

Análisis de lípidos de biomembranas
Curso Práctico

**Análisis de lípidos de biomembranas
Curso Práctico**

**Joaquín V. Rodríguez
Editor Científico**

Joaquín Rodríguez
Análisis de lípidos de biomembranas. Curso práctico - 1ª ed. - Rosario:
UNR Editora - Universidad Nacional de Rosario, 2008.
150 p.; 26x18 cm.

ISBN 978-950-673-663-7

1. Bioquímica. 2. Lípidos. I. Título
CDD 612

Diseño de tapa: Julia Rodríguez y Jimena Rodríguez
Diseño interior: UNR Editora

ISBN 978-950-673-663-7
© Joaquín Rodríguez. 2008
Hecho el depósito que marca la ley 11.723



RED DE EDITORIALES
DE UNIVERSIDADES
NACIONALES



**EDITORIALES
DE LA A.U.G.M.**

ASOCIACION DE UNIVERSIDADES
GRUPO MONTEVIDEO



IMPRESO EN LA ARGENTINA - PRINTED IN ARGENTINA
UNR EDITORA - EDITORIAL DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO
SECRETARÍA DE EXTENSIÓN UNIVERSITARIA

Autores

Joaquín V. Rodríguez

Doctor en Bioquímica, Profesor Adjunto de Farmacología de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR. Investigador Independiente del CONICET.
email: jrodrig@fbioyf.unr.edu.ar

Raquel M. Cravero

Doctora en Bioquímica, Profesora Adjunta de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas UNR. Investigadora Adjunta del CONICET.
email: rcravero@fbioyf.unr.edu.ar

Carla Gallo

M.Sc. en Biología, Profesor Principal de Bioquímica, Biología Molecular y Farmacología, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia.
email: galloc@upch.edu.pe

Mónica Hourcade

Bioquímica, a cargo del Servicio de Cromatografía Gaseosa acoplada a Espectrometría de Masas de la Facultad de Ciencias. Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR.
email: mhourcad@fbioyf.unr.edu.ar

María E. Mamprin

Doctora en Ciencias Biológicas, Jefe de Trabajos Prácticos de Farmacología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR. Investigadora Adjunta del CONICET.
email: mmamprin@fbioyf.unr.edu.ar

José M. Pellegrino

Bioquímico, docente de Fisiología de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR. Profesional Principal del CONICET.
email: jpellegr@fbioyf.unr.edu.ar

Giovanni Poletti

Licenciado en Biología, Profesor Auxiliar de Bioquímica, Biología Molecular y Farmacología, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia.
email: polettig@upch.edu.pe

Nelson G. Stürtz

Doctor en Ciencias Biológicas, Jefe de Trabajos Prácticos de Toxicología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR.
email: nsturtz@fbioyf.unr.edu.ar

Prólogo

En los años recientes, la bioquímica de lípidos de membranas ha tenido un crecimiento enorme en la literatura científica, sin embargo han aparecido muy pocos libros que enfoquen la metodología analítica en una forma que integre todas las etapas del análisis. Tampoco se han publicado textos en español que cubran en profundidad esta analítica y que puedan utilizarse para enseñar a estudiantes principiantes en la analítica de lípidos. Teniendo estas consideraciones en mente y con la experiencia obtenida durante el desarrollo del curso de postgrado «Análisis de lípidos de biomembranas» es que hemos escrito este libro. El texto ha sido pensado como un libro introductorio al análisis de lípidos de biomembranas para estudiantes de postgrado de Biología, Bioquímica, Biología Molecular y otras carreras afines.

En el texto se ha priorizado el desarrollo experimental de la metodología analítica de lípidos de biomembranas en etapas obviando revisiones de la literatura. En cada etapa del análisis se presenta una breve introducción para luego desarrollar un método seleccionado por los autores; en cada capítulo se incluye un experimento con sus resultados esperados obtenidos de experimentos realizados por estudiantes del curso. Se agregaron además notas adicionales con algunas técnicas y datos útiles para el analista.

Se han seleccionado técnicas simples y económicas que bastan para obtener información suficiente sobre la membrana del eritrocito y otros tejidos y membranas de origen natural. Se ha seleccionado como técnica separativa la cromatografía en capa fina que permite visualizar resultados con una inversión en equipamiento muy económica. Los lectores deben considerar que éste es un libro de texto introductorio al análisis de lípidos de biomembranas, que existen técnicas más potentes y sofisticadas como el NMR, la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas y la cromatografía de alta performance acoplada a la espectrometría de masas cuyo aprendizaje y utilización merecen tratamientos particulares por su complejidad y extensión y escapan a esta publicación. Han colaborado docentes de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario que participan del dictado del curso. Se destaca la participación de Carla Gallo y Giovanni Poletti de la Facultad de Ciencias y Filosofía de la Universidad Peruana Cayetano Heredia quienes en sus estadías en nuestro laboratorio desarrollaron y mejoraron algunas de las metodologías que se describen en el texto.

Contenido

	Agradecimientos	15
	Abreviaturas	17
	Recomendaciones a los lectores	19
Capítulo 1	Lípidos de Biomembranas	21
	<i>Carla Gallo, Raquel M. Cravero y Joaquín V. Rodríguez.</i> Consideraciones generales sobre lípidos. Clasificación de lípidos neutros y polares. Lípidos de biomembranas Glicerolípidos, esfingolípidos y esteroides. Estructuras de fosfolípidos. Ácidos grasos, nomenclatura y clasificación. Roles de los lípidos en las membranas biológicas. Referencias bibliográficas.	
Capítulo 2	Generalidades del trabajo con lípidos	37
	<i>Joaquín V. Rodríguez.</i> Material de vidrio, lavado del material de vidrio, agua destilada, material volumétrico. Nitrógeno y gases inertes. Equipamiento. Disposición de solventes utilizados en el laboratorio. Cerrado de ampollas de vidrio.	
Capítulo 3	Solventes orgánicos utilizados en el análisis de lípidos	43
	<i>Raquel M. Cravero</i> Consideraciones generales. Naturaleza y origen de las impurezas contenidas en los solventes. Toxicidad de los solventes orgánicos. Purificación de los solventes orgánicos comunes: acetona, cloroformo, éter dietílico, etanol, n-hexano y n- heptano, isopropanol, metanol, tetracloruro de carbono. Referencias bibliográficas.	
Capítulo 4	Esquema general del análisis de lípidos de biomembranas. Extracción de lípidos	51
	<i>Joaquín V. Rodríguez y María E. Mamprin</i> Esquema general del análisis de lípidos de biomembranas: Separación de lípidos no polares y polares. Separación de Fosfolípidos. Extracción de lípidos. Definición del procedimiento. a-Asociaciones hidrofóbicas; b- enlaces de hidrógeno y c-Asociaciones electrostáticas e hidrofóbicas, asociaciones covalentes. Características de los solventes utilizados para la	

extracción de lípidos. Tratamiento de membranas para la extracción de lípidos. Remoción de solventes de extractos de lípidos. Almacenamiento y conservación de extractos lipídicos. Métodos de extracción: Método de Folch, Método de Bligh y Dyer. Procedimientos específicos de extracción. Referencias bibliográficas. Experimento 1: Obtención y purificación de un extracto de lípidos proveniente de membranas de eritrocitos de rata/humano, almacenamiento y conservación. Notas adicionales: Almacenamiento de eritrocitos para el dosaje de lípidos. Por qué determinamos el fósforo del extracto lipídico. Referencias bibliográficas.

