Macmillan Magazines Limited.)

na, discusión que llegó al punto medular del tema referente a la estructura y función de la membrana. Más adelante retornaremos a la estructura de la membrana, pero primero examinaremos algunas de las principales funciones de la membrana en una célula viva (fig. 4-2).

4-1 Resumen de las funciones de la membrana

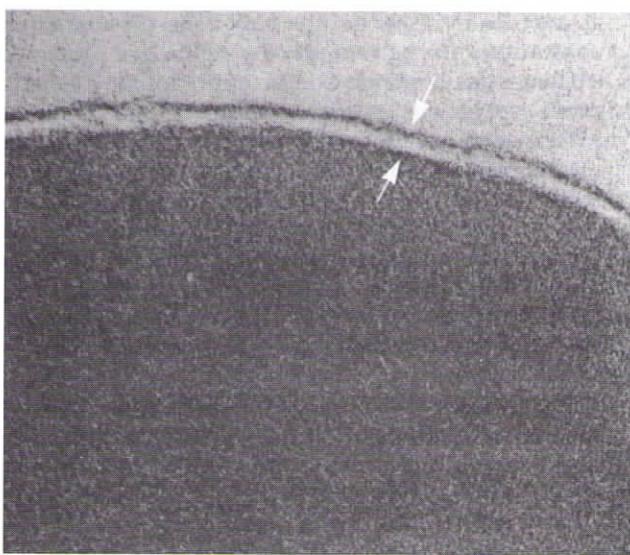
1. Compartimentalización. Las membranas son hojas continuas, sin aberturas, como las que encierran los compartimentos intracelulares. La membrana plasmática rodea todo el contenido de la célula, en tanto que las membranas nuclear y citoplasmática incluyen varios espacios celulares internos en los cuales tienen lugar actividades especializadas. Igual que el espacio dentro de un edificio debe dividirse para tener actividades de diferente tipo en sus compartimentos con un mínimo de interferencia externa, así también debe dividirse la célula. En la célula, la compartmentalización es particularmente importante debido a que los diferentes espacios están llenos de líquido, y si estos líquidos se mezclaran sería desastroso.

2. Las membranas constituyen barreras selectivamente permeables. Las membranas impiden el libre intercambio

de materiales de un lado a otro, pero al mismo tiempo proporcionan el medio para comunicar un espacio con otro. La membrana plasmática debe garantizar que las sustancias apropiadas penetren al citoplasma desde el espacio externo y las sustancias inapropiadas salgan de la célula. En esta función, la membrana plasmática actúa como barrera selectivamente permeable.

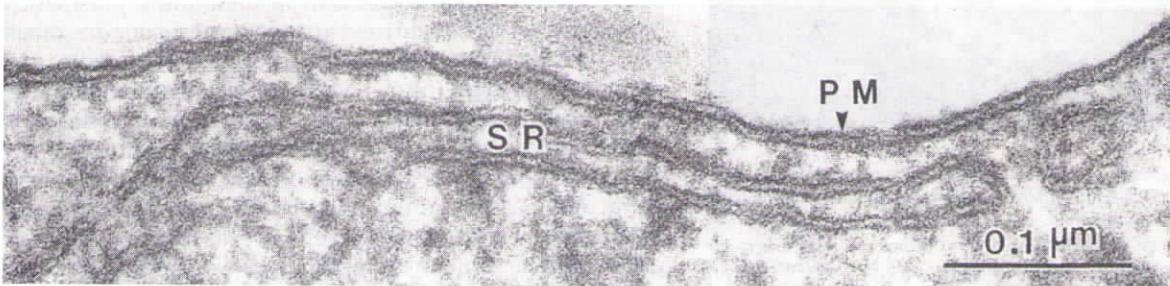
3. Transporte de solutos. La membrana plasmática contiene los mecanismos para transportar físicamente sustancias de un lado al otro de la membrana, con frecuencia de una región donde un soluto se encuentra en baja concentración a otra donde dicho soluto muestra concentración más alta. Los mecanismos de transporte de la membrana permiten que la célula acumule azúcares y aminoácidos, necesarios como energéticos de su metabolismo y para construir sus macromoléculas. La membrana plasmática tiene otra función relacionada con el transporte de solutos, que consiste en separar iones con carga opuesta y establecer gradientes iónicos. Esta capacidad es crucial para las células nerviosas y musculares, pero también puede desempeñar un papel en la respuesta de cualquier célula a su ambiente.

4. Respuesta a señales externas. La membrana plasmática tiene una función muy importante en la respuesta de una célula a los estímulos externos, proceso conocido como transducción de señales. Las membranas poseen re-



(a)

50 nm



(b)

FIGURA 4-1. Aspecto trilaminar de las membranas. *a)* Micrografía electrónica que muestra la estructura en tres capas (trilaminar) de la membrana plasmática de un eritrocito. Las flechas indican los bordes interno y externo. *b)* Borde externo de una célula muscular diferenciada desarrollada en un cultivo que muestra la estructura trilaminar similar a la de la membrana plasmática (MP) y la membrana del retículo endoplásmico liso (REL). (*a:* Cortesía de J.D. Robertson; *b:* según Andrew R. Marks y cols. *J. Cell Biol.* 114:307, 1991; con autorización de Rockefeller University Press.)

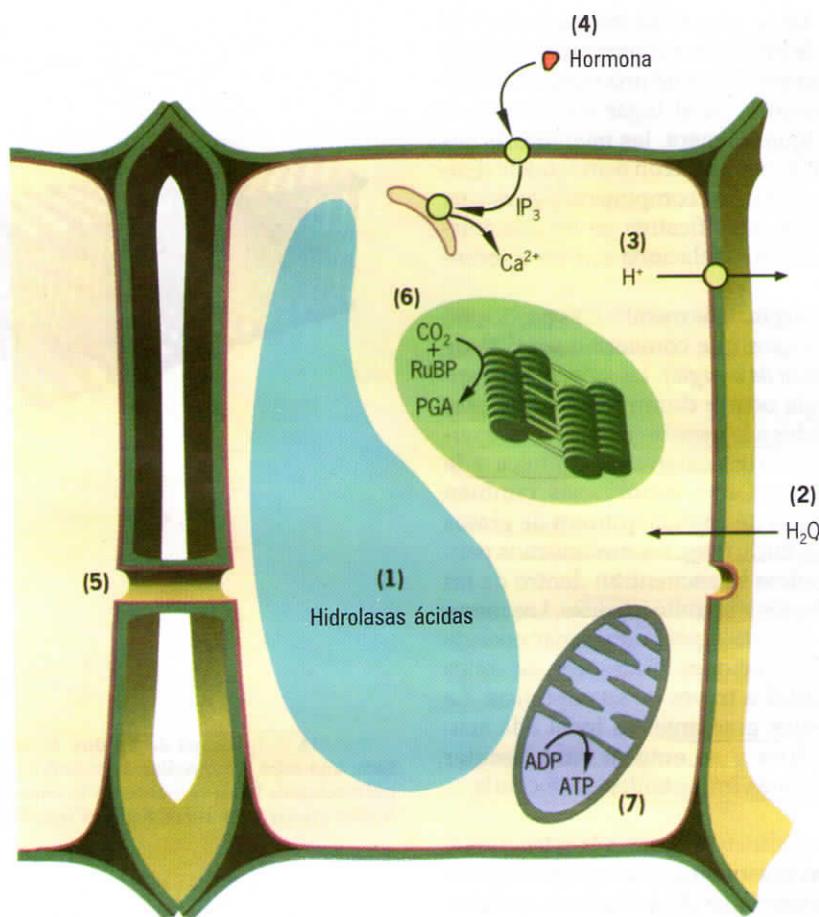


FIGURA 4-2. Resumen de las funciones de la membrana en una célula vegetal. 1) Ejemplo de una membrana compartamentalizada en la cual las enzimas hidrolíticas (hidrolasas ácidas) quedan encerradas dentro de una vacuola rodeada por una membrana. 2) Ejemplo del papel de las membranas como barrera selectivamente permeable. Las moléculas de agua pueden penetrar rápidamente a través de la membrana plasmática llenando el espacio disponible dentro de la célula vegetal y ejerciendo presión contra su pared celular. 3) Ejemplo de transporte de soluto. Los iones hidrógeno producidos por varios procesos metabólicos en el citoplasma son bombeados fuera de las células vegetales hacia el espacio extracelular por una proteína de transporte localizada en la membrana plasmática. 4) Ejemplo de la participación de una membrana en la transferencia de información de un lado a otro (transducción de señales). En este caso, una hormona (p. ej., ácido abscísico) se enlaza a la superficie externa de la membrana plasmática y desencadena la liberación de un mensaje químico (como IP_3) dentro del citoplasma. En este caso, IP_3 provoca la liberación de Ca^{2+} de un almacén citoplasmático. 5) Ejemplo del papel de la membrana en la comunicación de célula a célula. Los orificios entre células vegetales adyacentes, denominados plasmodesmata, permiten que los materiales se desplacen directamente del citoplasma de una célula a sus vecinas. 6) Ejemplo del papel de las membranas citoplasmáticas como sitio de localización de enzimas. La fijación de CO_2 por la célula vegetal es catalizada por una enzima que se relaciona con la superficie exterior de las membranas tilacoides del cloroplasto. 7) Ejemplo del papel de las membranas en la transducción de energía. La conversión de ADP a ATP ocurre en íntima conexión con la membrana externa de la mitocondria.

ceptores que se combinan con moléculas específicas (**ligandos**) con estructura complementaria. Diferentes tipos de células tienen membranas con distintos tipos de receptores, y por lo tanto pueden reconocer y responder a diferentes ligandos de su ambiente. Los ligandos mejor estudiados son hormonas, factores de crecimiento y neurotransmisores, todos unidos a la membrana plasmática pero que no la atraviesan. La interacción de un receptor de membrana plasmática con un ligando externo a veces provoca que la membrana genere una nueva señal que estimula o inhibe actividades internas. Por ejemplo, las señales generadas en la membrana plasmática pueden indicar a la célula que elabora más glucógeno, se prepare para la división celular, se

desplace hacia los puntos de mayor concentración de un compuesto particular, libere calcio de sus reservas internas o posiblemente que se suicide.

5. **Interacción intercelular.** Situada en la frontera de la célula viviente, la membrana plasmática media las interacciones que ocurren entre las células de un organismo multicelular. La membrana también permite a las células reconocerse entre sí, adherirse cuando es apropiado e intercambiar materiales e información.

6. **Sitios para actividades bioquímicas.** Las membranas proporcionan un medio para organizar las actividades celulares. Puesto que los reactantes se encuentran en solución, sus posiciones no son estables y su interacción depen-

de de colisiones al azar. En la página 61 del capítulo 2 se hizo notar que la unión de enzimas en complejos multienzimáticos facilita mucho la secuencia de una reacción, debido a que cada enzima se sitúa en el lugar correcto en el momento adecuado. De igual manera, las membranas suministran a la célula una extensa armazón o andamiaje dentro del cual se pueden ordenar los componentes para una interacción eficaz. Una parte significativa de los mecanismos enzimáticos de una célula se relaciona con sus diferentes membranas.

7. Transducción de energía. Las membranas participan estrechamente en los procesos que convierten un tipo de energía en otro (*transducción de energía*). La más fundamental transducción de energía ocurre durante la fotosíntesis, cuando los pigmentos unidos a la membrana absorben energía de la luz solar, la convierten en energía química y la almacenan en carbohidratos. Las membranas también participan en la transferencia de energía química de grasas y carbohidratos al ATP. En eucariotes, los mecanismos para estas conversiones energéticas se encuentran dentro de las membranas de los cloroplastos y las mitocondrias. Las membranas también sirven como sitios para almacenar energía cuando mantienen concentraciones diferentes de iones específicos o de otros solutos a través de su superficie. La energía almacenada en estos gradientes es igual a la acumulada en una pila eléctrica y se emplea para ejecutar muchas de las actividades más importantes de la célula.

Este capítulo se refiere principalmente a la estructura y funciones de la membrana plasmática, con excepción de su papel mediador en las interacciones intercelulares, que analizaremos en el capítulo 7. La estructura y funciones de las membranas citoplasmáticas se estudian en el capítulo 8.

4-2 Conceptos generales de la estructura de la membrana plasmática

Desde hace más de 50 años se sabe que la membrana está compuesta principalmente por lípidos y proteínas. El verdadero núcleo de la membrana consiste en una vaina de fosfolípidos dispuestos en una capa bimolecular, una **bicapa de lípidos** (fig. 4-3). Las bicapas de lípidos sirven principalmente como armazón estructural para la membrana y como barrera que impide movimientos desordenados de materiales hidrosolubles hacia adentro y afuera de la célula. Las proteínas de la membrana, por otra parte, efectúan la mayor parte de las funciones específicas resumidas en la sección previa.

Los primeros modelos de la estructura de la membrana, en particular el propuesto en 1935 por Hugh Davson, del University College de Londres, y por James Danielli, de la Universidad de Princeton, propusieron que las proteínas de la membrana se encontraban en la superficie externa de la bicapa de lípidos. Los experimentos efectuados a fines del decenio de 1960 condujeron a un concepto radicalmente diferente de la estructura de la membrana, según se detalló en el *modelo de mosaico fluido* propuesto, en 1972, por S. Jonathan Singer y Garth Nicolson, de la Universidad de California. En el modelo de mosaico fluido, el "dogma cen-

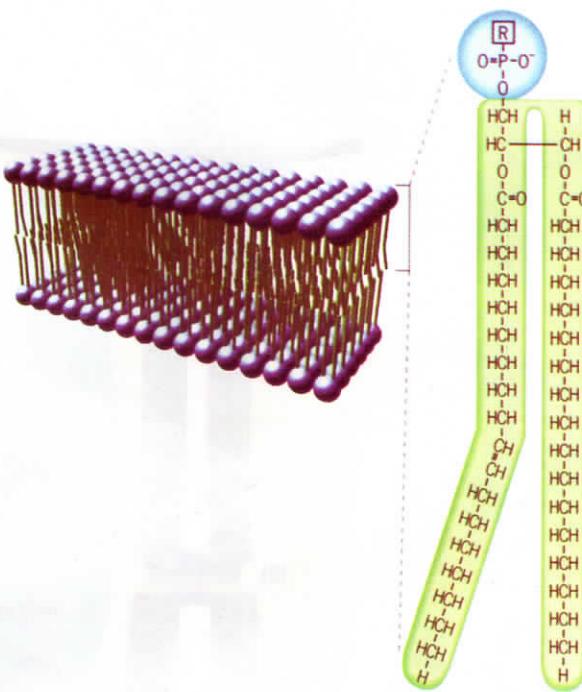


FIGURA 4-3. Bicapa de lípidos. El centro de una membrana contiene una capa bimolecular de fosfolípidos orientada con sus grupos hidrosolubles hacia el frente de la superficie externa y sus colas de ácidos grasos hidrófobos hacia el interior.

tral" de la biología de la membrana durante más de dos decenios, la bicapa de lípido se retiene como núcleo de la membrana, pero se presta gran atención al estado físico de los lípidos (fig. 4-4). En vez de consistir en una bicapa inmóvil estática, las moléculas de lípido se presentan en estado líquido capaces de girar y efectuar desplazamientos laterales dentro de la membrana.

