

Contribución al estudio del modo de acción de los antibióticos poliénicos. Interacción de la nistatina y etruscomicina con el colesterol

III. Naturaleza de las fuerzas de interacción. Estequiometría de las asociaciones

por

J. R. CHANTRES ANTORAZ, E. OTERO AENLLE
y M.^a P. PORTILLO IGLESIAS

Departamento de Físico-Química. Facultad de Farmacia. Madrid

RESUMEN

Los numerosos estudios realizados hasta la fecha sobre la interacción de diversos antibióticos poliénicos con el colesterol, en dispersión acuosa, han puesto de manifiesto diferencias de magnitud en dicha interacción, pero no en los principios en los que la misma está basada. Por el contrario, en el presente trabajo se aportan datos experimentales que permiten aclarar la naturaleza y distinto modo de acción de las fuerzas intermoleculares en cada caso, estableciendo que la interacción de la etruscomicina con el colesterol da lugar a un complejo con estequiometría única y definida, mientras que la de la nistatina con el esterol conduce a la formación de agregados moleculares o comicelados de progresiva complejidad.

SUMMARY

The large number of studies carried out to date about the interaction of several polyene antibiotics with cholesterol, in aqueous dispersion, had showed magnitude differences in such interaction, but not in the principles on it is based. On the contrary, in the present work we endeavoured an experimental study, in order to know on the nature and action mode of the intermolecular forces. Interactions between struscomycin-cholesterol, leads to the formation of a complexe with a very well described steochiometry. On the other hand, interactions nystatin-cholesterol arise the molecular aggregates or co-micellar structure of progressive complexity formation.

INTRODUCCIÓN

Las experiencias realizadas por diversos autores, encaminadas a tratar de averiguar cuál es la naturaleza de las fuerzas que gobiernan la interacción entre los antibióticos poliénicos y los esteroides son muy numerosas, tanto en aquellos sistemas en los que las sustancias se encuentran dispersadas en un medio acuoso, como en los que el esteroide forma parte de modelos lipídicos de membrana, o de membranas naturales (1-5). En general, los resultados obtenidos coinciden en señalar que es muy probable que la naturaleza principal de la interacción sea hidrofóbica, sin excluir la posibilidad de que, con una importancia secundaria, se puedan establecer enlaces por puentes de hidrógeno que colaboren a estabilizar los complejos formados.

Por lo que se refiere a la estequiometría de estos complejos de interacción, parece desprenderse de los estudios realizados hasta la fecha, que el número de moléculas de esteroide por molécula de antibiótico es de un orden comparable en todos los casos. En la tabla I, tomada de un importante trabajo publicado por Kruijff y Demel (6), se resumen los datos que se poseen hasta el momento a este respecto, y que han sido obtenidos, en diversos sistemas, por diferentes técnicas experimentales.

TABLA I

Estequiometría de la interacción antibiótico poliénico-colesterol, obtenida de diferentes estudios

<i>Antibiótico poliénico usado</i>	I	II	III	IV	V
Filipina.....	1,5	0,80 - 0,95	1,2	0,7	1,2
Anfotericina B.....	—	—	3,9	3,3	0,7
Nistatina.....	—	—	1,2	1,6	—
Etrusomicina.....	—	—	0,6	0,3	1,6
Piramicina.....	—	—	1,7	—	1,5

I: Espectroscopía UV sobre colesterol libre e incorporado a liposomas, (1), (2).

II: Espectrofluorometría sobre colesterol libre (4).

III: Análisis calorimétrico diferencial sobre liposomas que incorporan colesterol (1). Los datos están corregidos para la cantidad de colesterol no accesible, en los liposomas, a los antibióticos poliénicos (7).

IV: Estudios de permeabilidad sobre células de *A. laidlawii* conteniendo colesterol (7).

V: Unión a membranas de *A. laidlawii* conteniendo colesterol (3).

Para la filipina, por ejemplo, que ha sido la más ampliamente estudiada, los datos que existen en la literatura indican que la interacción con el colesterol es, aproximadamente, equimolecular; para los otros antibióticos poliénicos los resultados obtenidos con distintas técnicas son más dispersos, aunque en general se observa que sólo un pequeño número de moléculas de colesterol interaccionan con cada molécula de antibiótico.

Por nuestra parte, y como aportación a estas cuestiones, hemos realizado el estudio de la influencia de la fuerza iónica de la solución y de la temperatura, sobre la interacción de la etrusomicina y de la nistatina dispersadas en agua, con el colesterol, así como el efecto que ejerce la dilución sobre la estabilidad de los posibles complejos formados. Además, hemos intentado establecer, en cada caso, la estequiometría de los mismos por medio de la espectrofotometría UV, basándonos en los cambios espectrales ocasionados por la presencia del colesterol en el medio. Sobre todos estos aspectos no hemos encontrado referencia alguna en la bibliografía.

MATERIALES Y MÉTODOS

Antibióticos y colesterol

La procedencia de estos productos, así como su reconocimiento, preparación y control de las soluciones madres ya ha sido descrito en un trabajo anterior (5).

Preparación de las muestras

Análoga a la ya expuesta en publicaciones anteriores (5).

En los estudios de la influencia de la temperatura y de la dilución en la estabilidad del complejo de interacción, así como para determinar la estequiometría del mismo, el medio dispersante era una solución tampón 50 mM tris-40 mM HCl de pH = 7,4.

En las experiencias destinadas a establecer el efecto de la fuerza iónica, los diferentes valores de este parámetro se obtienen disolviendo en el mencionado tampón cantidades crecientes de KCl. Si se atribuye el valor de fuerza iónica cero, a dicho tampón, y no se igualan las actividades con las concentraciones molares, las diferentes soluciones tenían, como magnitud del citado parámetro, 0,15, 0,30, 0,50, 1,0 y 3,0. El pH de estas soluciones se mantuvo siempre en un valor de 7,45. La concentración de antibiótico fue de $1,5 \cdot 10^{-5}$ M, y la de colesterol de $5,17 \cdot 10^{-5}$ M, lo que equivale a una relación molar colesterol/antibiótico de 3,45.

Medidas espectrofotométricas

Se realizaron con un espectrofotómetro Shimadzu QV-50. Con ellas se estableció el valor de la relación de absorbancias entre los picos 3 y 1 de los espectros UV de los antibióticos, antes y después de la adición de colesterol, estableciéndose así el valor del parámetro Δ 3/1, en el caso de la determinación de la estequiometría o el (3/1)rel. para la medida de la influencia de la fuerza iónica o de la temperatura.

Medidas espectrofluorimétricas

Se aplicaron al estudio del efecto de la dilución sobre la estabilidad del producto resultante de la interacción antibiótico poliénico-colesterol, en las mismas condiciones de excitación, emisión y medida que las empleadas en trabajos anteriores (5).

RESULTADOS

Influencia de la fuerza iónica

El efecto que ejerce la fuerza iónica sobre la interacción antibiótico-colesterol queda reflejado en la figura 1, donde se utiliza el valor de (3/1)rel. como una medida de la extensión en que se ha formado el complejo resultante de aquélla (3, 7). En el caso de la etruscomicina, las lecturas de las absorbancias en los picos 3 y 1 de su espectro, después de su interacción con el colesterol, se efectuaron cuando había finalizado el proceso cinético que se presenta en este caso (8).