<p>Capítulo 5 Determinación de fósforo de fosfolípidos a partir de extractos lipídicos</p> <p><i>Giovanni Poletti y Carla Gallo</i></p> <p>Introducción. Fundamentos. Reactivos. Equipos y material de laboratorio. Muestras. Consideraciones generales. Procedimiento. Experimento 2: Determinación de P de fosfolípidos de un extracto lipídico obtenido de eritrocitos humanos. Resultados esperados. Referencias bibliográficas.</p>	<p>65</p>
<p>Capítulo 6 Determinación de Colesterol libre en extractos lipídicos de membranas biológicas</p> <p><i>Carla Gallo</i></p> <p>Introducción. Fundamentos. Reactivos. Equipos y material de laboratorio. Muestras. Consideraciones generales. Procedimiento. Experimento 3: Determinación de Colesterol total en extractos lipídicos de eritrocitos humanos. Resultados esperados. Referencias bibliográficas. Notas adicionales: solubilización y dispersión de lípidos. Referencias bibliográficas.</p>	<p>73</p>
<p>Capítulo 7 Separación de lípidos neutros y polares por cromatografía de capa fina (TLC).....</p> <p><i>Joaquín V. Rodríguez</i></p> <p>Fundamentos. Separación usando un sistema de solventes. Separación usando dos sistemas de solventes. Aplicación de las muestras en la placa cromatográfica. Desarrollo del cromatograma. Estándares de lípidos para TLC. Tabla 1 - Solventes utilizados para almacenar estándares de lípidos. Tabla 2 - Propiedades de lípidos utilizados como estándares para TLC. Sistemas de</p>	<p>81</p>

detección. Tinciones generales para lípidos. Tinciones específicas para lípidos. Referencias bibliográficas.
 Experimento 4: Separación de lípidos neutros de un extracto lipídico de eritrocitos de rata en TLC monodimensional. Análisis de los resultados.
 Notas adicionales: elución de lípidos de la silicagel.

<p>Capítulo 8</p>	<p>Separación de fosfolípidos por cromatografía de capa fina monodimensional</p> <p><i>Giovanni Poletti y Carla Gallo</i></p> <p>Fundamentos. Revelado e identificación. Cuantificación de fósforo de fosfolípidos separados por TLC. Curvas de calibración para densitometría. Reactivos. Equipo y material de laboratorio. Muestras. Consideraciones generales. Revelado e identificación. Cuantificación de fósforo de fosfolípidos. Curvas de calibración para densitometría. Procedimiento. Experimento 5: Separación de fosfolípidos de eritrocitos humanos en TLC monodimensional. Análisis de los resultados. Referencias bibliográficas</p>	<p>95</p>
<p>Capítulo 9</p>	<p>Análisis Cuantitativo de separaciones.....</p> <p><i>José M. Pellegrino</i></p> <p>Introducción al análisis de imágenes. Ventajas del análisis de imágenes. Digitalización de imágenes. Profundidad de la muestra y resolución del color. Los sistemas de imágenes como instrumentos analíticos. Dispositivos para adquisición de imágenes. Densitómetro de tira. Densitómetro de barrido. Cámaras digitales estándar. Cámaras integradoras. Lectores de placas. Escáneres de fluorescencia, multipropósito, etc. Escáneres: resolución, resolución óptica interpolada. Observaciones Prácticas: Adquisición de la imagen, archivo de la imagen, distancia entre calles. Cuestiones fundamentales acerca de escanear. Iluminación de campo claro. Ventajas de un sistema integrado de archivo y análisis. Características fundamentales convenientes en un sistema de archivo y análisis. Referencias bibliográficas. Experimento 6: Cuantificación de fosfolípidos de membrana de eritrocito por técnicas densitométricas. Resultados esperados.</p>	<p>105</p>
<p>Capítulo 10</p>	<p>Separación de fosfolípidos por cromatografía en capa fina bidimensional (TLC).</p> <p><i>Joaquín V. Rodríguez</i></p>	<p>123</p>

Fundamentos. TLC en silicagel modificada: TLC en fase reversa, AgNO_3 , Ac. Bórico, EDTA- Ac. Oxálico. Referencias bibliográficas. Experimento 7: Separación de fosfolípidos de un extracto de eritrocitos de rata/humano en TLC bidimensional. Identificación de fosfolípidos por tinciones específicas. Identificación de fosfolípidos por comparación con estándares. Resultados esperados

Capítulo 11 **Análisis de ácidos grasos por cromatografía gaseosa** 133

Mónica Hourcade y Nelson G. Stürtz

Introducción. Derivatización de ácidos grasos.

Esterificaciones catalizadas por ácidos. Reactivos.

Procedimientos. Esterificaciones catalizadas por bases.

Reactivos. Procedimientos. Transesterificación.

Equilibrio de reacción. Cinética de reacción y catálisis.

Otras reacciones para derivatizar ácidos grasos.

Análisis de ácidos grasos por cromatografía gaseosa.

Cuantificación y expresión de los resultados.

Experimento 8: Determinación de la composición de ácidos grasos de un extracto lipídico de eritrocitos por cromatografía gaseosa. Ejemplo de cálculo. Ejercicio.

Referencias bibliográficas.

Índice alfabético 151

Agradecimientos

A Bruno Gazzin

A Giancarlo Lunazzi

A Claudio Tiribelli

Quienes en el Departamento de Bioquímica y Biofísica de la Macromolécula (DBBCM) de la Universidad de Trieste, Italia, nos brindaron sus enseñanzas, su constante apoyo, su afecto y amistad que posibilitaron la realización de este libro.

Este libro fue financiado con el subsidio de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica de Argentina (ANPCyT) PICT-03-14492 BID 1728 OC/AR.

Este libro es dedicado a Zaida Penton, a Shirley Ainsworth y al personal de la Biblioteca del Centro Virtual de Biotecnología para las Américas de la Universidad Autónoma de Méjico, cuya entusiasta y desinteresada colaboración hicieron posible su realización.

Abreviaturas

AcH: ácido acético
AG: ácidos grasos
AGL: ácidos grasos libres
AGME: metil ésteres de ácidos grasos
BHT: butil hidroxiltolueno
Cl₃CH: cloroformo
CE: cerebrósidos
CO: colesterol
CO-E: ésteres de colesterol
CL: cardiolipina
DG: diacilglicéridos
DPG: difosfatidilglicerol
EFS: extracción de fase sólida
ELL: extracción líquido-líquido
EtOH: etanol
GL: glicerol
GC: cromatografía de gas
GCMS: cromatografía de gas-masa
GLP: glicolípidos
GN: gangliósidos
HPLC: cromatografía líquida de alta performance
HPTLC: TLC de alta performance
LPA: ácido lisofosfatídico
LPC: lisofosfatidilcolina
LPE: lisofosfatidiletanolamina
LPS: lisofosfatidilserina
MetOH: metanol
MG: monoacilglicéridos
MGDG: monogalactosil diacilglicerol
DGDG: digalactosil diacilglicerol
PA: ácido fosfatídico
PC: fosfatidilcolina
PE: fosfatidiletanolamina
PG: fosfatidilglicerol
PI: fosfatidilinositol
PL: fosfolípidos
PS: fosfatidilserina
PM: plasmalógeno
PUFA: ác. grasos poliinsaturados
RPTLC: TLC en fase reversa
SF: sulfátidos
SM: esfingomielina
TG: triacilglicérido
TLC: cromatografía en capa fina

Recomendaciones a los lectores

Todos los procedimientos descritos y sus cantidades han sido probados y usadas en los laboratorios de los autores (CG, GP, JR, MEM, RC Y JP), sin embargo sugerimos a cada lector que cuando reproduzca los experimentos descritos tenga en cuenta lo siguiente:

1. Los materiales, equipos y reactivos son distintos en cada laboratorio, debido a que pueden ser de otra marca de fabricante con distintas especificaciones.

