

BUENOS AIRES-CÓRDOBA-TUCUMÁN VIAJE POR LA RUTA DE LA CIENCIA Y SUS HISTORIAS

Palabras clave: Vitamina E; enzimas cooperativas unidas a membranas; fluidez de membranas; insulina; hormonas tiroideas; microcina J25.
Key words: Vitamin E; cooperative membranes-bound enzymes; membrane fluidity; insulin; thyroid hormones; microcin J25.

■ **Ricardo Norberto Farias**

rfarias@conicet.gov.ar

“En la vida hay tiempo para aprender, para sembrar, para cosechar, hoy, ha llegado el tiempo para agradecer. Y eso, es bueno.”

Con estas palabras comencé mi conferencia del 9 de noviembre de 2006 en ocasión de recibir el título de Profesor Emérito de la Universidad Nacional de Tucumán. Y ahora continúo;

“Agradecer a la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia en las personas de su Decana y Consejo Directivo por haberme propuesto como profesor Emérito de la Universidad Nacional de Tucumán y al Señor Rector y al Consejo Superior por aprobar la propuesta.

Agradecer a todas las personas que han contribuido para que yo tenga el honor, hoy, de recibir el diploma de Profesor Emérito de la UNT. A continuación, haré referencia cronológicamente a algunas de ellas que intervinieron en momentos claves del juego de mi vida, ayudan-

do, o simplemente cambiando el rumbo que me favoreció para acercar y ganar en momentos singulares del partido, que, como sucede en el tenis, cuando la pelota pega en la red se eleva y nadie sabe en que lado de la cancha va a caer. Es decir, relataré sólo los puntos que he ganado, de los puntos que he perdido no vale la pena recordarlos en este acto.

Por ello respetando la cronología.

Agradezco primero a mis padres Ricardo y Francisca que hayan comprendido en su tiempo que el estudio secundario, que ellos no habían tenido, era una nueva manera de progresar y de realizarse. El tiempo que corría en la década del cuarenta-cincuenta, era de fluidez social que permitió a las familias de menores recursos enviar a sus hijos a realizar el ciclo secundario. En esta etapa, debo agradecer también a mi maestro de séptimo grado Señor Díaz que, ante la pregunta de mi mamá sobre la capacidad de su hijo

Ricardo para seguir estudiando le respondió, estando yo presente, algo así como, “Sí, vale la pena hacer el sacrificio, es un chico capaz” A mí me quedó siempre la sensación, no sé si es cierta, que el maestro Díaz tuvo en cuenta en la conversación con mi madre, mi respuesta a su pregunta de meses atrás sobre “Cuántas cartas se reparten por día en la Capital Federal”. El Maestro Díaz tenía la costumbre de entrar a clase y hacer preguntas o realizar cálculos que exigían la atención de todos los alumnos. Yo era muy tímido y callado pero el día que preguntó: ¿Cuántas cartas se reparten por día en la Capital Federal? hice unos cálculos y como nadie respondía me anime a intervenir. Parece que el cálculo que realicé sobre la cantidad de cartas fue correcto. Nunca tuve la oportunidad de verificarlo. Pero eso sí recuerdo, el maestro Díaz fue muy cuidadoso en preguntarme todos los datos y detalles en los cuales me había basado para arribar a esa cifra.

Agradecer a mi padre que ante mi renuncia a mi empleo en el ferrocarril me respondiera "Bueno, casa y comida no te van a faltar" aliviándome así la angustia que me producía quedarme sin trabajo que, por ese entonces, era el único sostén de mis estudios universitarios. Ocurrió en la huelga ferroviaria de 1960. El motivo de la renuncia fue una disposición del gobierno de Frondizi que ordenaba a los Técnicos del ferrocarril a poner en movimiento las máquinas y romper la huelga. (Yo me desempeñaba como Técnico Químico en el Laboratorio del Ferrocarril San Martín, en Retiro)

Agradecer a Roberto Celis. Cuando conocí a Celis en los años 60, él ya era médico y sólo venía a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEyN) para cursar algunas materias específicas (Química, Física) que le servían para su Doctorado. En 1963, la casualidad quiso que me cruzara con Celis en la calle Perú a una cuadra de la Facultad. Por ese entonces, yo ya me había recibido de Licenciado en Química y buscaba trabajo. Después de recordar tiempos de estudiante, le pregunto qué hacía por ahí, Celis me comenta que ahora trabajaba con el Dr. Raúl Esteban Trucco y que el Dr. Trucco era un científico del grupo del Dr. Le-loir que había recientemente regresado de EE.UU. y estaba buscando recién egresados para integrar su grupo. A la semana yo tenía mi cargo de ayudante de primera con dedicación exclusiva, pagado por un subsidio del Ministerio de Salud Pública de Estados Unidos que el Dr. Trucco había conseguido antes de regresar, comencé así mi tesis doctoral bajo su dirección.

Agradecer a mi maestro científico el Dr. Trucco es un sentimiento muy fuerte. De él, lo que más recuerdo es una de sus consignas, el Dr. Trucco nunca lo expresó con la

palabra, pero sí con el ejemplo. La consigna fue "el científico argentino tenía la obligación de formar a otros científicos en el país, ya que tenía que recordar que él era un científico gracias a que otro argentino había elegido quedarse en la Argentina para hacer ciencia y formar nuevos científicos". En 1963, cuando conocí al Dr. Trucco, eran épocas de pioneros. Este ciclo sagrado del aprendizaje que luego es maestro no se rompió al menos en Tucumán, en este acto dos de sus discípulos están presentes: el Dr. Roberto Morero Director del INSIBIO y el Dr. Faustino Siñeriz Director del Proimi. En 1966 sucedió la intervención de las Universidades por el gobierno de Onganía y con ella vino la renuncia del Dr. Trucco y de su grupo. Algunos tomaron la decisión de irse del país como Celis, mientras que Lia Goldenberg, Faustino Siñeriz, Miguel de Billerbeck y yo acompañamos al Dr. Trucco a Córdoba.

Desde 1971 estoy en Tucumán. De ese entonces debo agradecer a la Dra. de Ruiz Holgado que se contactó conmigo, por encargo del Consejo Directivo de la Facultad que presidía el decano Dr. Marangoni, para ofrecerme venir a Tucumán junto con Faustino Siñeriz, Roberto Morero, Bernabé Bloj y Patricio Fay.

Agradecer a la Facultad de Bioquímica Química y Farmacia que me confió la dirección del Instituto de Química Biológica permitiendo consolidarme como científico y constituir un Instituto reconocido en Argentina y en el mundo. Hoy el Instituto está poblado de buena gente con ganas de trabajar en Ciencia en Tucumán.

Agradecer a los Drs. Francisco Barbieri, Alfredo Coviello, y Máximo Valentinuzzi por invitarme a participar en 1980 en la creación del Instituto Superior de Investigaciones Bio-

lógicas (INSIBIO). Instituto actualmente dependiente del CONICET y la UNT.

Agradecer a los investigadores del CONICET del Área de Ciencias de la Salud (no sé quienes fueron) que en el 2001 me votaron para representarlos en el Directorio del CONICET. Hace cinco años que sucedió la primera elección. Hace dos años volví a ser favorecido. Debo confesar que a esta nueva actividad la considero un regalo o mejor dicho una yapa en mi vida, puesto que después de los años de crisis en los cuales había fuerzas muy poderosas que querían disolverlo, con la ayuda del actual gobierno nacional se han producido grandes y favorables cambios para la ciencia Argentina que han posibilitado incrementar el nombramiento de becarios de 500 a 1500 anuales, la entrada de 500 nuevos investigadores cada año a la carrera del Investigador Científico y lograr en los cuatro pasados años el regreso de 236 jóvenes científicos al país, revirtiendo una nefasta característica de nuestra ciencia. En el transcurso de este mes el Directorio del CONICET aprobó la creación del Centro Científico Tecnológico CONICET-Tucumán que estará integrado en un principio por los institutos del CONICET que desarrollan su actividad en la provincia CERELA, PROIMI, INSUGEO e INSIBIO. Se espera que esta nueva organización descentralizada del CONICET, acompañada con la construcción de nuevos edificios e inversiones, permita potenciar la actividad de investigación y transferencia en Tucumán. Y eso es bueno.

