

Rebut: 15 d'octubre de 2016
Acceptat: 14 de novembre de 2016

IMPLICACIÓ DELS *LIPID RAFTS* EN EL PROCÉS DE FUSIÓ DELS VIRUS AMB EMBOLCALL

De Pouplana Sardà, Oriol;¹ Muñoz Juncosa, M. Montserrat; Pujol Cubells, Montserrat
Secció Departamental de Fisicoquímica. Facultat de Farmàcia
i Ciències de l'Alimentació. Universitat de Barcelona

Abstract

Lipid rafts are cholesterol-rich membrane domains which, having a different fluidity from lipids that surround them, regulate numerous membrane functions in eukaryotic cells. In recent years, rafts have been extensively studied because of the great interest the scientific community places on them. One of the reasons for such interest is their direct involvement in various diseases such as viral infection and, more specifically, in viral entry and the membrane fusion process whereby the virus is enveloped within the host's cell membrane. This paper presents a study of what these lipid domains are, their structure, and in what sense they are involved in viral infection, taking HIV-1 as a model. The paper also includes an examination of the membrane models used to mimic and study these lipid domains, and a thermodynamic study of mixtures of different lipid composition (in order to obtain the proportions for the formation of lipid rafts in a single layer model, obtaining stable monolayers).

Keywords: lipid rafts, viral diseases, VIH-1.

Resumen

Los dominios lipídicos o *lipid rafts* son dominios de membrana ricos en colesterol, con una fluidez distinta a la de los lípidos que los envuelven, que actúan regulando distintas actividades de la propia membrana de las células eucariotas. Durante los últimos años han sido motivo de estudio debido al interés que suscitan. Una de las razones de este interés es su implicación directa en distintas enfermedades, como las infecciones víricas y, más concretamente, en el proceso de fusión de los virus con membrana. En este trabajo se estudia su estructura y el mecanismo de participación en estos procesos infecciosos, tomando el VIH-1 como modelo. También se han investigado los modelos de membrana que se usan para mimetizar y analizar estos dominios, y se ha realizado un estudio termodinámico de mezclas de diferente composición lipídica para obtener las proporciones para la formación de *lipid rafts* en un modelo de monocapa, obteniéndose monocapas estables.

Palabras clave: dominios lipídicos, enfermedades víricas, VIH-1.

Resum

Els dominis lipídics o *lipid rafts* són dominis de membrana rics en colesterol, amb una fluïdesa diferent als lípids que els envolten, que actuen regulant diferents activitats de la pròpia membrana de les cèl·lules eucariotes. Els últims anys han estat motiu d'estudi atès l'interès que susciten. Una de les raons d'aquest interès és la implicació directa que tenen amb diferents malalties, com les infeccions víriques, i, més concretament, en el procés de fusió dels virus amb membrana. En aquest treball s'ha volgut estudiar quina és la seva estructura i com participen en aquests processos infecciosos adoptant el VIH-1 com a model. També s'han volgut estudiar els models de membrana que es fan servir per a mimetitzar i estudiar aquests dominis i s'ha fet un estudi termodinàmic de mesclades de diferent composició lipídica per aconseguir les proporcions per a la formació de *lipid rafts* en un model de monocapa, que ha permès obtenir monocapes estables.

Paraules clau: dominis lipídics, malalties víriques, VIH-1.

¹ Graduat en farmàcia, farmacèutic adjunt a la Farmàcia Pouplana de Barcelona. Ha estat becari col·laborador al Departament de Fisicoquímica de la Facultat de Farmàcia de la UB entre l'estiu de 2013 i mitjan 2014. El 2015, becari al Departament d'I+D al laboratori Prima-derm durant tres mesos (opouplana@gmail.com).

1. Introducció

Als anys noranta, Simons i Brown (Brown i London, 1997) demostraren que les membranes cel·lulars no estaven formades per capes homogènies de fosfolípids que contenien diverses proteïnes inserides, tal com s'havia proposat en el model del mosaic fluid (Singer i Nicolson, 1972). El descobriment dels *lipid rafts* ha suposat un avenç en la comprensió de la composició i la funció de la membrana. Aquest fet ha precipitat l'inici de molts estudis, els uns dirigits a la cerca de tècniques que en permetin l'estudi i els altres a determinar la funció dels propis dominis lipídics. En aquest sentit, s'han observat funcions de senyalització, adhesió i tràfic de membrana (Lingwood i Simons, 2010).

L'estudi dels dominis ha contribuït a l'actual comprensió de moltes malalties, en veure's que els dominis lipídics i les proteïnes que s'hi troben són dianes de malalties tals com l'Alzheimer, el Parkinson o l'asma, entre d'altres respostes al·lèrgiques, així com d'infeccions bacterianes o víriques (Simons i Ehehalt, 2002; Campbell *et al.*, 2001; Ono i Freed, 2001; Hawkes i Mak, 2006). Aquest treball se centra en la comprensió de la implicació dels *lipid rafts* en el procés de fusió dels virus amb embolcall, més específicament en els retrovirus, agafant el VIH com a model, i en l'estudi d'aquests dominis. Així mateix, es presenten els resultats obtinguts en un estudi experimental de mescles de diferent composició lipídica per tal d'obtenir les proporcions per a la formació de *lipid rafts* termodinàmicament estables.

2. Membranes biològiques

Les membranes biològiques són superfícies primes i flexibles que separen les cèl·lules, i alguns dels orgànuls que hi són continguts, del seu medi. Tenen un paper fonamental en l'estructura i la funció de les cèl·lules, embolcallant-les per tal de delimitar-les i, al mateix temps, esdevenint una barrera de permeabilitat selectiva.

L'any 1925, Gorter (Gorter i Grendel, 1925) va proposar que es disposaven en una doble capa lipídica, en contemplar que l'àrea per molècula dels lípids extrets d'un globus vermell era el doble que l'àrea de la pròpia cèl·lula. El primer model de membrana, però que incloïa proteïnes, va ser formulat l'any 1935 per Danielli (Danielli i Davson, 1935), que va proposar que hi havia proteïnes unides íntimament als caps polars dels lípids de la membrana. Amb el temps, es va anar veient que la doble capa lipídica constituïa una estructura de suport per a un gran nombre d'elements, que poden ser des de proteïnes complexes fins a molècules més simples. Aquestes proteïnes poden tenir funcions molt diverses, des de canals i bombes iòniques fins a marcadors cel·lulars, receptors químics, enzims generadors de missatgers secundaris o proteïnes d'unió a altres cèl·lules o estructures, entre d'altres. El 1972 es va acceptar el model proposat per Jonathan Singer i Garth Nicolson (Singer i Nicolson, 1972), en el qual es descrivia l'estructura de les membranes plasmàtiques com un mosaic fluid que conté diverses proteïnes inserides a una matriu homogènia de fosfolípids. Amb el temps, ha esdevingut el model tradicional de la membrana cel·lular. Al llarg de les dues darreres dècades s'ha redefinit el model com a resultat d'estudis fisicoquímics dels lípids de membrana (Brown, 1998). Per exemple, en un inici es considerava que el colesterol es distribuïa de manera homogènia i que la seva funció era la d'homogeneïtzar la membrana minimitzant les diferències entre els estats fluid i gel dels GPL (glucofosfolípids). D'altra banda, posteriorment es va veure l'existència de dominis rics i pobres en colesterol (Brown i London, 2000).

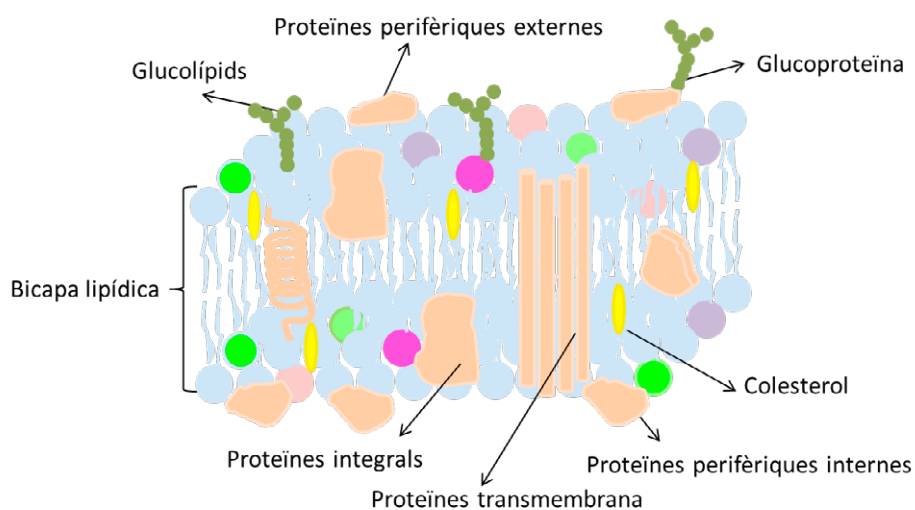


Figura 1. Esquema del model mosaic fluid per a les membranes biològiques proposat per Singer i Nicholson el 1972.

L'any 1997, Simons i Brown (Simons i Ikonen, 1997; Brown i London, 1997) van demostrar que les membranes biològiques no formen capes homogènies de lípids, tal com havia proposat Singer. Al contrari, van proposar que les membranes lipídiques es trobaven organitzades en microdominis independents anomenats *lipid rafts*. Aquests *lipid rafts* presentaven una composició específica i un dinamisme molecular diferents dels de la resta de lípids del voltant. Per això, la membrana biològica es descriu millor com un mosaic de dominis lipídics que com un mosaic fluid tal com es descrivia en el model tradicional.

2.1. Dominis lipídics o lipid rafts

La membrana cel·lular presenta una mescla complexa de lípids i proteïnes que permeten satisfer els requeriments cel·lulars. A mesura que s'estudiava la distribució dels lípids a les membranes, es va observar que aquestes no sempre presentaven una distribució homogènia (Van Meer, 1989). Per a coordinar les funcions de la membrana, aquesta pot segregar lateralment els seus constituents. De fet, es considera que els lípids s'organitzen en la dimensió lateral i presenten un major ordre, a curta i a llarga distància, del que es creia inicialment (Kusumi i Sako, 1996). Això s'explica gràcies a la immiscibilitat dinàmica líquid-líquid i recau en el concepte de la subcompartimentació de la membrana en dominis dinàmics.