2. Cada laboratorio tiene que poner a punto los métodos antes de usarlos para sus experimentos y/o investigaciones de modo que éstos se adecuen a las muestras experimentales, condiciones de trabajo, características de reactivos, instrumentos y la habilidad del usuario.

3. Las proporciones de los reactivos no deben ser cambiados, ni el orden de su uso.

4. Debe prestar la debida atención con el manejo de estos reactivos ya que son extremadamente tóxicos, inflamables y explosivos cuando se manipulan incorrectamente o mezclan en proporciones no adecuadas o en órdenes distintos. **LEA TODOS LOS DOCUMENTOS DE SEGURIDAD DE MANEJO DE SUSTANCIAS QUE SEAN RELEVANTES A LOS PRODUCTOS QUE USARÁ ANTES DE INICIAR UN PROCEDIMIENTO.**

5. Los puntos establecidos en las curvas de calibración de métodos son referenciales para el lector (esos valores se usan como se menciona anteriormente en los laboratorios de los autores) sin embargo usted puede necesitar modificar los puntos de la curva para determinar que los valores de sus muestras se encuentren dentro de los de la curva de calibración. Verifique si existe lógica en los valores calculados de los analitos obtenidos y los valores esperados y/o informados por otros autores.

Capítulo 1

Lípidos de biomembranas

Carla Gallo, Raquel M. Cravero y Joaquín V. Rodríguez

Consideraciones generales sobre lípidos

Al presente no hay una definición del término lípido que sea aceptada universalmente, en general se describe a los lípidos como sustancias de origen natural que son solubles en solventes orgánicos como el Cl_3CH , éter dietílico, hexanos y alcoholes. Este concepto excluiría a los compuestos producidos por síntesis y a otros compuestos (esteroides, carotenoides, terpenos y ácidos biliares) que también son reconocidos como lípidos. Christie ⁽¹⁾ ha propuesto una definición de lípidos:

Los lípidos son ácidos grasos y sus derivados y aquellas sustancias relacionadas biosintéticamente o funcionalmente a esos compuestos.

Por otra parte en el libro «A lipid glossary»⁽²⁾, se propone una definición de lípidos bastante aproximada a la de Christie:

Los lípidos son compuestos basados en ácidos grasos o sustancias relacionadas con los mismos como los correspondientes alcoholes o las bases de esfingosina.

Esta definición incluye la mayor parte de los grupos de compuestos generalmente reconocidos como lípidos. Para tener una idea del amplio grupo de compuestos que comprende esta definición, veamos qué sustancias incluye:

Los ácidos grasos (AG), alcoholes y aldehídos se presentan naturalmente en forma combinada. A menudo se encuentran como ésteres y forman amidas en los esfingolípidos. Los AG se encuentran unidos al glicerol formando mono, di y triacilglicéridos o en combinación con una unidad estructural adicional formando los fosfolípidos, glicosidiacilgliceroles y los éter-lípidos. Los AG pueden estar esterificados con esteroides (ésteres de esteroides) y con alcoholes de cadena larga (ceras) en lugar del glicerol.

Existe otra forma de clasificar a los lípidos que es aplicable en la separación cromatográfica de los mismos:

Lípidos simples: son aquellos cuya hidrólisis produce al máximo dos tipos de productos primarios por mol. Ejemplo triacilglicéridos (TG), esteroides (colesterol) y ésteres de esteroides.

Lípidos complejos: son aquellos cuya hidrólisis produce tres o más productos primarios por mol. Ejemplo: fosfolípidos (FL) y glicolípidos (GL).

Una forma adicional de clasificarlos es como lípidos neutros y polares:

Lípidos neutros: son aquellos lípidos que no poseen átomos cargados. Ejemplo: TG, esteroides (colesterol) y ésteres de esteroides (sinónimo de lípidos simples).

Lípidos polares: son aquellos lípidos que poseen grupos polares o cargados (PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , etc). Ejemplo: FL, GL, etc. (sinónimo de lípidos complejos).

Veamos ahora una clasificación de lípidos neutros y polares provenientes de tejidos animales y de plantas:

Lípidos neutros

1. mono, di y triacilgliceroles.
2. ácidos grasos libres y metil ésteres de AG.
3. colesterol y ésteres de colesterol.
4. alcoholes provenientes de AG.
5. ceras (ésteres de alcoholes de cadena larga y AG).

Lípidos polares

1. fosfolípidos ácidos:
 1. ácido fosfatídico.
 2. fosfatidilglicerol.
 3. difosfatidilglicerol (cardiolipina).
2. fosfolípidos:
 1. fosfatidilcolina y lisofosfatidilcolina.
 2. fosfatidiletanolamina y lisofosfatidiletanolamina.
 3. fosfatidilserina y lisofosfatidilserina.
 4. fosfatidilinositol.
 5. fosfolípidos.
3. glicolípidos:
 1. monogalactosil diacilglicerol.
 2. digalactosil diacilglicerol.
4. esfingolípidos
 1. esfingomielina y otros.
 2. ceramidas.
 3. monoglicosilceramidas (cerebrósidos).
 4. di, tri y tertraglicosilceramidas (globósidos y fucósidos).
 5. sulfátidos.

Todos los lípidos polares son de naturaleza anfipática, es decir, su estructura contiene una región polar y otra no polar. Son también anfipáticos algunos lípidos neutros como el colesterol libre y los ácidos grasos libres, debido a que contienen grupos polares pequeños (-OH y -COOH, respectivamente) en su estructura.

Lípidos de Biomembranas

Las membranas biológicas son agregados de moléculas, las cuales se organizan en forma de láminas cerradas, separando compartimientos acuosos. Los componentes mayoritarios de las membranas biológicas son lípidos y proteínas, otros constituyentes minoritarios son azúcares, iones y agua.

La mayoría de los lípidos que forman las membranas biológicas son de naturaleza anfipática. Estas moléculas presentan una región polar (llamada también cabeza polar) y una región hidrofóbica alargada (denominada cola hidrofóbica), las cuales en conjunto determinan una geometría espacial cilíndrica, ver figura 1.

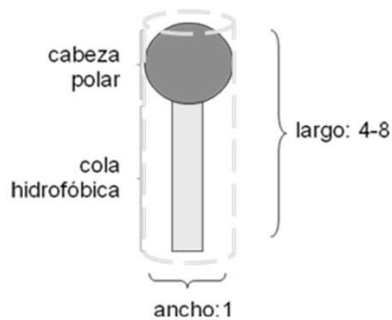


Fig. 1. Los lípidos de membrana son un grupo de moléculas anfipáticas que presentan la particularidad de ser más largas que anchas, en una proporción que puede variar entre 4:1 y 8:1.