Por último aunque no en la forma correlativa que me había propuesto al comienzo de estos agradecimientos.

Agradecer a mi compañera de Facultad Marta Couso que en las

vacaciones del verano de 1962 en Piriápolis, Uruguay, me presentara a Beatriz Torbidoni, mi esposa, que desde ese entonces me acompaña en las buenas y en las malas y con quien he constituido una hermosa familia de cinco adorables hijos y por ahora diez nietos. Y eso es bueno.

Muchas gracias a todos los presentes por acompañarme en este momento"

Así concluyó mi discurso. Deseo acotar que las cifras referidas al CONICET han seguido creciendo como las del número de nietos, que ya son doce.

■ 1. DEFICIENCIA EN VITAMINA E: ENZIMAS COOPERATIVAS DE MEMBRANAS

Como comenté en el discurso, mi inserción en la actividad científica no fue vocacional o buscada sino algo casual. El subsidio del Dr. Raúl Trucco estaba destinado a investigar las alteraciones metabólicas que se producían en la deficiencia de vitamina E. Se empleaba como animal de investigación al conejo, quien bajo las condiciones de deficiencia sufre distrofia muscular. Al mes el animal alimentado con una dieta sin Vitamina E no se puede incorporar después de acostarlo horizontalmente (decúbito dorsal). A los pocos días de presentar este síntoma el animal muere. Este hecho experimental me obligaba a concurrir al vivario de Perú 222 y más luego al de Núñez todos los días incluso fines de semana para controlar los conejos y extraerles sangre cuando presentaban los primeros síntomas de deficiencia. Con el empleo de los glóbulos rojos se estudiaba las alteraciones que se producían en el metabolismo de fosfato, luego de separar y aislar sus derivados en cromatografía de papel. Dejo de lado la comparación

con las actuales facilidades tecnológicas y comentar sólo lo engorroso de esta técnica y el tiempo que demandaba obtener un resultado aceptable. Es curioso pero en este momento, antes de seguir adelante, quiero remarcar que en el transcurso de estos experimentos se efectuó la primera observación sobre la influencia del componente lipídico de la dieta sobre la regulación de las enzimas de membranas que determinaron, como veremos en el desarrollo de esta revisión, el tema de investigación en los siguientes años y la realización de varias tesis doctorales. En 1993 aparece en el *Current Contents* un *Citation Classic* (Farias y Trucco, 1993) referido a una revisión de nuestros trabajos en el *Biochimica et Biophysica Acta* (Farias y col., 1975) sobre la regulación de enzimas unidas a membranas por el cambio de la composición lipídica de las mismas. Hasta ese momento solamente dos grupos de investigadores argentinos merecieron este reconocimiento.

¿Cómo comenzó esta historia? Resultados obtenidos con los conejos deficientes en vitamina E indicaban una alteración en el metabolismo del fosfato que estaba representado, entre muchos otros, por una caída en la concentración

del adenosina trifosfato (ATP) en los glóbulos rojos. Tomando en cuenta esta observación se estudió la enzima integral de membrana la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPasa}$ que utiliza el ATP para funciones de transporte del sodio y potasio de las células. El estudio del aumento de su actividad en la deficiencia constituyó mi primera participación en una publicación científica (Farias y col., 1966). Tomando en cuenta varias ventajas que ofrecía el cambio del animal de experimentación se sustituyó al conejo por ratas. Se comenzaron a estudiar aspectos cinéticos de la inhibición por fluoruro de las ATPasas de membranas de sus glóbulos rojos en ratas alimentadas con dieta comercial. Cuando se estuvo seguro que los resultados eran reproducibles se pasó a emplear ratas alimentadas con dietas suplementadas con o sin Vitamina E. Primera sorpresa fue que la cinética de inhibición por fluoruro no era la misma, sobre todo la forma de curvas. Los resultados indicaban que la cooperatividad de las enzimas $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPasa}$ y $(\text{Mg}^{2+})\text{-ATPasa}$ evaluado por coeficiente de Hill era menor en las ratas alimentadas con dieta comercial comparada con la dieta preparada en el laboratorio independiente de si contenían o no Vitamina E (Fig.1). Las dietas preparadas en el laboratorio tenían defi-

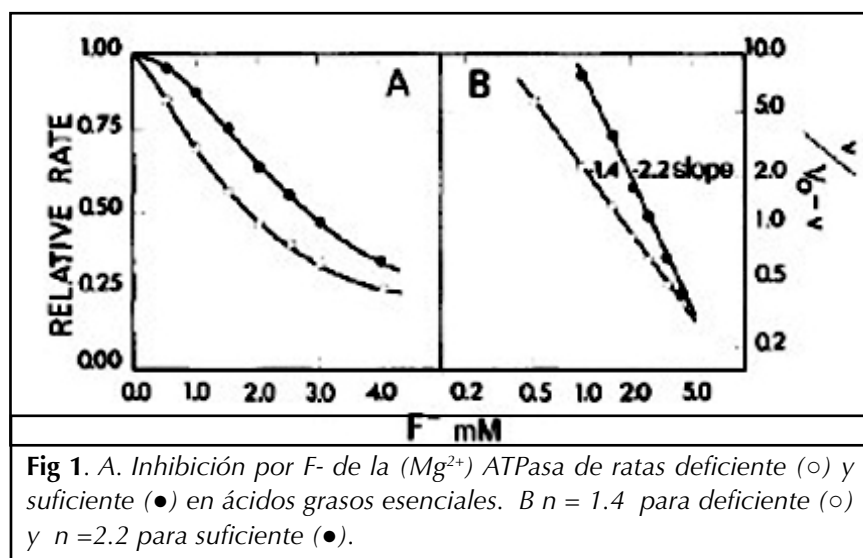


Fig 1. A. Inhibición por F^- de la $(\text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ de ratas deficiente ($\circ$) y suficiente ($\bullet$) en ácidos grasos esenciales. B $n = 1.4$ para deficiente ($\circ$) y $n = 2.2$ para suficiente ($\bullet$).

nido sus porcentajes de azúcares, grasa o aceite, vitaminas, minerales etc. Lo primero que se realizó fue suplementar la dieta comercial con el agregado de cada uno de los componentes de la dieta del laboratorio. El único componente que aumentaba el valor del coeficiente de Hill era el suplemento lipídico a la dieta comercial. Daba lo mismo suplementar con aceite de maíz o con grasa de cerdo. Mi tesis doctoral (Farias, 1967) fue desarrollada empleando conejos con deficiencia de Vitamina E. Cuando la tesis se escribió tuvo el agregado de estos experimentos realizados con diferentes dietas en ratas. La sugerencia de este agregado fue de mi director de tesis, el Dr. Trucco. "Agréguelo Farias, la observación es preliminar, al jurado le va a parecer descolgado pero, a pesar de todo, debe ser reportada en su tesis porque creo que es una observación importante". El experimento definitivo que confirmaba estos resultados lo terminé de noche, no había nadie en el laboratorio de Núñez hacia donde había comenzado el traslado de la Facultad desde Perú 222, estaba ansioso, así que llamé por teléfono a la casa del Dr. Trucco y me atendió su esposa, "Hola Tita, quiero hablar con el Dr. Trucco", "ya lo llamo", responde y me dice "ya sé para que lo llama" y agrega "¿dio bien el experimento?"

■ 2. DEFICIENCIA EN ACIDOS GRASOS ESENCIALES

Suponiendo que el comportamiento de las ratas alimentadas con la dieta comercial tenía relación con los ácidos grasos esenciales (AGE) se utilizó la dieta de laboratorio sin el agregado del componente graso. Las ratas deficientes en AGE presentaban los síntomas de retardo del crecimiento, lesiones seboreicas descamadas de la piel, decaimiento, alopecia o falta de pelo y finalmente su muerte como lo describieron

George y Mildred Burr en 1929. Las ratas deficientes en AGE exhibían idénticos coeficientes de Hill que las alimentadas con la dieta comercial. Así fue que las primeras publicaciones sobre el tema se realizaron con ratas alimentadas con dietas deficientes o suplementadas con AGE estudiando la activación por Na^+ y K^+ (Farias y col, 1968) y la inhibición por F^- (Farias y col. 1970) de las enzimas (Mg^{2+})-ATPasa y (Na^+ , K^+)-ATPasa.

