

# EFFECTO DE BILIRRUBINA NO CONJUGADA EN LA AUTOAGREGACIÓN DE FOSFOLÍPIDOS EN BICAPAS

Esteban G. Vega-Hissi, Gladys Ciuffo, Mario R. Estrada

Area de Química Física, Dpto. de Química, Universidad Nacional de San Luis.  
Chacabuco 917, San Luis, 5700, Argentina.

*E-mail:* [egvega@unsl.edu.ar](mailto:egvega@unsl.edu.ar)

## Introducción

Bilirrubina no conjugada (UCB), producto final del catabolismo del grupo hemo de las hemoproteínas, adopta una conformación plegada, "ridge-tile", en la que cada grupo ácido propiónico (o propionato, dependiendo del estado de ionización) establece uniones hidrógeno con las dipirrinonas opuestas <sup>1</sup>. La concentración de bilirrubina en plasma es normalmente baja y se encuentra principalmente unida a albúmina sérica humana (HSA) <sup>2</sup>. En casos graves de hiperbilirrubinemia la capacidad de unión de la albúmina se excede aumentando la proporción de la fracción libre en plasma que es capaz de atravesar las membranas biológicas <sup>3</sup> y difundir a los tejidos, especialmente al sistema nervioso central (SNC), donde puede acumularse de forma irreversible y producir alteraciones neurológicas (encefalopatía) <sup>4</sup>. Entre los mecanismos de toxicidad propuestos se encuentran: inducción de apoptosis, modulación del estrés oxidativo, inhibición del metabolismo neurotransmisor, interferencia con mecanismos celulares de fosforilación proteína/péptido <sup>4</sup> y perturbación de la estructura y función de membranas por alteración de las propiedades de los fosfolípidos de membrana con los que se agrega <sup>5</sup>. Si bien bilirrubina posee afinidad por fosfolípidos, la naturaleza de la interacción es poco conocida. Por lo tanto en este estudio se examina la forma en que bilirrubina interacciona con sistemas lipídicos (bicapas) a través de simulaciones computacionales.

## Resultados

Todas las simulaciones de dinámica molecular se llevaron a cabo con el paquete de programas GROMACS, versión 4.0.7.<sup>6</sup> Los fosfolípidos (dipalmitoil fosfatidil colina, DPPC) fueron modelados con los parámetros de Berger y colaboradores, y las especies de bilirrubina fueron parametrizadas según el campo de fuerza GROMOS96 53a6<sup>7</sup>. El proceso de autoensamblado de bicapas en presencia de UCB fue estudiado mediante simulaciones a presión constante de 1 atm y temperatura constante de 323 K, por encima de la temperatura de transición de fases.

A partir de soluciones con disposición aleatoria de moléculas de fosfolípidos, bilirrubina y agua (Figura 1a), la formación de la bicapa involucra las siguientes etapas (Figura 1b-1e): (1) separación inicial de las moléculas en fases acuosa y lipídica. Las colas hidrocarbonadas de los fosfolípidos se agregan reduciendo rápidamente la superficie hidrofóbica expuesta al solvente polar (Figura 2) en los primeros 200 ns. En esta primera etapa se forman agregados irregulares de fosfolípidos; (2) los agregados se reordenan y fusionan durante los próximos 5 ns, sin embargo la organización micelar aún domina; (3) los agregados se concentran formando una bicapa defectuosa (estructura metaestable) la cual es atravesada por un poro acuoso (50 ns a 150 ns). El cierre de este poro es la etapa limitante de la velocidad de formación de la bicapa equilibrada. En esta etapa se observó que algunas moléculas de UCB se localizan en el interior del poro demorando el cierre del mismo; (4) finalmente, el cierre del poro da lugar a la

relajación del sistema formando una bicapa equilibrada luego de los 150 ns. Ambas especies de UCB estudiadas se localizan en el interior de la bicapa. Sin embargo, la especie neutra penetra más profundamente que el dianión.