La distribución de polaridad y la geometría espacial de estos lípidos son las propiedades que determinan la estructura tridimensional de las membranas biológicas. En el medio acuoso de los seres vivos, los lípidos se agregan por medio de interacciones hidrofóbicas, exponiendo su zona polar al medio acuoso, y ocultando su zona no polar de éste, formando la estructura de bicapa, ver figura 2.

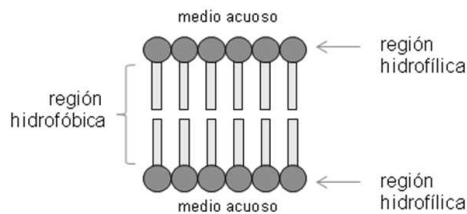


Fig. 2. Bicapa de lípidos anfipáticos.

La composición química de la cabeza polar y la cola hidrofóbica de los lípidos en las membranas biológicas es variada. Sin embargo, en la mayoría de lípidos de membrana, la cabeza polar contiene un grupo fosfato, y la cola hidrofóbica 2 cadenas hidrocarbonadas, que generalmente son ácidos grasos.

Si bien la mayoría de los lípidos de membrana presentan una geometría espacial cilíndrica, existen lípidos minoritarios con geometría cónica, como la

fosfatidiletanolamina que tiene una cabeza polar pequeña, o como los lisofosfolípidos, que al tener una sola cola hidrofóbica tienen una geometría espacial de cono invertido. Los lípidos con geometría cónica participan en la formación de curvaturas en las membranas (ver figura 3)^(4,5).

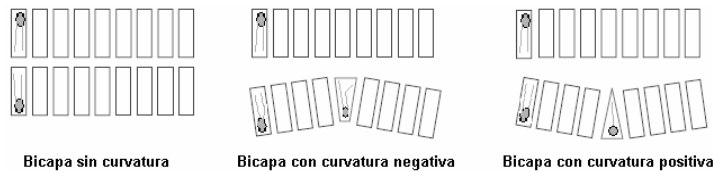


Fig. 3. Geometría de los lípidos de membrana y formación de curvaturas. Modificado de: Escribá PV. Membrane-lipid therapy: a new approach in molecular medicine. Trends in Molecular Medicine. 12(1): 34-43. 2006.

Las bicapas de lípidos que conforman las membranas son agregados moleculares ordenados (mantienen un arreglo tridimensional) y a la vez fluidos (las moléculas tienen libertad de movimiento). El movimiento browniano hace posible que los lípidos formadores de bicapa puedan movilizarse sobre el plano de cada monocapa, y también la rotación de sus cadenas hidrocarbonadas. La libertad de movimiento de las moléculas en la bicapa, determina la fluidez de ésta. La fluidez de las membranas es modulada por las propiedades estructurales de las cadenas hidrocarbonadas (por ejemplo longitud, presencia de dobles enlaces) y de las cabezas polares de los propios lípidos formadores de bicapa (p.ej. capacidad de formar puentes de hidrógeno o de generar interacciones electrostáticas con iones presentes en el medio acuoso)^(6,7).

Los esteroides son un grupo de lípidos de membrana que presentan una región no polar voluminosa y rígida que termina en una cola hidrocarbonada, y una cabeza polar pequeña. Estas moléculas se intercalan con los lípidos formadores de bicapa en las membranas, modulando su fluidez, principalmente mediante su interacción con las colas hidrocarbonadas (ver figura 4)⁽⁸⁾. Existen esteroides propios de células animales (colesterol) y vegetales (fitosteroides). Los esteroides presentan afinidad diferencial con diferentes lípidos de membrana; esto determina la formación de dominios de lípidos (llamados también microdominios) dentro de cada plano de la bicapa^(4,9).

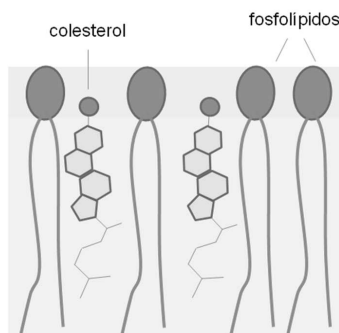


Fig. 4. Interacción entre el colesterol y los fosfolípidos en la membrana de una célula animal. Modificado de: Maxfield FR, Taba I. Role of cholesterol and lipid organization in disease. Nature. 438 (1): 612-619. 2005.

Las membranas biológicas se encuentran tanto en virus (virus de cubierta), como en bacterias, y en las células de plantas y animales. Si bien muchas especies de lípidos de membrana son comunes a organismos muy diversos, también se pueden observar especies particulares en diferentes grupos de organismos, como por ejemplo los fitanilgliceroles que son propios de las archaeobacterias. Tanto los virus de cubierta como ciertas bacterias presentan una bicapa única, mientras que las células de plantas y animales presentan un sistema interno de membranas que comprende a las estructuras llamadas organelas (por ejemplo núcleo, retículo endoplásmico, mitocondria, cloroplasto, lisosoma, peroxisoma, etc.). El sistema de endomembranas conforma alrededor del 90 % del total de superficie de membrana de la célula⁽⁶⁾.

La composición de lípidos es distinta en las diferentes membranas de un mismo organismo. En la mayor parte de casos, los lípidos que componen las diferentes membranas son los mismos pero su proporción relativa varía (ver figura 5).

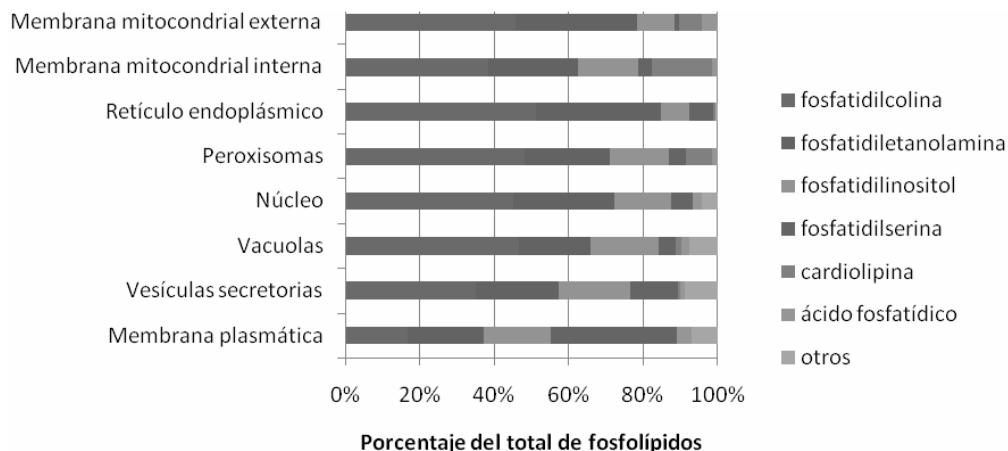


Fig. 5. Composición de fosfolípidos la membrana plasmática y de las organelas de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*). Diseño tomado de: Nelson DL & Cox MM. Lehninger Principles of Biochemistry. 4th Edition. 2005. WH Freeman. Datos experimentales tomados de: Zinser E et al. 1991. Phospholipid Synthesis and Lipid Composition of Subcellular Membranes in the Unicellular Eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol. 173(6): 2026-2034.