■ 3. NOCHE DE LOS BASTONES LARGOS

Durante el transcurso de esta historia científica tiene lugar otra historia paralela de carácter político que la afecta. Con la "Revolución Argentina" mediante, se produce en 1966 la "Noche de Bastones Largos". Este lamentable hecho, provoca la renuncia de la mayoría de las personas que trabajaban con el Dr. Trucco en el Centro de Microbiología de la Facultad. Aquí me detengo a recordar a dos de los integrantes notables de ese grupo: al Dr. Roberto Celis que hasta hace pocos años fue Director del Departamento de Microbiología de la Escuela de Medicina de la Universidad de Nueva York y al Dr. Noe Zwaig que en el momento de las renunciaciones se encontraba realizando su postdoctorado en la Universidad de Harvard. Cuando el ambiente de Exactas parecía cambiar el Dr. Zwaig regresó a la Facultad pero en 1974 la administración del Rector Ottalagano lo dejó cesante. Desde ese entonces abandonó la actividad científica y estableció su librería en Caballito. Tanto Celis como Zwaig habían trabajado con el Dr. César Milstein en el Instituto Malbrán de donde tuvieron que irse. Los tiempos no eran fáciles en Argentina para hacer ciencia.

■ 4. ENZIMAS COOPERATIVAS DE MEMBRANAS EN LAS UNIVERSIDADES NACIONALES DE CÓRDOBA Y TUCUMÁN

A principio de 1968, como lo relato más arriba, el grupo del Dr. Trucco integrado por Lía Goldenberg, Faustino Siñeriz, Miguel de Billerbeck y yo nos trasladamos al Instituto de Ciencias Químicas (luego Facultad de Química) de la Universidad de Córdoba. El Director del Instituto era el Dr. Ranwell Caputto. Durante el año 1967 la Fundación Bariloche se hizo cargo de mantener financieramente al grupo en Buenos Aires. La experiencia en el Instituto de Ciencias Químicas fue muy enriquecedora, eran épocas fundacionales en la organización de la actividad de investigación científica en la Universidad de Córdoba. La organización de la docencia de grado y posgrado era pionera y moderna. Mucho de lo aprendido lo trasladé como docente a la UNT. En Córdoba se incorporaron al grupo tres becarios del CONICET, Patricio Fay, Bernabé Bloj y Roberto D. Morero. Las investigaciones en el tema de regulación de enzimas cooperativas de membranas se continuaron desarrollando en Córdoba y a partir de 1971 en Tucumán. Lía Goldemberg terminó su tesis describiendo el comportamiento de las ATPasas en otros tejidos (riñón, hígado, cerebro) (Goldemberg y col., 1973) y la enzima p-nitrofenilfosfatasa de glóbulos rojos (Goldemberg y col., 1972) en ratas con deficiencia en AGE. Roberto Morero estudió la inhibición por fluoruro de la enzima acetilcolinesterasa de glóbulos de ratas alimentadas con o sin suplemento de aceite de maíz a la dieta. Los valores de n eran de 1.6 en las ratas suplementadas y de 1.0 en deficiencia de AGE. El tratamiento con detergente de las membranas biológicas permite obtener sus componentes en el estado soluble y su reconstitución cuando el detergente se separa por diálisis.

La enzima proveniente de las ratas deficientes aumentaba el valor de n de 1.0 a 1.6 en estado soluble y bajaba a 1.0 en la membrana reconstituida (Morero y col 1972). Es decir la membrana se comportaba como un "Macroefector". La acetilcolinesterasa pero no las ATPasas mantenían su actividad durante este proceso. Bernabé Bloj determinó los valores de n de las ATPasas y de la acetilcolinesterasa en ratas alimentadas con diferentes suplementos grasos en la dieta (Bloj y col., 1973). Cuando estos resultados se graficaron en función de la fluidez de la membrana se pudo observar que los valores de n de la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ disminuían de 3,6 a 2,0, mientras los de la acetilcolinesterasa aumentaban de 1,0 a 1,6 (Fig 2). Los cambios de

los valores de n de la $(\text{Mg}^{2+})\text{-ATPase}$ no correlacionaban con la fluidez de la membrana. Con el análisis de la composición de los ácidos grasos de las membranas de cada grupo experimental se calculó la fluidez de la membrana como el índice de doble ligaduras de los ácidos grasos dividido por la cantidad de ácidos grasos saturados. En otros experimentos se estableció que los valores de n de la activación por magnesio (Mg^{2+}) en presencia de concentraciones constantes de calcio (Ca^{2+}), la $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})\text{-ATPase}$ correlacionaban positivamente con la fluidez de membrana (Galo y col., 1975). Faustino Siñeriz estudió si estos fenómenos regulatorios se presentaban también en bacterias. Para ello empleó una *Escherichia coli*

auxotrofa en la síntesis de ácidos grasos insaturados (la bacteria no crece sin un suplemento de ácidos grasos insaturados en el medio de cultivo) y determinó la inhibición por sodio (Na^+) de la $(\text{Ca}^{2+})\text{-ATPase}$ de las membranas de la bacteria desarrollada con diferentes ácidos grasos insaturados. Los valores de n aumentaban de 1.2 a 3.0 con el aumento de fluidez (Siñeriz y col., 1975). La $(\text{Ca}^{2+})\text{-ATPase}$ es una enzima periférica de membrana de bacterias y mitocondrias que está ligada a la síntesis de ATP en el transporte de electrones. En resumidas cuentas, en este periodo, habíamos establecido una correlación general entre el comportamiento cooperativo de algunas enzimas unidas a membranas con la fluidez de las mismas. Esta regulación tenía la característica que no dependía, si los efectores eran un inhibidor o un activador o si la enzima era ligada a la membrana de forma integral o periférica y que no importaba que función cumpliera en la célula o del reino que provenían las enzimas (para tener más detalles Farias y col 1975). Después de llegar a esta conclusión tuvimos el *plus* de ser el único laboratorio en condiciones de evaluar la fluidez de la membrana utilizando nuestro sistema de enzimas cuando los métodos fisicoquímicos actuales (fluorescencia, Raman etc.) que se emplean con ese fin recién comenzaban a desarrollarse.

■ 5. EVALUACIÓN DE FLUIDEZ DE MEMBRANAS CON ENZIMAS COOPERATIVAS

En el tiempo que comenzaron estos estudios el método mas común para estudiar la influencia del medio ambiente que rodeaba a las enzimas de las membranas era el empleo del Arrhenius plots. El experimento se realizaba midiendo la actividad de la enzima a distintas temperaturas y luego se graficaba la actividad en