Aquests dominis són coneguts com a dominis lipídics o *lipid rafts* i sorgeixen per la preferència que presenten els esfingolípid i el colesterol per agrupar-se. Presenten enllaços que fluctuen a nivell de nanoescala entre esfingolípid, colesterol i proteïnes. Això implica que, tot i tractar-se de dominis fluids i dinàmics, es troben més ordenats que no pas la bicapa que els envolta. Aquests enllaços poden estabilitzar-se per a establir plataformes que funcionin en la senyalització, l'adhesió i el tràfic de membrana (Simons i Toomre, 2000; Simons i Gerl, 2010; Simons i Sampaio, 2011). Així doncs, els esfingolípid i el colesterol formen dominis estables pel procés conegut com a activació dels *lipid rafts*, i posteriorment, un cop han realitzat la seva funció, es desfan. És a dir, són estables mentre estan activats i fan la seva funció.

Per a entendre l'organització que adopten els lípids de la membrana i el perquè de la seva compartimentació en dominis, cal estudiar primerament l'estructura d'aquests lípids i el que comporta. Com es pot veure a la figura 2 (Fantini *et al.*, 2002), els glicero-fosfolípids (GPL), com la fosfatidilcolina, acostumen a presentar un o més dobles enllaços, generalment en forma *cis*, fet que impedeix que estableixi determinades interaccions entre les cadenes. Això es tradueix en la formació, a temperatura fisiològica, d'una fase en un estat poc ordenat, conegut com a estat fluid o líquid desordenat (*Ld*). D'altra banda, els esfingolípids, com l'esfingomièlina o els GSLs (glucoesfingolípids), acostumen a presentar cadenes saturades (sense dobles enllaços).

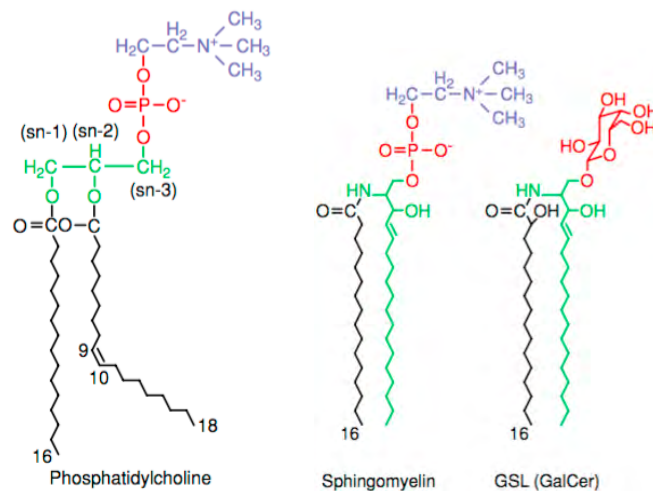


Figura 2. Estructura d'un GPL, la fosfatidilcolina, amb un doble enllaç entre els carbonis 9 i 10 en *cis* (Fantini *et al.*, 2002)

Figura 3. Estructura de l'esfingomièlina i un glucoesfingolípide amb un doble enllaç en *trans* (Fantini *et al.*, 2002).

En cas de presentar-ne algun, aquest és en *trans* i entre els carbonis 4 i 5, fet que implica que adopti una estructura molt diferent del cas anterior (figura 3: Fantini *et al.*, 2002). Aquesta estructura els permet establir enllaços de van der Waals, que es tradueixen en un estat molt més ordenat que el cas anterior, conegut com a tipus gel o sòlid ordenat (*So*), a temperatura fisiològica, i una temperatura de transició (*Tm*) més alta que no pas els GPL.

La diferència en la capacitat d'agrupar-se dels esfingolípids i els GPL es tradueix en la formació de fases diferenciades en la membrana. Els GPL purs, a temperatures per sota del seu *Tm*, es troben en l'estat tipus gel. Quan la temperatura supera aquest paràmetre, passen a l'estat tipus desordenat. D'altra banda, la presència de colesterol condensa aquests GPL i genera una fase homogènia amb propietats intermèdies entre gel i líquid desordenat, i és en aquest fet que es basava el model del mosaic fluid. D'altra banda, a temperatura fisiològica, els esfingolípids es troben en un estat d'ordenació tipus gel caracteritzat per un major empaquetament i per rigidesa de les cadenes de carboni en el cas dels GPL. La presència de colesterol, que té preferència per unir-se a l'esfingomièlina, afavoreix la separació de totes dues fases i genera un estat intermedi conegut com a líquid ordenat (*Lo*) (Brown i London, 2000). En aquesta fase, les cadenes dels grups acil es trobaran molt empaquetades (Fantini *et al.*, 2002) i, alhora, presentaran una major mobilitat gràcies al fet que entre les cadenes d'esfingolípids s'intercalaran

molècules de colesterol, tal com es mostra a la figura 4 (Eeman i Deleu, 2010). Aquesta és la disposició que presentarien els dominis lipídics. També s'ha proposat que el colesterol es disposaria entre els dominis dels esfingolípid i els GPL i que establiria una transició energètica favorable entre les diferents fases (Rietveld i Simons, 1998).

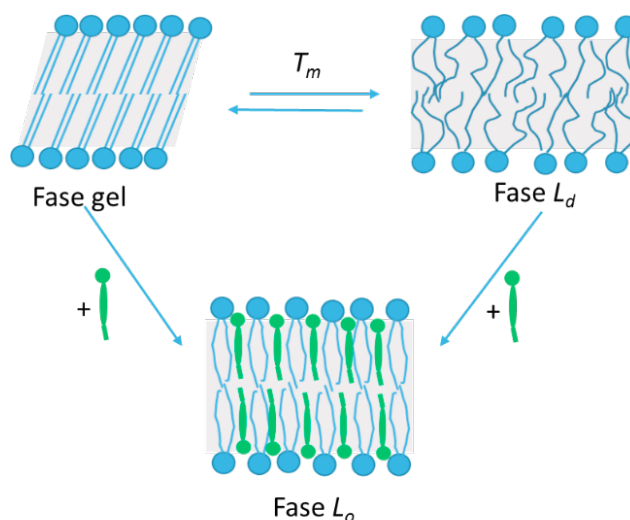


Figura 4. Representació de les fases gel: líquid desordenat (L_d) i líquid ordenat (L_o) (Eeman i Deleu, 2010).

Com ja s'ha esmentat, a més de lípids, en els *lipid rafts* també hi trobem proteïnes. De fet, en la membrana cel·lular podem diferenciar, en aquest sentit, tres tipus de proteïnes: aquelles que trobem principalment associades a un domini lipídic, les que estan en la fase lipídica desordenada i les que alternen totes dues regions. Aquestes últimes presenten una afinitat més dèbil que les primeres i serà només per la unió d'un determinat lligand que se n'afavorirà la unió al domini. Això s'explica perquè s'activa un canvi conformacional de la proteïna i/o esdevé oligomeritzada. Aquesta oligomerització incrementa l'afinitat de la proteïna pel *lipid rafts*. Tanmateix, si aquesta proteïna perdés l'oligosacàrid, perdria l'afinitat pel domini. Això vol dir que l'entrada i la sortida de la proteïna al domini (amb la seva consegüent funcionalització) pot estar estretament regulada (Harder *et al.*, 1998; Zacharias *et al.*, 2002).

Tant els esfingolípid i el colesterol atrauen les proteïnes dels *lipid rafts* durant el procés d'activació, alhora que les proteïnes poden organitzar específicament la distribució dels lípids. Això vol dir que tots dos fets es combinen en la formació dels dominis. Així doncs, l'activació del domini lipídic ve acoblada a una ordenació determinada dels lípids de membrana que anirà destinada a funcionalitzar, enfocar i coordinar la bioactivitat dels constituents de la membrana (Simons i Ikonen, 1997; Lingwood i Simons, 2010). Val a dir que no serà indispensable la presència de les proteïnes dels *lipid rafts* per a la formació dels dominis, però que la seva presència en condicionarà la funció. Aquestes poden ser proteïnes unides a un GPI (glicosilfosfatidilinositol), proteïnes transmembrana (Skibbens *et al.*, 1989; Sargiacomo *et al.*, 1993; Danielsen i Van Deurs, 1995) i tirosinacinas doblement acilades de la família Src (Casey, 1995), entre d'altres.

2.2. Estructura dels lipid rafts

S'han proposat diversos models d'organització dels *lipid rafts*, però ens centrarem en el model descrit per Simons (Simons i Ikonen, 1997). Proposa que uns esfingolípid s'associen a uns altres mitjançant interaccions febles entre els caps carbohidrats dels glicoesfingolípid (figura 5). Aquests caps són força voluminosos i estan units a cadenes llargues d'àcids grassos. L'estructura resultant comporta la presència d'espais hidrofòbics que seran ocupats per molècules de colesterol. Aquests cúmuls de colesterol i esfingolípid que es formen a la cara exoplàsmica de la membrana plasmàtica actuen com a juntes o unitats. A més, trobem que les zones de fluids que hi intervenen estan ocupades per fosfatidilcolines insaturades.

Si es parla de l'estructura, no es pot deixar de fer referència a les dimensions del domini. Mitjançant microscòpia de força fotònica es va poder determinar el domini en les membranes de fibroblasts com unions d'uns 50 nm, cosa que representa una superfície coberta per uns 3.000 esfingolípid (Pralle *et al.*, 2000). Això explica que no es poguessin veure amb microscòpia òptica. En aquest sentit, es va proposar que els *lipid rafts* serien sintetitzats a nivell del Golgi i del RE (Van Meer, 1989; Brown i London, 1998) i enviats a la membrana, on es trobarien dispersos (Mukherjee i Maxfield, 2000). El que s'envia serien dominis individuals de mida petita (50 nm). Quan s'activen, els dominis s'agrupen i les proteïnes funcionalment associades poden interactuar. Aquesta mida petita dels dominis individuals resultaria fonamental per a mantenir l'estat *off*. Quan es dona l'activació és quan tenim la unió dels dominis dispersos i la formació de dominis més grans que, amb l'ajut de les proteïnes dels dominis lipídics, realitzaran la funció de senyalització (Harder *et al.*, 1998).