Es posible encontrar también algunos lípidos no anfipáticos en las membranas biológicas, pero a diferencia de los lípidos anfipáticos, éstos se encuentran en pequeñas cantidades, y debido a su naturaleza físicoquímica, no tienen capacidad de ordenarse en forma de bicapa. En las membranas los lípidos no anfipáticos se encuentran alojados en la interfaz hidrofóbica entre monocapas (ver figura 6).

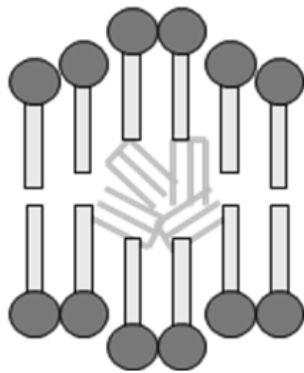


Fig. 6. Triacilglicéridos en una bicapa

Estructuralmente, existen tres grupos principales de lípidos de membrana: los glicerolípidos, los esfingolípidos y los esteroides. A continuación listamos las especies de lípidos de estos tres grupos que se encuentran con mayor frecuencia en las membranas biológicas:

Glicerolípidos: fosfatidilcolinas (PC), fosfatidiletanolaminas (PE), fosfatidilserinas (PS), fosfatidilinositoles (PI), mono y digalactosil diacilgliceroles (MGDG, DGDG).

Esfingolípidos: esfingomielina (SM)

Esteroides: colesterol y fitosteroides

La mayoría de los lípidos de membranas provienen de la molécula de glicerol (Figura 7), una estructura simple de tres átomos de carbono que contiene un grupo hidroxilo en cada carbono. En estas moléculas, denominadas glicerolípidos, dos grupos hidroxilos son reemplazados por ácidos grasos de cadenas largas (ácido palmítico, esteárico, etc.) y la tercer posición es reemplazada por un grupo polar (ejemplo: fosfato).

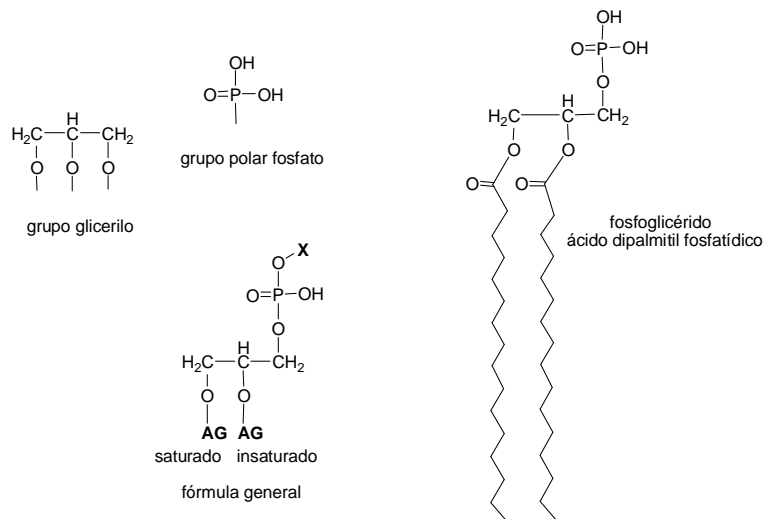


Fig 7. Estructura general de fosfolípidos.

Los glicerolípidos difieren entre ellos tanto en las identidades de los ácidos grasos contenidos en la molécula como en la del grupo polar. Por lo general los glicerolípidos contienen un AG saturado y uno insaturado, este último en el carbono medio del glicerol (hay excepciones a este arreglo, como es el caso de la membrana alveolar en pulmón, en la que los dos AG son saturados). Los grupos polares de los glicerolípidos también varían, la mayor parte de ellos contienen fosfato al que se le adicionan otros grupos como la colina y aminos de estructura similar (etanolamina), aminoácidos como la serina, o azúcares alcohol como el inositol, dando origen a los fosfolípidos: fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS) y fosfatidilinositol (PI) respectivamente (figura 8). Debido a la presencia de fosfato en su estructura molecular, a este grupo de glicerolípidos se les denomina glicerofosfolípidos o simplemente fosfolípidos.

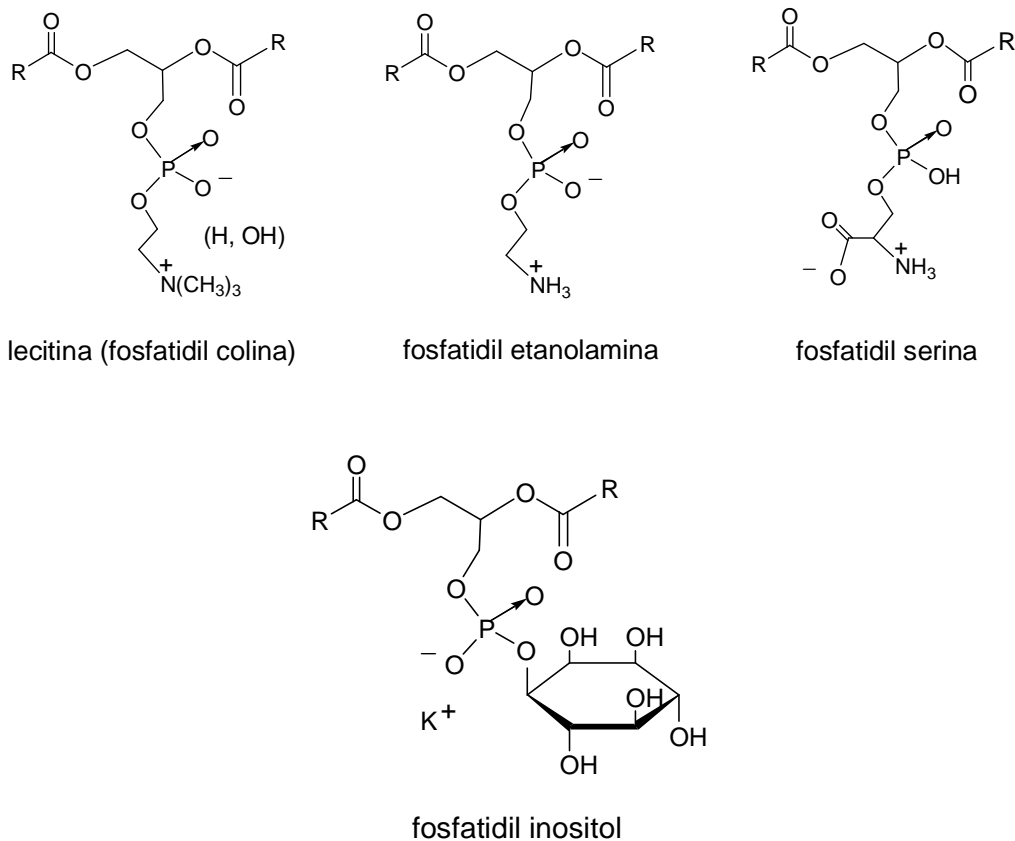


Fig. 8. Estructuras de fosfolípidos.