Como se puede observar a través de la mencionada figura, un aumento de la fuerza iónica no sólo no destruye la interacción, como podría esperarse si ésta dependiera de fuerzas electrostáticas, sino que la favorece ligeramente. La magnitud de este efecto positivo llega a ser hasta de un 3,7 y 7,1 por 100 del valor a fuerza iónica cero, para los sistemas de etruscomicina y nistatina respectivamente. Estos resultados son semejantes a los obtenidos por Norman y cols. (2) para el complejo filipina-colesterol, y parecen confirmar que las interacciones hidrofóbicas son las de mayor importancia en la asociación entre el antibiótico y el esterol.

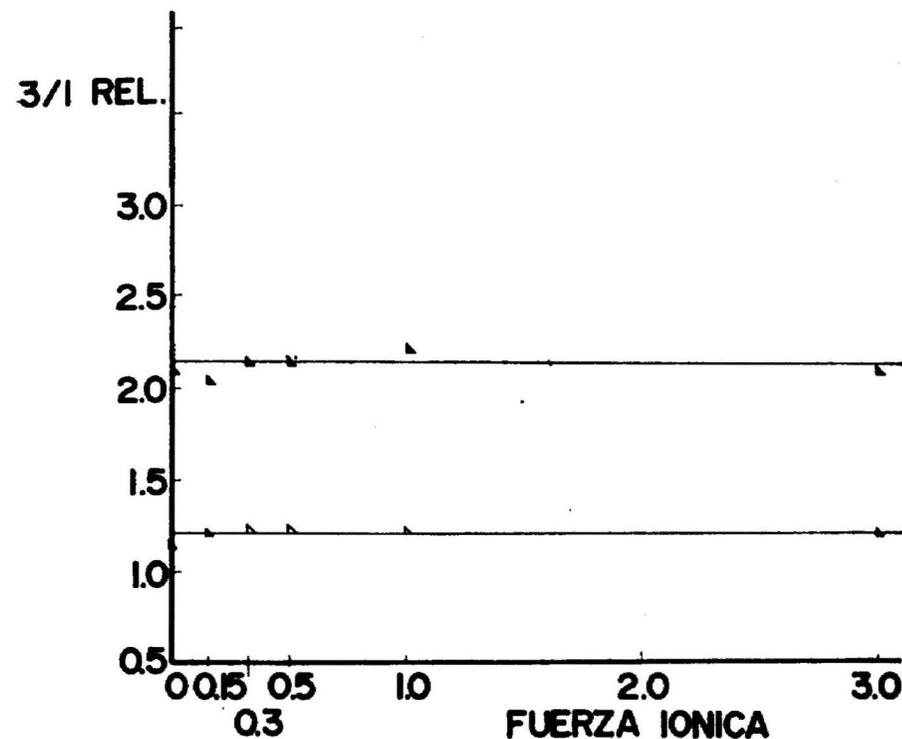


Fig. 1.—Influencia de la fuerza iónica sobre la interacción antibiótico poliénico-colesterol. Etruscomicina: \blacktriangle . Nistatina: \triangle .

Influencia de la temperatura

El efecto de la temperatura sobre las interacciones que estamos estudiando, se realizó midiendo el cambio espectral a través del parámetro (3/1)rel. Las temperaturas a las que se investigó el fenómeno fueron 0°, 10°, 20° y 40° C. Antes de proceder a la dispersión del colesterol, la muestra del antibiótico fue incubada durante quince minutos a la temperatura constante a la que se iba a efectuar la experiencia, determinando luego el valor de 3/1, mediante las correspondientes lecturas espectrofotométricas. Añadido el colesterol en la muestra se incubó de nuevo durante otros quince minutos a la misma temperatura, al cabo de los cuales se procedía a la medida de las absorbancias en los picos 3 y 1 respectivos de cada sistema, obteniendo así el nuevo valor de 3/1, y de aquí el del parámetro (3/1)rel. Se manejaron dos concentraciones de antibióticos: $3.0 \cdot 10^{-5}$ M y $1.5 \cdot 10^{-5}$ M, y una de colesterol: $3.0 \cdot 10^{-5}$ M, con lo que resultaba

que finalmente el fenómeno quedaba investigado para dos relaciones molares de colesterol/antibiótico, de valor 10,0 y 2,0, respectivamente. Los resultados obtenidos se reflejan en la figura 2.

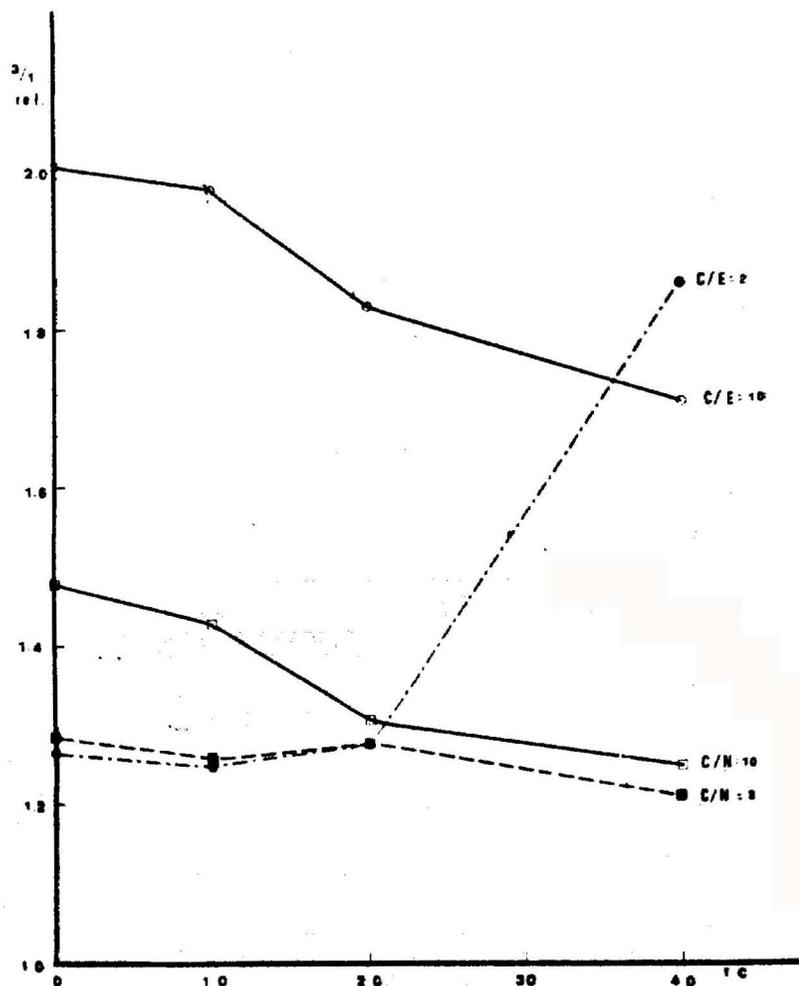


Fig. 2.—Influencia de la temperatura sobre la interacción antibiótico poliénico-colesterol.