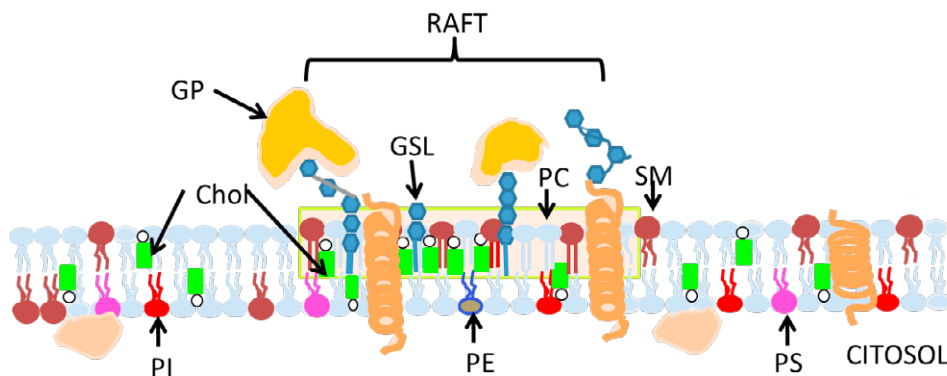


Figura 5. Representació de l'estructura d'un *lipid raft*. Chol: colesterol, GP: Glucoproteïna, GSL: glucoesfingolípid, PC: fosfatidilcolina, SM: esfingomièlina, PI: fosfatidil inositol, PS: fosfatidil serina, PE: fosfatidiletanolamina.

Finalment, si parlem de l'estructura, cal esmentar la forma caveolar que poden adoptar els dominis. Les cavèoles (Kurzchalia i Partan, 1999) són petites invaginacions (figura 6) a la membrana cel·lular que es poden trobar en molts tipus diversos de cèl·lules i que esdevenen plataformes per a proteïnes i lípids per a dur a terme processos d'interacció i transmissió de senyals. El que es creu és que la cavèola es forma com a conseqüència de l'agrupació dels *lipid rafts*. Això explica que, per a formar les cavèoles, siguin necessàries unes proteïnes anomenades caveolines (n'hi ha tres tipus diferents) que són

proteïnes associades als dominis lipídics. Estudis recents proposen que aquestes cavèoles tindrien un paper clau en el procés d'endocitosi de diversos virus (Pelkmans i Helenius, 2002; Pelkmans, 2005; Pike, 2006).



Figura 6. Representació de l'estructura d'un *lipid raft* en una cavèola.
Les caveolines provoquen una invaginació en el domini lipídic.

3. Virus, una entitat menor a la cèl·lula

Els virus (Willey *et al.*, 2008) són entitats infeccioses que es caracteritzen per tres aspectes fonamentals: són simples, acel·lulars i requereixen emprar estructures de l'hoste que infecten per a poder reproduir-se, ja que no són capaces de sintetitzar totes les estructures que necessiten emprar. Aquests tres punts són crítics en la seva diferenciació de les cèl·lules (cal recordar que una cèl·lula és la unitat bàsica, de menor mida, que es pot considerar viva), junt amb el fet que els virus poden contenir DNA o RNA, però no tots dos alhora.

Una partícula vírica completa o virió està formada per una o més molècules de DNA o RNA tancades en una estructura proteica. A més, també pot presentar altres capes més complexes formades per carbohidrats, lípids i proteïnes. Aquesta estructura només existeix quan el virus es troba a nivell extracel·lular. Tanmateix, mentre es trobi fora de la cèl·lula presentarà pocs enzims, o cap, fet que comportarà que no es pugui replicar.

Quan el virus entra dins la cèl·lula, existeix fonamentalment com a àcid nucleic replicatiu, ja que es desprèn de la coberta proteica. En aquesta fase, el virus emprarà diverses estructures de la cèl·lula hoste per a multiplicar el material genètic i els components del virió. Finalment, després de l'assemblatge, s'alliberaria al medi extracel·lular la partícula completa o virió.

3.1. Estructura dels virus

La mida d'un virus oscil·la entre els 10 i els 400 nm i pot presentar dues estructures fonamentals que ajuden a la seva classificació. Primer de tot, el material genètic, que pot ser de DNA o RNA i de cadena simple o doble. En segon lloc, la càpsida. Es tracta d'una estructura proteica que conté i protegeix el material genètic alhora que ajuda en la transferència del material genètic a l'hoste infectat. Aquesta càpsida està formada per subunitats anomenades protòmers. En funció de la simetria que adopti, podem classificar els virus en helicoidals, icosaèdrics o complexos. Si bé durant molt de temps es va creure que no tenien enzims, s'ha descobert que alguns virus en poden presentar. Si en presenten, gene-

ralment es trobaran associats a la càpsida i estaran molt implicats en el procés de replicació del material genètic. Això vol dir que, tot i que no es poden replicar pel seu compte, poden presentar determinats enzims indispensables per a completar la replicació. Un exemple el trobem en el virus de la grip, que presenta una RNA polimerasa dependent de RNA.

Un altre aspecte que permet classificar els virus és la presència o absència d'embolcall. Es tracta d'una capa lipídica externa a la nucleocàpsida. Normalment, es forma a partir de les membranes cel·lulars o nuclears de l'hoste, tot i que les proteïnes de l'embolcall estan codificades per gens vírics. Aquestes proteïnes poden trobar-se projectades cap a fora, com si fossin espícules. Com que cada virus en té de diferents, poden emprar-se per a identificar-los. Aquestes glicoproteïnes de l'embolcall solen estar implicades en el procés d'adhesió a la cèl·lula hoste.

3.2. Reproducció vírica

El procés de reproducció que segueixen els virus no és únic; varia considerablement en funció de la seva estructura i del genoma que presenti. De totes maneres, hi ha uns aspectes generals que tots comparteixen.

Primer de tot, cal que tant el virus com la cèl·lula hoste es trobin, fet que es dona a l'atzar per col·lisió. Si la cèl·lula resulta ser un hoste potencial, el virus s'hi adherirà i podrà prosseguir el procés infectiu. L'adsorció estarà regulada per la interacció entre els receptors de membrana de la cèl·lula hoste i les molècules superficials del virió (una proteïna estructural de la càpsida o un conjunt de proteïnes, una glicoproteïna de l'embolcall o altres estructures, com són les fibres). S'ha observat que els receptors d'alguns virus amb embolcall es concentren, precisament, en els *lipid raft*, fet que ens porta a entendre que podrien estar implicats en el procés d'adsorció i penetració.

Un cop s'ha donat el procés d'adsorció, el virus trigarà poc temps a penetrar dins la cèl·lula, procés acompanyat de la descapsidació. Un cop dins, s'inicia l'expressió dels gens codificats en el genoma víric. Seguidament es replica el genoma víric i se sintetitzen les proteïnes víriques. Finalment, mitjançant un procés d'autoassemblatge de les proteïnes de la càpsida i el material genètic, es formen els nous virions, que surten de la cèl·lula per lisi o gemmació.

Els mecanismes de penetració dels virus són característics i variats, ja que depenen de l'estructura i del genoma, tal com ja s'ha comentat. De manera general, se n'han pogut diferenciar dos grups: els que penetren per fusió de la membrana vírica amb la membrana plasmàtica de l'hoste i els que penetren per endocitosi. Aquest treball se centrarà en el primer cas.

El procés de fusió de la coberta vírica amb la membrana requereix la presència de glicoproteïnes específiques de la coberta, anomenades proteïnes de fusió. Es tracta d'unes seqüències d'uns vint aminoàcids que s'uniran a proteïnes de la membrana plasmàtica. Després de la unió, es produeix la reorganització dels lípids de la membrana, la fusió de les meitats adjacents de les membranes en contacte i la formació de porus de fusió proteics. Finalment, la nucleocàpsida penetra en el citoplasma, on s'inicia la transcripció de l'RNA, estant aquest encara dins la càpsida, per part de la polimerasa vírica associada a la nucleocàpsida. Les proteïnes de la membrana de l'hoste que s'uneixen al pèptid fusió també es troben associades als *lipid rafts* (Ono i Freed, 2005; Waheed i Freed, 2010). En aquest sentit, s'ha estudiat l'entrada dels virus amb embolcall associada a aquests dominis lipídics. Entre ells podem destacar els virus de l'Ebola (Bavari *et al.*,

2002; Freitas *et al.*, 2011; Hunt *et al.*, 2011), del dengue (Lee *et al.*, 2005; Reyes-Del Valle *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2008; Puerta-Guardo *et al.*, 2010), de l'hepatitis C (Kapadia *et al.*, 2007; Voisset *et al.*, 2008), de l'herpes simple humà (HSV-1) (Bender *et al.*, 2003; Gianni *et al.*, 2010), de la influència (Cleverley *et al.*, 1997; Sieczkarski i Whittaker, 2002; Takeda *et al.*, 2003; Lakadamyali *et al.*, 2004) o de la immunodeficiència humana (VIH-1) (Mañes *et al.*, 2000; Campbell *et al.*, 2001; Liao *et al.*, 2003; Huarte *et al.*, 2008; Carter *et al.*, 2009).

4. Interacció dels virus amb embolcall amb les membranes cel·lulars

Perquè es doni l'entrada dels virus amb embolcall a l'interior de la cèl·lula hoste és indispensable la fusió de les membranes de tots dos subjectes, fet en el qual es veuen implicats els dominis lipídics o *lipid rafts*. Tanmateix, perquè aquest procés es doni, cal un primer reconeixement per part de les proteïnes de fusió. S'han realitzat diversos estudis per a estudiar els mecanismes pels quals això es dona i s'han pogut diferenciar dues vies majoritàries.

Per un costat, tenim l'endocitosi de la partícula vírica i la posterior fusió de l'embolcall amb la membrana de l'endosoma (White, 1992). El procés es dona a pH baix perquè l'interior de l'endosoma, on es troba la partícula vírica, presenta un pH àcid. Primerament, aquesta via d'entrada va ser demostrada per Helenius (White *et al.*, 1983) i els seus col·laboradors mitjançant microscòpia electrònica i estudis bioquímics. Posteriorment, es va confirmar la necessitat d'un pH baix per al procés de fusió (White, 1992) mitjançant l'ús d'agents de coneguda capacitat per a augmentar el pH dels endosomes. Aquests van aconseguir bloquejar el procés de fusió de membranes. Aquesta via és seguida per virus com els de la influència o els de la somatitis vesicular (VSV). Els virus que penetren a la cèl·lula mitjançant aquest procés presenten mecanismes de fusió de membranes no dependents de mecanismes cel·lulars (Martin i Helenius, 1991; Reda *et al.*, 1995; Blumenthal *et al.*, 1987). És a dir, no dependents ni de la presència de *lipid rafts* a la membrana plasmàtica ni del citoesquelet cel·lular.