Por acción de enzimas que operan realizando hidrólisis selectiva de los enlaces éster en los fosfolípidos, pueden obtenerse lisofosfolípidos o fosforil éster o el ácido fosfatídico. Las fosfolipasas A₁ y A₂ hidrolizan los ésteres en

posición 1 y 2 de las moléculas de fosfolípido produciendo los lisofosfolípidos como la lisofosfatidilcolina (LPC), lisofosfatidiletanolamina (LPE), etc. (figura 10). La fosfolipasa C hidroliza el enlace fosfatidil éster para dar diacilglicerol y fosforil éster. En cambio la fosfolipasa D hidroliza la base y produce ácido fosfatídico y el alcohol correspondiente (ver figura 11).

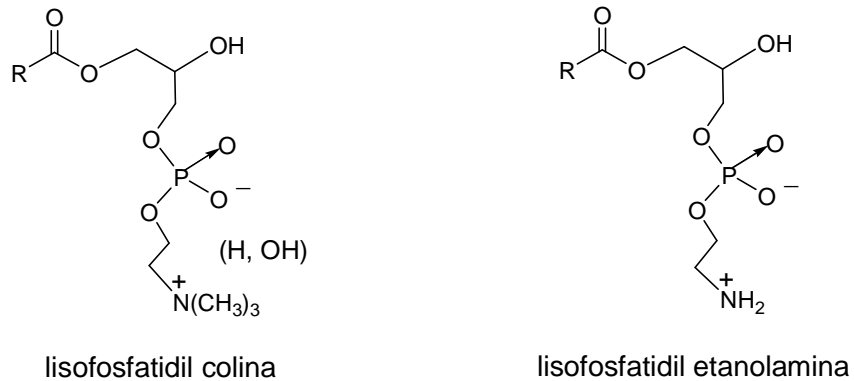


Fig.10. Estructuras de lisofosfolípidos.

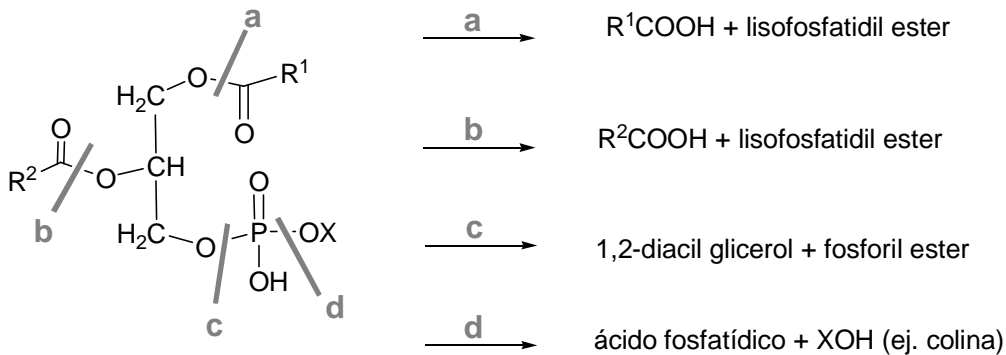


Fig.11. Sitios de hidrólisis de los glicerosfosfolípidos por fosfolipasas.

Es importante destacar que cada clase de fosfolípido de membrana presenta una variedad de AG asociados a ellos; por ejemplo, la fosfatidilcolina no es un compuesto, sino un grupo de compuestos que contiene el mismo grupo de fosfocolina pero diferentes cadenas de AG. Estos compuestos se conocen como especies moleculares de PC.

Las especies moleculares de una clase de lípido determinado, son moléculas individuales que difieren en el tipo o combinación de las cadenas acílicas. El número teórico de especies moleculares en una clase de lípido puede calcularse del número total de diferentes acilos presentes (n) y del número de grupos acilos en cada molécula (x) y es n^x (2).

La segunda clase de lípidos de membrana cuantitativamente importante son los esfingolípidos. La estructura básica de esta molécula es la esfingosina (figura 12). Esta molécula posee la estructura de los glicerolípidos con algunas diferencias: la primera cadena hidrocarbonada es siempre de 15 átomos de carbono con una doble ligadura en posición 1 (15:1), la diferencia es que está unida al glicerol por un enlace simple C-C, más que por un grupo éster como en los glicerolípidos, el glicerol retiene su hidroxilo. En el segundo carbono puede encontrarse un AG unido al glicerol por un enlace amida. El grupo polar puede contener un grupo fosfato más colina dando origen a la esfingomielina (SM), un grupo hidroxilo (origina las ceramidas), un azúcar simple (cerebrósidos) o un polisacárido complejo (gangliósidos).

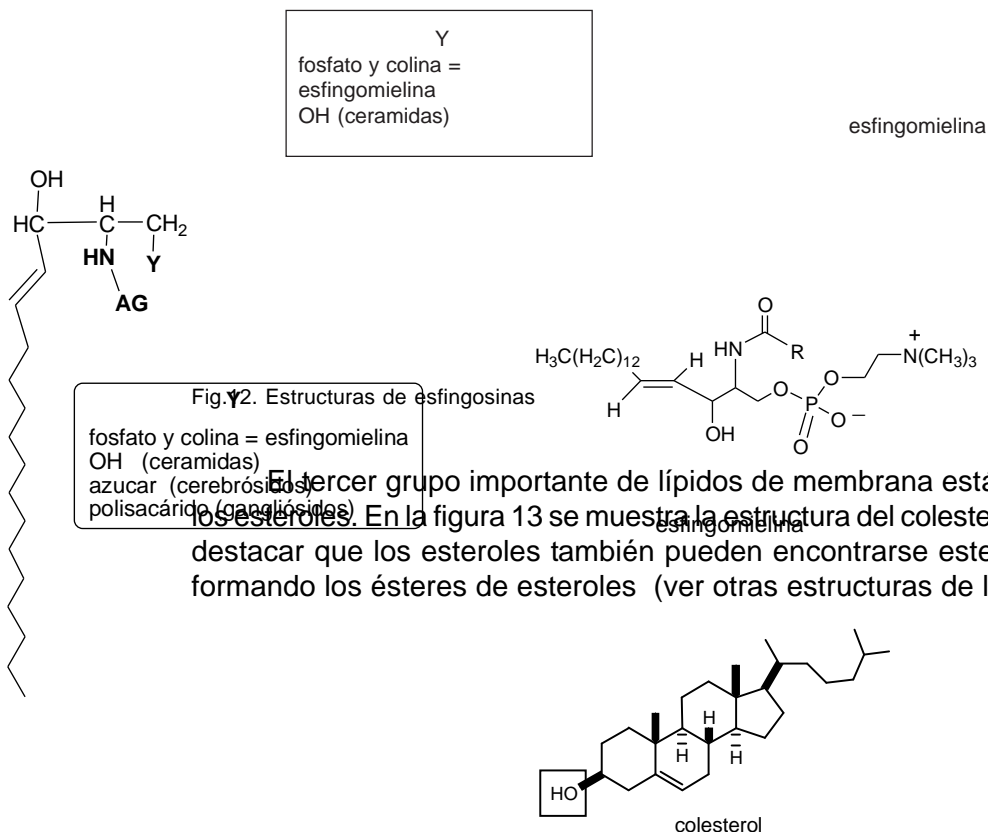


Fig.13. Estructura del colesterol.