La estructura y disposición de las proteínas de la membrana en el modelo de mosaico fluido son notablemente diferentes de las propuestas en modelos previos. Las proteínas del mosaico fluido se presentan como "un mosaico" de partículas discontinuas que penetran profundamente hacia el interior y atraviesan por completo la capa de lípidos (fig. 4-4). Pero lo más importante del modelo de mosaico fluido es que considera las membranas celulares como estructuras dinámicas cuyos componentes son móviles, con capacidad para reunirse y participar en interacciones transitorias o semipermanentes de diferentes tipos. En las siguientes secciones examinaremos parte de las pruebas empleadas para formular y apoyar este modelo dinámico de la estructura de la membrana y consideraremos algunos datos recientes que aún confirman este modelo.

Composición de la membrana

Todas las membranas son estructuras de lípidos y proteínas cuyos componentes se mantienen unidos formando una delgada capa por medio de enlaces no covalentes. Además

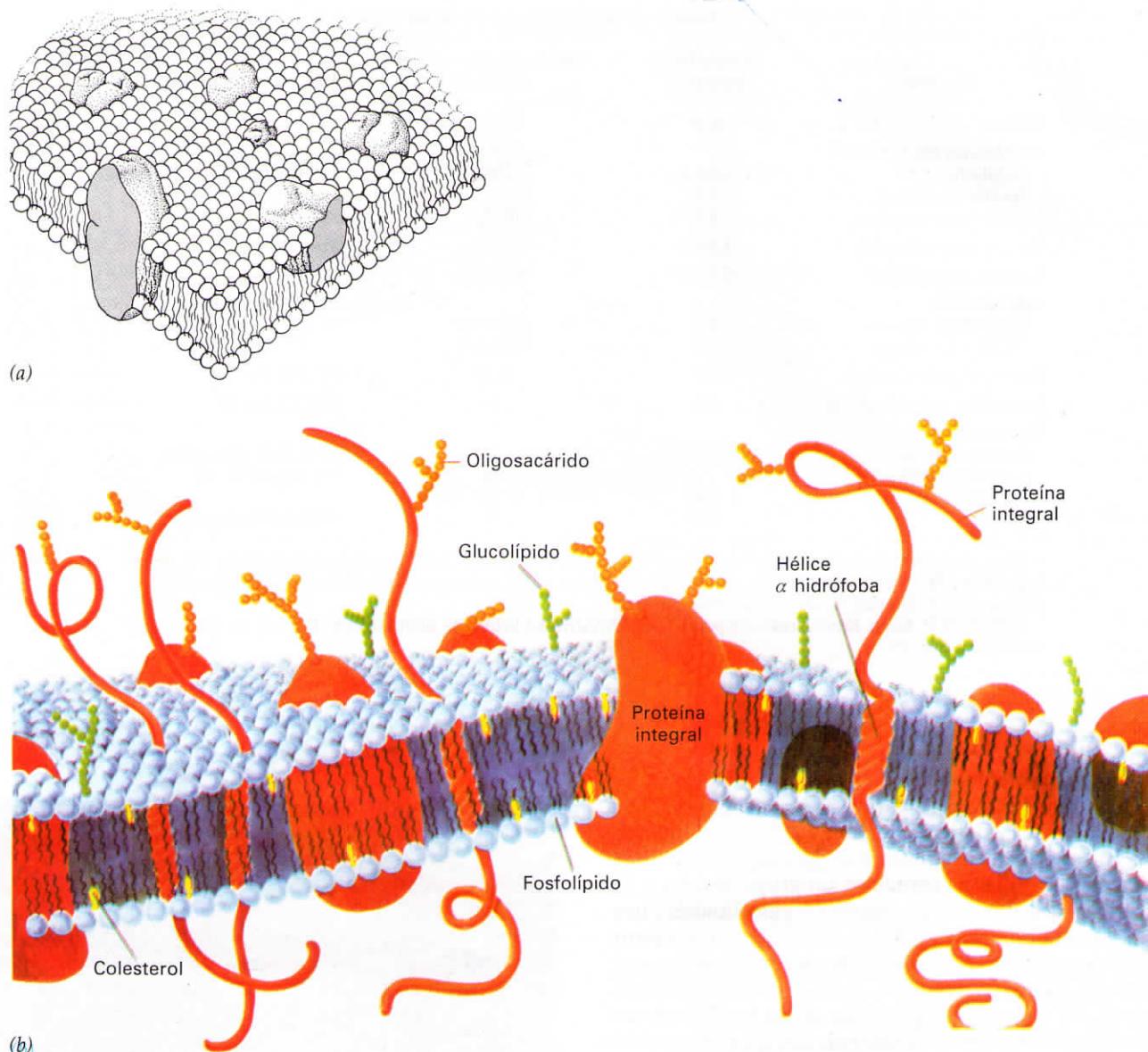


FIGURA 4-4. Estructura de la membrana plasmática. *a)* Modelo del mosaico fluido de la estructura de la membrana según lo propusieron inicialmente Singer y Nicolson, en 1972. A diferencia de modelos previos, las proteínas penetran y atraviesan la bicapa de lípidos. *b)* Representación actual de la membrana que muestra la misma organización básica propuesta por Singer y Nicolson. Ahora se sabe que la superficie externa de la mayor parte de las proteínas de la membrana, y también un pequeño porcentaje de los fosfolípidos, contienen cadenas cortas de azúcares (cadenas con cuentas amarillas y verdes) que constituyen glucoproteínas y glucolípidos. Estas porciones de las cadenas de polipéptidos se extienden a través de todo el espesor de la bicapa de lípidos; en condiciones típicas se presentan como hélices α compuestas de aminoácidos hidrófobos. (*a:* Reimpreso con permiso de S.J. Singer y G.L. Nicolson, Science 175:720, 1972. American Association for Advancement of Science.)

de lípidos y proteínas, la membrana también contiene carbohidratos (fig. 4-4, *b*). La proporción entre lípidos y proteínas varía considerablemente (cuadro 4-1) según el tipo de membrana celular (plasmática, reticuloendoplasmática, complejo Golgi), tipo de organismo (procariote, vegetal, animal) y tipo de célula (cartilaginosa, muscular, hepática). Por ejemplo, en la membrana interna de las mitocondrias, la relación proteína/lípidos es muy alta en comparación con la membrana plasmática del eritrocito, que a su vez es alta comparada con las membranas de la vaina de mielina

que rodean una célula nerviosa. Estas diferencias pueden correlacionarse en gran medida con la función particular de estas membranas. La membrana interna de las mitocondrias contiene proteínas transportadoras de la cadena de transporte de electrones y su contenido de lípidos es menor en relación con otras membranas. La mejor manera de describir la vaina de mielina es como un aislante eléctrico que envuelve la neurona (fig. 4-5), una función que es mejor realizada por una gruesa capa de lípidos de resistencia eléctrica elevada y contenido mínimo de proteínas.

CUADRO 4-1. Contenido de lípidos y proteínas de las membranas

Membrana	Proteína/lípidos (peso/peso)	Colesterol/lípidos polares (mol/mol)	Principales lípidos polares*
Mielina	0.25	0.7-1.2	Cer, PE, PC
Membranas plasmáticas			
Célula hepática	1.0-1.4	0.3-0.5	PC, PE, PS, Efm
Ascitis de Ehrlich	2.2	0.5-1.2	
Vellosidad intestinal	4.6		
Fastasma de eritrocito	1.5-4.0	0.9-1.0	Efm, PE, PC, PS
Retículo endoplásmico	0.7-1.2	0.03-0.08	PC, PE, Efm
Mitocondrias			DPG, PC, PE, Plas
Membrana externa	1.2	0.03-0.09	
Membrana interna	3.6	0.02-0.04	
Bastoncillos de la retina	1.5	0.13	PC, PE, PS
Laminillas del cloroplaso	0.8	0	GalDG, SL, PS
Bacterias			
Grampositivas	2.0-4.0	0	DPG, PG, , PE, aaPG
Gramnegativas		0	PE, PG, DPG, AP
Micoplasma	2.3	0	
Halófila	1.8	0	PGP análogo del éter

* Las abreviaturas son: Cer, cerebrósidos; DPG, difosfatidilglicerol, GalDG, galactosildiglicérido; AP, ácido fosfatídico; PC, fosfatidicolina; PE, fosfatidiletanamina; aaPG, ésteres aminoacil de fosfatidilglicerol; Plas, plasmalógeno; SL, sulfolípido; Efm, esfingomielina.

FUENTE: E.D. Korn, Reproducido, con permiso, de ANNUAL REVIEW OF BIOCHEMISTRY, vol. 38, © 1969, por Annual Reviews Inc.

Lípidos de la membrana

Las membranas contienen varios tipos de lípidos, todos anfipáticos; o sea, contienen regiones hidrófilas e hidrófobas (como se ilustra en la figura 4-3). La mayor parte de los lípidos de la membrana contienen un grupo fosfato, y las principales excepciones son colesterol y glucolípidos. Puesto que casi todos los fosfolípidos de la membrana poseen un esqueleto glicerol, se les denomina **fosfoglicéridos** (fig. 4-6). A diferencia de los triglicéridos, que poseen tres ácidos grasos (pág. 47, cap. 2), los glicéridos de la membrana son diglicéridos: sólo dos grupos hidroxilo del glicerol se esterifican para formar ácidos grasos; el tercero se esterifica para formar un grupo fosfato. La molécula sin otras sustituciones, además del fosfato y las dos cadenas lípidas acilo, se denomina ácido fosfatídico y prácticamente está ausente en la membrana. En vez de esto, los diglicéridos de la membrana contienen un grupo adicional unido al fosfato, por lo general en forma de colina (para formar la fosfatidicolina), etanolamina (la fosfatidiletanamina), serina (la fosfatidilserrina), o inositol (el fosfatidilinositol). Cada uno de estos grupos es pequeño e hidrófilo y, junto con el fosfato eléctricamente cargado al cual se unen, forman un dominio muy hidrosoluble en un extremo de la molécula denominado grupo de la cabeza. Por lo contrario, las cadenas lípidas acilo son largas, no ramificadas, formadas por hidrocarburos hidrófobos (fig. 4-6). Un ácido graso de la membrana puede estar completamente saturado (o sea, carecer de dobles enlaces), monoinsaturado (un solo doble enlace) o poliinsaturado (más de un doble enlace). A menudo los fosfoglicéridos contienen una cadena lípida acilo insaturada y una saturada.

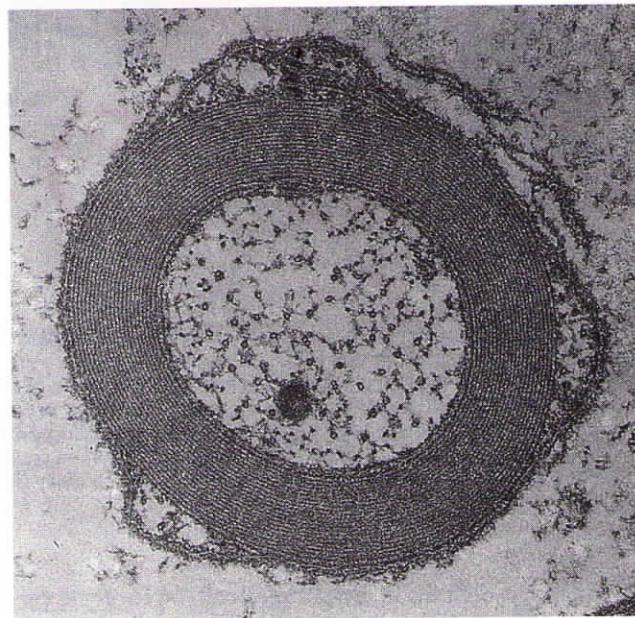


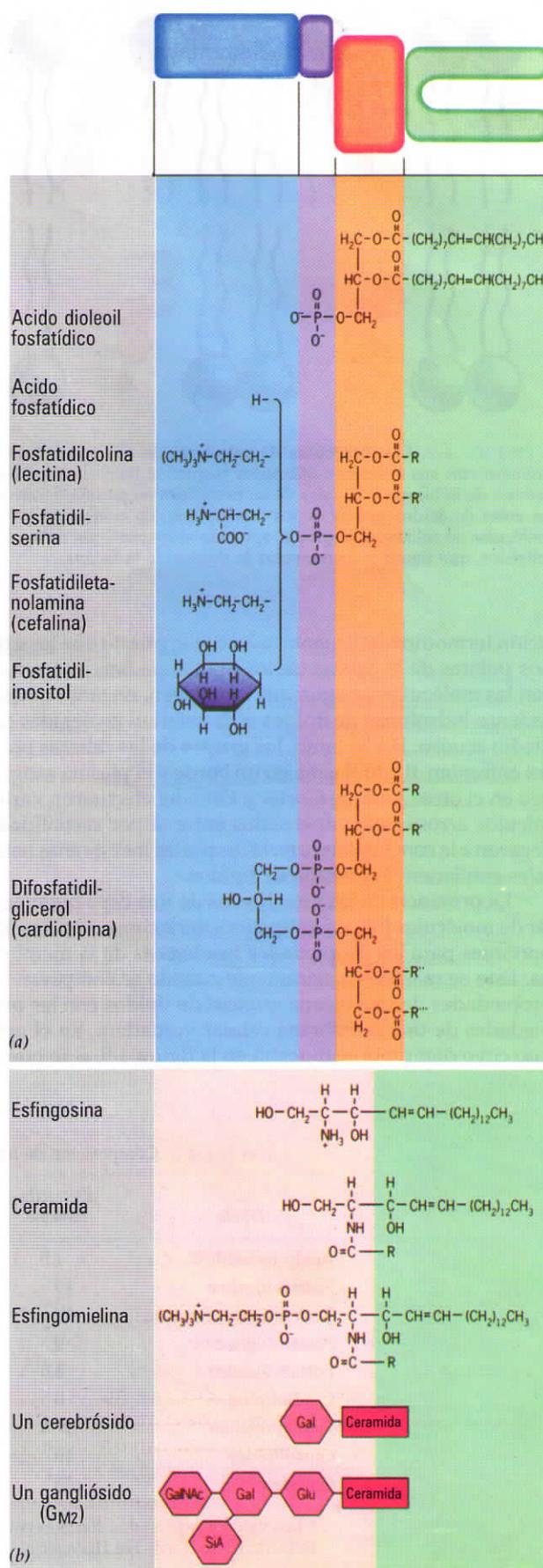
FIGURA 4-5. Vaina de mielina. Micrografía electrónica del axón de una célula nerviosa rodeada por una vaina de mielina que consta de capas concéntricas de membrana plasmática. La vaina de mielina aísla la célula nerviosa de su entorno y como resultado aumenta la velocidad a la cual pueden viajar los impulsos a lo largo del axón (analizado en la página 156). (Tomado de Leonard Napolitano, Francis LeBaron y Joseph Scaletti, J. Cell Biol. 34:820, 1967. Con permiso de Rockefeller University Press.)