En las estructuras formadas a expensas de las interacciones hidrofóbicas, el factor de la distancia entre las especies reaccionantes es de primordial importancia, ya que el origen de la estabilización energética de estas asociaciones moleculares debe buscarse, fundamentalmente, en las fuerzas de dispersión de London, que se establecen

cooperativamente cuando las distancias intermoleculares son adecuadas. Por esta razón, un aumento del movimiento browniano de las moléculas, ocasionado por un incremento de la temperatura, motiva la disociación de aquellas estructuras. Este es el resultado al que se llega por medio de nuestras experiencias, por lo que a los complejos del colesterol con la etruscomicina y nistatina se trata.

El fenómeno al que nos estamos refiriendo se pone claramente de manifiesto en presencia de un exceso de colesterol, como refleja la gráfica precedente, en la que asimismo se puede observar cómo cursa de una forma casi paralela para los dos antibióticos estudiados. Numéricamente se puede comprobar que, en ambos casos, la cantidad de complejo antibiótico poliénico-colesterol, formado a 40° C, representa un 85,07 y 84,46 por 100, del formado a 0° C para los sistemas que contienen etruscomicina y nistatina respectivamente. Para el complejo nistatina-colesterol, y cuando la mencionada relación molar adquiere el valor 2,0, el fenómeno muestra los mismos caracteres cualitativos, aunque la variación se hace menos significativa. De todo lo anterior se desprende que la interacción es máxima a 0° C. Resultados similares fueron obtenidos por de Kruijff y cols. (3) para las interacciones de la filipina y anfotericina B, con el colesterol en medio acuoso, y para la filipina, anfotericina B, nistatina y etruscomicina con liposomas y membranas de *A. laidlawii* que contenían colesterol.

En el caso del complejo de la etruscomicina, y cuando la relación molar colesterol/antibiótico toma asimismo el valor de 2,0, el comportamiento del sistema presenta unos rasgos característicos que juzgamos del mayor interés. Así podemos ver cómo después de un ligero descenso del parámetro (3/1)rel. al pasar de 0° a 10° C, nos encontramos con que el valor correspondiente a los 20° C iguala al obtenido a 0° C, continuando la tónica ascendente hasta los 40° C, donde el valor del citado parámetro llega a representar aproximadamente un 146,5 por 100 del que corresponde a 0° C. Esto parece contradecir el supuesto, enunciado anteriormente, de que la interacción era máxima a la temperatura más baja. Sin embargo, tal contradicción es, a nuestro juicio, aparente. No podemos olvidar que la interacción entre la etruscomicina y el colesterol está condicionada por un proceso cinético (8), que como tal ha de venir influenciado en su desarrollo por varios factores. Uno de ellos es precisamente la temperatura, que se encuentra ligada a la constante de velocidad por medio de la ecuación de Arrhenius. Desde nuestro punto de vista, la interacción, que por la naturaleza de sus fuerzas está favorecida a baja temperatura, ya tiene lugar a 0° C, pero no en la extensión que correspondería a las cantidades presentes de los reactivos, porque el proceso cinético es muy lento a esta temperatura. Esto mismo parece válido para el intervalo de 0°-10° C, y el sistema se comporta en él de la misma forma a como lo hace cuando la relación

mo ar es 10,0, dado que los incrementos de $(3/1)_{rel.}$ son prácticamente iguales. Sin embargo, a partir de esta última temperatura, el proceso cinético comienza a ser significativo y sus consecuencias se reflejan en el valor del cambio espectral. Así, a $20^{\circ}C$ el valor de $(3/1)_{rel.}$ iguala al obtenido a $0^{\circ}C$, pero mientras que en este caso la extensión que alcanza la interacción es debida a la magnitud de las fuerzas que la gobiernan, en aquél, en el que, como hemos visto, dicha magnitud es menor, los efectos de la puesta en marcha del proceso cinético compensan, durante el mismo período de incubación, este factor negativo, alcanzándose finalmente la formación de una misma cantidad de complejo, a juzgar por el parámetro $(3/1)_{rel.}$ Por encima de los $20^{\circ}C$, el efecto acelerador de la temperatura es más acusado, poniéndose de manifiesto toda la capacidad de cambio espectral que son capaces de originar las proporciones presentes de los reactivos, durante quince minutos de incubación. De hecho, en este tiempo y a la temperatura de $40^{\circ}C$, la magnitud de dicho cambio se aproxima bastante al valor final que alcanza este parámetro en el curso del proceso cinético a $23^{\circ}C$, al cabo de tres horas.

Cuando el colesterol se encuentra en exceso, como el proceso cinético es mucho más rápido, se puede estudiar con más claridad la influencia de la temperatura sobre las fuerzas de interacción.

Efecto de la dilución

Con el objeto de estudiar la estabilidad de los productos resultantes de la interacción antibiótico-colesterol, frente a la dilución, se preparó cada uno de ellos en la forma habitual, caracterizándolos por medio de la lectura de un valor estable en su señal de fluorescencia, que coincidía con los de experiencias anteriores. Una vez logrado esto se procedía a diluir progresivamente cada sistema con la solución fondo en la que habían sido preparados, de forma que la concentración final resultaba ser de hasta $1/256$ veces la original. Preparadas en cada caso las series, se efectuaron las lecturas de la señal de fluorescencia correspondiente (5). La concentración de los antibióticos en las muestras sin diluir era de $7,5 \cdot 10^{-6} M$, y la de colesterol de $15,0 \cdot 10^{-6} M$ y $30,0 \cdot 10^{-6} M$, que corresponden a las relaciones molares colesterol/antibiótico de 2,0 y 4,0.

Los resultados obtenidos se recogen en las figuras 3 y 4, donde se representan los valores de cada lectura, multiplicados por el correspondiente factor de dilución, frente a una coordenada que expresa esta última variable.

Como se puede observar, una progresiva dilución lleva, aparentemente, a la destrucción del complejo nistatina-colesterol, mientras

que, por el contrario, el complejo formado por la etruscomicina y el colesterol no se ve afectado en absoluto por este fenómeno.