Per l'altre costat, tenim la fusió de l'embolcall víric amb la membrana plasmàtica (Moore *et al.*, 1993), regulada per la interacció entre una proteïna de l'embolcall i un receptor de membrana. En aquest cas, la fusió de membranes es donarà a pH neutre. Aquesta ruta és emprada per famílies com els paramixovirus o els retrovirus. En aquest sentit, la família que estudiarem més detalladament serà la dels retrovirus i, més concretament, el VIH (Sundquist i Kräusslich, 2012).

4.1. Implicació de proteïnes en el procés de fusió

Independentment del tipus de fusió que segueixin, són dependents de la presència d'una glicoproteïna de fusió. S'han arribat a distingir dos tipus de proteïnes fusió: les de classe I i les de classe II (Stiasny *et al.*, 2002).

Per un costat, les proteïnes fusió de classe I maduren per escissió proteolítica a partir del precursor i produeixen una subunitat fixada a la membrana amb un pèptid fusió aminoterminal o aminoparoximal. Després de la fusió, es forma una estructura trimèrica amb una espiral de triple cadena al seu nucli (Chan i Kim, 1998; Skehel i Wiley, 2000). En aquest grup trobem les famílies ortomixovirus (virus de la influència), retrovirus (VIH-1), paramixovirus i filovirus (virus de l'Ebola).

Per l'altre costat, les proteïnes fusió de classe II no es formen a partir de l'escissió proteolítica d'un precursor, sinó que són sintetitzades com un complex amb una segona glicoproteïna de membrana. Amb aquesta classe, el procés de fusió implica l'escissió de la proteïna accessòria (Kielian *et al.*, 2000). Aquest tipus de proteïna de fusió la presenten les famílies flavivirus (virus de l'hepatitis C, virus del dengue) i alphavirus.

4.2. Cicle del VIH i dominis lipídics

Si bé és cert que les proteïnes víriques presenten una funció fonamental dirigint i catalitzant el procés de fusió (Kondo *et al.*, 2015), s'ha comprovat que resulta igual d'important la composició lipídica de l'embolcall víric i de la cèl·lula hoste. Això s'explica per la importància que presenten tant l'estructura de la bicapa lipídica com les propietats físiques dels lípids mateixos.

Durant la sortida del VIH de la cèl·lula hoste, aquest incorpora en el seu propi embolcall part dels *lipid rafts* presents a la membrana plasmàtica (Brügger *et al.*, 2006; Chertova *et al.*, 2006). Així doncs, podem dir que realitzen, si més no en part, una funció estructural. Mes enllà d'aquest fet, els dominis lipídics presenten un paper fonamental en, com a mínim, quatre aspectes molt importants del cicle del virus. Són: el pas a través de la mucosa d'un hoste quan el virus arriba a l'organisme, l'entrada del virus a les cèl·lules del sistema immune, la senyalització dels canvis en la funció de la cèl·lula hoste, així com la sortida del virus d'aquesta cèl·lula i la dispersió a través del sistema vascular de l'hoste.

Primerament, mitjançant la unió a un glicoesfingolípid galactosilceramida de la superfície apical de la mucosa epitelial, el virus és capaç d'entrar per a, posteriorment, sortir per la cara basolateral. La implicació del domini lipídic en aquest fet s'ha pogut demostrar gràcies a un estudi en què es va bloquejar el pas a través de l'epiteli inhabilitant l'agrupació dels propis dominis (Alfsen *et al.*, 2001).

A partir d'aquí, la glicoproteïna gp120 del VIH s'uneix primer al receptor CD4 i, posteriorment, als coreceptors tipus quimiocines, CCR5 i CXLR4 (Abbas *et al.*, 2014). Aquest fet precipita la fusió de l'embolcall víric amb la membrana cel·lular.

Aquests tres receptors de membrana s'han trobat en les membranes resistents a detergents (DRM), que estan associades als *lipid rafts* (Campbell *et al.*, 2001).

En diversos estudis s'ha vist que no només els virus, sinó també els bacteris i els paràsits, modifiquen la senyalització de la cèl·lula hoste per habilitar la seva posterior entrada. El mateix passa en el cas del VIH. La proteïna Nef, una *early HIV gene product*, incrementa la infectivitat del virus i ho fa a través dels *lipid rafts* (Zheng *et al.*, 2001). Concretament, s'uneix de manera específica a tirosina-cinases de la família Src, que ja hem dit que estan associades als dominis, i provoquen un increment en la secreció d'IL-2 que reorganitza el complex de senyalització de les cèl·lules T i prepara el lloc de gemmació (Zheng *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2000). De fet, s'ha observat que la infecció d'un hoste amb una soca de VIH-1 que no produeix la proteïna Nef no arriba a patir la sida (Kirchhoff *et al.*, 1995).

La sortida del virus de la cèl·lula infectada depèn específicament de la proteïna vírica Gag (Ono i Freed, 2001; Lindwasser i Resh, 2001). El virus presenta entre 1.200 i 1.500 molècules Gag que multimeritzen a la cara citosòlica de la cèl·lula i afavoreixen l'assemblatge i la sortida viral. Les proteïnes Gag interaccionen amb els *lipid rafts* que contenen les proteïnes *spike*, que reagrupen els *lipid rafts* per a promoure l'assemblatge

del virus. Així doncs, la interacció entre les proteïnes Gag del VIH-1 i els dominis lipídics provoca un canvi conformational en els requeriments de l'assemblatge de l'embolcall (Campbell *et al.*, 2001).

Tanmateix, tot aquest procés s'ha pogut bloquejar mitjançant l'eliminació del colesterol de la membrana (indispensable per a la formació del *lipid raft*) (Ono i Freed, 2001).

5. Inhibidors del pèptid fusió del vih com a potencials antiretrovirals

Estudis recents centren l'interès en la comprensió del funcionament d'aquest procés de fusió pel paper clau que presenta en el cicle del virus. Centrant-nos en el VIH-1, s'han identificat inhibidors del pèptid fusió (FI) gp41 que s'han establert com a prometedors antiretrovirals amb una activitat demostrada major als que hi havia fins ara (Naidier i Anglister, 2009; Pan *et al.*, 2010; Veiga *et al.*, 2006). Aquest fet ja es va traduir el 2003 en l'aprovació de l'enfuvirtida per part de la FDA (Food and Drug Administration) i l'EMA (Kilby & Eron 2003; European Medicines Agency). Aquests inhibidors tenen un interès especial perquè presenten una baixa toxicitat i una gran biodistribució, però, sobretot, pel baix nivell de resistències. D'aquí que s'emprin en pacients que ja no responen a altres tractaments.

Cal tenir en compte que el gp41 és una proteïna altament conservada i que, en inhibir-la, actuen sobre el procés de formació del porus de fusió i la fusió de les membranes. Concretament, actuen sobre la formació del 6HB originat en la interacció entre l'extrem C-terminal del domini HR2 i l'N-terminal del domini HR1 del gp41 (Chan *et al.*, 1997). Com que aquest pèptid, la major part del temps, es troba recobert per un complex proteic tridimensional, resulta difícil accedir-hi en un medi aquós. L'única excepció es dona durant el procés de fusió, quan els dominis HR s'exposen per a formar el 6HB. Això vol dir que el procés d'inhibició cal que es doni en un marge de temps molt estret. Aquest fet justifica l'interès que es pot tenir en l'obtenció de membranes sintètiques que mimetitzin les víriques i plasmàtiques en les quals es puguin concentrar els pèptids fusió i els corresponents receptors, respectivament.

6. Models de membrana

Les membranes biològiques són sistemes molt complexos que fan del seu estudi una tasca difícil. Per aquest motiu, al llarg dels anys s'han buscat diversos sistemes que mimetitzessin aquestes membranes simplificant el model. Això permetria facilitar l'estudi de les diverses propietats de la membrana, així com de la seva composició i la del seu ús en fases de cribatge farmacològic. Els sistemes més coneguts són les monocapes i les bicapes lipídiques, i és el primer el més simple i el més fàcil d'estudiar. D'altra banda, les bicapes lipídiques es podrien dividir en dos grups principals: les vesícules lipídiques o liposomes i les bicapes lipídiques en suport sòlid (SLB).

Les monocapes lipídiques, també conegudes com a pel·lícules de Langmuir, són monocapes de fosfolípids d'una molècula de gruix estesa a la interfície aire/aigua (Brown i Rose, 1992; Maget-Dana, 1999; Brockman, 1999), que representen la meitat d'una membrana cel·lular. Són els models de membrana més senzills per a mesurar i detectar interaccions específiques entre molècules biològicament actives, com els pèptids o les proteïnes, així com interaccions lípid-lípid. Això s'explica perquè podem contro-

lar fàcilment molts paràmetres, com la composició de la subfase, la temperatura del sistema o la naturalesa i el grau d'empaquetament de les molècules o estat d'ordenació dels compostos estesos. La caracterització de les interaccions abans esmentades es pot deduir a partir de les isoterms de compressió, que són obtingudes a partir de la mesura de la pressió superficial (π) a la interfície com a funció de l'àrea per molècula (A) dels compostos estesos a la interfície aire-aigua. De fet, l'estudi d'aquesta corba permet deduir diversos paràmetres d'interès, com la compressibilitat, la pressió de col·lapse o l'energia lliure d'excés de Gibbs, que ens permetran caracteritzar aquestes interaccions. A partir d'aquesta corba, es pot trobar una composició estable que mimetitzi la membrana a una pressió determinada. Un cop fet això, es pot realitzar un estudi cinètic de penetració, que permet avaluar la capacitat que té un compost actiu que vulguem estudiar de penetrar la monocapa, fet que es pot extrapol·lar a la capacitat de travessar la cèl·lula.