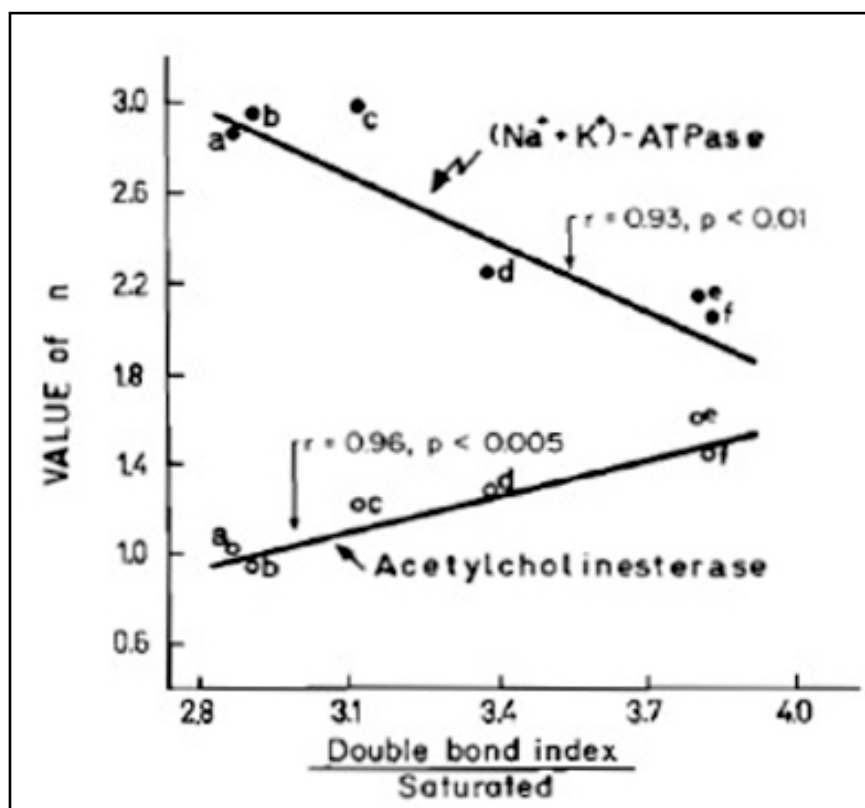


Fig 2. Relación entre los valores de n la relación índice de doble ligaduras/ácidos grasos saturados de los ácidos grasos de la membrana de eritrocitos de ratas alimentadas con dietas suplementadas a) grasa hidrogenada; b) grasa de cerdo; c) aceite de lino; d) aceite de oliva e) aceite de maíz y f) dieta comercial.

función de la inversa de la temperatura ($1/T$). De esa manera por lo general aparecía un quiebre en la correlación denominado temperatura de inflexión (T_i) que podía tener diferencias, si por ejemplo el animal había sido alimentado con dietas con diferentes suplementos lipídicos o cualquier otra condición experimental que resultara en un cambio de la influencia de membrana sobre la enzima. Según consideraciones termodinámicas simples, se necesitaría un cambio de más de 2,8 kcal/mol en la interacción entre la enzima y la membrana para dar un cambio notable en la posición de T_i en el correspondiente de *Arrhenius plot* mientras débiles cambios del orden de 0.7-0.8 kcal/mol, serían suficientes para dar un cambio significativo en los valores de n , coeficiente de Hill (Siñeriz y col., 1975).

5.1. Colesterol

Los primeros experimentos fueron para corroborar con nuestro sistema de enzimas, que el colesterol incorporado a las membranas disminuía su fluidez como había sido postulado con técnicas biofísicas por otros autores. El incremento del colesterol en las membranas se realizó de dos formas, A) *in Vivo*: alimentando ratas con dietas suplementadas con aceite de maíz sin (control) o con el agregado de colesterol y B) *in Vitro*: agregando el colesterol a las membranas de las ratas controles en el tubo de ensayo. El incremento del colesterol en las membranas disminuía los valores n en la acetilcolinesterasa y aumentaba en la (Na^+ , K^+)-ATPasa en las membranas con (Bloj y col., 1973) es decir que usando nuestro sistema (ver Fig 2) se confirmaba que el colesterol disminuía la fluidez.

5.2. Insulina

Similares experimentos fueron

llevados a cabo *in Vitro* con la hormona insulina por Eddy Massa en el sistema membranas de ratas (Massa y col., 1975) y por Hortensia Moreno en membranas de bacterias (Moreno y Farias 1976). En ambos casos el agregado de insulina a las membranas indicó que la hormona disminuye la fluidez de las membranas. Los resultados fueron confirmados *in Vivo* con ratas en condiciones de diabetes (Uñates y Farias 1979). La popular curva de glucosa, que se usa primariamente en la clínica para determinar si una persona sufre o no diabetes, se realizó en ratas normales alimentadas con dietas suplementadas con maíz. En este caso el cambio de fluidez de membrana indicado por los valores de n es inverso a la curva ascendente y descendente de la glucosa en sangre (Fig3).

La insulina y el glucagón, dos hormonas producidas por el páncreas y la epinefrina (adrenalina) segregada principalmente por la médula de las glándulas suprarrenales son los principales responsables

de controlar el metabolismo de la glucosa. Mientras que la insulina disminuye los niveles la glucosa en sangre, el glucagón y la epinefrina la incrementan. Este inter-juego fisiológico entre insulina epinefrina y glucagón tiene su correlato en la modificación de la fluidez de la membrana (Melian y col., 1978). La insulina disminuye mientras que la epinefrina aumenta la fluidez. El glucagón no modifica la fluidez pero si inhibe la acción de la insulina pero no la de la epinefrina. El cortisol que también aumenta la concentración de glucosa plasmática aumenta la fluidez de la membrana evaluada por enzimas cooperativas al igual que la epinefrina (Massa y col., 1975) pero sólo la epinefrina compite con el efecto del la insulina, no el cortisol (Melian y col., 1978).

Las membranas biológicas están constituidas, entre muchas otras por proteínas y fosfolípidos que se disponen espacialmente como una bicapa (dos mono capas de fosfolípidos con sus cargas hacia el exte-

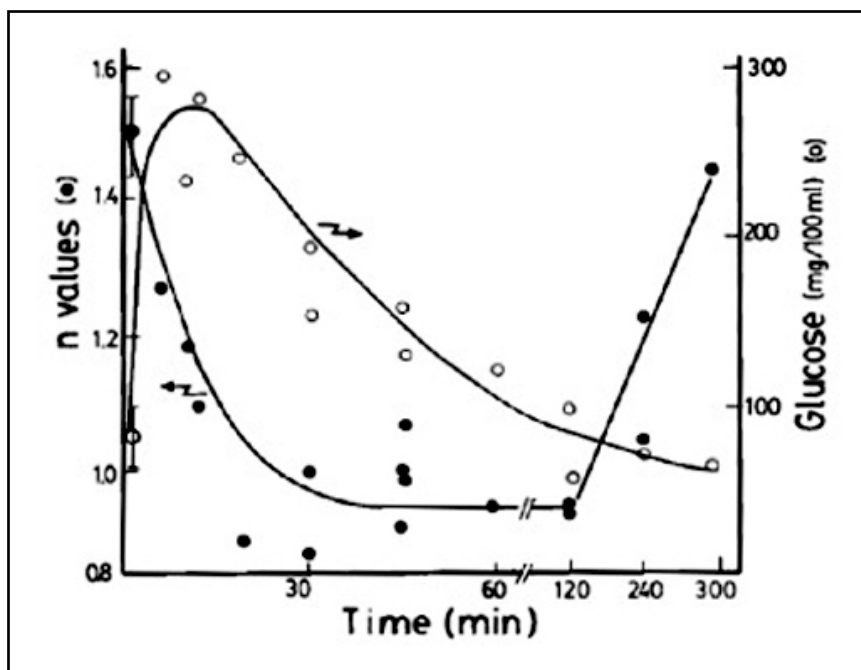


Fig 3. Valores de n de acetil colinesterasa (●) y concentración de glucosa en sangre (○) en función de tiempo después de la inyección de glucosa. El incremento de glucosa en correlaciona con el incremento de insulina.

rior de la membrana). Los liposomas constituidos sólo por fosfolípidos se disponen espacialmente en una bicapa similar en su forma a las de las membranas biológicas. Por lo tanto los liposomas son considerados como membranas modelos. Empleando pruebas fluorescentes se determinó que la insulina también disminuye la fluidez de liposomas (Farias y col 1986). Los cambios de la fluidez de la membrana biológica por la acción de la insulina fueron revisados (Farias 1987).

5.3 Hormona de crecimiento

La hormona de crecimiento humana (hGH) es un polipéptido de una sola cadena de 191 aminoácidos, sintetizada, almacenada y secretada por las células somatotropas de la adeno-hipófisis. En un trabajo en colaboración con el grupo del Dr. Alejandro Paladini, que por ese tiempo tenía el único equipo en Argentina para sintetizar péptidos, ensayamos la hormona y varios fragmentos sintéticos de ella con distinta longitud y de diferentes zonas de la molécula. La hormona afectó los coeficientes de Hill tanto para la in-

hibición por F^- de la acetilcolinesterasa de eritrocitos de rata como en la inhibición por Na^+ de la (Ca^{2+}) -ATPasa de *Escherichia coli* de tal manera que nos indicó que la hGH disminuía la fluidez de las membranas. Con los resultados de los fragmentos, concluimos que una zona de 31 aminoácidos correspondientes a las posiciones de la 88 a 120 de la hGH contenía el "sitio activo" para su acción sobre la fluidez de membrana proveniente de tan diferentes células. (Farias y col., 1978).