FIGURA 4-6. Estructura química de los lípidos de la membrana. *a)* Estructura de los lípidos derivados de glicerol, todos los cuales son fosfolípidos (véase también figura 2-22). *b)* Lípidos derivados de esfingosina. La esfingomielina es un fosfolípido, los gangliósidos son glucolípidos. Un tercer lípido de la membrana es el colesterol, que se muestra en la siguiente figura ($R =$ cadena lipoacil).

Un tipo menos abundante de lípidos de membrana, denominados *esfingolípidos*, se derivan de esfingosina, un alcohol aminado que contiene una larga cadena de hidrocarburo (fig. 4-6). Los esfingolípidos contienen esfingosina unida a un ácido graso (R en la figura 4-6, *b*) a través de su grupo amino. Esta molécula es un *ceramido*. Los diferentes lípidos formados por esfingosina contienen grupos adicionales esterificados en el alcohol terminal de la fracción esfingosina. Si el resultado de la sustitución es la introducción de un grupo fosforilcolina, entonces la molécula es una esfingomielina, el otro *fosfolípido* de la membrana. La molécula será un *glucolípido* si la sustitución introduce un carbohidrato. Si el carbohidrato es un azúcar simple, el glucolípido se denomina *cerebrósido*; si es un oligosacárido, el glucolípido se llama *gangliósido*. Puesto que todos los esfingolípidos tienen dos largas cadenas de hidrocarburos hidrófobas en un extremo y una región hidrófila en el otro, también son anfipáticos y con estructura total básicamente similar a la de fosfoglicéridos.

Otro componente lípido de ciertas membranas es el esterol *colesterol* (véase fig. 2-9), que en ciertas células animales puede constituir hasta 50% de las moléculas lípidas de la membrana plasmática. Las membranas plasmáticas de la mayor parte de las células vegetales y de todas las células bacterianas carecen de colesterol. El colesterol es más pequeño que los otros lípidos de la membrana y menos anfipático. Como se muestra en la figura 4-7, las moléculas de colesterol se orientan con sus grupos hidroxilo hidrófobos hacia la superficie de la membrana y su extremo hidrófobo integrado a la bicapa de lípidos. Más adelante analizaremos el efecto de estas moléculas sobre las propiedades de la bicapa. En el cuadro 4-2 se presentan los lípidos que componen diferentes membranas.

Bicapa de lípidos. En 1925, dos científicos holandeses, E. Gorter y F. Grendel, propusieron por primera vez que las membranas celulares podían contener una bicapa de lípidos. Estos investigadores extrajeron lípidos de eritrocitos humanos y midieron la superficie cubierta por dichos lípidos al extenderlos sobre la superficie del agua (fig. 4-8, *a*). Puesto que los eritrocitos de mamífero carecen de núcleo y de organelos citoplásmicos, la membrana plasmática es la única estructura que contiene lípidos; por lo tanto, se puede asumir que todos los lípidos del eritrocito corresponden a la membrana plasmática (página 140). La proporción entre la superficie de agua cubierta por los lípidos extraídos de eritrocitos y la superficie calculada para los eritrocitos de los cuales se extrajeron dichos lípidos varió entre 1.8 y 2.2 a 1. Gorter y Grendel concluyeron que la verdadera proporción era 2:1 y que la membrana plasmática contenía una capa bimolecular de lípidos o simplemente una **bicapa de lípidos**. También sugirieron que los grupos polares de cada capa molecular (**hoja**) se dirigían al exterior de la bicapa (como se muestra en la figura 4-8, *b*). Esta sería la dispo-



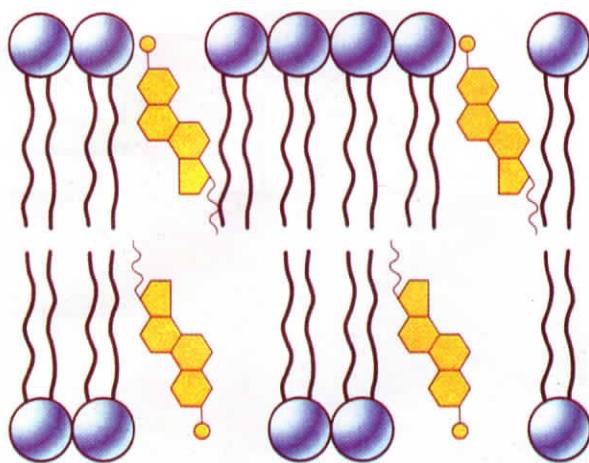


FIGURA 4-7. Las moléculas de colesterol de una membrana se orientan con sus extremos hidrófilos pequeños hacia la superficie externa de la bicapa y la masa de su estructura empacada dentro de las colas de ácidos grasos de los fosfolípidos. La colocación de las moléculas de colesterol impide el apretado empacamiento de los fosfolípidos, que tiende a incrementar la fluidez de la bicapa.

sición termodinámicamente favorecida, puesto que los grupos polares de la cabeza de los lípidos podían interactuar con las moléculas de agua que los rodean, en tanto que las cadenas hidrófobas de lípidos acilo estarían protegidas del medio acuoso. Por lo tanto, los grupos de las cabezas polares enfrentan al citoplasma en un borde y el plasma sanguíneo en el otro. Aunque Gorter y Grendel efectuaron varios cálculos erróneos (compensados entre sí por casualidad), llegaron a la conclusión correcta de que las membranas naturales contienen una bicapa de lípidos.

La presencia en las membranas de una capa bimolecular de moléculas lípidas anfipáticas tiene consecuencias importantes para las propiedades fisiológicas de la membrana. Esto se manifiesta claramente cuando se comparan las propiedades de una bicapa *artificial* de lípidos con las propiedades de una membrana celular verdadera. En el aparato cuyo diagrama se muestra en la figura 4-9, *a*, se puede

preparar con facilidad una bicapa artificial. Los lípidos empleados se recogen con la punta de un pincel fino y luego se aplican en los pequeños agujeros de una hoja de plástico que separa dos cámaras acuosas. Los líquidos colocados a través de las aberturas forman una delgada película que *espontáneamente* se adelgaza hasta un espesor menor de 10 nm (fig. 4-9, *b*). Muchos criterios demuestran que esta película es una bicapa de lípidos con la misma organización mostrada en la figura 4-3. La formación espontánea de una bicapa indica que esta disposición de las moléculas lípidas es la organización termodinámicamente preferida.

Las bicapas artificiales también pueden adoptar la forma de vesículas esféricas llamadas **liposomas**; según el método de formación, pueden consistir en un nido de esferas membranosas concéntricas o en una simple bicapa continua de lípidos que rodea un compartimiento acuoso (fig. 4-10). Los liposomas son invaluables para investigar las propiedades de las membranas. Se pueden introducir proteínas de la membrana en los liposomas y estudiar su función en un ambiente mucho más simple que el de una membrana natural. También se han probado liposomas que contienen DNA o diferentes fármacos dentro de su compartimiento central como sistemas potencialmente transportadores para entregar materiales a células específicas del cuerpo (página 153).

En el cuadro 4-3 se comparan las propiedades de una bicapa artificial de lípidos con las de una membrana natural. Es evidente que son notablemente similares. Incluso el aspecto de una bicapa artificial en el microscopio electrónico (fig. 4-9, *c*) revela la misma imagen de tres capas observada en las membranas naturales. Sin duda, gran parte de la estructura y comportamiento de las membranas es resultado de la presencia de una bicapa de lípidos. Las propiedades no similares entre las dos, en particular de permeabilidad y resistencia eléctrica, se atribuyen a las proteínas de la membrana.

La presencia de una bicapa de lípidos tiene muchas consecuencias en la estructura y funcionamiento de la célula. Debido a la cohesión y formación espontánea de las bicapas nunca se observan membranas con bordes libres; siempre son estructuras íntegras continuas. Como resultado, las membranas forman extensas redes interconectadas que se

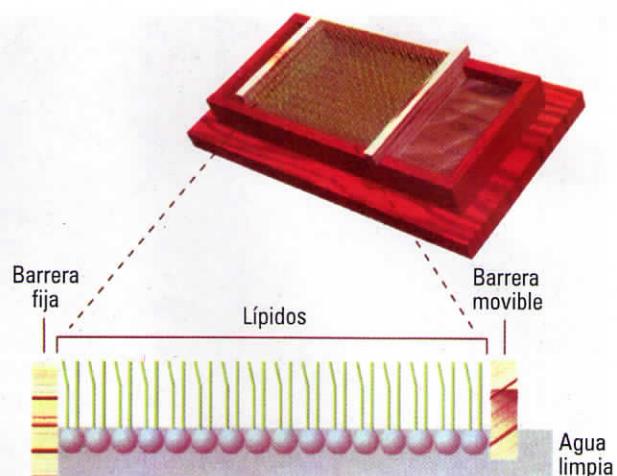
CUADRO 4-2. Composición de los lípidos de algunas membranas biológicas*

Lípido	Eritrocito humano	Mielina humana	Mitocondrias de corazón de ternera	E. coli
Acido fosfatídico	1.5	0.5	0	0
Fosfatidilcolina	19	10	39	0
Fosfatidiletanolamina	18	20	27	65
Fosfatidilglicerol	0	0	0	18
Fosfatidilsérina	8.5	8.5	0.5	0
Cardiolipina	0	0	22.5	12
Esfingomielina	17.5	8.5	0	0
Glucolípidos	10	26	0	0
Colesterol	25	26	3	0

* Los valores expresados son porcentaje en peso de los lípidos totales.

FUENTE: C. Tanford, *The Hydrophobic Effect*, p. 109, Wiley, 1980.

FIGURA 4-8. Cálculo de la superficie de una preparación de lípidos. a) Cuando se disuelve una muestra de fosfolípidos en un solvente orgánico, como el hexano, y se extiende sobre una superficie acuosa, las moléculas de fosfolípidos forman una capa sobre el agua cuyo espesor es de una sola molécula: capa monomolecular. En esta capa las moléculas se orientan con sus grupos hidrófilos enlazados a la superficie del agua y sus cadenas hidrofobas dirigidas al aire. Para estimar la superficie que los lípidos cubrirían si fueran parte de una membrana, se comprimen las moléculas de dichos lípidos en el área más pequeña posible por medio de barreras desplazables. Mediante este tipo de aparato, Gorter y Grendel concluyeron que los eritrocitos contenían suficientes lípidos para formar una capa sobre su superficie de dos moléculas de espesor: una bicapa. b) Naturaleza de la bicapa de lípidos, según la propusieron Gorter y Grendel. Los grupos polares se dirigen hacia afuera y las colas de ácidos grasos hacia adentro.



(a)

(b)

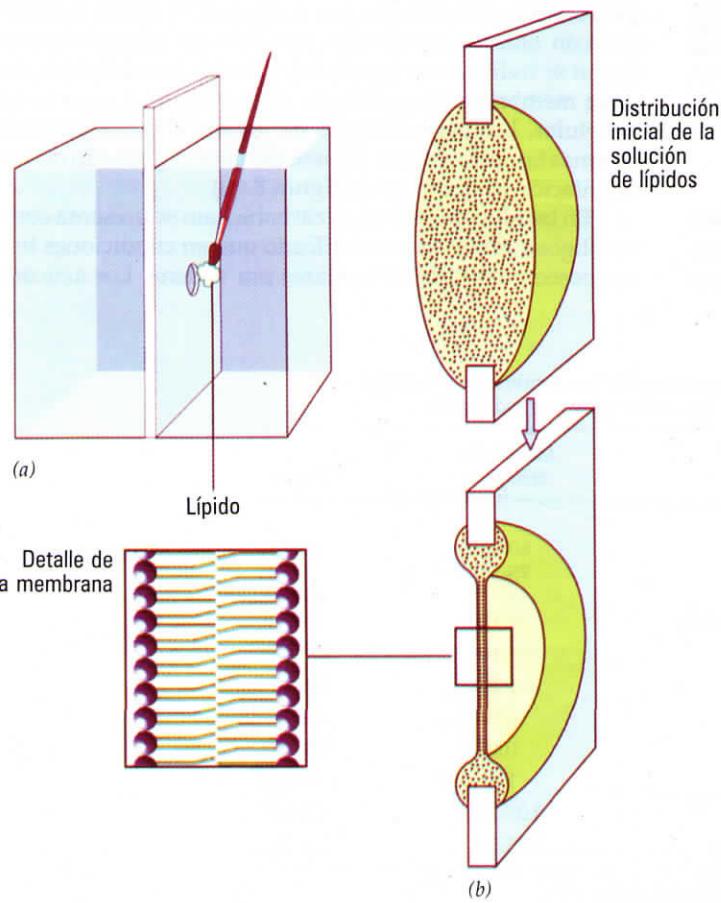
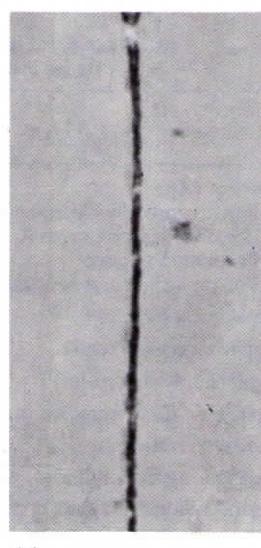


FIGURA 4-9. Procedimiento experimental para la preparación de bicapas artificiales. a) Los lípidos disueltos en un solvente se aplican con una brocha a través de un agujero practicado en una placa que separa dos cámaras acuosas. b) Inicialmente, la capa de lípidos es gruesa pero pronto se adelgaza de manera espontánea para formar la bicapa. c) Micrografía electrónica de una bicapa artificial de lípidos fijada con permanganato de potasio y nitrato de lantano que muestra el aspecto trilaminar en ausencia de proteínas. El borde oscuro y las líneas exteriores al parecer son los sitios de las cabezas polares. (c: Cortesía de Glen L. Decker.)