Para el sistema que contiene nistatina, la representación gráfica

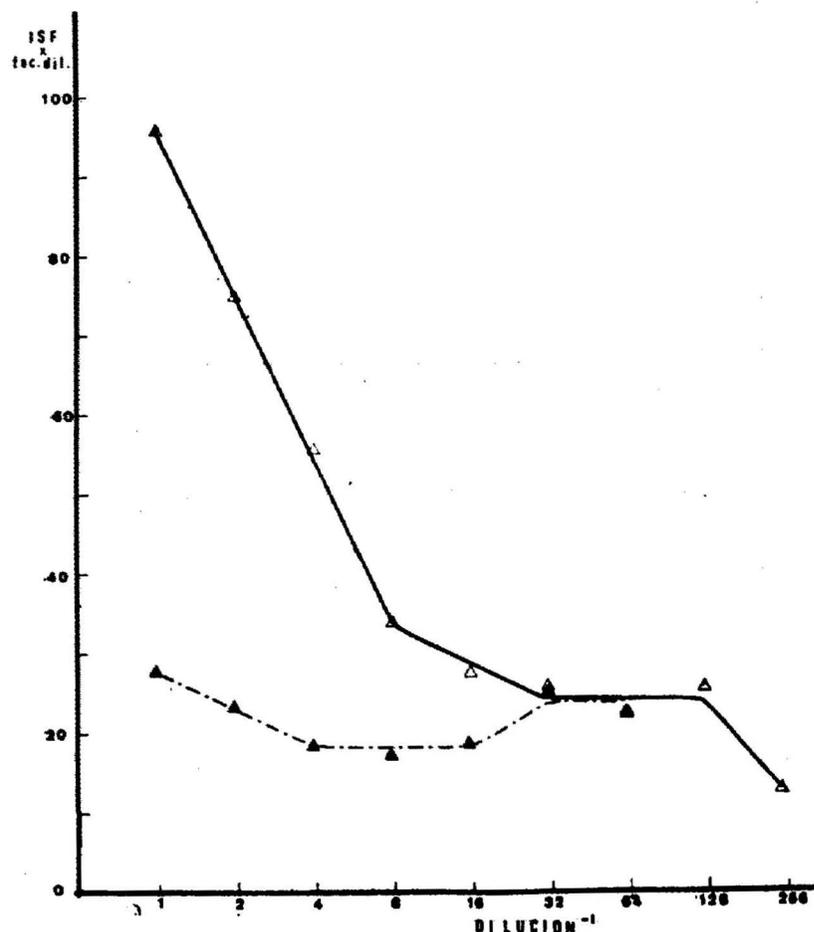


Fig. 3.—Efecto de la dilución sobre la estabilidad del producto de la interacción de la nistatina con el colesterol. Concentración inicial del antibiótico: $7,5 \cdot 10^{-6} M$; relación molar colesterol/antibiótico: 4— Δ y 2— \bullet .

de los datos obtenidos nos permite comprobar, que cuando la relación molar colesterol/antibiótico vale 4,0, el complejo que resulta parece ser estable dentro del rango de concentraciones de colesterol comprendido entre $9,38 \cdot 10^{-7}$ y $2,34 \cdot 10^{-7} M$, que corresponde al rango de concentraciones de antibiótico de $2,34 \cdot 10^{-7}$ y $5,86 \cdot 10^{-8} M$. Cuando la mencionada relación molar vale 2,0, aparecen dos situaciones semejantes de estabilidad. La primera comprende el rango de concen-

traciones de colesterol de $3,75 \cdot 10^{-6}$ a $9,38 \cdot 10^{-7}$ M, correspondiente a las concentraciones de antibiótico de $1,88 \cdot 10^{-6}$ a $4,69 \cdot 10^{-7}$ M, y la segunda abarca, para el colesterol, las concentraciones comprendidas entre $4,69 \cdot 10^{-7}$ y $2,34 \cdot 10^{-7}$ M, y para el antibiótico de

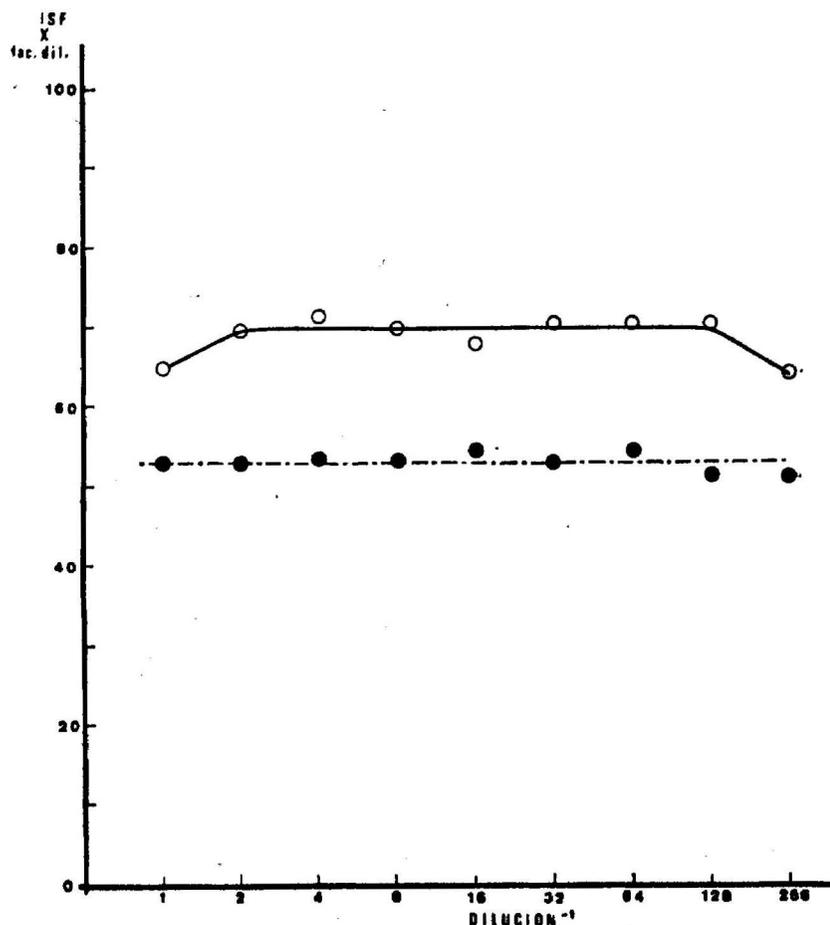


Fig. 4.—Efecto de la dilución sobre la estabilidad del producto de la interacción de la etruscomicina con el colesterol. Concentración inicial del antibiótico: $7,5 \cdot 10^{-6}$ M; relación molar colesterol/antibiótico: 4—○ y 2—●.

$2,34 \cdot 10^{-7}$ a $1,17 \cdot 10^{-7}$ M. A través de estos datos podemos comprobar que ambos sistemas sólo tienen un campo de existencia común que es el que corresponde a las concentraciones de colesterol comprendidas entre los valores $4,69 \cdot 10^{-7}$ y $2,34 \cdot 10^{-7}$ M, inclusives. Entre estos límites, el producto de la interacción entre la nistatina y el colesterol tiene las mismas características, a juzgar por la señal

de fluorescencia y su comportamiento frente a la dilución, con independencia de que la relación molar inicial colesterol/antibiótico valga 4,0 ó 2,0.

En el caso del complejo etruscomicina-colesterol, como ya hemos mencionado, la dilución no parece afectar a la estabilidad del sistema, y, salvo unas pequeñas desviaciones en los valores límites, que se puede atribuir a un esperado fenómeno de filtro interno, los resultados son muy satisfactorios, mostrando cada una de las relaciones molares su propio valor de la señal de fluorescencia.

ESTEQUIOMETRÍA DE LAS INTERACCIONES

a) Nistatina-colesterol

Para tratar de establecer la estequiometría de la interacción nistatina-colesterol se determina la variación del parámetro $\Delta 3/1$ con respecto a concentraciones crecientes de colesterol, para cantidades fijas de antibiótico. La presencia de una meseta en el perfil de la representación de $\Delta 3/1$, frente a la concentración de colesterol, se atribuye a que en esas condiciones se forma un complejo estable. La relación molar entre sus constituyentes queda así definida, dentro del error experimental, por el comienzo de la misma, suponiendo que la magnitud del cambio de $3/1$ es proporcional a la cantidad de complejo formado, de acuerdo con los estudios de Norman y cols. (2) en el caso de la interacción de la filipina con el colesterol.