5.4 Hormonas Tiroideas

El primer reporte sobre el efecto no genómico de las hormonas tiroideas, tan de moda en la actualidad (Farias y col., 2006), se concretó en los trabajos realizados por Diego de Mendoza (primer becario Conicet de la UNT incorporado en 1974). La observación que hizo Diego fue que los valores de n de la acetilcolinesterasa de las ratas alimentadas con aceite de maíz decrecían de 1.6 a 1.0 cuando los animales eran colocados por una semana en la cámara fría a 4-8 °C. Después de mucho estudio bibliográfico nos dimos cuenta

que el eje tiroideo (hipotálamo-hipófisis-tiroides-tejido diana) estaba involucrado en esta observación. Los resultados indicaron que la triiodotironina (T3) decrece la fluidez de la membrana, la tiroxina (T4) bloquea la acción de la T3 y la tirotropina (TSH) desbloquea la acción de la T4 (Fig. 4).

Este inter-juego hormonal tan fascinante y absolutamente original nos dio resultados para escribir y enviar para su publicación varios trabajos incluido efectos en las membranas de bacterias (de Mendoza y col., 1977; de Mendoza y Farias 1978; de Mendoza y col 1978). Pero como dice Martín Fierro "*Era la casa del baile un rancho de mala muerte y se enllenó de tal suerte que andábamos a empujones: nunca faltan encuentros cuando un pobre se divierte*". El "encontrón" fue, que Diego tenía que concursar por la beca de perfeccionamiento y no tenía aun ningún trabajo publicado. En ese entonces los *papers* y sus respectivas aprobaciones, rechazos y correcciones iban y venían por correo.

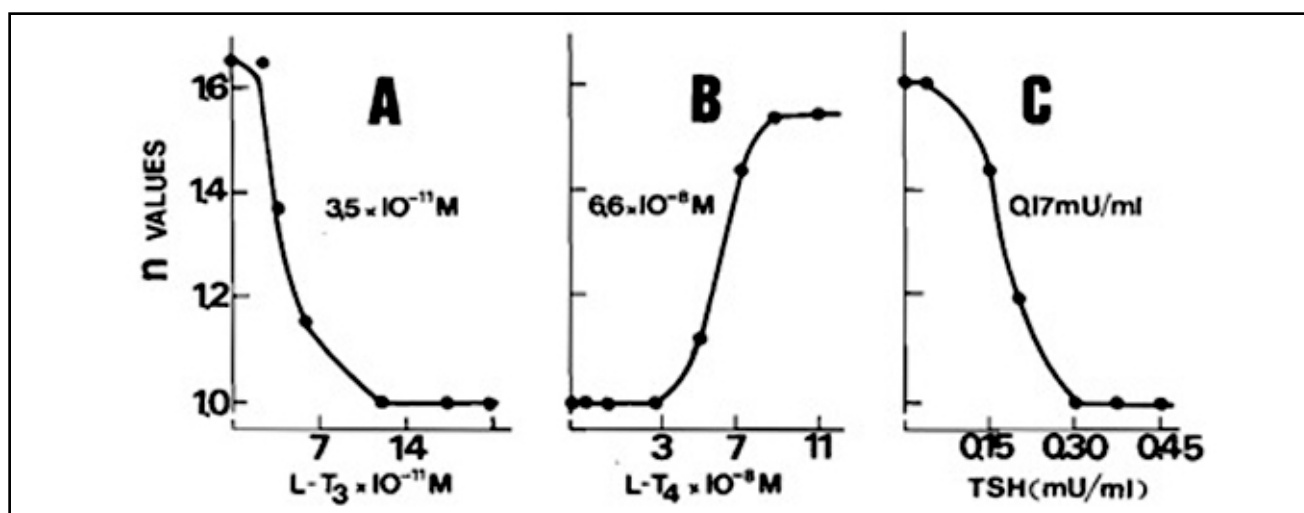


Fig 4. Valores de n para la inhibición por F^- de eritrocitos de ratas alimentados con dieta suplementada con aceite de maíz (A) en función de la T3, (B) en función de la T4 en la presencia de 10^{-9} M de T3 y (C) en función de la TSH en presencia de 10^{-9} M T3 y 10^{-7} M de T4. Dentro de las figuras esta indicado la $K_{0.5}$ de la T3, T4 y TSH respectivamente.

Los resultados del empleo de las enzimas cooperativas para evaluar los cambios en la fluidez de la membrana en presencia de hormonas y otros efectores como pesticidas (Domenech y col., 1977) fueron revisados en 1980 en *Advances in Lipid Research* (Farias 1980). En la UNT realizaron su tesis en esta área los hoy doctores: Hortensia Moreno, Elena Martínez de Melián y Diego de Mendoza.

■ 6. ESTUDIOS DE LAS HORMONAS TIROIDEAS CON OTROS MÉTODOS

Desde la década del setenta hasta la fecha se ha incorporado a nuestro laboratorio el estudio de varios aspectos de las hormonas tiroideas describiendo, desde ese entonces, los primeros receptores de T3 con muy alta afinidad en membranas (Botta y col., 1983; Botta y Farias 1985; Botta y col., 1989). En la figura 5 se muestra la correlación entre los cambios de los valores n y el desplazamiento de unión de la T3 I^{125}

radioactiva a la membrana en función de T3.

La inhibición o activación de la (Ca^{2+}, Mg^{2+}) -ATPasa por hormonas tiroideas a concentraciones fisiológicas (T3 10^{-10} M, T4 10^{-8} M) depende de la composición de ácidos grasos de la membrana determinada por el suplemento lipídico en la dieta (Galo y col., 1981).

Saliendo de experimentos con membranas, se identificó en los glóbulos rojos humanos que la proteína citosólica que presentaba alta afinidad con T3 era la enzima *piruvato kinasa* (Fanjul y Farias 1991, 1993, 1993). Más recientemente, empleando métodos físico-químicos, se corroboró que al igual que en las membranas biológicas la hormona T3 disminuye la fluidez de la bicapa lipídica en liposomas en estado fluido (liquido cristalino) o no fluido (gel) mientras que la T4 sólo lo hace en estado fluido (Farias y col., 1995; Chehin y col., 1995; Chehin y col., 1999). En el agregado de las hormo-

nas tiroideas debajo de la monocapa de fosfolípidos aumenta de presión en superficie y disminuye sustancialmente su potencial. La contribución negativa del dipolo de las hormonas se opone a la bien conocida contribución positiva de los fosfolípidos en la monocapa. Estos efectos se correlacionaron con contenido de yodo de las moléculas T4, T3 y T2. Estas observaciones sugirieron un nuevo y sorprendente efecto de las hormonas tiroideas sobre la organización bipolar de las membranas biológicas. (Isse y col., 2003).

Los estudios descriptos con las hormonas tiroideas en modelos de membrana inquietan cuando uno especula que estos efectos estén relacionados con aquellas observaciones realizadas por Diego de Mendoza. Estos últimos temas fueron desarrollados en las tesis Doctorales de Joaquín A. Botta, Andrea Fanjul, Rosana Chehin y Blanca Isse. Actualmente en asociación con la investigadora independiente Rosa M. S. Álvarez se progresa en los estudios sobre cambios de conformación que sufren las hormonas tiroideas en su interacción con fosfolípidos empleando espectroscopía Raman (Álvarez y col., 2005). También en colaboración con los grupos de la Dra. Sandra Incerpi de la Universidad de Roma tres de Italia (D'Arezzo y col., 2004) y de la Dra. Graciela Cremaschi de la Universidad Católica de Buenos Aires (Barreiro y col., 2011) se realizan estudios sobre efectos no-genómico de las hormonas tiroideas. En estos experimentos se emplean las hormonas ligadas a compuestos de gran volumen (T3-Sepharosa) para asegurarse que las hormonas no entren a las células.