(c)

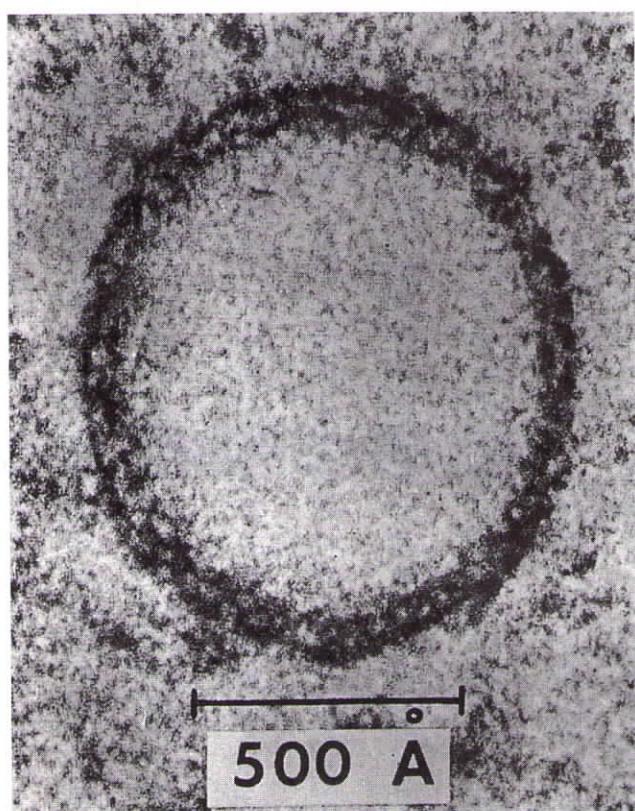


FIGURA 4-10. Un liposoma. Micrografía electrónica de un liposoma, que es una vesícula esférica cuya pared externa está compuesta de una sola bicapa continua de lípidos que rodea una cámara llena de líquido. Los liposomas se forman al suspender fosfolípidos en solución acuosa y luego sometiendo la suspensión a sonicación, lo que provoca que los lípidos se autoensamblen formando esas vesículas cerradas. (Cortesía de Walter Stoeckenius.)

ramifican a través de las células. Gracias a la flexibilidad de la bicapa de lípidos, las membranas son deformables y pueden cambiar toda su forma, como ocurre durante la loco-

moción (fig. 4-11, a) o la división celular (fig. 4-11, b). Se cree que la bicapa de lípidos facilita la fusión o el desdoblamiento de las membranas. Por ejemplo, durante la secreción, cuando las vesículas citoplásmicas se funden con la membrana plasmática, o la fertilización, cuando dos células se unen para formar una sola célula (fig. 4-11, c), participan procesos en los cuales dos membranas separadas se reúnen para constituir una capa continua.

La formación espontánea de bicapas de lípidos también es importante en las teorías de la evolución celular. Una capa externa que contiene lípidos proporciona la barrera necesaria para aislar el medio interno viviente cuyas propiedades son muy diferentes a las del medio externo. Según estudios de bicapas artificiales, puede esperarse que dicha barrera se forme de manera espontánea. La formación de una barrera alrededor del primer conjunto de moléculas autoduplicantes, al parecer fue el primer paso esencial en la evolución de las células.

Carbohidratos de la membrana

Las membranas plasmáticas de células eucariotas poseen carbohidratos unidos mediante enlaces covalentes a los componentes lípidos y proteínicos (fig. 4-4, b). Según la especie y el tipo de célula, el contenido de carbohidratos de la membrana plasmática varía entre 2 y 10% del peso. Por ejemplo, la membrana plasmática del eritrocito, mostrada en la figura 4-1, a, contiene alrededor de 52% de proteína, 40% de lípidos y 8% de carbohidratos. Del 8% de carbohidratos, cerca de 7% se une a lípidos mediante enlaces covalentes para formar glucolípidos, y el restante 93% se une a proteínas con enlaces covalentes para formar glucoproteínas. Como se indica en la figura 4-4, b, todos los carbohidratos de la membrana plasmática se enfrentan en el espacio extracelular. Los carbohidratos de las membranas celulares internas también suelen alejarse del citosol (la razón de esta orientación se ilustra en la figura 8-10).

En las glucoproteínas, el carbohidrato se presenta como un oligosacárido corto ramificado que en condiciones típicas posee menos de 15 azúcares por cadena. Los azúcares

CUADRO 4-3. Propiedades físicas de las membranas biológicas y de las bicapas de lípidos simples no modificadas

Propiedades	Membranas biológicas	Bicapa
Espesor (\AA):		
Por microscopia electrónica	60-130	60-90
Por difracción de rayos X	75-100	—
Por método óptico	—	40-80
Por capacitancia y constante dieléctrica	30-150	40-130
Resistencia (Ω/cm)	$10^2\text{-}10^5$	$10^6\text{-}10^8$
Capacitancia ($\mu\text{F}/\text{cm}^2$)	0.5-1.3	0.3-1.3
Potencial de reposo (mV)	10-90	0-140
Voltaje de desintegración (mV)	100	100-550
Índice de refracción	1.6	1.56-1.66
Tensión interfacial (ergios/ cm^2)	0.03-3.0	0.2-6.0
Permeabilidad al agua (10^{-4} cm/seg)	0.25-58	2.3-24

FUENTE: F. Vandenheuvel, *Adv. Lipid Res.* 9:173, 1971.

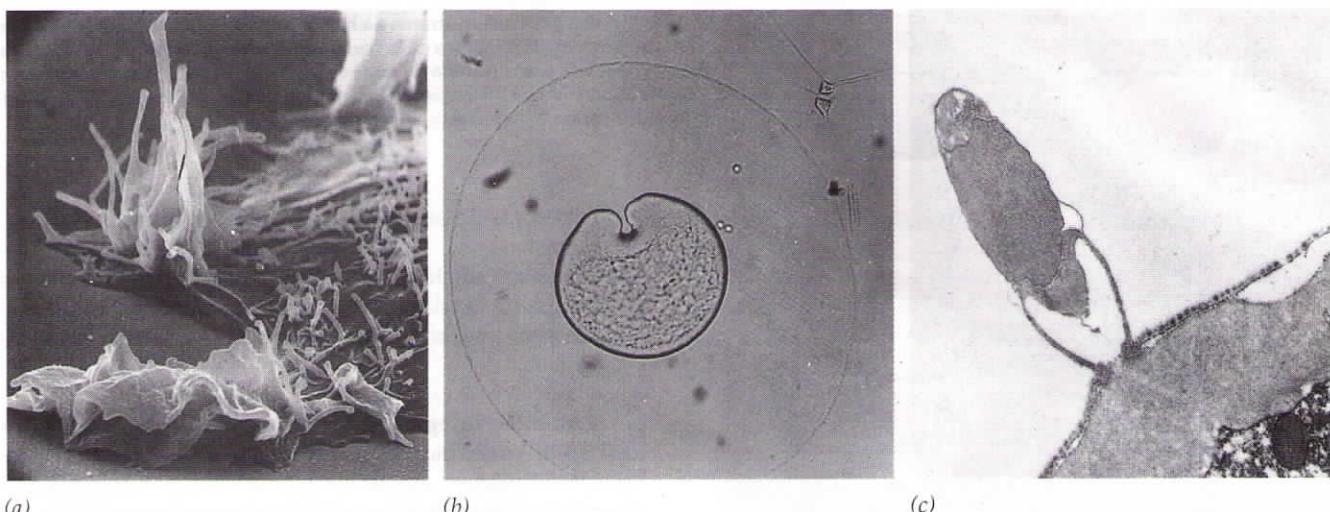


FIGURA 4-11. Propiedades dinámicas de la membrana plasmática. *a)* El borde delantero de una célula en movimiento casi siempre contiene sitios donde la membrana plasmática muestra surcos ondulantes. *b)* La división de una célula se acompaña de deformación de la membrana plasmática conforme es tirada hacia el centro de la célula. A diferencia de la mayor parte de las células en etapa de división, el surco de desdoblamiento de este huevo ctenóforo en división comienza en un polo y se desplaza unidireccionalmente a través del huevo. *c)* Las membranas pueden fusionarse con otras membranas. Este espermatozoide se encuentra en el proceso de fusionar su membrana plasmática con la del óvulo. (*a:* Cortesía de Jean Paul Revel; *b:* cortesía de Gary Freeman; *c:* cortesía de A.L. y L.H. Colwin.)

observados con mayor frecuencia en estas cadenas de carbohidratos se muestran en la figura 4-12, *a*. El ácido siálico por lo común es el azúcar terminal de los oligosacáridos y confiere carga negativa a las cadenas de carbohidratos. Los oligosacáridos pueden unirse a diferentes aminoácidos mediante dos tipos principales de ligaduras (fig. 4-12, *b*). Se piensa que estos carbohidratos ramificados participan en la mediación de las interacciones de la célula con otras células y también con su entorno no viviente (esto se analiza en el capítulo 7).

Todavía no se comprenden bien las funciones de los glucolípidos de la membrana, aunque se les pueden asignar ciertas propiedades. Por ejemplo, los carbohidratos de los glucolípidos de la membrana plasmática de eritrocitos determinan si el grupo sanguíneo de una persona es A, B, AB u O. Los determinantes ABO son cadenas cortas ramificadas de oligosacáridos (fig. 4-13). La persona con tipo sanguíneo A posee una enzima con una *N*-acetilgalactosamina en el extremo de la cadena, en tanto que una persona con sangre tipo B tiene una enzima que se une a galactosa en la cadena terminal. Las personas con tipo sanguíneo AB poseen ambas enzimas, en tanto que las personas con sangre tipo O carecen de enzimas capaces de unirse a cualquier azúcar terminal. También se ha demostrado que los glucolípidos participan en ciertas enfermedades infecciosas; la toxina del cólera y el virus de la influenza penetran en su célula específica uniéndose primero a los gangliósidos de la superficie celular. Si los glucolípidos pueden funcionar como "compuertas" para la entrada de patógenos, tal vez tengan algún tipo de función receptora en las células normales. En contraste con la mayor parte de los carbohidratos de peso molecular elevado (como glucógeno, almidón o celulosa), los cuales son polímeros de un solo azúcar, los oligosacáridos unidos a proteínas y lípidos de la membrana

muestran considerable variabilidad estructural. Por consiguiente, estas cadenas de oligosacáridos pueden mostrar especificidad en sus propias interacciones y con otros tipos de moléculas.

Proteínas de la membrana

Según el tipo de célula y el organelo particular del interior de dicha célula, una membrana puede contener desde una docena hasta más de 50 proteínas diferentes. Estas proteínas no se disponen al azar dentro de la membrana, sino que cada una se localiza y orienta en una posición particular respecto de la bicapa de lípidos. Es digno de notar que todas las proteínas de la membrana se sitúan asimétricamente de modo que las propiedades de la porción externa de la membrana son muy diferentes a las de la porción interna. Como resultado de esta "lateralidad" de la membrana, las proteínas de partes de la membrana que interactúan con otras células o con ligandos extracelulares, como hormonas o factores de crecimiento, se enfrentan al exterior, en tanto que las proteínas de las partes de la membrana que interactúan con moléculas citoplásmicas, como proteínas G o proteincinasas (capítulo 15), enfrentan el interior de la célula. Las proteínas de la membrana se pueden agrupar en tres tipos distintos según la intimidad de su relación con la bicapa de lípidos (fig. 4-14). Estos grupos son:

1. **Proteínas integrales**, que penetran en la bicapa de lípidos. En realidad, prácticamente todas las proteínas integrales atraviesan por completo la bicapa de lípidos y por lo tanto tienen dominios que sobresalen en ambos lados de la membrana, el extracelular y el citoplásmico.
2. **Proteínas periféricas**, que se localizan por completo fuera de la bicapa de lípidos, sobre la superficie extracelular o citoplásmica, pero todavía relacionadas con la

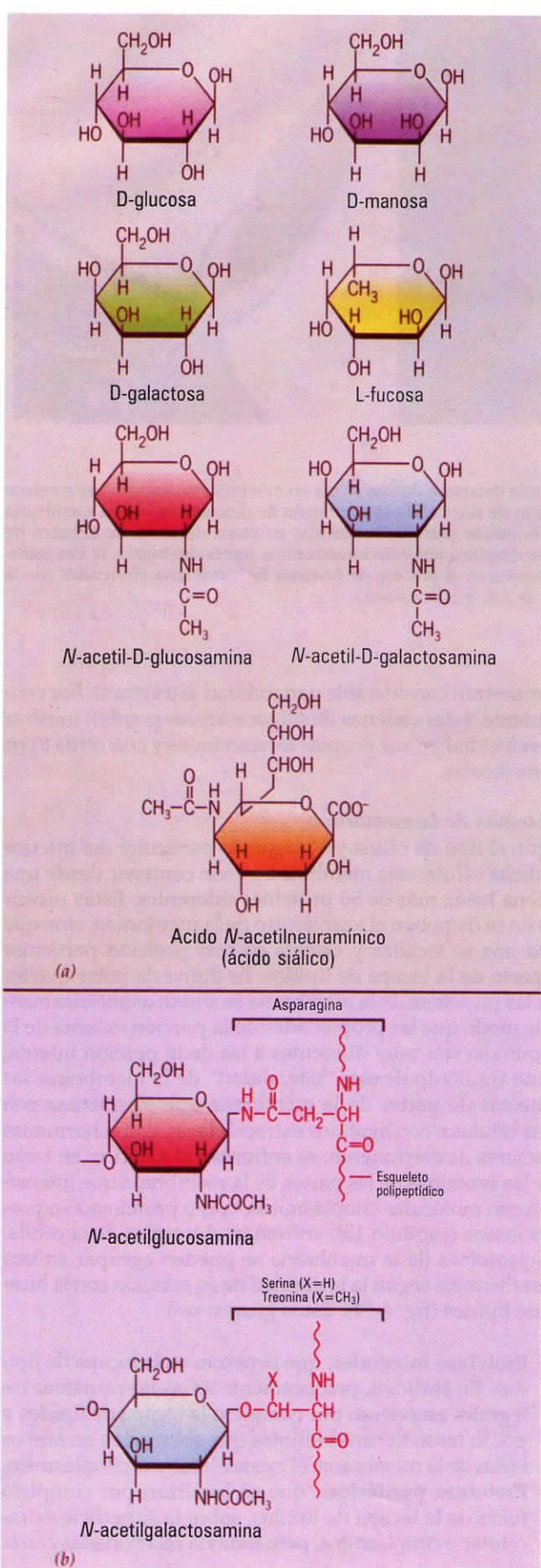


FIGURA 4-12. Carbohidratos de la membrana. a) Estructura química de los azúcares predominantes en la membrana. b) Los dos tipos de enlace que unen azúcares a una cadena de polipéptidos. La unión *N*-glucosídica entre asparagina y *N*-acetilglucosamina es más común que la unión *O*-glucosídica entre serina o treonina y *N*-acetilgalactosamina.

superficie de la membrana mediante enlaces no covalentes.