Como se puede ver en las figuras 5 y 6, que son tan solo una muestra del conjunto de nuestras experiencias, parece ser que de la interacción de la nistatina con el colesterol no surge un solo producto, sino un total de hasta cuatro. Reagrupados todos los resultados obtenidos, podríamos decir, en primera instancia, y dentro del rango de relaciones molares colesterol/antibiótico investigados, que estas cuatro formaciones poseen las siguientes estequiometrías:

I	II	III	IV
0,4-0,6	1,2-1,7	2,1-2,6	3,0-3,3

Estos datos confirman la existencia de un agregado de estequiometría 1,2-1,7, ya citado por Norman y cols. (1) a partir del análisis calorimétrico diferencial realizado sobre liposomas que incorporan colesterol, y por de Kruijff y cols. (7), en sus estudios de permeabilidad en células de *A. Laidlawii* que contenían colesterol.

b) *Etrusomicina-colesterol*

El planteamiento, en este caso, es el mismo que en el sistema anterior, salvo que aquí, debido a la existencia de un proceso cinético en la interacción, las medidas fueron realizadas al cabo de tres horas de incubación a 23° C, es decir, cuando el parámetro $\Delta 3/1$ ya per-

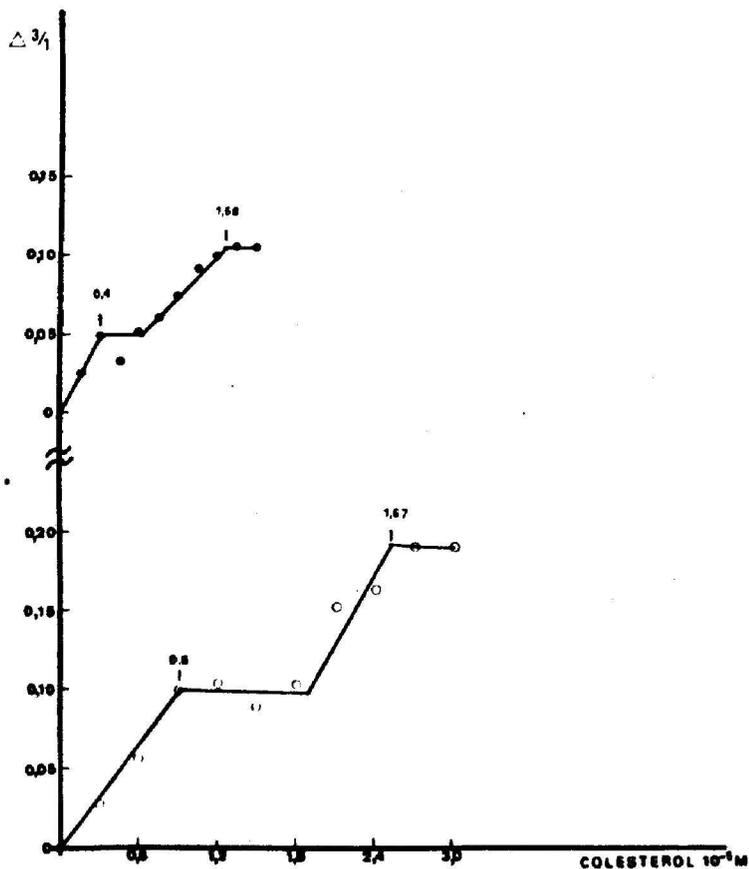


Fig. 5.—Nistatina en medio acuoso. Variación de $\Delta 3/1$ con la concentración de colesterol. Concentración del antibiótico: $7,5 \cdot 10^{-6}$ M —● y $10 \cdot 10^{-6}$ M —○. Las cifras al comienzo de las mesetas indican el valor correspondiente a la relación molar colesterol/nistatina.

manecía constante. Al igual que en el sistema que incorporaba nistatina, las experiencias se realizaron con diferentes concentraciones de antibiótico. La figura 7 es un ejemplo del tipo de perfil de la

variación de $\Delta 3/1$ con la concentración de colesterol, en este caso. Aquí la adición de cantidades crecientes de colesterol parece provocar un crecimiento indefinido del parámetro $\Delta 3/1$, sin que surja ninguna situación de estabilidad, semejante a la que en el sistema nistatina-colesterol daba lugar a la aparición de diversas mesetas en esta misma representación.

Un análisis matemático de las curvas obtenidas demuestra que se

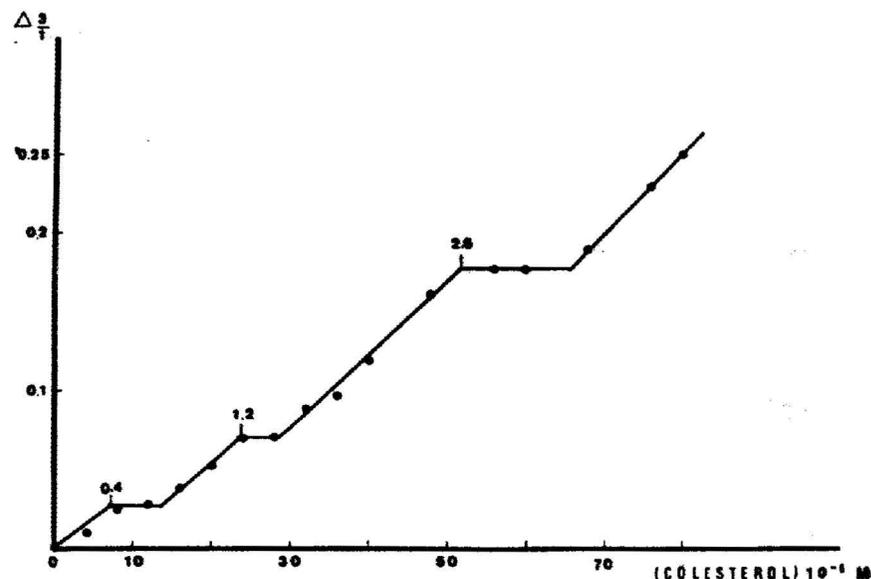


Fig. 6.—Nistatina en medio acuoso. Variación de $\Delta 3/1$ con la concentración de colesterol. Concentración del antibiótico: $1,0 \cdot 10^{-5}$ M. Las cifras al comienzo de las mesetas indican el correspondiente valor de la relación molar colesterol/nistatina.

trata de una familia de hipérbolas equiláteras. Norman y cols. (2) en el estudio de la estequiometría del complejo filipina-colesterol, encontraron que la representación gráfica del parámetro $\Delta 3/1$ frente a la concentración de colesterol presente en el medio, al comienzo de la interacción, daba lugar asimismo a una hipérbola equilátera, cuya asíntota era paralela al eje en el que se representaban las concentraciones de colesterol. En el citado trabajo, estos autores determinan la estequiometría del complejo filipina-colesterol a partir de una familia de curvas que son semejantes a las obtenidas por nosotros, pero con la diferencia ya reseñada en cuanto a las características del asintotismo de aquéllas.