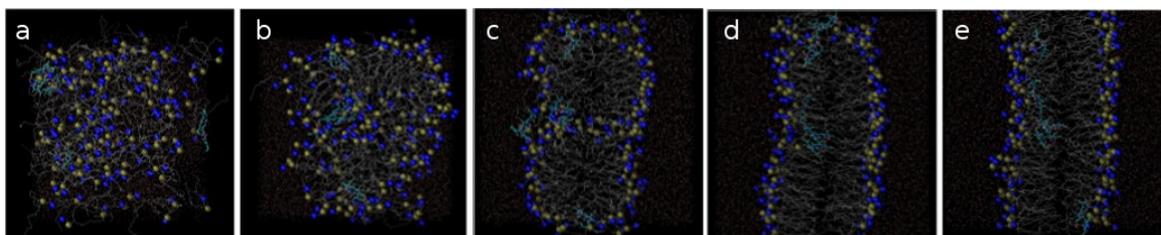


Figura 1. Cuadros instantáneos del proceso de autoensamblaje de fosfolípidos en una bicapa en presencia de bilirrubina. **(a)** Configuración inicial. **(b)** Formación de agregados irregulares a los 200 ps. **(c)** Inicio de la formación de una bicapa primitiva luego de los 5 ns. **(d)** Estructura metaestable con un poro acuoso transmembrana desde los 50 ns. **(e)** Configuración de bicapa equilibrada sin la presencia de poro a partir de los 150 ns.

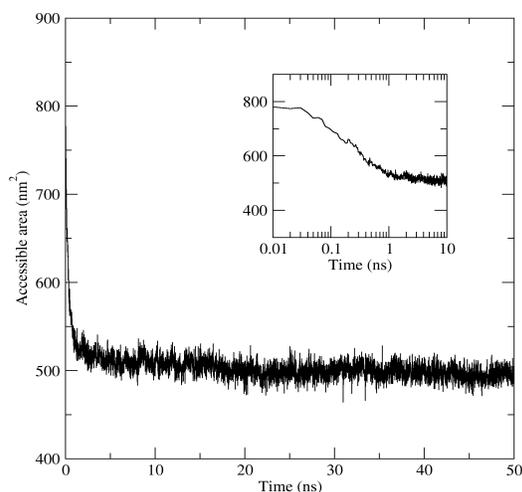


Figura 2. Superficie accesible al solvente de los grupos hidrofóbicos de los fosfolípidos de los primeros 50 ns de simulación. La superficie de las colas no polares expuesta disminuye rápidamente durante el primer nanosegundo (ver gráfico inserto, escala de tiempo logarítmica) y luego la reducción se atenúa.

## Conclusiones

Si bien el tiempo de vida del poro transmembrana es variable, con valores entre 5-80 ns en sistemas de fosfolípidos y agua<sup>8</sup>, ante la presencia de moléculas de bilirrubina el poro transmembrana tarda en cerrarse. Este efecto es independiente del estado de protonación de UCB. Además es importante resaltar que a pesar de que ambas especies se localizan en el interior de la bicapa, la especie protonada (neutra) penetra más profundamente que la totalmente desprotonada (dianión).

## Referencias

- (1) Nogales, D.; Lightner, D. A. *The Journal of Biological Chemistry* **1995**, *270*, 73-77.
- (2) Ostrow, J. D.; Mukerjee, P.; Tiribellis, C. *Journal Of Lipid Research* **1994**, *35*, 1715-1737.
- (3) Zucker, S. D.; Goessling, W.; Hoppin, A. G. *The Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274*, 10852-10862.
- (4) Ostrow, J. D.; Pascolo, L.; Brites, D.; Tiribelli, C. *Trends in Molecular Medicine* **2004**, *10*, 65-70.
- (5) Vázquez, J.; García-Calvo, M.; Valdivieso, F.; Mayor, F.; Mayor, F. J. *The Journal of Biological Chemistry* **1988**, *263*, 1255-1265.
- (6) Hess, B.; Kutzner, C.; Spoel, D. van der; Lindahl, E. *Journal of Chemical Theory and Computation* **2008**, *4*, 435-447.
- (7) Oostenbrink, C.; Villa, A.; Mark, A. E.; Gunsteren, W. F. van *Journal of computational chemistry* **2004**, *25*, 1656-76.
- (8) Marrink, S. J.; Lindahl, E.; Edholm, O.; Mark, a E. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123*, 8638-9.