3. **Proteínas ancladas a lípidos**, localizadas fuera de la bicapa de lípidos, pero unidas mediante enlaces covalentes a una molécula lípida situada dentro de la bicapa.

Proteínas integrales de la membrana. Igual que los fosfolípidos de la bicapa, las proteínas integrales de la membrana también son anfipáticas y presentan porciones hidrófilas e hidrófobas. A diferencia de las proteínas solubles del citoplasma, que tienden a presentar un núcleo hidrófobo y una superficie hidrófila (fig. 2-28), las proteínas integrales de la membrana contienen residuos no polares en gran parte de su superficie expuesta. Estas regiones no polares de la proteína se integran al interior de la bicapa de lípidos donde pueden sufrir interacciones hidrófobas con cadenas lípidas acilo (fig. 4-14). La función de estos dominios hidrófobos para introducir proteínas en la "pared" lípida de la membrana es muy parecida a la de ganchos que pueden introducirse en los orificios de un perchero. El resto de una proteína integral se compone principalmente de aminoácidos iónicos y polares no integrados a la bicapa que sobresalen

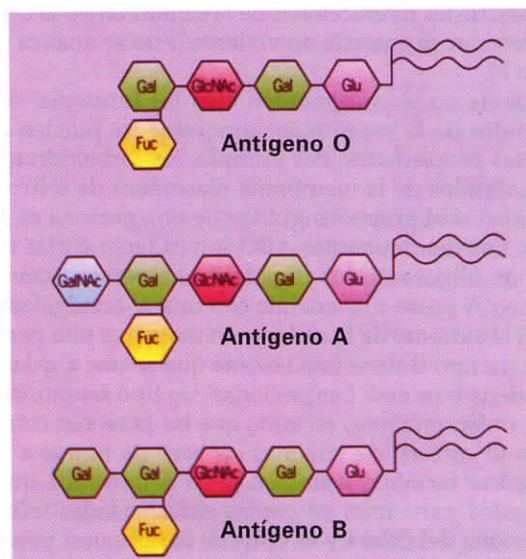


FIGURA 4-13. Antígenos de los grupos sanguíneos. El tipo sanguíneo de una persona (A, B, AB u O) es determinado por una corta cadena de azúcares unidos mediante enlace covalente a lípidos y proteínas de la membrana del eritrocito. Aquí se muestran los oligosacáridos unidos a los lípidos de la membrana (que forman un gangliósido) que producen los tipos sanguíneos A, B y O. Una persona con tipo sanguíneo AB tiene gangliósidos con ambas estructuras, A y B.

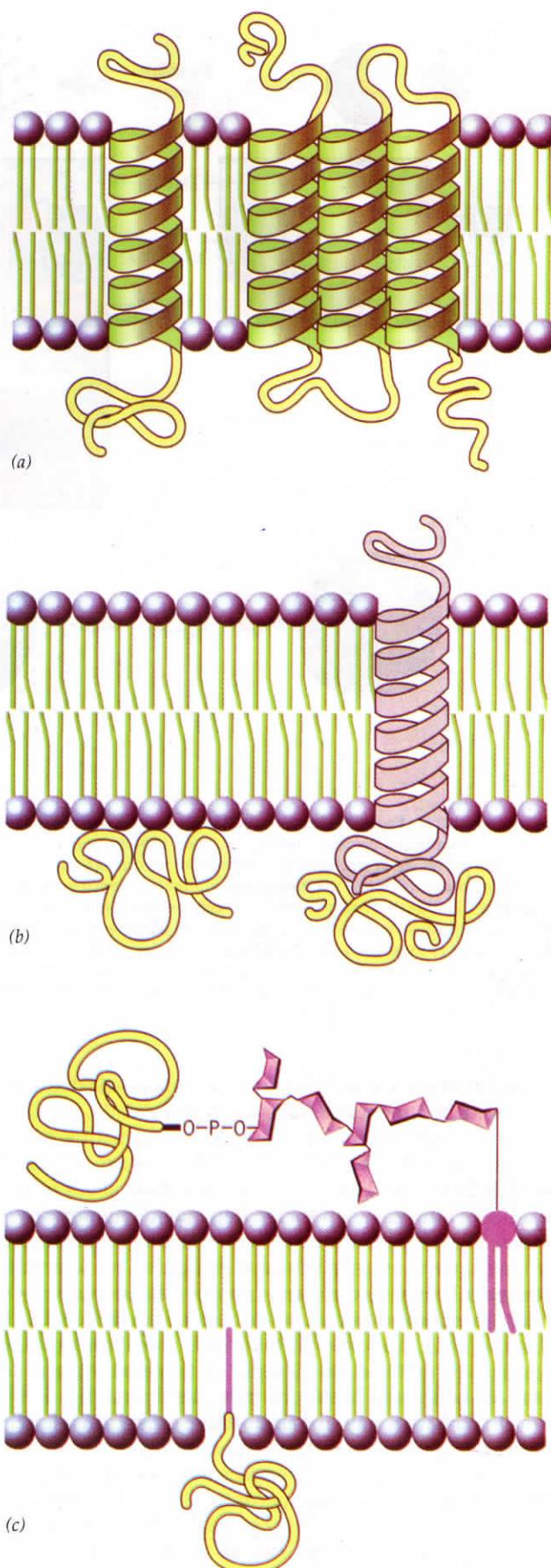
FIGURA 4-14. Tres clases de proteínas de la membrana. *a)* Proteínas integrales que pueden contener una o más hélices que atraviesan la membrana. *b)* Proteínas periféricas de la superficie interna de la membrana que mantienen uniones no covalentes con los grupos polares de la bicapa de lípidos o con alguna proteína integral de la membrana. *c)* Proteínas ancladas en lípidos, las cuales pueden enlazarse en forma covalente a un fosfolípido o a un ácido graso integrado en la bicapa de lípidos.

len del borde de la bicapa en uno o ambos lados o forman un canal acuoso a través de la misma. Estos dominios hidrófilos son las partes de una proteína integral que pueden interactuar con sustancias hidrosolubles (iones, sustratos de bajo peso molecular, hormonas y otras proteínas) en la superficie de la membrana o dentro de un canal central. Como veremos más adelante, no es necesario que las proteínas integrales sean estructuras fijas, sino más bien deben tener capacidad para desplazarse lateralmente dentro de la propia membrana.

Debido a su superficie hidrófoba, las proteínas integrales de la membrana son difíciles de extraer y de estudiar. La extracción de estas proteínas de membrana de ordinario se logra con ayuda de un detergente. Los detergentes son compuestos anfipáticos (fig. 2-20) con un extremo polar y una cadena no polar de carbohidratos. Gracias a esta estructura, los detergentes pueden sustituir a los fosfolípidos estabilizantes de las proteínas integrales en tanto mantienen su solubilidad en solución acuosa. Una vez que las proteínas se solubilizan por acción del detergente, se pueden efectuar varios procedimientos analíticos para determinar los aminoácidos que componen a la proteína, su peso molecular, la secuencia de aminoácidos, y algo más.

La orientación de una proteína dentro de la membrana se puede determinar experimentalmente utilizando agentes no penetrantes, como marcadores o modificadores de las proteínas. Consideremos lo que ocurre cuando se trata una preparación de células intactas con una enzima proteolítica como la tripsina, demasiado grande para atravesar la membrana plasmática (fig. 4-15, *a*, recuadro superior). Las partes de las proteínas de membrana situadas en el lado externo de la bicapa de lípidos serán digeridas por la enzima añadida, pero las partes situadas entre la bicapa o en la cara de la membrana enfrentada al citoplasma no serán afectadas. El efecto del tratamiento puede determinarse extrayendo las proteínas y sometiéndolas a electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecilsulfato de sodio (fig. 4-15, *b*). La proteína con parte de su estructura digerida se desplaza a una posición diferente en el gel cuando se compara con la misma proteína de una membrana no tratada. Para determinar si una parte de la proteína sobresale de la cara citoplásica de la membrana se puede incrementar la permeabilidad de las células mediante tratamiento con detergentes no iónicos o por choque osmótico (fig. 4-31, *b*). En estas condiciones, la membrana plasmática ya no actúa como barrera para la penetración de las enzimas proteolíticas, de modo que las partes citoplásicas de la proteína también sufrirán la digestión enzimática (parte inferior de la figura 4-15, *a,b*).

Una manera alternativa de predecir la organización de una proteína integral de membrana es a partir de la secuen-



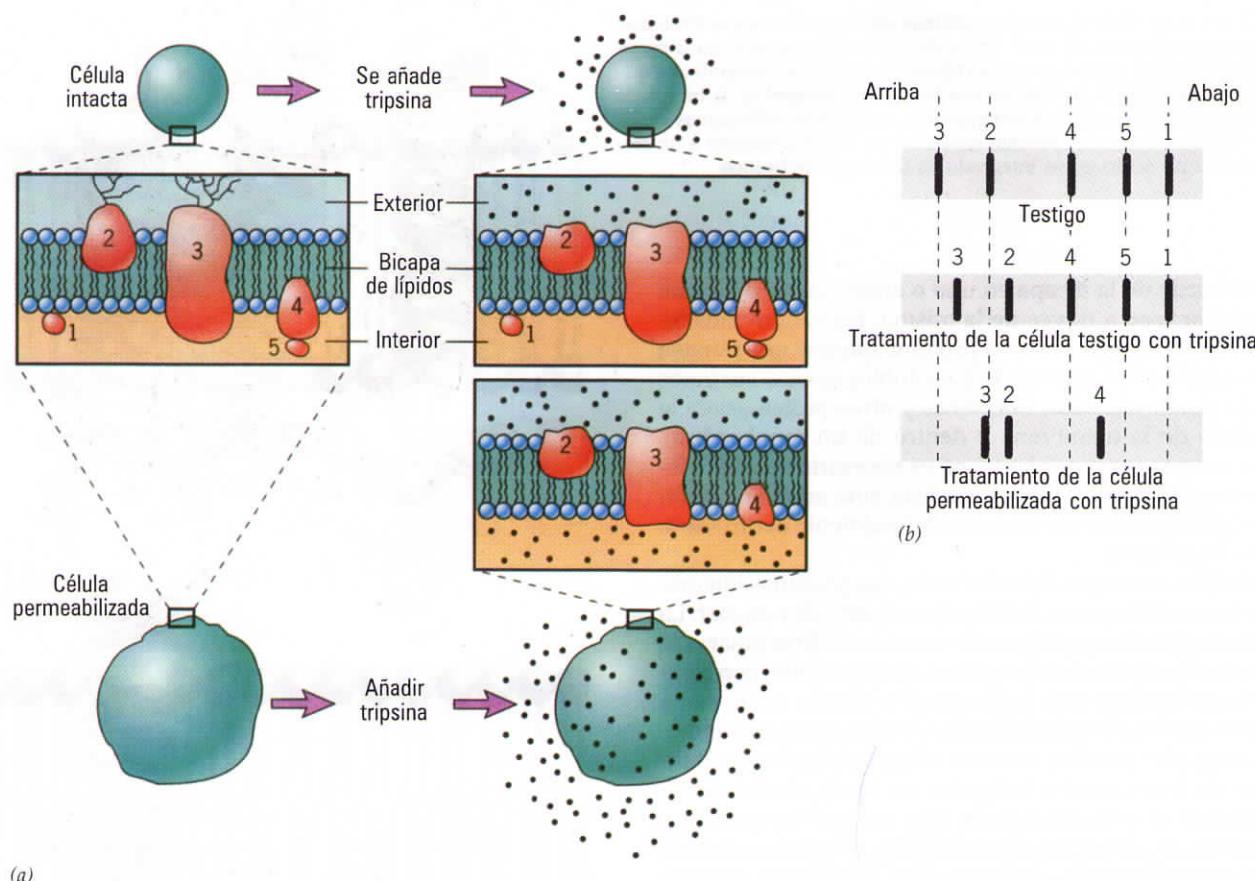


FIGURA 4-15. Procedimiento experimental para determinar la orientación de las proteínas dentro de una membrana plasmática. La hipotética membrana estudiada contiene cinco proteínas distintas. *a)* Las células intactas se tratan con tripsina, una enzima no penetrante, para digerir las partes de la proteína proyectadas al medio externo. Por lo contrario, si la célula se vuelve permeable (por extracción con detergentes no iónicos o exposición a un medio hipotónico), las partes de las proteínas de membrana proyectadas al interior del citoplasma también son accesibles a la digestión proteolítica. *b)* Esquema de los resultados de la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (EGPA-DSS) que muestra el patrón de bandas que se obtiene en el experimento descrito en *a*. La velocidad de migración de las proteínas durante la electroforesis es inversamente proporcional a su peso molecular. Por lo tanto, las proteínas a las que se suprime una parte se desplazan con mayor rapidez a través del gel. Al concluir el experimento, estas proteínas están más cerca del borde inferior del gel, o sea, recorren una mayor distancia en comparación con la que hubieran recorrido si no fueran tratadas con la enzima.

cia de aminoácidos de dicha proteína, que puede deducirse de la secuencia de nucleótidos de un gen aislado. En condiciones típicas se puede predecir que los segmentos de una proteína que atraviesan la membrana constan de una cadena de 20 a 25 aminoácidos no polares que tal vez formen una hélice alfa. Esta suposición depende de numerosos estudios, los cuales han demostrado que esos segmentos de proteína que atraviesan la bicapa de lípidos, los segmentos **transmembrana**, de ordinario consisten en aminoácidos no polares organizados en conformación alfa helicoidal. La glucoforina A, principal proteína de la membrana plasmática del eritrocito, es un ejemplo de proteína integral con una sola hélice alfa hidrófoba transmembrana (fig. 4-16).