Nosotros hemos desarrollado un planteamiento semejante basado en las siguientes consideraciones. A las curvas obtenidas les corres-

ponde una asíntota que es paralela al eje que representa los valores de $\Delta 3/1$. Sin que podamos explicar la razón profunda que motiva esta conducta, lo que sí podemos afirmar es que la forma de la curva surge como resultado de una tendencia mucho más rápida a la anulación de la absorbancia en el pico 1 del espectro UV del antibiótico, que la que corresponde al pico 3, después de la interacción del mismo

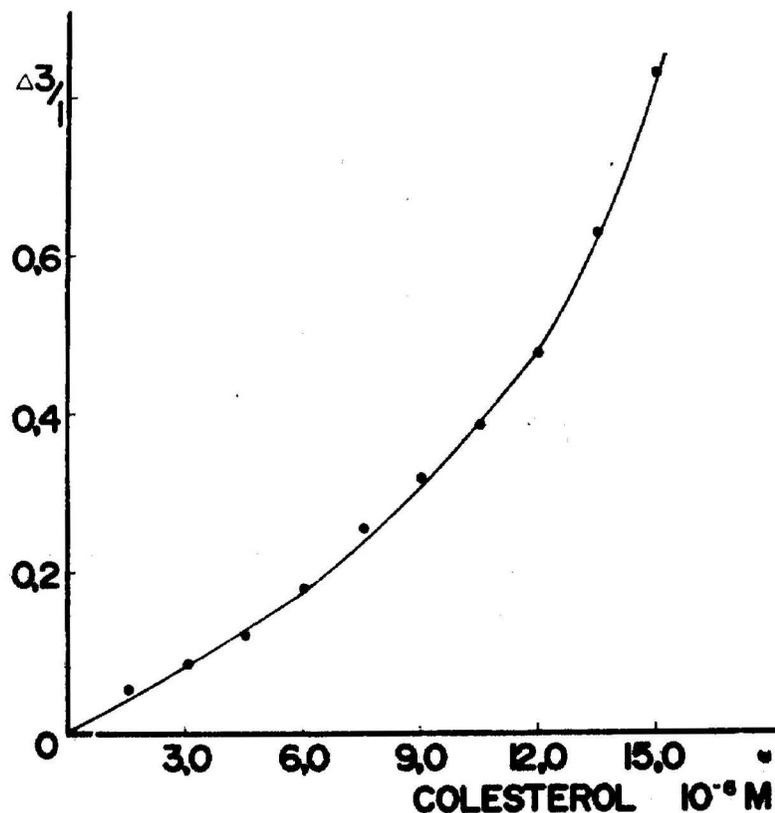


Fig. 7.—Etruscomicina en medio acuoso. Variación de $\Delta 3/1$ con la concentración de colesterol. Concentración del antibiótico: $7,5 \cdot 10^{-6}$ M.

con el colesterol, lo que hace que $\Delta 3/1$ tienda a infinito. En la práctica esto no es así, y la curva no tiene un campo de existencia real más allá de los valores consignados; de hecho, sucesivos incrementos de la concentración de colesterol provocan una ruptura en las características de crecimiento de la curva. Sin embargo, en su campo de existencia, la misma es válida para establecer la estequiometría de

la interacción etruscomicina-colesterol, como vamos a tratar de demostrar.

En la figura 8 se muestra una de las posibilidades de cambio de ejes que sobre una hipérbola del tipo: $y \cdot x = a$, daría lugar a una representación gráfica semejante a la obtenida por medio de nuestros resultados experimentales. Sin embargo, un análisis matemático de la transformación nos indica que la ecuación que surge después de la misma, impone que la representación gráfica del inverso de $\Delta 3/1$ frente al inverso de la concentración de colesterol $[c]$, sea una

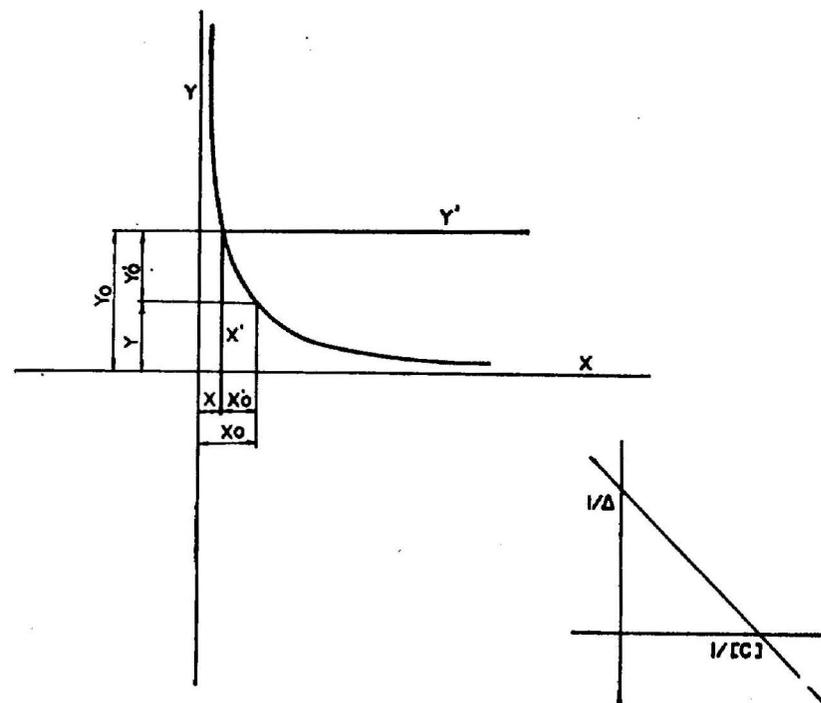


Fig. 8

línea recta del tipo de la incluida en la citada figura. Los hechos que se desprenden de dicha representación, sin embargo, no están de acuerdo con los resultados experimentales, ya que, como se puede ver, la misma implica una disminución progresiva del valor de $\Delta 3/1$ a medida que aumenta la concentración de colesterol. Dicha transformación, por lo tanto, no resulta válida.

Por el contrario, si aceptamos el esquema indicado en la figura 9, la situación cambia bastante. En efecto, en este caso la ecuación de la curva, que en el sistema de referencia (X, Y) es:

$x \cdot y = -a$, en el sistema (X', Y') es, como se puede demostrar:

$$y_0 = \frac{-Y \cdot x_0}{x_0 - x}$$

o lo que es idéntico:

$$\Delta 3/1 = \frac{-y \cdot [c]}{[c] - x}$$

de donde surge:

$$1/\Delta = (x/y) \cdot 1/[c] - 1/y$$

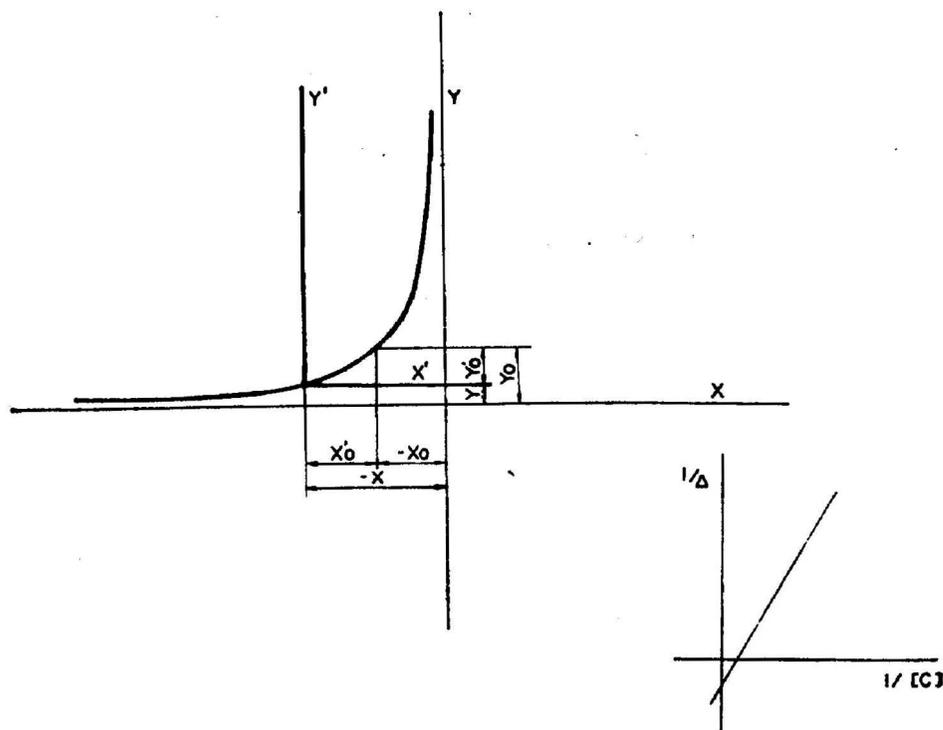


Fig. 9

en la que hemos sustituido $\Delta 3/1$ por Δ . Como se ve, en la representación gráfica de $1/\Delta$ frente a $1/[c]$, se obtiene una recta del tipo de la incluida en la figura 9, y en la que ahora se cumple que a concentraciones crecientes de colesterol corresponden valores crecientes de $\Delta 3/1$.

Los parámetros x e y son dos constantes, ya que se trata de las coordenadas del origen del sistema de referencia (X', Y') con respecto al (X, Y) , y su significado físico es el siguiente.

Si en la ecuación de la recta, hacemos:

$$1/c = 0, \quad \text{tendremos: } 1/\Delta = -1/y$$

Entonces, independientemente del signo, que en este caso no tiene un sentido físico, es evidente que y representa un determinado valor del parámetro $\Delta 3/1$. De acuerdo con la ecuación de la curva en el sistema de referencia (X, Y) .

$$-x \cdot y = -x/2 (y + y_0)$$

luego:

$$y = y_0$$

Otorgando a los símbolos su significación, tenemos:

x = concentración necesaria de colesterol para producir el valor máximo, teóricamente infinito, del parámetro $\Delta 3/1$.

$x/2$ = mitad de la concentración de colesterol necesaria para producir el valor máximo del parámetro $\Delta 3/1$.

y_0 = valor del parámetro $\Delta 3/1$ correspondiente a la mitad de la concentración de colesterol necesaria para producir el valor máximo de $\Delta 3/1$.

El valor de x se obtiene en cada caso por medio de la abscisa en el origen de la representación $1/\Delta$ frente a $1/c$.

Por el mismo tipo de razonamiento que el expuesto por Norman y cols (2), es de esperar que si el complejo etruscomicina-colesterol tiene una estequiometría definida, la representación de una serie de concentraciones de antibiótico frente a la concentración de colesterol necesaria para dar lugar al valor máximo de $\Delta 3/1$, esto es, cuando en la solución ya no se encuentra el antibiótico libre, sino que todo él está formando parte del complejo, y mostrando, por tanto, su propio valor de la relación 3/1, ésta sea una línea recta de cuya pendiente obtengamos el valor de la razón estequiométrica: moléculas de colesterol/moléculas de etruscomicina.

Por otra parte, queda así establecida la diferencia entre los parámetros empleados por Norman y cols. en el citado trabajo, y los utilizados por nosotros. Así, mientras que ellos determinan la concentración de colesterol necesaria para producir la mitad del valor máximo de $\Delta 3/1$, punto en el que suponen que las concentraciones de complejo y antibiótico libre son iguales, nosotros podemos determinar precisamente la concentración de colesterol que provoca dicho

cambio máximo, instante en el que ya no hay antibiótico libre en el medio.

La figura 10 representa una aplicación de las anteriores hipótesis a nuestros datos experimentales. Para la construcción de este tipo de rectas hemos aplicado el método de los mínimos cuadrados a la dispersión de los puntos experimentales, con el fin de determinar la ecuación de las rectas de regresión correspondientes, y así poder

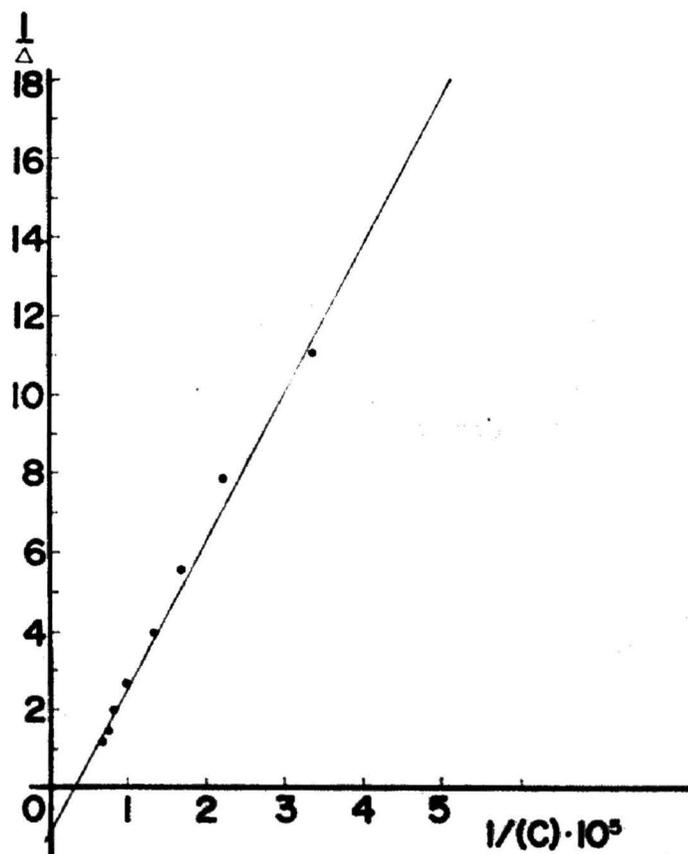


Fig. 10.—Representación gráfica de $1/\Delta$ frente a $1/c$ para determinar la concentración necesaria de colesterol para lograr el valor máximo de Δ 3/1. Concentración de etruscomicina: $7,5 \cdot 10^{-6}$ M.

hallar, con el mínimo error, los respectivos valores de cada una de las abscisas en el origen. En algún caso, en lugar de utilizar los valores experimentales se ha manejado el valor teórico predecible por la curva, con lo que se lograba una correlación lineal más ajustada. Cuando se ha efectuado este cambio, el mismo ha afectado casi

siempre al valor más bajo de Δ 3/1 —uno o dos puntos— que eran también los que por su pequeña magnitud podrían contener mayor error. Los valores de los factores de correlación encontrados fueron del orden de 0,999.