Per tal de visualitzar l'organització dels compostos presents a la interfície, formant la monocapa, o els canvis produïts per la inserció a la monocapa d'un compost d'interès, es pot combinar la tècnica de formació de la monocapa de Langmuir amb microscòpia de fluorescència o microscòpia d'angle Brewster. Per aprofundir en l'estructura, la microscòpia de força atòmica (AFM) (Reviakine i Brisson, 2000) permet visualitzar les propietats de la monocapa lipídica a escala nanoscòpica. Aquesta tècnica requereix la transferència de la monocapa a un suport sòlid. En aquest sentit, la tècnica més emprada amb aquest propòsit és la tècnica Langmuir-Blodgett (LB) (Holmberg *et al.*, 2001). El suport sòlid pot ser tant hidrofòbic com hidrofílic, estant els caps polars en contacte amb el suport en el darrer cas i les cues hidrofòbiques en el primer. En tot cas, el procés sempre es fa a una pressió superficial constant. Per a tal propòsit, cal realitzar el procés mentre la monocapa es va comprimint, fet que es tradueix en una disminució de l'àrea per molècula. Tanmateix, el procés és monitorat amb la ràtio de transferència, que és la ràtio entre la disminució de l'àrea per molècula respecte a l'àrea per molècula de la monocapa amb els constituents a la interfície de la pel·lícula.

Les vesícules lipídiques o liposomes (Gregoriadis, 1991) són models de membrana versàtils, normalment emprats per a estudiar el comportament de les membranes en diversos processos, com el reconeixement molecular, l'adhesió cel·lular, el tràfic de membrana o la fusió de membranes regulada per unions no covalents entre proteïnes o proteïnes i carbohidrats (Voskuhl i Ravoo, 2009). D'altra banda, també s'ha estudiat l'aplicació de les vesícules lipídiques com a vehicle de fàrmacs, proteïnes, enzims o DNA (Peetla *et al.*, s.d.; El Maghraby *et al.*, 2008). Tot i permetre un estudi més acurat que en el cas de les monocapes, aquest model no aconsegueix imitar l'asimetria que es pot trobar a les membranes biològiques. A més, la composició final de la vesícula que s'obté és lleugerament diferent de la mescla lipídica emprada inicialment per a la seva formació. Aquesta diferència resulta més pronunciada en funció de la tècnica que s'empra (Rodríguez *et al.*, 2005).

Aquestes estructures lipídiques recobreixen un compartiment aquós i es formen per la dispersió aquosa d'una membrana lipídica. A diferència de les monocapes, les vesícules lipídiques presenten dues capes que s'agruparan d'una manera similar a com ho fan les membranes biològiques. En funció del mètode de preparació, es poden obtenir diversos tipus d'estructures amb bicapes (Lorin *et al.*, 2004; Mui *et al.*, 2003), a més de vesícules lipídiques multilamel·lars (MLV), vesícules unilamel·lars grans (LUV), vesícules unilamel·lars petites (SUV) o vesícules unilamel·lars gegants (GUVs) (Wesołowska *et al.*, 2009).

Les bicapes lipídiques en suport sòlid (SLB) (Tamm i McConnell, 1985) són models de membrana formats per una bicapa d'àcids grassos fixats a una superfície sòlida, que pot ser de mica, de vidre o d'òxid de silicó. És a dir, que els caps polars de la primera monocapa es troben encarats a la superfície de suport, mentre que les cues apolars de les dues capes es troben en contacte. El fet que es fixi la bicapa en un suport, per un costat, augmenta l'estabilitat de la bicapa i, per l'altre, facilita la posterior caracterització i estudi, en comparació amb les vesícules lipídiques lliures (Loose i Schwille 2009). Això últim es pot fer mitjançant diverses tècniques analítiques sensibles com l'AFM (Goksu *et al.*, 2009), l'espectrometria secundària de masses (SIMS) (Chan i Boxer, 2007) i la microscòpia de fluorescència (Crane i Tamm, 2007), entre d'altres. El gran interès que ha suscitat aquest model ha provocat el desenvolupament de diverses tècniques per a generar-les.

En primer lloc, la tècnica basada en la Langmuir-Blodgett en la qual, un cop s'ha transferit la monocapa formada a la interfície aire-aigua a un suport sòlid, el mateix suport es fa descendir aquest cop fins a la interfície aire-aigua de la segona monocapa, de manera que les cues apolars de la segona monocapa resten adherides a les cues de la primera monocapa, que ja es trobava fixada al suport sòlid. Aquesta tècnica permet controlar la composició de les capes de manera molt més acurada que amb les altres tècniques, així com la seva asimetria.

En segon lloc, tenim la tècnica basada en la fusió d'una vesícula lipídica en la superfície de suport (Mingeot-Leclercq *et al.*, 2008). La fusió s'obté escalfant fins a la temperatura de transició de fase dels lípids una suspensió de vesícules, concretament de SUV, que estan en contacte amb el suport. El procés implica, doncs, l'adsorció de la vesícula al suport, seguida de la seva deformació, el seu aixafament i la seva ruptura. Aquesta tècnica, a diferència de l'anterior, no permet un control tan acurat de la composició i l'asimetria de les capes, ja que dependrà en tot moment de la composició de la vesícula i de com es trenca.

Un altre mètode és el que permet l'obtenció de la bicapa a partir d'una solució micel·lar formada per una mescla de surfactant i fosfolípids (Lee *et al.*, 2009). Aquesta tècnica es basa a submergir el suport en la solució, de manera que s'hi van adherint les micelles mixtes i es va formant la bicapa. Aquest procés provoca una diferència de concentració micel·lar entre la zona de la solució immediata a la superfície, que va disminuint, i la resta de la solució, que es manté aproximadament constant. El problema és que tenim una bicapa de fosfolípids i surfactants, però volem que sigui majoritàriament de fosfolípids. La formació d'aquesta bicapa es veu afavorida per la diferència de solubilitat del fosfolípid i el surfactant i s'aconsegueix mitjançant repetides esbandides amb la solució, que ara presenta una menor concentració micel·lar. Amb aquest procés s'aconsegueix que el surfactant adherit al suport torni a la solució (atesa la major solubilitat respecte al fosfolípid), mentre que els fosfolípids (que presenten una menor solubilitat) s'adheriran al suport.

Aquests mètodes permeten l'obtenció de bicapes fixades en un suport sòlid i s'ha demostrat que són molt útils per a la comprensió de l'organització molecular de les membranes biològiques, així com per a estudiar les interaccions moleculars entre fàrmacs i membranes cel·lulars (Peetla *et al.*, s.d.). D'altra banda, es va observar que la proximitat entre la bicapa i el suport sòlid podia alterar les propietats de la membrana, i se'n podrien veure afectades, per exemple, la mobilitat dels seus components o la incorporació de proteïnes transmembrana. Per aquest motiu, es va desenvolupar un altre model, conegut com a *tethered lipid bilayer* (Chan i Boxer, 2007), que consisteix en una bicapa separada del suport (Rossi i Chopineau, 2007). Hi ha diversos mètodes per a ob-

tenir-los, però són força més complexos que els anteriors. Un esquema il·lustratiu dels diferents models esmentats es pot consultar a Chan i Boxer, 2007.

D'una manera més concreta, tot i que les monocapes i les bicapes en suport sòlid són força emprades, els models més usats per a l'estudi dels *lipid rafts* són els GUV i, d'una manera més general, els liposomes. En tot cas, per a l'estudi dels dominis lipídics, els models es complementen amb tècniques microscòpiques com la microscòpia confocal, l'espectroscòpia de masses o l'AFM, entre d'altres.

7. Estudi termodinàmic de mescles lipídiques

7.1. Materials

Instrumentació

- Balança de Langmuir de NIMA Technology model 601, amb un sensor de pressió PS4, equipada amb una làmina de Wilhelmy de paper, i cubeta de tefló de 20 × 30 cm².

Dissolvents, reactius i solucions amortidores

- Dissolvents: cloroform (Cl₃CH) + metanol (MeOH) 2:1.
- Reactius: àcid clorhídric (HCl), hidròxid de sodi (NaOH).
- Solucions amortidores: TRIS 10mM (hidroximetil aminometà C₄H₁₁NO₃).

Lípids

Tots els lípids emprats són d'Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, Estats Units):

- 1,2 dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DMPC) PM = 677,95 g/mol.
- 1,2 dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoserina (DMPS) PM = 701,85 g/mol.
- 1,2 dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC) PM = 786,11 g/mol.
- 1,2 dioleoil-sn-glicero-3-fosfoserina (DOPS) PM = 810,03 g/mol.
- Colesterol (CHOL) PM = 537,26 g/mol.
- Esfingomielina (SM) PM = 731,08 g/mol.

7.2. Metodologia

Per a l'estudi de mescles lipídiques per a la formació de dominis lipídics es va emprar la balança de Langmuir per tal d'obtenir les corbes π -A a partir de les quals es va procedir a l'estudi de miscibilitat dels diferents components de la mescla.

La corba π -A, és a dir, la mesura de π (pressió superficial de la interfície) com a funció d'A (àrea per molècula) dels compostos presents a la interfície aire-aigua és el que es coneix com a isoterma de compressió. L'obtenció d'aquestes corbes per a mescles de components en diferents proporcions permet caracteritzar la idealitat o no del sistema. Quan l'àrea per molècula d'una monocapa mixta o A_m (formada per més d'un compost) és igual a la suma de les àrees per molècula dels compostos per separat a la mateixa pressió superficial, es considera que tenim una mescla ideal (Gaines, 1966), és a dir, totalment miscible o del tot immiscible. D'altra banda, si la mescla ens dona una A_m diferent, aquest fet s'atribueix a una interacció específica entre tots dos compostos. Tot plegat es pot quantificar a partir de l'energia lliure en excés de mescla (G^E) (Goodrich, 1957).

Si G^E presenta valors positius, voldrà dir que les interaccions entre les molècules dels diferents compostos són més dèbils que les que es donen entre les molècules del compost, és a dir, que tenim separació de fases. Si, al contrari, els valors són negatius, voldrà dir que les interaccions entre els compostos de la mescla són més fortes, és a dir, que s'ha format un complex estable.