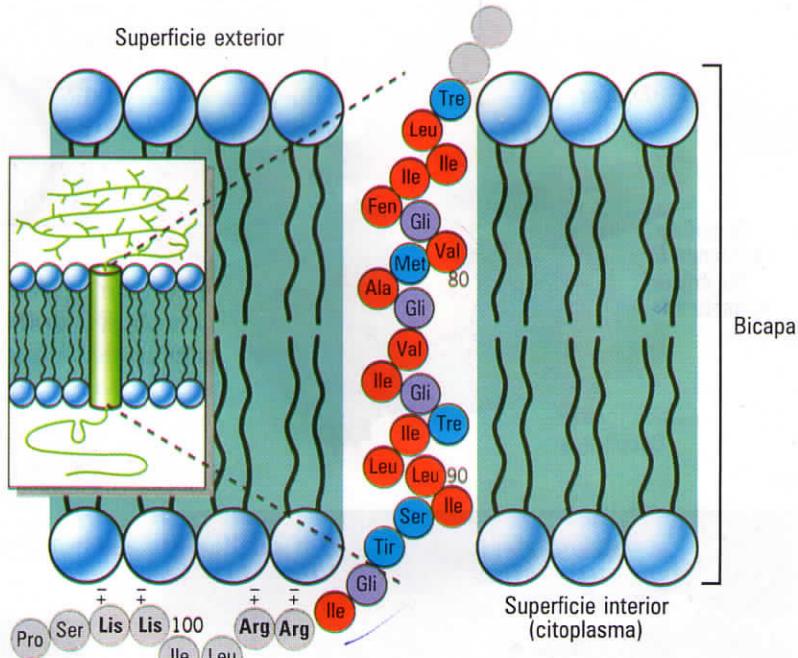
Sin embargo, hay una importante excepción a la regla de las hélices transmembrana predominantemente hidrófobas. Muchas proteínas integrales de la membrana contienen un canal acuoso para permitir el paso de iones o de solutos polares a través de la bicapa de lípidos. Se cree que las paredes de estos canales acuosos contienen: 1) hélices

anfipáticas en las cuales una cara de cada hélice consta de aminoácidos no polares enfrentados a la bicapa de lípidos, en tanto que la cara opuesta contiene principalmente residuos polares enfrentados al poro (fig. 4-17), o 2) un borde de láminas beta muy similar al barril beta ilustrado en la figura 5-3.

Las proteínas integrales se pueden clasificar de la siguiente manera:

1. *Proteínas monotópicas* integradas a la bicapa de lípidos y expuestas en una sola superficie de la membrana. Estas proteínas son raras, si en realidad existen. Se cree que el citocromo b_5 , una proteína de las membranas citoplásicas, es una proteína monotópica, pero no hay acuerdo unánime.
2. *Proteínas bitópicas* que poseen un segmento dentro de la membrana y por lo tanto la atraviesan una sola vez y están expuestas en ambos lados de la membrana (fig. 4-16). Esta clase incluye gran variedad de receptores de

FIGURA 4-16. Glucofórmica A, una proteína integral con un solo dominio transmembrana. La hélice α simple que atraviesa la membrana contiene predominantemente residuos hidrófobos. (Los aminoácidos de la hélice se muestran con un color codificado según el carácter de su grupo R, igual que en la figura 2-26.) Se cree que los cuatro aminoácidos con carga positiva del dominio citoplásmico de la proteína de membrana forman enlaces iónicos con grupos cargados negativamente en las cabezas de los lípidos. Los carbohidratos están unidos a ciertos residuos de aminoácidos en la superficie externa de la proteína. Todos los oligosacáridos, excepto uno, mantienen enlaces O (la excepción es el oligosacárido unido al residuo de asparagina en la posición 26). En la página 139 se analiza el papel de la glucofórmica en la membrana del eritrocito.



la membrana plasmática que enlazan diferentes ligandos en su superficie externa (p. ej., un factor de crecimiento, un péptido hormona o un antígeno) y transmiten un mensaje a través de la membrana hacia el citoplasma por medio del segmento que atraviesa dicha membrana (fig. 15-25).

3. *Proteínas politépicas* que poseen más de un segmento dentro de la membrana y por lo tanto se entrelazan avanzando y retrocediendo a lo largo de la membrana. Esta clase incluye las proteínas que forman canales para el paso de iones y solutos a través de la membrana plasmática y también proteínas con otras funciones (p. ej., el receptor para la partícula señal del receptor del retículo endoplásmico, el receptor adrenérgico que se enlaza a la epinefrina, el pigmento fotosensible de los bastoncillos de la retina, y los polipéptidos M y L del centro de reacción fotosintética de las bacterias, que se muestra en la página 115). El centro de reacción bacteriana contiene proteínas integrales cuya disposición precisa dentro de la membrana fue descrita por primera vez mediante cristalografía de rayos X.

Proteínas periféricas de la membrana. Las proteínas periféricas se unen a la membrana mediante débiles enlaces electrostáticos, sea a grupos hidrófilos de la cabeza de los lípidos o a porciones hidrófilas de las proteínas integrales que sobresalen de la bicapa (fig. 4-14). Las proteínas periféricas de ordinario se solubilizan mediante extracción con soluciones acuosas salinas concentradas o pH alcalino. En realidad, la distinción entre proteínas integrales y periféricas es incierta, porque muchas proteínas de membrana contienen varios polipéptidos, algunos de los cuales penetran en la bicapa de lípidos y otros permanecen en la periferia.

Las proteínas periféricas mejor estudiadas (principalmente de la familia espectrina) se localizan en la superficie interna de la membrana plasmática (fig. 4-31). Estas proteínas forman una red fibrilar que actúa como "esqueleto" flexible para suministrar apoyo mecánico a la membrana cuando se producen cambios rápidos en la morfología celular y también para fijar las proteínas integrales de la membrana. Otras proteínas periféricas sobre la superficie interna de la membrana funcionan como enzimas o factores transmisores de señales a través de la membrana. La superficie

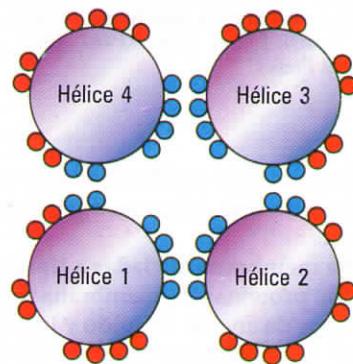
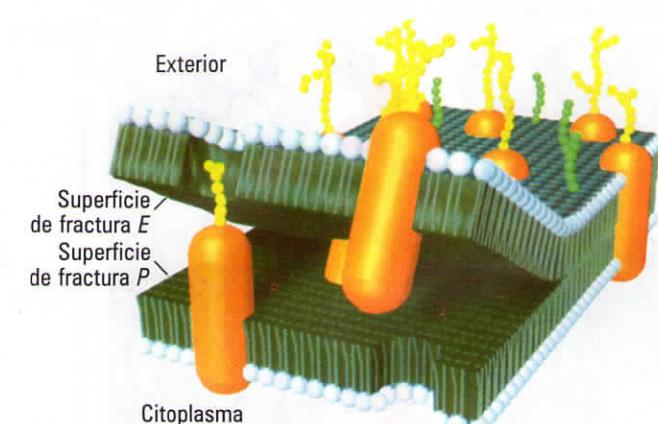
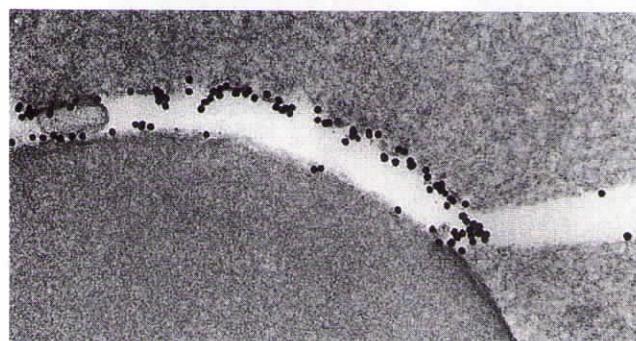


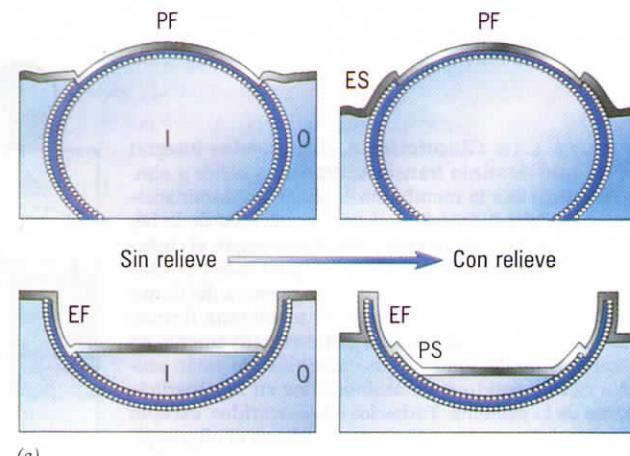
FIGURA 4-17. Representación esquemática de cuatro hélices α originadas como un haz dentro de la membrana. Los círculos pequeños en azul representan cadenas laterales polares (grupos R) asociadas al centro del complejo, en tanto que los pequeños círculos rojos representan residuos no polares relacionados con la bicapa de lípidos que los rodean. Nótese que las cadenas laterales en realidad se proyectan desde el esqueleto en toda la longitud de cada hélice a diferentes niveles; para representarlos en la figura se reducen a un solo plano.



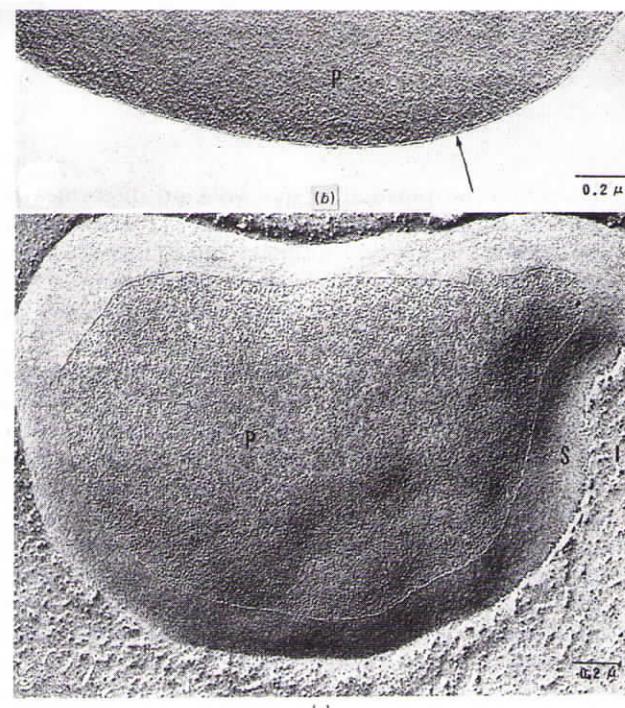
(a)



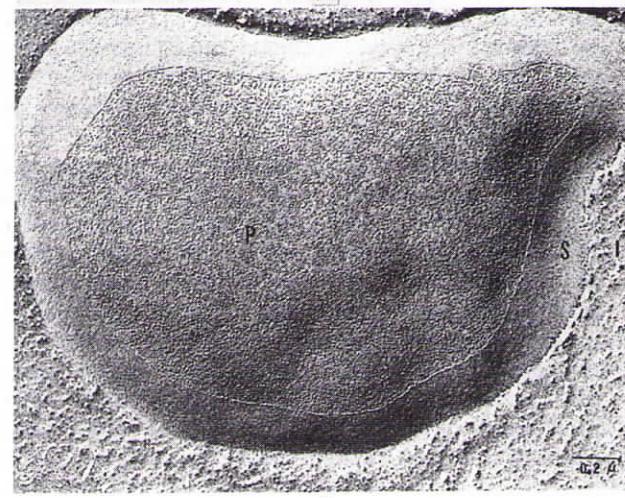
(b)



(a)



(b)



(c)

extracelular de la membrana plasmática también puede contener proteínas periféricas, pero estas proteínas están menos bien definidas.

Proteínas de membrana ancladas a lípidos. Se distinguen dos tipos de proteínas de membrana ancladas a lípidos, según los tipos de anclaje al lípido y la superficie de la membrana sobre la cual están expuestos. Varias proteínas presentes en la cara externa de la membrana plasmática se enlazan a ésta mediante un oligosacárido corto unido a una molécula de glucofosfatidilinositol (GFI) integrada a la hoja externa de la bicapa de lípidos (fig. 4-14, c). La presencia de estas proteínas ancladas al GFI fue descubierta cuando se demostró que ciertas proteínas de la membrana podían liberarse mediante una fosfolipasa que reconocía y rompía específicamente a los fosfolípidos que contienen inositol.

FIGURA 4-18. Fractura por congelación: técnica para investigar la estructura de la membrana celular. a) Cuando se golpea un bloque de tejido congelado con una hoja cortante, el plano de fractura que atraviesa el tejido casi siempre pasa por enmedio de la bicapa de lípidos. El plano de fractura rodea las proteínas en vez de romperlas a la mitad y las separa en una de las dos mitades de la bicapa. b) Esta micrografía muestra la superficie de un eritrocito congelado y luego fracturado, pero en vez de preparar una réplica, se dejó derretir y el tejido se coloreó con un marcador para los grupos carbohidratos que sobresalen en la superficie externa de la proteína integral glucoferrina (fig. 4-16). Se puede observar que la glucoferrina al separarse muestra preferencia por la mitad externa de la membrana. (b: Según Pedro Pinto da Silva y María R. Torrisi, J. Cell Biol. 93:467, 1982; con permiso de Rockefeller University Press.)