Averiguadas cada una de las concentraciones de colesterol capaces de producir, en cada caso, el valor máximo de Δ 3/1, se procedió a la representación gráfica de las concentraciones de etruscomicina frente a aquéllas. El resultado se muestra en la figura 11, pudiendo comprobarse que, en efecto, se produce una relación lineal que prueba la existencia de una única y definida estequiometría en la interacción

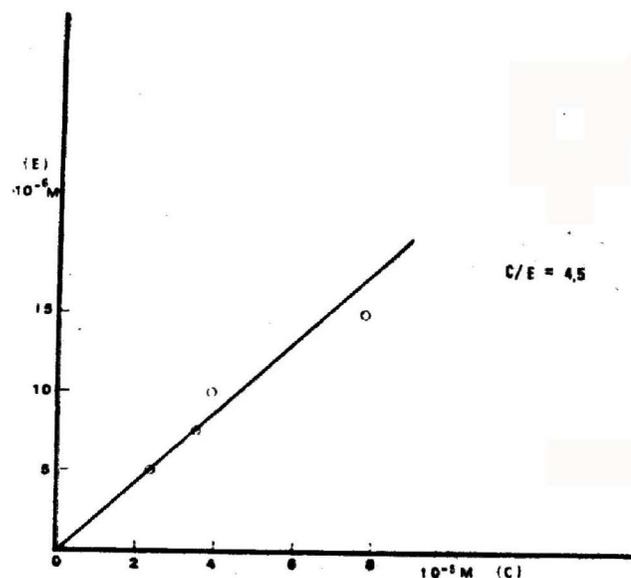


Fig. 11.

de la etruscomicina con el colesterol, cuyo valor, deducido, como hemos dicho, a través de la pendiente de la recta, corresponde a 4,5 moléculas de colesterol por cada molécula de antibiótico.

El valor estequiométrico hallado por nosotros es superior a los que se pueden encontrar en la bibliografía, y que, obtenidos por diversas técnicas, difieren significativamente entre sí. Por el momento no disponemos de argumentos suficientes que nos permitan aclarar los motivos de tales discrepancias.

DISCUSIÓN

Del estudio de la influencia de la fuerza iónica y la temperatura sobre la interacción antibiótico poliéxico-colesterol, surgen nuevos datos que apoyan la suposición de que las fuerzas que desempeñan el principal papel en la misma son fundamentalmente de naturaleza hidrofóbica. Sin embargo, a pesar de que las interacciones de la etruscomicina y de la nistatina con el colesterol muestran, en términos generales, unas características semejantes, hecha abstracción de la magnitud de cada una de ellas, algunos resultados parecen indicar que existen diferencias de base entre una y otra. Así, aparte de las ya señaladas en trabajos anteriores (5, 8), hay que considerar que el complejo etruscomicina-colesterol es estable frente a la dilución, a juzgar por la variación de la intensidad de la señal de fluorescencia con la misma, al contrario de lo que ocurre con el que corresponde al formado por la nistatina y el colesterol, ya que el descenso que se produce, en este caso, en el anterior parámetro, es superior al que cabría esperar por la simple dilución del sistema, lo que parece indicar que con la misma tiene lugar la disociación del producto resultante de esta interacción.

Por otro lado, el estudio estequiométrico, por espectrofotometría UV, de ambas interacciones, en un medio acuoso, demuestra que mientras que la etruscomicina da lugar a la formación de un complejo con una estequiometría única y definida, en la que aproximadamente dos moléculas de este antibiótico se unen a nueve de colesterol, la interacción de éste con la nistatina ofrece distintas posibilidades de agregación, que dependen del valor que alcance la relación molar colesterol/antibiótico y que son, al menos, cuatro, dentro del rango de relaciones molares que se han investigado.

Por estas razones, pensamos que hay que considerar la posibilidad de que de la interacción de la etruscomicina con el colesterol surja una asociación cerrada, en la que muy posiblemente exista un equilibrio entre el complejo resultante y sus constituyentes, mientras que en el caso de la interacción de la nistatina con el colesterol los resultados obtenidos parecen indicar que se podría estar produciendo un tipo de asociación abierta, o bien que en el fenómeno coexistieran dos o más procesos de asociación abierta y cerrada en forma complementaria. Este último modo de comportamiento es asimilable a un proceso de polimerización por condensación, y en cierta forma recuerda a la respuesta de los sistemas micelares frente a un incremento de la concentración de la sustancia anfílica.

Todo ello nos sugiere que, mientras que la asociación de la nistatina y el colesterol pudiera tener lugar, tan sólo, como resultado de la interacción entre estos productos y el medio en el que se encuen-

tran, con la consiguiente tendencia a la formación de agregados moleculares o micelados, integrados por moléculas de ambas sustancias, que exhiben una edificación progresiva de su estructura a medida que aumenta la relación molar colesterol/antibiótico, la interacción de la etruscomicina con el colesterol, permite que sus moléculas se encuentren a la distancia adecuada para que la acción de fuerzas de corto enlace originen una asociación, que, tanto desde el punto de vista estereoquímico como estequiométrico está perfectamente definida. En este fenómeno podría tener una influencia importante el tamaño y forma de cada uno de los antibióticos en relación con el colesterol.

Las diferencias existentes entre un sistema y otro de antibiótico, en su interacción con el colesterol, podrían ser debidas, precisamente, a la posibilidad de que se establezcan las mencionadas relaciones intermoleculares, una vez alcanzadas las distancias implícitas en un primer proceso de agregación, lo que se relaciona con la magnitud de las mismas y, lo que es más importante, con su efecto cooperativo sobre la estabilidad del sistema.

Para finalizar, apuntemos la posibilidad de que estas diferencias que se observan entre el modo de interaccionar los dos antibióticos con el colesterol, en un medio acuoso, tenga también su reflejo en la forma de actuación de aquéllos sobre la membrana plasmática, por lo que, en nuestra opinión, es preciso diseñar nuevas experiencias que, comprendiendo sistemas modelo o membranas biológicas, ayuden a clarificar estos extremos.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) NORMAN, A. W., DEMEL R. A., DE KRUIJFF, B., GENRTS VAN KESSEL, W. S. M. y VAN DEENEN, L. L. M.: «Biochemica Biophysica Acta», 290, 1, 1972.
- (2) NORMAN, A. W., DEMEL, R. A., DE KRUIJFF, B., y VAN DEENEN, L. L. M.: «J. Biol. Chem.», 247, 6, 1918-1929, 1972.
- (3) KRUIJFF, B. DE, GERRITSEN, W. J., OERLEMANS, A., VAN DIJCK, P. W. M., DEMEL, R. A. y VAN DEENEN, L. L. M.: «Biochim. Biophys. Acta», 339, 44-56, 1974.
- (4) SCHROEDER, F., HOLLAND, J. F., y BIEBER, L. L.: «Biochemistry», 11, 16, 3.105, 1972.
- (5) CHANTRES, J. R., OTERO AENLLE, E., y PORTILLO, M.ª P.: ESTOS ANALES: XLIII, I, 81, 1977.
- (6) KRUIJFF, B. DE, y DEMEL, R. A.: «Biochim. Biophys. Acta», 339, 57, 1974.
- (7) KRUIJFF, B. DE, GERRITSEN, W. J., OERLEMANS, A., DEMEL, R. A. y VAN DEENEN, L. L. M.: «Biochim. Biophys. Acta», 339, 30-43, 1974.
- (8) CHANTRES, J. R., OTERO AENLLE, A., y PORTILLO, M.ª P.: ESTOS ANALES: XLIII, 2, 171, 1977.