Les isoterms de compressió es realitzen en un equip NIMA Technology Langmuir Film Balance model 601, amb un sensor de pressió PS4. Consta d'una làmina de Wilhelmy de paper (que mesurarà la variació en la pressió superficial amb l'àrea), una barrera responsable de generar els canvis d'àrea superficial i una cubeta rectangular de tefló (20 × 30 cm). Els estudis es van fer a una temperatura constant de laboratori de 25° C i es va repetir tres vegades cada mesura per garantir la reproductibilitat.

Els lípids (DMPC, DMPS, DOPC, DOPS, CHOL i SM) es van dissoldre en una mescla de cloroform-metanol 2:1 a la concentració d'1 mM, i es van fer les mescles a partir de les respectives dissolucions mare prèviament preparades. La solució amortidora utilitzada va ser la solució tampó de TRIS 10 mM. Es van emprar 290 ml de tampó en cada estudi, es van estendre 70 µL de la mescla de lípids a estudiar i es va deixar evaporar el disolvent durant 5-10 minuts abans de la compressió.

A partir del pendent de la isoterma π -A es va calcular el mòdul de compressió C_s a partir de l'equació 3.1, on A és l'àrea per molècula a la pressió determinada (π).

$$C_s^{-1} = -A \left(\frac{\delta \pi}{\delta A} \right) \quad \text{Equació 3.1}$$

$$G^E = \int_0^\pi [A_{1,2} - (x_1 A_1 + x_2 A_2)] \delta \pi \quad \text{Equació 3.2}$$

Posteriorment, es va calcular l'energia lliure d'excés (G^E) a partir de l'equació 3.2, on $A_{1,2}$ és l'àrea molecular mitjana de la monocapa mixta a la pressió determinada, sent A_1 i A_2 les respectives àrees moleculars de les monocapes de les substàncies pures a la mateixa pressió superficial. X_1 i X_2 són les respectives fraccions molars dels components a la monocapa mixta.

7.3. Resultats experimentals

L'anàlisi dels resultats obtinguts (la figura 7 mostra, a títol d'exemple, els resultats en forma gràfica per a la barreja (DMPC-DMPS (3:2)) i colesterol) permet fer una sèrie de consideracions respecte de les diferents barreges estudiades, com pot ser l'efecte del colesterol i l'esfingomielina, la importància de la insaturació de les cadenes dels lípids estudiats o, inclús, l'ordre en què es fa la barreja final. També es pot analitzar el canvi dels paràmetres característics (àrea per molècula i coeficient de compressió amb la pressió).

Primerament, es va estudiar l'efecte de la incorporació del colesterol sobre les mescles de fosfolípids DMPC/DMPS (3:2) i DOPC/DOPS (3:2) observant l'efecte condensador del colesterol en ser incorporat a la barreja, tal com s'ha descrit a la bibliografia (Brown i London, 2000). Aquesta incorporació ve acompanyada d'una interacció en la mescla que es desvia de la idealitat, tot i fer-ho en poca mesura. Això es pot explicar pel fet d'incorporar a la mescla fosfolípids carregats negativament (DMPS i DOPS), ja que s'ha vist que presenten menors desviacions de la idealitat que no pas els de càrrega neutra (DMPC i DOPC) (Jurak, 2013). El càlcul de G^E permet quantificar aquesta desviació, en què els valors negatius ens indiquen la formació d'una monocapa més estable per la in-

corporació del colesterol, i es destaca $x_{Chol} = 0,6$ en el cas del DMPC/DMPS (3:2)/CHOL i la $x_{Chol} = 0,8$ en el del DOPC/DOPS (3:2)/CHOL. A més, observant els valors de G^E es demostra la major atracció que presenta el colesterol per als fosfolípids saturats (DMPC/DMPS) que no pas per als insaturats (DOPC/DOPS).

La combinació de contracció d'àrea i valors negatius de G^E en monocapes mixtes és indicativa de formació de complexes lipídics estables a la proporció indicada.

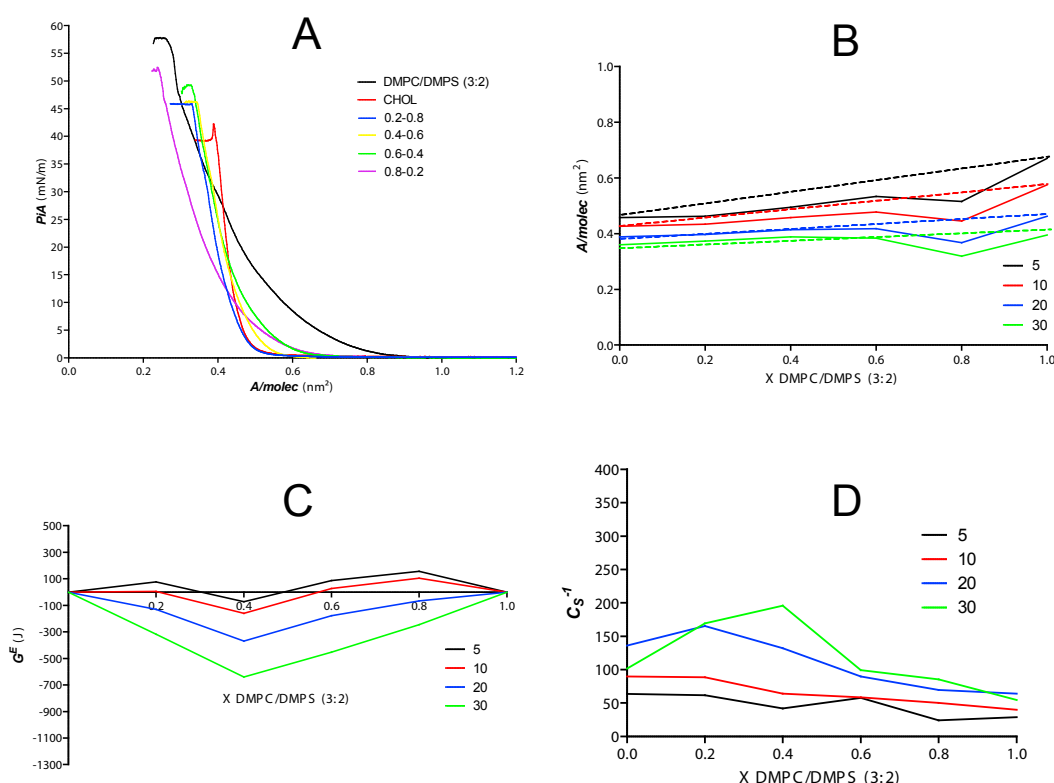


Figura 7. Dades obtingudes en l'estudi de miscibilitat de fosfolípid (DMPC-DMPS (3:2)) i colesterol. A) Corbes π -A; B) desviacions de la idealitat; C) energia de Gibbs d'excés, i D) mòdul de compressibilitat. En les figures B, C i D, la representació es fa a quatre pressions superficials diferents (5, 10, 20 i 30 mNm⁻¹).

L'estudi va prosseguir amb una anàlisi de l'efecte de la incorporació d'esfingomielina als mateixos fosfolípids. En incorporar-la hi interacciona i, d'una manera molt diferent al colesterol, produeix una disminució de l'àrea per molècula, però amb desviacions negatives en la regla de l'additivitat en totes les fraccions estudiades. La G^E presenta dos mínims a $x_{Sm} = 0,8$ i $x_{Sm} = 0,4$, en el sistema DMPC/DMPS (3:2)/SM, i un a $x_{Sm} = 0,5$ en el sistema DOPC/DOPS (3:2)/SM.

Finalment, un cop establertes les proporcions lípid/colesterol i lípid/esfingomielina més estables, es va prosseguir estudiant la influència de la incorporació de l'esfingomielina, en el primer cas, i del colesterol, en el segon. És a dir, es va estudiar la incorporació d'esfingomielina a les mescles DMPC/DMPS (3:2)/CHOL (0,4/0,6) i DOPC/DOPS (3:2)/CHOL (0,2/0,8), així com la incorporació de colesterol a les mescles DMPC/DMPS (3:2)/SM (0,2/0,8), DMPC/DMPS (3:2)/SM (0,6/0,4) i DOPC/DOPS (3:2)/SM (0,4/0,6). En els dos primers casos es palesa la importància de la insaturació en la formació d'una nova mem-

brana estable, mentre que en el cas del fosfolípid saturat només s'observa un petit mínim d'energia en la barreja amb $x_{sm} = 0,8$, molt poc significativa. En el sistema amb fosfolípids insaturats es veuen desviacions negatives fins a arribar a una $x_{sm} = 0,8$ i valors de G^E també negatius, fet indicatiu de la formació de monocapes estables en l'interval de concentracions a què ens hem referit. D'altra banda, tenim els estudis de miscibilitat de colesterol amb els sistemes lípid/esfingomielina. Els estudis de miscibilitat del CHOL amb els sistemes DMPC/DMPS (3:2)/SM (0,2/0,8) i DMPC/DMPS (3:2)/SM (0,6/0,4) mostren un patró de miscibilitat molt similar en tots els casos, excepte per al DMPC/DMPS (3:2)/SM (0,6/0,4)/CHOL a una $x_{chol} = 0,8$, en què es demostren interaccions atractives: el colesterol s'insereix a la membrana i forma sistemes estables. En el cas del sistema DOPC/DOPS (3:2)/SM (0,4/0,6), les desviacions són molt poc marcades, i s'observen valors negatius de G^E per a un interval de concentracions entre $x_{chol} = 0,5$ i 1 amb un mínim a DOPC/DOPS (3:2)/SM (0,4/0,6)/CHOL en la proporció 0,2/0,8.

El Cs^{-1} és un indicatiu de l'estat en què es troba la membrana a les diferents pressions durant la compressió, de tal manera que valors entre 12,5 i 50 mNm⁻¹ faran referència a un estat de líquid expandit, valors entre 50 i 100 mNm⁻¹ correspondran a un estat comprès entre líquid expandit i líquid condensat, en valors entre 100 i 250 mNm⁻¹ l'estat serà de líquid condensat i, finalment, valors de 1.000 a 2.000 mNm⁻¹ correspondran a l'estat sòlid (Gaines, 1966). Els valors de Cs^{-1} a la pressió de 30 mNm⁻¹, que és la que millor mimetitzava la pressió de les membranes biològiques, confirmen que així que augmenta el colesterol en els diferents sistemes emprats s'incrementa el mòdul de compressibilitat. D'altra banda, quan és l'esfingomielina la que s'incorpora, s'observa que en sistemes sense colesterol no modifica pràcticament l'estat de la monocapa, mentre que quan ho fa a sistemes que contenen colesterol causa una disminució del coeficient de compressibilitat, cosa que es pot interpretar com un moviment cap a la fase desordenada. Per una altra part, les membranes amb fosfolípids saturats i colesterol són més condensades, amb cadenes hidrocarbonades més ordenades que les que formen el colesterol amb fosfolípids insaturats.