FIGURA 4-19. Efecto de la técnica al "aguafuerte" sobre una preparación de fractura por congelación. a) En tanto el procedimiento de fractura expone el interior de la membrana (las superficies de fractura E y P, EF y PF), el proceso al aguafuerte expone una parte de las superficies interna y externa de la membrana (superficies E y P, ES y PS). b) Réplica de una parte del eritrocito humano tratado con la técnica de fractura por congelación. Se observa que la superficie de fractura P está cubierta con partículas de 8 nm de diámetro, aproximadamente. Un pequeño surco (flecha) marca el sitio de unión de la superficie cubierta de partículas y el hielo que la rodea. c) Réplica de un eritrocito fracturado por congelación y cuyo relieve se fijó con técnica al "aguafuerte". Durante el proceso, la sublimación del hielo expone una superficie lisa (S) claramente demarcada en la superficie interna P de fractura. (a: Según Pedro Pinto da Silva y Daniel Branton, J. Cell Biol. 45:599, 1970; b-c: según Thomas W. Tillack y Vincent T. Marchesi, J. Cell Biol. 45:649, 1970; con permiso de Rockefeller University Press.)

Otro grupo de proteínas presentes en el lado *citoplásmico* de la membrana plasmática se encuentra anclado a la membrana mediante largas cadenas de hidrocarburos integradas a la hoja interna de la bicapa de lípidos (fig. 4-14, c). Al menos dos proteínas relacionadas en esta forma con la membrana plasmática (Src y Ras) han sido implicadas en la transformación de células normales a estados malignos.

Distribución de las proteínas integrales: análisis de fracturas por congelación y de imágenes por congelación “al aguafuerte”

El concepto de que las proteínas pueden atravesar todo el espesor de la membrana en vez de limitarse simplemente al exterior de la bicapa se originó principalmente de los resultados de una técnica llamada **duplicación por fractura de muestras congeladas** (véase sección 17-2). En este procedimiento, el tejido se solidifica por congelación y luego se golpea el bloque congelado con una hoja afilada para fracturarlo en dos pedazos. El plano de fractura se sitúa con mayor frecuencia entre las dos hojas de la bicapa de lípidos (fig. 4-18). Una vez abierta la membrana en esta forma se depositan metales sobre las superficies expuestas para formar una réplica en relieve que puede observarse con el microscopio electrónico. Como se muestra en la figura 4-19, esta réplica parece un camino regado de grandes pedruscos llamados **partículas relacionadas con la membrana**. Puesto que el plano de fractura pasa a través del centro de la bicapa, estas partículas corresponden a proteínas integrales de la membrana extendidas cuando menos hasta la mitad del espesor de la capa de lípidos situada en el centro de la membrana. Cuando el plano de fractura alcanza a determinada partícula, la rodea en vez de romperla a la mitad. En consecuencia, cada proteína (partícula) se separa unida a una mitad de la membrana plasmática y deja el correspondiente “hoyuelo” en la otra mitad. En la figura 4-19, a, se muestra la relación entre fracturas en la cara interna P (*protoplásmica*) y fracturas en la cara externa E (*ectoplásmica*). En la figura 4-19, b, se muestra la naturaleza particular de la cara con fracturas P en la membrana del eritrocito humano.

La técnica de fractura por congelación no sólo permite visualizar las proteínas integrales de la membrana, sino que también se puede modificar para revelar proteínas periféricas o partes de las proteínas integrales presentes en la *superficie* de las membranas interna (P) o externa (E). Para examinar las superficies de la membrana se debe efectuar un paso adicional en el procedimiento antes de cubrir las caras fracturadas con metal (sombreado) para observarlas en el microscopio electrónico. La muestra congelada y fracturada se expone al vacío durante un corto tiempo, durante el cual una delgada capa de hielo de ambas superficies, superior e inferior, de la membrana se evapora sin pasar por el estado líquido (sublimación) (fig. 4-19, a). Al cubrir esta superficie con el metal se puede observar su textura en la réplica (porción marcada con S en la figura 4-19, c). Este procedimiento de sublimación se denomina **congelación al “aguafuerte”**. El gran valor de las técnicas de fractura por congelación y congelación al “aguafuerte” es que permiten investigar la heterogeneidad microscópica de la membrana. En la réplica aparecen y pueden identificarse diferencias localizadas en partes de la membrana, como se muestra en la figura 4-20

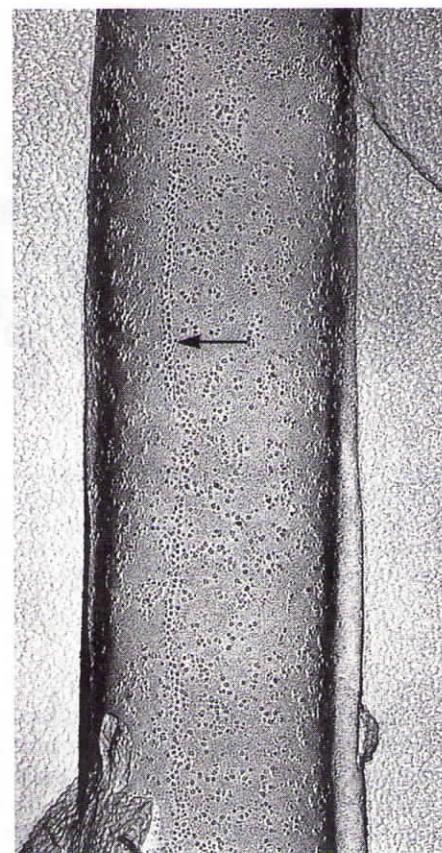


FIGURA 4-20. Distribución heterogénea de las proteínas integrales de membrana. Cuando se expone la membrana plasmática del flagelo de un espermatozoide de mamífero durante fractura por congelación, se puede observar que contiene una doble fila de partículas denominadas “cierre automático” (flecha). La técnica de fractura por congelación es ideal para revelar este tipo de heterogeneidad microscópica dentro de una membrana. En la figura 4-30 se muestra la distribución de proteínas específicas en la membrana del espermatozoide a una escala mayor. (Cortesía de Daniel S. Friend.)

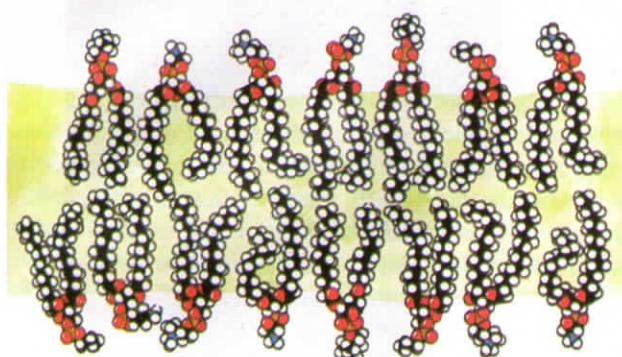
de una pequeña porción del espermatozoide. A diferencia del análisis bioquímico, las observaciones microscópicas no promedian a todos los individuos de la población, sino que los muestran tal como pueden apreciarse.

4-3 Lípidos y fluidez de la membrana

El estado físico de los lípidos de una membrana puede describirse por su fluidez (o viscosidad).¹ Igual que muchas otras sustancias, los lípidos pueden existir en fase sólida cristalina o en fase líquida de viscosidad variable, según la temperatura. Por ejemplo, consideremos una sencilla bicapa artificial hecha de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina cuyos ácidos grasos son principalmente insaturados. Si la temperatura de la bicapa se mantiene relativamente alta (p. ej., 37°C), el lípido existe en estado relativamente fluido,

¹ Fluidez y viscosidad guardan relación inversa; la fluidez es una medida de la facilidad para fluir y viscosidad es la resistencia a fluir.

(a) Arriba de la temperatura de transición



(b) Abajo de la temperatura de transición

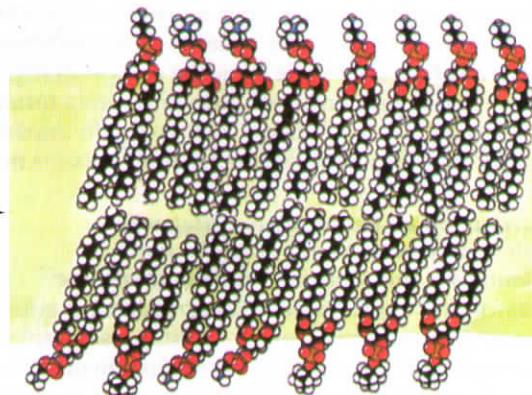


FIGURA 4-21. La estructura de la bicapa de lípidos depende de la temperatura. La bicapa aquí mostrada se compone de dos fosfolípidos, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina. *a)* Arriba de la temperatura de transición, las moléculas de lípidos y sus extremos hidrófobos tienen libertad de movimiento en ciertas direcciones, aunque retienen un grado de orden considerable. *b)* Por debajo de la temperatura de transición el movimiento de las moléculas se restringe en forma notable y toda la bicapa puede describirse como un gel cristalino congelado. (Según R.N. Robertson, *The Lively Membranes*, Cambridge University Press, 1983. Reimpreso con autorización de Cambridge University Press.)

semejante al líquido (fig. 4-21, *a*). A esta temperatura, la bicapa de lípido se describe mejor como un cristal líquido bidimensional. Igual que en un cristal, las moléculas aún mantienen una orientación específica; en este caso, los ejes longitudinales de las moléculas permanecen prácticamente paralelos entre sí, pero los fosfolípidos individuales son capaces de girar o desplazarse lateralmente en el plano de la bicapa. Si la temperatura disminuye lentamente, se alcanza un punto donde ocurre un cambio distintivo en la naturaleza de la bicapa (fig. 4-21, *b*). El lípido pasa de su estado normal semejante a líquido a un gel cristalino “congelado” donde el movimiento de los fosfolípidos está muy restringido. La temperatura a la cual ocurre este cambio se denomina *temperatura de transición*.

La temperatura de transición de una bicapa particular depende de los lípidos particulares que la constituyen. El determinante de mayor importancia es el grado de insaturación de las cadenas ácidas acilo de los fosfolípidos, o sea, su contenido en dobles enlaces (específicamente enlaces *cis*). La temperatura de transición y la fluidez son determinadas por la capacidad de la molécula para compactarse. Aunque los ácidos grasos saturados tienen forma de barras rectas y los ácidos grasos *cis* insaturados presentan incurvaciones en la cadena donde se localizan los dobles enlaces (figs. 2-19

y 4-21), los fosfolípidos con cadenas saturadas pueden compactarse más firmemente que los que contienen cadenas insaturadas. Cuanto mayor sea el grado de insaturación de los ácidos grasos de la bicapa, menor será la temperatura necesaria para que la bicapa pase al estado de gel (cuadro 4-4).

El límite dentro del cual los diferentes lípidos cambian de fase es muy amplio. Por ejemplo, se pueden sintetizar varias fosfatidicolinas y emplearlas para formar bicapas cuya temperatura de transición varía desde temperaturas menores de 0°C hasta mayores de 60°C. Las moléculas de colesterol alineadas con las cadenas lípidas acilo de los fosfolípidos de la bicapa (fig. 4-7) afectan la fluidez de la membrana al alterar la manera de compactarse de las cadenas de hidrocarburos. Como resultado, el colesterol tiende a evitar temperaturas de transición bruscas y también puede incrementar la estabilidad y disminuir la permeabilidad de la membrana.

Importancia de la fluidez de la membrana

¿Qué papel representa el estado físico de la bicapa de lípidos en las propiedades biológicas de la membrana? Al parecer, la fluidez de la membrana corresponde a un compromiso perfecto entre estructura rígida ordenada sin posibilidad de movimientos y líquido no viscoso totalmente fluido en el cual los componentes de la membrana no pueden mantener una orientación determinada y carecen de oportunidad para organizarse y suministrar apoyo mecánico. La fluidez es importante porque permite que ocurran interacciones dentro de la membrana. Por ejemplo, gracias a la fluidez de la membrana algunas proteínas se ensamblan en un sitio particular de la membrana y forman estructuras especializadas como uniones intercelulares, compuestos que captan luz y sinapsis. La transferencia de señales a través de la

CUADRO 4-4. Punto de fusión de los ácidos grasos comunes con función lípida en el carbono 18

Ácido graso	Dobles enlaces	Punto de fusión (°C)
Ácido esteárico	0	70°
Ácido oleico	1	13°
Ácido α -linoleico	2	-9°
Ácido linolénico	3	-17°

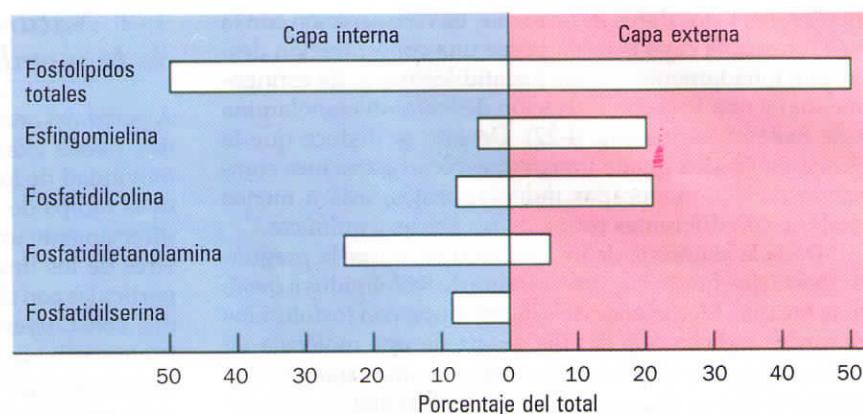


FIGURA 4-22. Distribución asimétrica de fosfolípidos en la membrana plasmática del eritrocito humano.

membrana plasmática requiere de la interacción de receptores transmembrana que se unen a ligandos sobre la superficie externa de la membrana y estimulan enzimas situadas en la superficie interna de la misma. Debido a la fluidez de la membrana, las moléculas que interactúan pueden reunirse, efectuar la reacción necesaria y separarse. La fluidez también tiene relación con el ensamblado de la membrana, tema que analizaremos en la sección 8-3. Las membranas sólo se originan a partir de membranas preexistentes y crecen mediante un proceso que añade componentes lípidos y proteínas a la matriz líquida de una hoja membranosa. Muchos de los procesos celulares más básicos, incluyendo movimiento celular, crecimiento de la célula y división de la misma, formación de uniones intercelulares, secreción y endocitosis, dependen de movimientos de los componentes de la membrana y tal vez no serían posibles si la membrana fuera una estructura rígida no fluida.