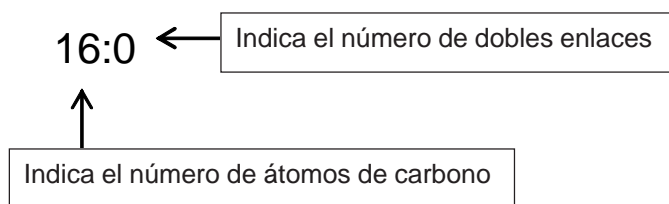
Los AG constituyentes de lípidos de membranas, son cadenas hidrocarbonadas largas que poseen un grupo terminal carboxilo y un metilo en el otro extremo.

Al presente han sido identificados más de 1000 AG provenientes de fuentes naturales. Respecto a los AG de origen animal, hay cinco de ellos que son los más abundantes: ácidos palmítico, esteárico, oleico, linoleico y araquidónico.

Los AG se identifican con un nombre trivial, un nombre sistemático y un identificador numérico. Como ejemplo veamos al ácido palmítico que es un AG de 16 átomos de carbono.

Nombre trivial: ácido palmítico Nombre sistemático: ácido hexadecanoico

Identificador numérico: 16:0, la clave del identificador numérico está dada por el significado de los dos números separados por los dos puntos:



Cuando en la molécula se presentan dobles enlaces es necesario indicar su posición, para ello al identificador numérico se le agrega el símbolo Δ seguido de un número que indica la localización del doble enlace contando la posición del carbono desde el carboxilo terminal del AG que es el carbono número 1.

Ejemplo ácido oleico 18:1 Δ 9, que es un AG de 18 átomos de carbono con una doble ligadura en la posición 9. El ácido linoleico 18:2 Δ 9, 12, es un AG de 18 átomos de carbono con dos dobles enlaces en las posiciones 9 y 12.

Los AG pueden agruparse en familias de acuerdo al número de dobles enlaces en la molécula. Los AG sin dobles enlaces se llaman saturados y se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Ácidos grasos saturados comunes

Fórmula general $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$

Átomos de carbono en la cadena	Nombre sistemático	Nombre trivial
2	Etanoico	Acético
4	Butanoico	Butírico
6	Hexanoico	Caproico
8	Octanoico	Caprílico
10	Decanoico	Cáprico
12	Dodecanoico	Laúrico
14	Tetradecanoico	Mirístico
16	Hexadecanoico	Palmítico
18	Octadecanoico	Esteárico
20	Eicosanoico	Araquídico

Los AG que tienen un doble enlace en la molécula se denominan monoinsaturados y se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Ácidos grasos monoinsaturados.

Fórmula general $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_m-\text{COOH}$

Símbolo	Nombre trivial	Familia
16:1 Δ 9	Palmitoleico	n-7, ω -7
18:1 Δ 9	Oleico	n-9, ω -9
18:1 Δ 6	Petroselínico	n-12
18:1 Δ 11	Cis-vacénico	n-7
20:1 Δ 9	Gadoleico	n-11
20:1 Δ 11	Cetoleico	n-9
22:1 Δ 13	Erúcico	n-9

Aquellos AG con más de dos dobles enlaces se denominan poliinsaturados. Para los AG monoinsaturados a poliinsaturados se utiliza también otra clasificación conocida como omega (ω). El grupo ω se determina por el número de átomos de carbono entre el metilo terminal de la molécula y el doble enlace. Ejemplo si el doble enlace más cercano al metilo terminal se posiciona a 3 átomos de carbono, el AG se conoce como ω -3 o AG n-3. Este tipo de AG se encuentra en grandes cantidades en los peces. El ácido oleico en la clasificación ω es n-9.

Ac. oleico: 18:1 Δ 9 n-9

En las grasas provenientes de animales se encuentran cuatro familias ω de AG poliinsaturados, ellas se conocen como n-3, n-6, n-9 y n-7. Veamos entonces ejemplos de algunas familias de poliinsaturados:

n - 6

linoleico 18:2

γ linolénico 18:3

dihomo- γ -linolénico 20:3 Δ 8,11,14

araquidónico 20:4 Δ 5,8,11,14

Ac. araquidónico $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_4-(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_4-(\text{CH}_2)_2-\text{COOH}$ n-6 20:4

n - 3

α -linoleico 18:3

Estearidónico 18:4

Eicosanopentaenoico (EPA) 20:5 Δ 5,8,11,14,17

Ac. Eicosanopentaenoico $\text{CH}_3-\text{CH}_2-(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_5-(\text{CH}_2)_2-\text{COOH}$ n-3 20:5

Los AG ω -6 y ω -3 son denominados esenciales porque no pueden ser generados a partir de precursores en el sistema metabólico humano y deben entonces ser provistos por la dieta.

Existe una clasificación para los AG insaturados que está relacionada a la estereoquímica del doble enlace (en base a la disposición espacial de los átomos de H unidos al doble enlace). En la naturaleza la mayor parte de los AG tienen los átomos de H en los dobles enlaces en configuración *cis*, también puede ocurrir que se presenten en configuración *trans* como en el caso de los AG provenientes de los TG de las margarinas a consecuencias del proceso de fabricación⁽³⁾. La configuración *cis* introduce una curvatura en la molécula de AG, en cambio la configuración *trans* no, por ello la estructura tridimensional no es la misma. Los ácidos grasos con dobles enlaces *cis* favorecen las estructuras tridimensionales cónicas en los lípidos de membrana, y al ocupar más área tridimensional propician el movimiento molecular, incrementando la fluidez. Por el contrario, los ácidos grasos con dobles enlaces *trans* promueven estructuras tridimensionales cilíndricas en los lípidos de membrana, y favorecen el contacto entre moléculas vecinas, disminuyendo la fluidez (ver figura 14) y pueden ser responsables de las propiedades aterogénicas de los AG *trans*.

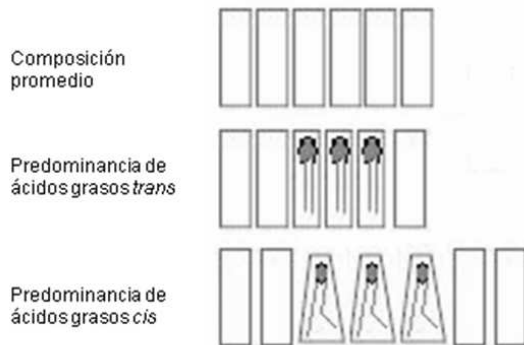


Fig. 14. Estructura tridimensional de los lípidos de membrana con ácidos grasos insaturados.

Roles de los lípidos en las membranas biológicas

Para comprender el rol de los lípidos en las membranas es necesario tener en cuenta que muchas de sus funciones biológicas están relacionadas a su interacción con las proteínas presentes en el ambiente de la membrana. En conjunto, lípidos y proteínas confieren las siguientes funciones a la célula: barrera permeable y selectiva para el paso de solutos, interfaz para la recepción de señales del medio extracelular y para la transducción de estas señales hacia el interior de la célula. En las organelas, lípidos y proteínas interactúan también para mediar el paso de solutos y de señales. En la membrana de ciertas organelas además, la interacción entre lípidos y proteínas permite la segregación de componentes que se van sintetizando, de tal forma que la composición de

las distintas estructuras subcelulares se preserva durante el ciclo de vida de la célula.