Hasta aquí esta larga historia que comenzó en 1964 en los laboratorios de FCEyN en la calle Perú 222. Esta Historia se completa, remarcando que los graduados que lograron

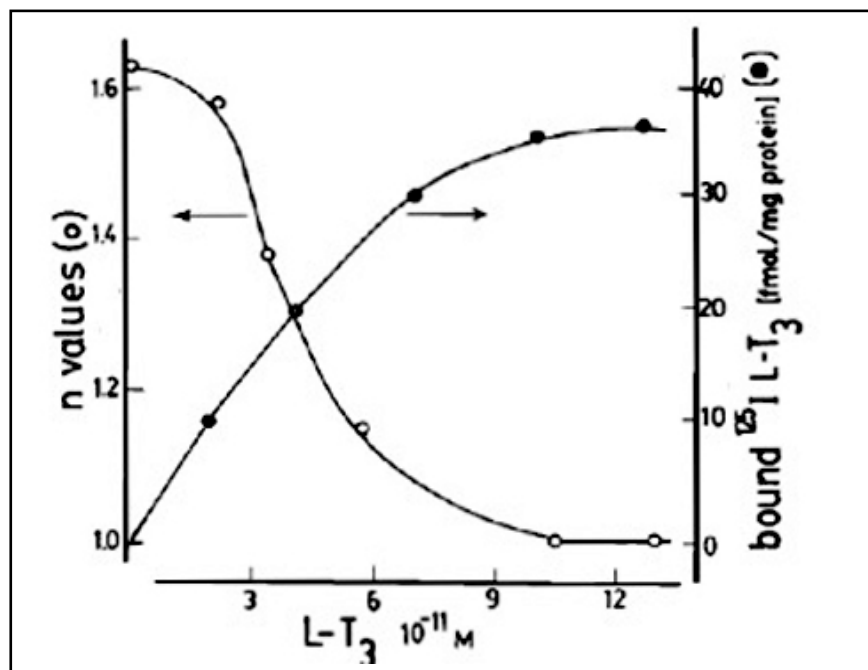


Fig 5. Valores de n (○) de la acetilcolinesterasa y I^{125} T3 unido a la membrana de eritrocitos de ratas (●) función de concentración de T3.

su tesis en estos temas, salvo alguna excepción, todos regresaron al país después de su postdoctorado en el extranjero para cumplir la consigna del Dr. Trucco del *ciclo sagrado del aprendiz que luego es maestro*.

■ 7. MICROCINA UN NUEVO ANTIBOTICO

Un nuevo antibiótico bautizado Microcina J25 (MccJ25) fue aislado de una cepa de *Escherichia coli* de materia fecal de bebe tucumano por Raúl Salomón (Salomón y Farías, 1992). Raúl regresó después de haber trabajado con el grupo que descubrió las microcinas en el Instituto Ramón y Cajal de Madrid. La

Microcina J25 resultó ser un péptido de 21 aminoácidos muy activo sobre cepas de *E. coli*, *Salmonella* y *Shigella* (Salomón y Farías, 1992) con habilidad de inhibir la RNA polimerasa (Delgado y col., 2001) y producir peróxidos en las bacterias sensibles (Bellomio y col., 2007). El péptido tiene una extraordinaria e inusual estructura, que consiste de un anillo de 8 aminoácidos (unión de tipo lactámica entre Gly1 y Glu8) y una cola carboxil terminal de 11 aminoácidos que se pliega sobre sí misma y pasa a través del anillo o lazo, donde queda estéricamente atrapada por las cadenas laterales voluminosas de los residuos Phe19 y Tyr20 (Rosengren y col., 2003). La

estructura ha sido descripta, muy gráficamente, como una “cola enlazada” (“lassoed tail”) (Fig. 6).

El sistema genético de la MccJ25 está formado por tres genes, *mcjA*, *mcjB* y *mcjC*, esenciales para la producción de MccJ25, y un gen de inmunidad: *mcjD* (Solbiati y col., 1996). El producto del gen de inmunidad es la proteica McjD que transporta MccJ25 hacia fuera de la célula productora en asociación con la proteína de membrana externa TolC (Delgado y col., 1999). El transportador indígena de *E. coli* Yojj también actúa en la exclusión del antibiótico (Delgado y col., 2005). La entrada de la microcina en las células blanco es mediada por el receptor de membrana externa FhuA y las proteínas de membrana interna TonB, ExbB, ExbD, y SbmA (Salomón y Farías, 1993; Salomón y Farías, 1995). La Figura 7 resume la entrada y salida del antibiótico de la células y sus blancos de acción.

En ratones infectados con *S. Newport* el péptido ejerce un potente y remarcable efecto antimicrobiano (López y col., 2007). Su compacta estructura le proporciona una elevada estabilidad a altas temperaturas y a pHs extremos entre 2 a 12. Estas propiedades y la ausencia de toxicidad sobre líneas celulares eucarióticas propicia su uso como agente terapéutico humano y como bio-preservante de alimentos (Pomares y col. 2009). En la descripción de las propiedades, mecanismo de acción y aplicación del antibiótico realizaron su tesis doctoral Raúl Salomón, José Solbiati, María José Chiuchiolo, Fabián López y Fernanda Pomares. Otras tesis se desarrollan actualmente bajo la dirección de otros investigadores del INSIBIO. En la Figura 8 se muestra la fotografía en el patio trasero de la casa de Tucumán del festejo del grupo de la Microcina cuando recibió en el

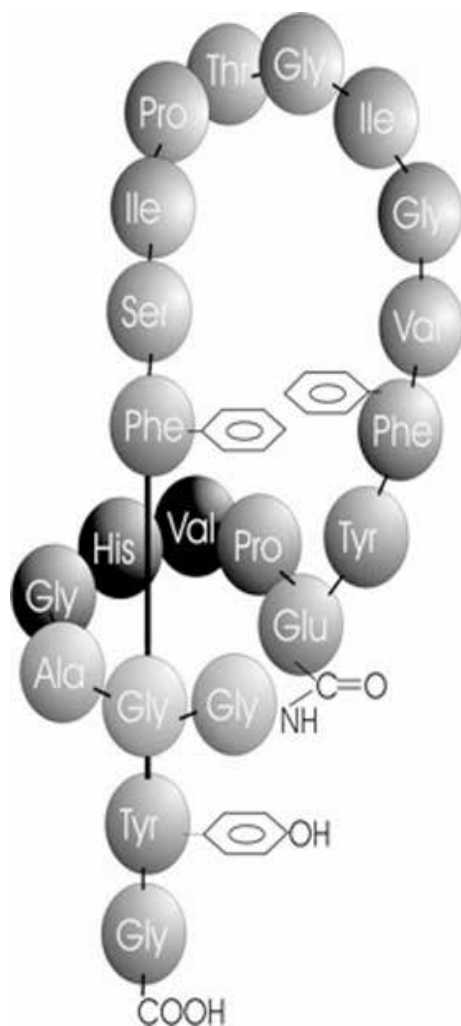


Fig 6. Microcina J25.