En conclusió, l'estudi indica que els sistemes formats per fosfolípid/colesterol/esfingomielina formen complexos estables a la interfície aire/aigua amb proporcions diferents d'acord amb la hipòtesi de formació dels *lipid rafts*. Per a l'estudi d'interacció del pèptid de fusió del virus de la immunodeficiència humana i dels seus possibles inhibidors, amb aquests microdominis es proposa la proporció fosfolípid/colesterol/esfingomielina 1:2:2, pel fet de ser una mescla que facilita el mínim d'energia, així com la proporció 2:1:1, donada la similitud amb el contingut de les membranes biològiques.

8. Bibliografia

- ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H.H., PILLAI, S. (2014) *Cellular and Molecular Immunology*, Disponible a: <https://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=RWYWBAQAQBAJ&pgis=1> [accés: 28.5.2016].
- ALFSEN, A. *et al.* (2001) «Secretory IgA Specific for a Conserved Epitope on gp41 Envelope Glycoprotein Inhibits Epithelial Transcytosis of HIV-1». *The Journal of Immunology*, 166 (10), pp. 6257-6265.
- BAVARI, S. *et al.* (2002) «Lipid raft microdomains: a gateway for compartmentalized trafficking of Ebola and Marburg viruses». *The Journal of Experimental Medicine*, 195 (5), pp. 593-602.
- BENDER, F.C. *et al.* (2003) «Specific association of glycoprotein B with lipid rafts during herpes simplex virus entry». *Journal of Virology*, 77 (17), pp. 9542-9552.

- BLUMENTHAL, R. *et al.* (1987) «pH-dependent fusion of vesicular stomatitis virus with Vero cells. Measurement by dequenching of octadecyl rhodamine fluorescence». *Journal of Biological Chemistry*, 262 (28), pp. 13614-13619.
- BROCKMAN, H. (1999) «Lipid monolayers: why use half a membrane to characterize protein-membrane interactions?». *Current Opinion in Structural Biology*, 9 (4), pp. 438-443.
- BROWN, D.A., LONDON, E. (1998) «Functions of lipid rafts in biological membranes». *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 14, pp. 111-136.
- (2000). «Structure and Function of Sphingolipid- and Cholesterol-rich Membrane Rafts». *Journal of Biological Chemistry*, 275 (23), pp. 17221-17224.
- (1997) «Structure of detergent-resistant membrane domains: does phase separation occur in biological membranes?». *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 240 (1), pp. 1-7.
- BROWN, D.A., ROSE, J.K. (1992) «Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface». *Cell*, 68 (3), pp. 533-544.
- BROWN, R.E. (1998) «Sphingolipid organization in biomembranes: what physical studies of model membranes reveal». *Journal of Cell Science*, 111, pp. 1-9. A
- BRÜGGER, B. *et al.* (2006) «The HIV lipidome: a raft with an unusual composition». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (8), pp. 2641-2646.
- CAMPBELL, S., CROWE, S., MAK, J. (2001) «Lipid rafts and HIV-1: from viral entry to assembly of progeny virions». *Journal of Clinical Virology*, 22 (3), pp. 217-227.
- CARTER, G.C. *et al.* (2009) «HIV entry in macrophages is dependent on intact lipid rafts». *Virology*, 386 (1), pp. 192-202.
- CASEY, P. (1995) «Protein lipidation in cell signaling». *Science*, 268 (5208), pp. 221-225.
- CHAN, D.C. *et al.* (1997) «Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein». *Cell*, 89 (2), pp. 263-273.
- CHAN, D.C., KIM, P.S. (1998). «HIV entry and its inhibition». *Cell*, 93 (5), pp. 681-684.
- CHAN, Y.-H.M., BOXER, S.G. (2007) «Model membrane systems and their applications». *Current Opinion in Chemical Biology*, 11 (6), pp. 581-587.
- CHERTOVA, E. *et al.* (2006) «Proteomic and biochemical analysis of purified human immunodeficiency virus type 1 produced from infected monocyte-derived macrophages». *Journal of Virology*, 80 (18), pp. 9039-9052.
- CLEVERLEY, D.Z., GELLER, H.M., LENARD, J. (1997) «Characterization of cholesterol-free insect cells infectible by baculoviruses: effects of cholesterol on VSV fusion and infectivity and on cytotoxicity induced by influenza M2 protein». *Experimental Cell Research*, 233 (2), pp. 288-296.
- CRANE, J.M., TAMM, L.K. (2007) «Fluorescence microscopy to study domains in supported lipid bilayers». *Methods in Molecular Biology (Nova Jersey, Clifton)*, 400, pp. 481-488.
- DANIELLI, J.F., DAVSON, H. (1935). «A contribution to the theory of permeability of thin films». *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 5 (4), pp. 495-508.
- DANIELSEN, E.M., VAN DEURS, B. (1995). «A transferrin-like GPI-linked iron-binding protein in detergent-insoluble noncaveolar microdomains at the apical surface of fetal intestinal epithelial cells». *Journal of Cell Biology*, 131 (4), pp. 939-950.
- EEMAN, M., DELEU, M. (2010) «From biological membranes to biomimetic model membranes». *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 14 (4), pp. 719-736.
- FANTINI, J. *et al.* (2002) «Lipid rafts: structure, function and role in HIV, Alzheimer's and prion diseases». *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 4 (27), pp. 1-22.
- FREITAS, M.S. *et al.* (2011) «Measuring the strength of interaction between the Ebola fusion peptide and lipid rafts: implications for membrane fusion and virus infection». *PloS One*, 6 (1), p. e15756.
- GAINES, G.L. (1966). *Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces*. Nova York, Wiley.
- GIANNI, T., GATTA, V., CAMPADELLI-FIUME, G. (2010) « $\alpha V\beta 3$ -integrin routes herpes simplex virus to an entry pathway dependent on cholesterol-rich lipid rafts and dynamin2». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107 (51), pp. 22260-22265.

- GOKSU, E.I. *et al.* (2009) «AFM for structure and dynamics of biomembranes». *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788 (1), pp. 254-266.
- GOODRICH, F. (1957) «Molecular interaction in mixed monolayers», a Shulman, J. H. [ed.]. *Proceedings of the 2nd International Congress of Surface Activity*. Londres, Butterwords, vol. 1, pp. 85-91.
- GORTER, E., GRENDL, F. (1925) «On Bimolecular Layers of Lipoids on the Chromocytes of the Blood». *The Journal of Experimental Medicine*, 41 (4), pp. 439-443.
- GREGORIADIS, G. (1991) «Overview of liposomes». *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 28 (supl. B), pp. 39-48.
- HARDER, T. *et al.* (1998) «Lipid Domain Structure of the Plasma Membrane Revealed by Patching of Membrane Components». *The Journal of Cell Biology*, 141 (4), pp. 929-942..
- HAWKES, D., MAK, J. (2006) «Lipid Membrane; A Novel Target for Viral and Bacterial Pathogens». *Current Drug Targets*, 7 (12), pp. 1615-1621.
- HOLMBERG, K., MOTSCHMANN, H., MÖHWALD, H. (2001). «Langmuir Blodgett films». In *Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry*. New York: Wiley pp. 629-648.
- HUARTE, N. *et al.* (2008) «Lipid modulation of membrane-bound epitope recognition and blocking by HIV-1 neutralizing antibodies». *FEBS Letters*, 582 (27), pp. 3798-3804.
- HUNT, C.L. *et al.* (2011) «The Tyro3 receptor kinase Axl enhances macropinocytosis of Zaire ebola-virus». *Journal of Virology*, 85 (1), pp. 334-347.
- JURAK, M. (2013) «Thermodynamic aspects of cholesterol effect on properties of phospholipid monolayers: Langmuir and Langmuir-Blodgett monolayer study». *The Journal of Physical Chemistry. B*, 117 (13), pp. 3496-3502.
- KAPADIA, S.B. *et al.* (2007) «Initiation of hepatitis C virus infection is dependent on cholesterol and cooperativity between CD81 and scavenger receptor B type I». *Journal of Virology*, 81 (1), pp. 374-383.
- KIELIAN, M. *et al.* (2000) «Specific roles for lipids in virus fusion and exit. Examples from the alpha-viruses». *Sub-cellular biochemistry*, 34, pp. 405-455.
- KILBY, J.M., ERON, J.J. (2003) «Novel therapies based on mechanisms of HIV-1 cell entry». *The New England Journal of Medicine*, 348 (22), pp. 2228-2238.
- KIRCHHOFF, F. *et al.* (1995) «Brief report: absence of intact nef sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection». *The New England Journal of Medicine*, 332 (4), pp. 228-232.
- KONDO, N. *et al.* (2015) «Distinct requirements for HIV-cell fusion and HIV-mediated cell-cell fusion». *Journal of Biological Chemistry*, 290 (10), pp. 6558-6573.
- KURZCHALIA, T. V., PARTAN, R.G. (1999) «Membrane microdomains and caveolae». *Current Opinion in Cell Biology*, 11 (4), pp. 424-431.
- KUSUMI, A., SAKO, Y. (1996) «Cell surface organization by the membrane skeleton». *Current Opinion in Cell Biology*, 8 (4), pp. 566-574.
- LAKADAMYALI, M., RUST, M.J., ZHUANG, X. (2004) «Endocytosis of influenza viruses». *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, 6 (10), pp. 929-9-36.
- LEE, C.-J. *et al.* (2008) «Cholesterol effectively blocks entry of flavivirus». *Journal of virology*, 82 (13), pp. 6470-6480.
- LEE, C.-J., LIAO, C.-L., LIN, Y.-L. (2005) «Flavivirus activates phosphatidylinositol 3-kinase signaling to block caspase-dependent apoptotic cell death at the early stage of virus infection». *Journal of virology*, 79 (13), pp. 8388-8399.
- LEE, C., WACKLIN, H., BAIN, C.D. (2009) «Changes in molecular composition and packing during lipidmembrane reconstitution from phospholipid-surfactant micelles». *Soft Matter*, 5 (3), pp. 568-575.
- LIAO, Z., GRAHAM, D.R., HILDRETH, J.E.K. (2003) «Lipid rafts and HIV pathogenesis: virion-associated cholesterol is required for fusion and infection of susceptible cells». *AIDS Research and Human Retroviruses*, 19 (8), pp. 675-687.
- LINDWASSER, O.W., RESH, M.D. (2001) «Multimerization of human immunodeficiency virus type 1 Gag promotes its localization to barges, raft-like membrane microdomains». *Journal of Virology*, 75 (17), pp. 7913-7924.