Conservación de la fluidez de la membrana

La temperatura interna de la mayor parte de los organismos (que no sean aves ni mamíferos) varía con la temperatura ambiental. Para muchas actividades de la célula es indispensable que la membrana permanezca en estado fluido, por tanto las células deben tener capacidad para regular la fluidez de su membrana frente a condiciones variables controlando el tipo de fosfolípidos que las constituyen. La conservación de la fluidez de la membrana es un ejemplo de homeostasis a nivel celular y puede demostrarse de varias maneras. Por ejemplo, cuando disminuye la temperatura de un cultivo de células, éstas responden metabólicamente. La respuesta inicial de "urgencia" está mediada por enzimas capaces de "remodelar" las membranas y hacer la célula más resistente al frío. Esta remodelación se lleva a cabo por desaturación de enlaces simples en las cadenas lípidas acilo para formar dobles enlaces y reordenamiento (barajeo) de cadenas en las diferentes moléculas para formar fosfolípidos con dos ácidos grasos insaturados. El reordenamiento se lleva a cabo mediante fosfolipasas, que desdoblan al ácido graso del esqueleto glicerol, y aciltransferasas, que los transfieren a fosfolípidos diferentes. Ade-

más, las células cambian el tipo de fosfolípidos que sintetizan en favor de otros que contengan más ácidos grasos insaturados. Como consecuencia de la actividad de estas diferentes enzimas, las propiedades físicas de una membrana celular coinciden con las condiciones prevalecientes en su entorno. En diversos organismos se ha demostrado la conservación de fluidez de las membranas mediante ajustes en la composición de las grasas acilo, incluyendo mamíferos en estado de hibernación, peces que viven en estanques y cuya temperatura corporal cambia notablemente del día a la noche, plantas resistentes al frío y bacterias que viven en aguas termales.

Para comprobar que la insaturación de los ácidos grasos contribuye a la tolerancia de bajas temperaturas, se han efectuado experimentos empleando cianobacterias incapaces de efectuar ciertos tipos de desaturación. Cuando se compara la velocidad de crecimiento de cepas nativas y de las mutantes a 34°C, se observa poca diferencia, pero cuando la temperatura desciende a 22°C, el tiempo de duplicación de las células mutantes se eleva hasta 59 horas en comparación con el tiempo de duplicación de las cepas nativas, que es de 22 horas. Si experimentalmente se introduce en las células mutantes el gen que codifica la enzima (*des A*), se restablece la tolerancia al frío.

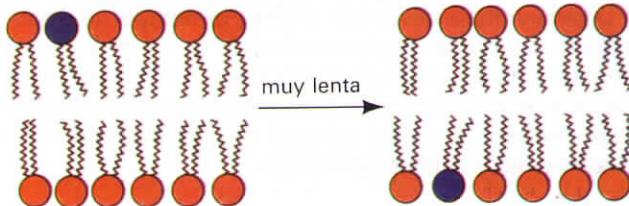
Asimetría de los lípidos de la membrana

La bicapa de lípidos consta de dos hojas distintas y no hay razón para suponer que la composición de los lípidos en ambas mitades deba ser idéntica. De hecho, hay numerosas pruebas que indican que los lípidos de la membrana plasmática se distribuyen en un patrón muy asimétrico. Una serie de experimentos que han conducido a esta conclusión tiene la ventaja de que las enzimas que digieren lípidos no penetran la membrana plasmática y, por consiguiente, sólo digieren los lípidos que residen en la hoja externa de la bicapa. Si se somete un eritrocito humano a la acción de una fosfolipasa que hidroliza fosfoglicéridos, casi 70% de la fosfatidilcolina de la membrana se libera en el medio, pero sólo se libera 20% de la fosfatidiletanolamina de la membrana y menos de 10% de la fosfatidilsérina de dicha

membrana. Estos datos indican que, en comparación con la hoja interna, la capa externa posee una concentración desproporcionadamente alta de fosfatidilcolina (y de esfingomielina) y una baja concentración de fosfatidiletanolamina y de fosfatidilsérina (fig. 4-22). De esto se deduce que la bicapa de lípidos puede imaginarse como estructura compuesta de dos monocapas independientes, más o menos estables, con diferentes propiedades físicas y químicas.

Dada la asimetría de los fosfolípidos, surge la pregunta: ¿hasta qué grado hay intercambio de fosfolípidos a través de la bicapa? Mediciones de diferente tipo con fosfolípidos marcados indican que la vida media de una molécula de fosfolípido que permanece fija dentro de una capa, en oposición a la que se mueve a través de la otra capa, se mide en horas o días. En contraste, un fosfolípido puede desplazarse lateralmente dentro de la misma capa con bastante facilidad. Se estima que un fosfolípido puede difundir de un extremo al otro de una bacteria en uno o dos segundos. Por lo tanto, de todos los posibles movimientos que puede efectuar un fosfolípido, el paso desde un lado al otro de la membrana (flip-flop) es el más restringido (fig. 4-23). Este dato no es sorprendente, pues para que eso ocurra, el grupo de la cabeza hidrófila del lípido tendría que pasar a través de la capa hidrófoba interna de la membrana, lo cual es termodinámicamente desfavorable. Sin embargo, hay células que contienen enzimas, llamadas *flipasas*, que mueven activamente ciertos fosfolípidos desde una capa de la membrana a la otra. Estas enzimas pueden participar en el establecimiento de la asimetría de los lípidos y también revertir la velocidad de los lentos movimientos pasivos que ocurren a través de la membrana.

(a) Difusión transversa (flip-flop)



(b) Difusión lateral

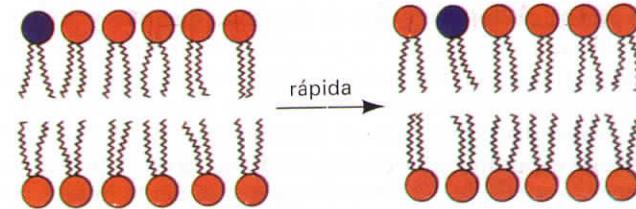


FIGURA 4-23. Movimientos posibles de los fosfolípidos en una membrana. a) El movimiento de un fosfolípido de una capa de la membrana a la otra (denominado "flip-flop") ocurre a una velocidad muy lenta debido a que es necesario desplazar el grupo polar de la cabeza a través de los ácidos grasos situados en el centro de la bicapa. b) Dentro de una capa los fosfolípidos pueden difundir lateralmente con rapidez.

4-4 Naturaleza dinámica de la membrana plasmática

A partir del análisis previo se deduce que la bicapa de lípidos puede existir en un estado relativamente fluido. La movilidad de las moléculas individuales de lípidos dentro de la bicapa de la membrana plasmática puede observarse directamente uniendo partículas doradas a las cabezas polares de los lípidos y siguiendo el movimiento de dichas partículas con el microscopio (fig. 4-24). Puesto que los lípidos constituyen la matriz en la cual están embebidas las proteínas integrales de las membranas, el estado físico de estos lípidos también es un importante factor determinante de la movilidad de dichas proteínas integrales. La demostración de que las proteínas integrales pueden moverse dentro de la membrana plasmática fue una de las piedras angulares para formular el modelo de mosaico fluido. Las propiedades dinámicas de las proteínas de la membrana se revelan de diferentes maneras.

Difusión de las proteínas de la membrana luego de la fusión celular

La **fusión celular** es una técnica para unir dos células de diferente tipo o células de dos especies distintas y producir una célula con un citoplasma común y una sola membrana plasmática continua. La fusión se logra haciendo "pegajosa" la superficie externa de las células, de modo que sus membranas plasmáticas se adhieran entre sí. La fusión celular se puede inducir añadiendo ciertos virus inactivados

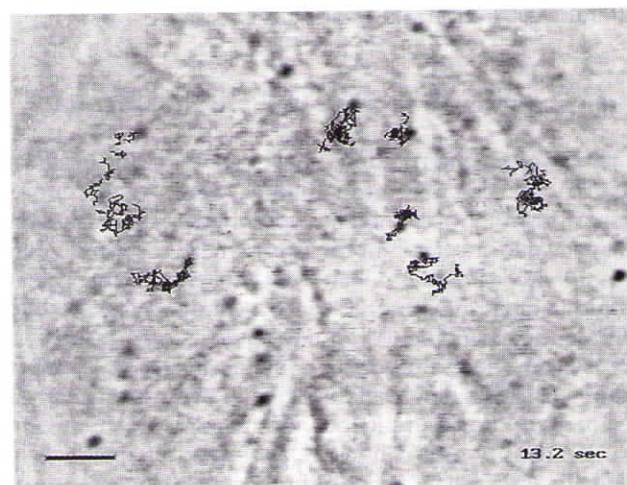


FIGURA 4-24. Determinación experimental de la movilidad de los fosfolípidos dentro de la bicapa de lípidos de la membrana plasmática. Un pequeño número de fosfolípidos de la capa externa de la membrana plasmática de un fibroblasto vivo fueron marcados con partículas de oro y sus movimientos se siguieron bajo microscopio en una pantalla de video. Pudo demostrarse que los lípidos marcados se mueven al azar dentro de la membrana según lo indican los rastros trazados sobre la superficie de la célula. La barra representa 3 μm . (Según Greta, M. Lee y cols.: J. Cell Biol. 120:28, 1993; con permiso de Rockefeller University Press.)

que se unen a la superficie de la membrana o agregando el compuesto polietilenoglicol. La fusión de las células ha desempeñado un importante papel en biología celular y en la actualidad es parte de la técnica para preparar anticuerpos específicos (sección 17-13).

En los primeros experimentos para demostrar que las proteínas de la membrana tenían capacidad de movimiento en el plano de la membrana se empleó la fusión celular, y fueron publicados en 1970 por L.D. Frye y Michael Edidin, de la Universidad Johns Hopkins. En estos experimentos se fusionaron células de ratón y de humanos, y luego se observó la localización de proteínas específicas de la membrana plasmática una vez que las dos membranas se volvieron continuas. Para seguir la distribución de las proteínas de la membrana, de ratón o humanas, en diferentes momentos después de la fusión se prepararon anticuerpos contra uno u otro tipo de proteínas y se unieron mediante enlaces covalentes a colorantes fluorescentes. Los anticuerpos contra proteínas de ratón formaron complejos con un colorante que produce fluorescencia verde y los anticuerpos contra proteínas humanas con uno que produce fluorescencia roja. Cuando se añadieron los anticuerpos a las células fusiona-

das se enlazaron a las proteínas humanas o de ratón y pudo determinarse su localización bajo microscopio de fluorescencia (fig. 4-25, a). En el momento de la fusión, la membrana plasmática podía considerarse mitad humana y mitad ratón; o sea, las dos proteínas permanecieron separadas en su propio hemisferio (paso 3, fig. 4-25, a,b). Después de la fusión, conforme transcurrió el tiempo, se observó que las proteínas de la membrana se desplazan lateralmente dentro de la misma hacia el hemisferio opuesto. Unos 40 minutos después, las proteínas de cada especie estaban distribuidas uniformemente alrededor de toda la membrana celular híbrida (paso 4, fig. 4-25, a). Cuando se efectúa el mismo experimento a temperatura más baja, la viscosidad de la bicapa de lípidos aumenta y la movilidad de las proteínas de la membrana disminuye (fig. 4-25, c).

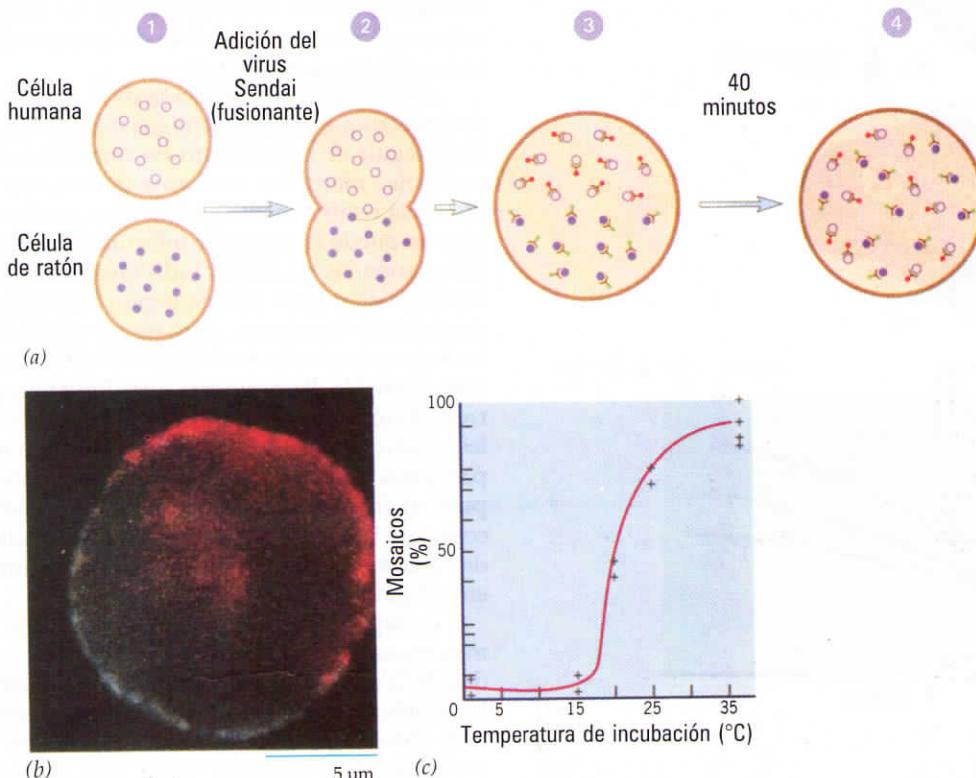


FIGURA 4-25. Con ayuda de la fusión celular se puede demostrar la movilidad de las proteínas de la membrana. a) Diseño de un experimento en el cual se fusionaron células humanas y de ratón (pasos 1-2); posteriormente se siguió la distribución de las proteínas de cada célula durante cierto tiempo en los híbridos (pasos 3-4). Las proteínas de la membrana de ratón se indican con círculos sólidos, las proteínas de la membrana humana en círculos abiertos. En los híbridos, las proteínas humanas y de ratón se localizaron por su interacción con anticuerpos fluorescentes rojos y verdes, respectivamente. b) Micrografía que muestra una célula fusionada en la cual las proteínas de ratón y humanas aún se encuentran en sus respectivos hemisferios (equivalente al híbrido de la parte a, paso 3). c) El efecto de temperatura sobre la difusión de las proteínas de la membrana pudo observarse examinando el porcentaje de células donde aparecen mezcladas las proteínas de las dos especies (que forman un mosaico) 40 minutos después de la fusión. El porcentaje de células mosaico se incrementa de manera brusca cuando la temperatura se eleva a más de 15°C, lo que sugiere que los lípidos sufren una fase de transición durante la cual pasan del estado de gel al estado líquido. (b,c: Según L.D. Frye y Michael Edidin, J. Cell Sci. 328:334, 1970; con permiso de The Company of Biologists Ltd.)