Las proteínas de membrana se organizan topológicamente en la bicapa lipídica de acuerdo a las características de los grupos R de sus aminoácidos. Los grupos polares generalmente se encontrarán dirigidos hacia los compartimientos acuosos (espacio intra y extra-celular, interior de canales iónicos o de transportadores de sustancias polares). Los grupos R no polares se encontrarán interactuando con la región no polar de la bicapa lipídica. Así, existen proteínas que interactúan únicamente con la región polar de los lípidos de membrana (proteínas periféricas) o proteínas que penetran o atraviesan la bicapa, formando parte de la estructura de la misma (proteínas integrales). Las proporciones de proteína/lípido varía enormemente entre diferentes membranas, por ejemplo en la membrana plasmática de las células de mielina (que rodean las fibras nerviosas) la proporción es de 1:9 y en la membrana mitocondrial externa de 1:1.

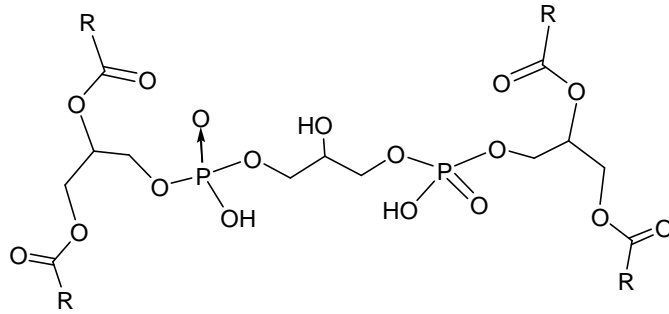
A continuación listamos las principales interacciones que ocurren entre lípidos y proteínas en las membranas:

- Algunas proteínas se encuentran unidas covalentemente a cadenas hidrocarbonadas (miristato, palmitato, farnesilo o geranil-geranilo –los dos últimos isoprenoides–) o a fosfolípidos como el glicosilfosfatidil inositol. Esto permite que las proteínas se encuentren ancladas en la bicapa. La hidrólisis de la porción hidrocarbonada por enzimas intracelulares genera cambios conformacionales en la proteína, y permite modular la actividad de ésta^(7,10).
- Los lípidos de membrana (principalmente fosfoinosítidos y diacilglicerol) pueden ser reconocidos por sitios de unión específicos presentes en las proteínas de membrana, tanto integrales como periféricas, o también por proteínas que conforman el citoesqueleto^(11,12).
- El grosor y la curvatura de la bicapa pueden resultar de la interacción entre regiones polares y no polares de lípidos y proteínas, y la forma tridimensional de éstas moléculas^(4,5).
- Los lípidos que forman parte estructural de la bicapa pueden ser convertidos en una amplia gama de intermediarios de señalización celular (10,12). Un ejemplo de esto es la acción de las fosfolipasas, descrita previamente en este capítulo.

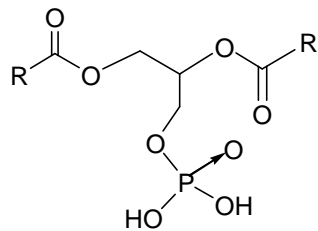
Los lípidos y las proteínas coexisten formando agregados en la bicapa. Estos agregados son denominados microdominios o balsas lipídicas, debido a que contienen una composición de lípidos y proteínas diferente al de la bicapa que los rodea. Sin embargo, la composición de estos microdominios no es estática: lípidos y proteínas son intercambiados hacia y fuera de los microdominios, con cursos temporales que van de fracciones de segundo a varias horas. Los microdominios, con diámetro promedio de varios cientos de nanómetros, esta-

rían involucrados en diversos procesos relacionados con la actividad de proteínas de membrana y la generación de señales celulares^(4,7).

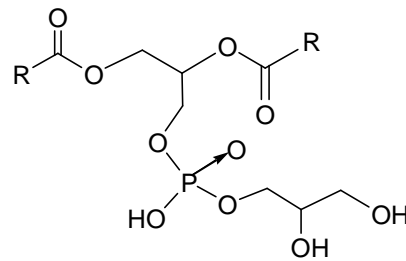
Otras estructuras de lípidos



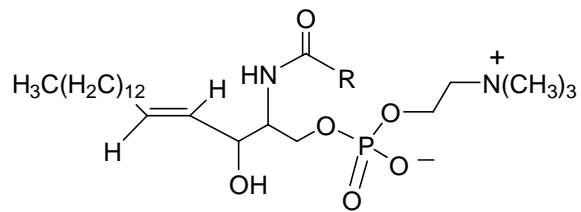
cardiolipina



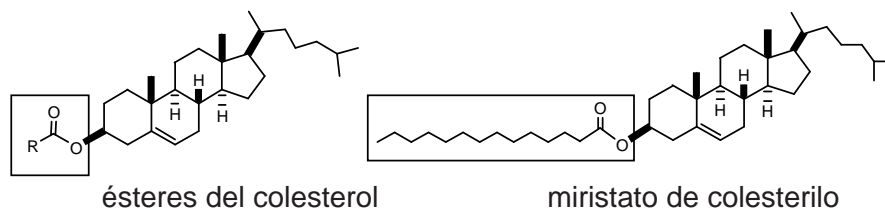
ácido fosfatídico



fosfatidil glicerol



esfingomielina



Referencias bibliográficas

1. CHRISTIE, W.W. Fatty acids and lipids in: Gas Chromatography and Lipids. A practical guide. Scotland, The Oily Press Ltd.; 1989:81-83.
2. GUNSTONE, F.D. and HERSLÖF, B.G. in A lipid glossary, Scotland, The Oily Press Ltd. 1992:11.
3. LAPOSATA, M. Fatty acids. Biochemistry to clinical significance. *Am.J.Clin.Pathol.* 1995; 104:172-179.
4. SPRONG, H., VAN DER SLUIJS, P., VAN MEER, G.. How proteins move lipids and lipids move proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2001; 2: 504-513.
5. ESCRIBÁ, P.V. Membrane-lipid therapy: a new approach in molecular medicine. *TRENDS in Molecular Medicine.* 2006; 12: 34-43.
6. LODISH, H., BERK, A., KAISER, C., KRIEGER, M., SCOTT, M., BRETSCHER, A., PLOEGH, H., MATSUDAIRA, P. in Biomembrane Structure. Molecular Cell Biology, 6ta Edición. W.H. Freeman Ed. 2008: 411-436.
7. VEREB, G., SZOLLOSI, J., MATKO, J., NAGY, P., FARKAS, T., VÝGH, L., MATYUS, L., WALDMANN, T.A., DAMJANOVICH, S. Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 2003;100: 8053-8058.
8. MAXFIELD, F.R., TABA, I. Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature.* 2005; 438: 612-619.
9. MCKERSIE, B.D., THOMPSON, J.E. Influence of plant sterols on the phase properties of phospholipid bilayers. *Plant Physiol.* 1979; 63:802-805.
10. EYSTER, K.M. The membrane and lipids as integral participants in signal transduction: lipid signal transduction for the non-lipid biochemist. *Advan. Physiol. Educ.* 2007; 31:5-16.
11. HURLEY, J.H. Membrane binding domains. *Biochim. Biophys. Acta* 2006; 1761: 805-811.
12. FERNANDIS, A.Z., WENK, M.R. Membrane lipids as signaling molecules. *Curr. Opin. Lipidol.* 2007; 18:121-128.