- LINGWOOD, D., SIMONS, K. (2010) «Lipid rafts as a membrane-organizing principle». *Science* (Nova York), 327 (5961), pp. 46-50.
- LOOSE, M., SCHWILLE, P. (2009) «Biomimetic membrane systems to study cellular organization». *Journal of Structural Biology*, 168 (1), pp. 143-151.
- LORIN, A. *et al.* (2004) «Les liposomes: Description, fabrication et applications». *Biotechnology, Agronomy and Society and Environment*, 8 (3), pp. 163-176.
- MAGET-DANA, R. (1999) «The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes». *Biochimica et Biophysica Acta*, 1462 (1-2), pp. 109-140.
- EL MAGHRABY, G.M., BARRY, B.W., WILLIAMS, A.C. (2008) «Liposomes and skin: from drug delivery to model membranes». *European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 34 (4-5), pp. 203-222.
- MAÑES, S. *et al.* (2000) «Membrane raft microdomains mediate lateral assemblies required for HIV-1 infection». *EMBO Reports*, 1 (2), pp. 190-196.
- MARTIN, K., HELENIUS, A. (1991) «Transport of incoming influenza virus nucleocapsids into the nucleus». *Journal of Virology*, 65 (1), pp. 232-244.
- MINGEOT-LECLERCQ, M.-P. *et al.* (2008) «Atomic force microscopy of supported lipid bilayers». *Nature Protocols*, 3 (10), pp. 1654-1659.
- MOORE, J.P., JAMESON, B.A., WEISS, R.A., SATTENTAU, Q.J. (1993) «The HIV-cell fusion reaction». *J. Bentz, ed. Viral Fusion Mechanisms* (Boca Raton, FL, CRC press), pp. 233-289.
- MUI, B., CHOW, L., HOPE, M.J. (2003) «Extrusion technique to generate liposomes of defined size». *Methods in Enzymology*, 367, pp. 3-14.
- MUKHERJEE, S., MAXFIELD, F.R. (2000) «Role of Membrane Organization and Membrane Domains in Endocytic Lipid Trafficking». *Traffic*, 1 (3), pp. 203-211.
- NAIDER, F., ANGLISTER, J. (2009). «Peptides in the treatment of AIDS». *Current Opinion in Structural Biology*, 19 (4), pp. 473-482.
- ONO, A., FREED, E.O. (2001) «Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98 (24), pp. 13925-13930.
- ONO, A., FREED, E.O. (2005) «Role of lipid rafts in virus replication». *Advances in Virus Research*, 64, pp. 311-358.
- PAN, C., LIU, S., JIANG, S. (2010) «HIV-1 gp41 fusion intermediate: a target for HIV therapeutics». *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi*, 109 (2), pp. 94-105.
- PEETLA, C., Stine, A., Labhasetwar, V. (s.d.) «Biophysical interactions with model lipid membranes: applications in drug discovery and drug delivery». *Molecular Pharmaceutics*, 6 (5), pp. 1264-1276.
- PELKMANS, L. (2005) «Secrets of caveolae- and lipid raft-mediated endocytosis revealed by mammalian viruses». *Biochimica et Biophysica Acta*, 1746 (3), pp. 295-304.
- PELKMANS, L., HELENIUS, A. (2002) «Endocytosis Via Caveolae». *Traffic*, 3 (5), pp. 311-320.
- PIKE, L.J. (2006) «Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function». *Journal of Lipid Research*, 47 (7), pp. 1597-1598.
- PRALLE, A. *et al.* (2000). «Sphingolipid-Cholesterol Rafts Diffuse as Small Entities in the Plasma Membrane of Mammalian Cells». *The Journal of Cell Biology*, 148 (5), pp. 997-1008.
- PUERTA-GUARDO, H. *et al.* (2010) «Antibody-dependent enhancement of dengue virus infection in U937 cells requires cholesterol-rich membrane microdomains». *The Journal of General Virology*, 91 (2), pp. 394-403.
- REDA, T. *et al.* (1995) «Influence of the spectrin network on fusion of influenza virus with red blood cells». *Molecular Membrane Biology*, 12 (3), pp. 271-276.
- REVIKINE, I., BRISSON, A. (2000) «Formation of Supported Phospholipid Bilayers from Unilamellar Vesicles Investigated by Atomic Force Microscopy». *Langmuir*, 16 (4), pp. 1806-1815.
- REYES-DEL VALLE, J. *et al.* (2005) «Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells». *Journal of Virology*, 79 (8), pp. 4557-4567.

- RIETVELD, A., SIMONS, K. (1998) «The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 1376 (3), pp. 467-479.
- RODRIGUEZ, N., PINCET, F., CRIBIER, S. (2005) «Giant vesicles formed by gentle hydration and electroformation: A comparison by fluorescence microscopy». *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 42 (2), pp. 125-130.
- ROSSI, C., CHOPINEAU, J. (2007) «Biomimetic tethered lipid membranes designed for membrane-protein interaction studies». *European Biophysics Journal*, 36 (8), pp.955-965.
- SARGIACOMO, M. *et al.* (1993) «Signal transducing molecules and glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells». *Journal of Cell Biology*, 122 (4), pp. 789-807.
- SIECZKARSKI, S.B., WHITTAKER, G.R. (2002) «Influenza virus can enter and infect cells in the absence of clathrin-mediated endocytosis». *Journal of Virology*, 76 (20), pp. 10455–10464.
- SIMONS, K., EHEHALT, R. (2002) «Cholesterol, lipid rafts, and disease». *Journal of Clinical Investigation*, 110 (5), pp. 597-603.
- SIMONS, K., GERL, M.J. (2010) «Revitalizing membrane rafts: new tools and insights». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11 (10), pp. 688-699.
- SIMONS, K., IKONEN, E. (1997) «Functional rafts in cell membranes». *Nature*, 387 (6633), pp. 569-572.
- SIMONS, K., SAMPAIO, J.L. (2011) «Membrane organization and lipid rafts». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3 (10), p. a004697.
- SIMONS, K., TOOMRE, D. (2000) «Lipid rafts and signal transduction». *Nature Reviews. Molecular Cell biology*, 1 (1), pp. 31-39.
- SINGER, S.J., NICOLSON, G.L. (1972) «The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes». *Science*, 175 (4023), pp. 720-731.
- SKEHEL, J.J., WILEY, D.C. (2000). «Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin». *Annual Review of Biochemistry*, 69, pp. 531-569.
- SKIBBENS, J.E., ROTH, M.G., MATLIN, K.S. (1989) «Differential extractability of influenza virus hemagglutinin during intracellular transport in polarized epithelial cells and non polar fibroblasts». *Journal of Cell Biology*, 108 (març), pp. 821-832.
- STIASNY, K. *et al.* (2002) «Membrane interactions of the tick-borne encephalitis virus fusion protein E at low pH». *Journal of Virology*, 76 (8), pp. 3784-3790.
- SUNDQUIST, W.I., KRÄUSSLICH, H.-G. (2012) «HIV-1 assembly, budding, and maturation». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2 (7), p. a006924.
- TAKEDA, M. *et al.* (2003) «Influenza virus hemagglutinin concentrates in lipid raft microdomains for efficient viral fusion». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 (25), pp. 14610–14617.
- TAMM, L.K., McCONNELL, H.M. (1985) «Supported phospholipid bilayers». *Biophysical Journal*, 47 (1), pp. 105-113.
- VAN MEER, G. (1989) «Lipid traffic in animal cells». *Annual Review of Cell Bbiology*, 5, pp. 247-275.
- VEIGA, A.S., SANTOS, N.C., CASTANHO, M.A.R.B. (2006) «An insight on the leading HIV entry inhibitors». *Recent Patents on Anti-infective Drug Discovery*, 1 (1), pp. 67-73.
- VOISSET, C. *et al.* (2008) «Ceramide enrichment of the plasma membrane induces CD81 internalization and inhibits hepatitis C virus entry». *Cellular Microbiology*, 10 (3), pp. 606-617. Disponible a: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17979982> [accès: 3.5.2016].
- VOSKUHL, J., RAVOO, B.J. (2009) «Molecular recognition of bilayer vesicles». *Chemical Society Reviews*, 38 (2), pp. 495-505.
- WAHEED, A.A., FREED, E.O. (2010) «The Role of Lipids in Retrovirus Replication». *Viruses*, 2 (5), pp. 1146-1180.
- WANG, J.K. *et al.* (2000) «The Nef protein of HIV-1 associates with rafts and primes T cells for activation». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97 (1), pp. 394-399.

- WESOŁOWSKA, O. *et al.* (2009) «Giant unilamellar vesicles - a perfect tool to visualize phase separation and lipid rafts in model systems». *Acta Biochimica Polonica*, 56 (1), pp. 33–39.
- WHITE, J. (1992) «Membrane fusion». *Science*, 258 (5084), pp. 917-924.
- WHITE, J., KIELIAN, M., HELENIUS, A. (1983) «Membrane fusion proteins of enveloped animal viruses». *Quarterly Reviews of Biophysics*, 16 (2), pp. 151-195.
- WILLEY, J.M., SHERWOOD, L., WOOLVERTON, C.J. (2008). *Microbiología de Prescott, Harley y Klein*. 7a ed. McGraw-Hill Higher Education.
- ZACHARIAS, D.A. *et al.* (2002) «Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells». *Science* (New York), 296 (5569), pp. 913-916.
- ZHENG, Y.-H. *et al.* (2001) «Nef increases infectivity of HIV via lipid rafts». *Current Biology*, 11 (11), pp. 875-879.