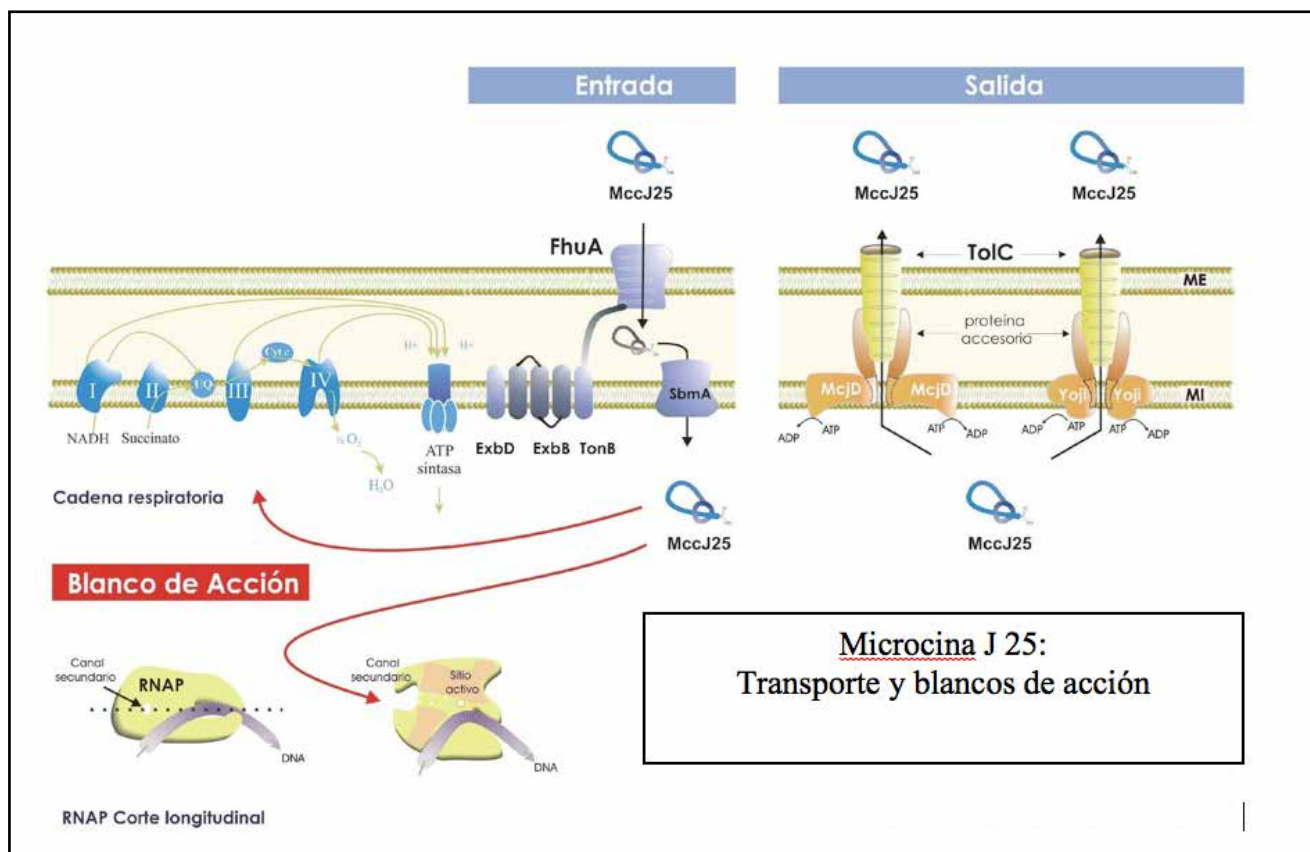


Fig 7. Entrada y salida de la MJ25 de la células.



Fig 8. Grupo de la Microcina fotografiado en el patio del fondo de la casa historica en accion del premio Bernardo A. Houssay de CIDIQUIFA 2006.

2006 el Premio Bernardo Houssay otorgado por CIDIQUIFA.

■ 8. BECAS ALBERT EINSTEIN

Las becas Albert Einstein estaban disponibles en la Facultad de Cien-

cias Exactas y Naturales para ayudar a aquellos alumnos que tenían dificultad para terminar la carrera. Me inscribí y rápidamente tuve una en-

trevista con los profesores de la Facultad que integraban la Fundación. Luego de escuchar mi caso, alumno del tercer año sin sostén económico por renuncia a su empleo en el ferrocarril, resolvieron otorgarme la beca con la única obligación de recibirme en dos años. Cumplí ya que pude dedicarme exclusivamente a la carrera y ahorrar tiempo, trabajando había cursado los tres primeros años en cuatro. Eran los mismos profesores que gestionaban los fondos de las empresas ATANOR, Compañía Química, etc. Fig. 9 muestra la foto de entrega de la beca en el aula magna de la Facultad.

■ 9. HORCO MOLLE

Cuando llegué a Tucumán, en 1971, la UNT disponía de un complejo residencial de 36 viviendas destinadas a alojar a profesores que llegaban de diferentes lugares del país y del extranjero. Horco Molle (horco, del quichua cerro, montaña) está situado en la ladera del cerro San Javier a 12-14 Km de Tucumán. Con mi familia habitamos la casa 14 por ocho años. Actualmente se

sigue destinando al mismo fin. En ese lugar tan especial se vivía en comunidad en medio de la selva tucumana, compartiendo alegrías y sinsabores... ¡y qué época nos tocó! Los fines de año eran especiales por los exámenes, casi nadie viajaba antes de enero a visitar a su familia o salir de vacaciones, así que se realizaban reuniones a la canasta para la fiesta de Navidad y Fin de Año. En un determinado momento, los profesores ganábamos 200 dólares estadounidenses, y llegamos en 1976 a un mínimo de 80. Se compartían los autos que llevaban y traían cuatro a cinco profesores a sus facultades, incluyendo los chicos. Salíamos antes de las 7 y volvíamos a las 8 ó 9 de la noche y a veces más tarde. Cada día se cambiaba de coche y de chofer. En la heladera de la casa 12 se mantenía suero antiofídico porque ocasionalmente aparecía alguna yarará (nunca tuvimos problemas de ese tipo, por suerte). Los asados comunitarios... uno ponía el carbón, otro traía un par de chorizos, aquel contribuía con un trozo de carne. En un periodo dado comenzaron a aparecer desconocidos que nada tenían

de universitarios. René G. Favaloro, que regresó al país en ese periodo le comentaba en charla informal a uno de nosotros con quien trabó relación de investigación y de amistad: "¡Qué período triste elegimos para retornar!" Pero todo ya es historia, por fortuna... un chico de "Horco Molle" que leyó esta historia, comentó;

"¡Hermoso! Yo le pondría mucho más. Como las compras colectivas en el mercado de abasto, los autos que no arrancaban, las casa con todas las puertas abiertas, y los chicos íbamos y veníamos de casa en casa. Nos criamos perdidos en el cerro colgados de los árboles, chupando caña de azúcar, remontando barriletes, haciendo fogatas nocturnas, andando a caballo y jugando al "futbol" o a las bolitas. Ninguno de nosotros siguió un camino convencional... Somos los chicos de Horco Molle. Los que nos criamos protegidos por la magia de la yunga en medio del horror de los años 70."

■ BIBLIOGRAFIA

Alvarez R.M.S., Cutin E.H., Farias R.N. (2005) *Conformational changes of 3, 5, 3'-triiodo L-thyronine induced by interactions with phospholipid, Physiological speculations*. J. Membrane Biol. **205**, 61-69.

Angel R.C., Botta J.A., Farias R.N. (1989) *High affinity L-triiodothyronine binding to right side out and inside-out vesicles from rat and human erythrocyte membrane*. J. Biol. Chem. **264**, 19143-19146.

Barreiro Arcos M., Sterle H., Paulazo M., Vlli E., Klecha A., Isse B., Pellizas C., Farías R.N., Cremaschi G. (2011) *Cooperative non-genomic and genomic actions*



Fig 9. Aula magna de la Facultad entrega de beca.

- on thyroid hormone mediated-modulation of t-cell proliferation involve up-regulation of thyroid hormone receptor and inducible nitric oxide synthase expression. *J Cell Physiol* **226** (12), 3208-3218.
- Bloj B., Morero R.D., Farias R.N. (1973) Membrane fluidity, cholesterol and allosteric transitions from membrane-bound (Mg^{++}) ATPase, (Na^{+},K^{+}) ATPase and acetylcholinesterase from rat erythrocytes. *FEBS Letters* **38**, 101-105.
- Bloj B., Morero, R.D., Farías R.N., Trucco R.E. (1973) Membrane lipid fatty acids and regulation of membrane-bound enzymes. Allosteric behaviour of erythrocyte (Mg^{++}) ATPase (Na^{+},K^{+}) ATPase and acetylcholinesterase from rats fed different fat-supplemented diets. *Biochim. Biophys. Acta.* **311**, 67-69.
- Botta J.A., de Mendoza D., Morero R.D., Farias R.N. (1983) High affinity L-triiodothyronine binding sites on washed rat erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.* **258**, 6690-6692.
- Botta J.A., Farias R.N. (1985) Solubilization of L-triiodothyronine binding site from human erythrocyte membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **133**, 442-448.
- D'Arezzo S., Incerpi S., Davis F.B., Acconcia F., Marino M., Farias R.N., Davis P.J. (2004) Rapid nongenomic effects of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine on the intracellular pH of L-6 myoblasts are mediated by intracellular calcium mobilization and kinase pathways. *Endocrinology* **145**, 5694-703.
- de Mendoza D., Farias, R.N. (1978) Effect of cold exposure on rat erythrocyte membrane-bound acetylcholinesterase. Role of thyrotropin in the thyroid hormones interplay. *J. Biol. Chem.* **253**, 6249-6254.
- de Mendoza D., Moreno H., Farias R.N. (1978) Membrane cooperative enzymes: High molecular specificity for blocking action of thyroxine on triiodothyronine effect in rat erythrocyte and *Escherichia coli* systems. *J. Biol. Chem.* **253**, 6255-6259.
- de Mendoza D., Moreno H., Massa E.M., Morero R.D., Farias, R.N. (1977) Thyroid hormone actions and membrane-fluidity: blocking action of thyroxine on triiodothyronine effect. *FEBS Lett.* **84**, 199-203.
- Fanjul A., Farias R.N. (1991) Novel cold sensitive cytosolic 3,5,3'-triiodo L-thyronine binding proteins in human red cell. Isolation and characterization. *J. Biol. Chem.* **266**, 16415-16419.
- Fanjul A., Farias R.N. (1993) Cold sensitive cytosolic 3,5,3' triiodothyronine binding protein and pyruvate kinase from human blood red cell share similar regulatory of hormones binding by glycolytic intermediates. *J. Biol. Chem.* **268**, 175-17.
- Fanjul A., Farias R.N. (1993) Molecular interconversion of cold sensitive cytosolic 3,5,3' triiodothyronine binding protein from human erythrocytes. Effect of cold, heat and pH treatments. *Biochemical Journal.* **290**, 579-582.
- Farias R.N. (1967) Metabolismo de fosfato en glóbulos rojos de conejo en deficiencia de Vitamina E (alfa tocoferol). Tesis Doctoral UBA.
- Farias R.N. (1980). Membrane cooperative enzymes as a tool for the investigation of membrane structure and related phenomena. *Adv. Lipid Res.* **17**, 251-282.
- Farias R.N. (1987) *Insulin membrane interactions and membrane fluidity changes*. *Biochim. Biophys. Acta.* (Reviews on Biomembranes). **906**, 459-468.
- Farias R.N., Bloj B., Morero R.D., Siñeriz F., Trucco R.E. (1975). Regulation of allosteric membrane-bound enzymes through changes in membrane lipid composition. *Biochim. Biophys. Acta.* (Reviews on Biomembranes). **415**, 231-251 Citation Classic
- Farias R.N., Celis T.F.R., Goldemberg, A.L., Trucco, R.E. (1966) Erythrocyte adenosinetriphosphatase in tocopherol-deficient rabbits. *Arch. Biochem. Biophys.* **116**, 34-38.
- Farias R.N., Fiore A. M., Pedersen J. Z., Incerpi S. (2006) Nongenomic actions of thyroid hormones: a focus on membrane transport systems. *Current Medicinal Chemistry. Immunology, Endocrine and Metabolic Agents* **6**, 241-254.
- Farias R.N., Goldemberg A.L., Trucco R.E. (1968) Effect of fat deprivation on the interactions of sodium and potassium with the (Na^{+}, K^{+}) activated ATPase from rat erythrocytes. *Life Sciences* **7** 1177-1181.
- Farias R.N., Goldemberg A.L., Trucco R.E. (1970) The effect of fat deprivation on the allosteric inhibition by fluoride of the (Mg^{++})-ATPase and (Na^{+}, K^{+})-ATPase from rat erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **189**, 38-44.

- Farias R.N., Lopez Viñals A., Morero R.D. (1986) *Fusion of negatively charged phospholipid vesicles by insulin. Relationship with lipid fluidity*. J. Biol. Chem. **261**, 15508-15512.
- Farias R.N., Trucco R. E. (1993). *Membrane-bound enzyme regulation*. Current Contents **36-2** 8 (<http://garfield.library.upenn.edu/classics1993/A1993KC97100001.pdf>)
- Farias R.N., Uñates L.E., Moreno H., Peña C., Paladini A.C. (1978) *Human growth active site for membrane cooperative enzymes*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **85**, 85-91.
- Galo M.G., Bloj B., Farias R.N. (1975) *Kinetic changes of the erythrocyte (Mg²⁺, Ca²⁺) ATPase of rats fed different fat-supplemented diets*. J. Biol. Chem. **250**, 6204-6207.
- Galo M.G., Uñates L.E., Farias R.N. (1982) *Effect of membrane fatty acid composition on the action of thyroid hormones on (Ca²⁺, Mg²⁺) ATPase from rat erythrocyte*. J. Biol. Chem. **256**, 7113-7114.
- Goldemberg A.L., Farias R.N., Trucco R.E. (1972) *Allosteric changes of p-nitrophenylphosphatase from rat erythrocytes in fat deficiency*. J. Biol. Chem. **247**, 4299-4304.
- Goldemberg A.L., Farias R.N., Trucco R.E. (1973) *Allosteric transition and membrane-bound ATPase from rat tissues. The effect of fat deprivation on the allosteric inhibition by fluoride*. Biochem. Biophys. Acta. **291**, 489-493.
- Massa E.M., Morero R.D., Bloj B., Farias R.N. (1975) *Hormone action and membrane fluidity: Effect of insulin and cortisol on the Hill coefficients of rat erythrocytes membrane-bound acetylcholinesterase and (Na⁺, K⁺) ATPase*. Biochim. Biophys. Res. Commun. **66**, 115-112.
- Moreno H., Farias R.N. (1976) *Insulin decreases bacterial membrane fluidity. Is it a general event on its action?* Biochem. Biophys. Res. Commun. **72**, 74-80.
- Morero R.D., Bloj B., Farias R.N., Trucco R.E. (1972) *The allosteric transitions from membrane-bound enzymes. Behavior of erythrocyte acetylcholinesterase from fat-deficient rats*. Biochem. Biophys. Acta **282**, 157-165.
- Rosengren K.J., Clark R.J., Daly N.L., Goransson U., Jones A., Craik D.J. (2003) *Microcin J25 has a threaded sidechain-to-backbone ring structure and not a head-to-tail cyclized backbone*. J. Am. Chem. Soc. **125**, 12464-12474.
- Salomon R.A., Farias R.N. (1992) *Microcin 25, a novel antimicrobial peptide produced by Escherichia coli*. J. Bacteriol. **174**, 7428-7435.
- Salomon R.A., Farias R.N. (1993) *The FhuA protein is involved in microcin 25 uptake*. J. Bacteriol. **175**, 7741-7742.
- Salomon R.A., Farias R.N. (1995) *The peptide antibiotic microcin 25 is imported through the Ton B pathway and SbmA protein*. J. Bacteriol. **177**, 3323-3325.
- Siñeriz F., Bloj B., Farias R.N., Trucco R.E. (1973) *Regulation by membrane fluidity of the allosteric behavior of the (Ca⁺⁺) adenosine triphosphatase from Escherichia coli*. J. Bacteriol. **115**, 723-726.
- Siñeriz F., Farias R.N., Trucco R.E. (1975) *Thermodynamic considerations. The convenience of the use of allosteric "probes" for the study of lipid-protein interactions in biological membranes*. J. Theor. Biol. **52**, 113-120.
- Solbiati J.O., Ciaccio M., Farias R.N., Salomon R.A. (1996) *Genetic analysis of plasmid determinants for microcin J25 production and immunity*. J. Bacteriol. **178**, 3661-3663.
- Uñates L.E., Farias R.N. (1979) *Biomembrane cooperative enzymes. "In vivo" modulation of rat erythrocyte acetylcholinesterase by insulin in normal and diabetic conditions*. Biochem. Biophys. Acta. **568**, 363-369.