

COMPOSICIÓN LIPÍDICA DE LA MEMBRANA MITOCONDRIAL INTERNA DEL MÚSCULO DE *Ascaris suum*

Lipidic Composition of Inner Mitochondrial Membrane from *Ascaris suum*

Evelin Rojas Villarroel¹, Zadila Suárez de Mata², Pedro Izquierdo Córser¹, Gabriel Torres Ferrari¹ y Aiza García Urdaneta¹

¹Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia, Apartado 15252. Maracaibo, Venezuela.

²Departamento de Biología Celular, Laboratorio de Bioquímica de Parásitos, Universidad Simón Bolívar.

Sartenejas, Venezuela. E-mail: evelinro@yahoo.com; zsuarez@usb.ve; izquier@cantv.net

RESUMEN

Las proteínas y los lípidos juegan un rol importante en la estructura y función de las membranas celulares y subcelulares. Diversos investigadores han estudiado acerca de los lípidos que componen la membrana mitocondrial de muchos organismos y han encontrado principalmente fosfolípidos (cardiolipina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina) y colesterol. La composición lipídica de la membrana mitocondrial interna (mmi) de ningún helminto se ha determinado hasta ahora. *Ascaris suum*, parásito helminto que habita el intestino delgado del cerdo y metaboliza los carbohidratos hasta ácidos grasos de cadena corta en condiciones anaeróbicas, ha sido utilizado como modelo en estudios de bioquímica comparativa. En este estudio, se aisló mediante centrifugación diferencial en sacarosa, la fracción mitocondrial del músculo de *Ascaris* y luego se separó la mmi por centrifugación en presencia de fosfato de potasio 10mM. La fracción de lípidos de la mmi fue extraída por el método de Folch y aplicada en cromatoplacas para Cromatografía en Capa Fina (CCF). Mediante ensayos enzimáticos para la determinación indirecta de colesterol y triacilglicéridos, y con CCF se encontró que colesterol, fosfolípidos y otro lípido no identificado, están presentes en la membrana interna de la mitocondria del parásito. La fracción de fosfolípidos separada por CCF fue extraída de la sílica gel con cloroformo: metanol: H₂O (30:50:20) y analizada en Cromatografía de Gases (CG) para determinar su composición en ácidos grasos. Los ácidos oleico, palmítico, linoleico y esteárico se encontraron en: 8,38; 7,98; 6,39 y 6,28%, respectivamente. Otros ácidos como el linolénico y mirístico, estaban en menor proporción (1,65 y 0,50%, respectivamente), similar a lo reportado en otras investigaciones referidas a la composición lipídica mitocondrial de

otros organismos, lo que sugiere un papel importante de estos ácidos grasos para la función mitocondrial.

Palabras clave: Colesterol, fosfolípidos, lípidos, membrana mitocondrial interna, mitocondria.

ABSTRACT

The lipids and proteins play an important role in cellular and subcellular membranes structure and function. Several researchers have studied mitochondrial membrane lipids from many organisms, observing mainly phospholipids (cardiolipin, phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine) and cholesterol. The lipidic composition of inner mitochondrial membrane (mmi) of none helminthes has been determinate. *Ascaris suum*, one helminthe parasite that inhabits the small intestine of pig and metabolizes carbohydrates to short chain volatile fatty acids of in aerobic conditions, has been used as a model in comparative biochemistry studies. In this study, the mitochondrial fraction from *Ascaris* muscle was isolated by means of differential centrifugation in sucrose and the mmi was separated by centrifugation in 10mM Potassium Phosphate. The mmi lipidic fraction was extracted by Folch method and applied on plate for Thin Layer Chromatography (TLC). By mean of indirect enzymatic assays for cholesterol and triglycerides determination, and with TLC, cholesterol, phospholipid and other unknown lipid were found in parasite inner membrane. The fraction of phospholipids separated by TLC was extracted from silica gel with chlorophorm: methanol: H₂O (30:50:20) and analyzed by Gas Chromatography (GC) to determine fatty acids composition. Oleic, palmitic, linoleic and stearic acid were present in 8.38; 7.98; 6.39 and 6.28%, respectively. Others acids as linolenic and miristic were found in minor proportion (1.65 and 0.50%), in concordance with reports of researches about mitochondrial lipidic composition in other organisms that

suggests an important role of these fatty acids in mitochondrial function.

Key words: Cholesterol, phospholipids, lipids, inner mitochondrial membrane, mitochondria.

INTRODUCCIÓN

Las membranas celulares constituyen un arreglo complejo no uniforme, de lípidos y proteínas. Tradicionalmente se ha señalado a los fosfolípidos como los principales constituyentes lipídicos de estas estructuras, sin embargo dependiendo del tipo y la dinámica de membrana, existen dominios formados por fosfolípidos y colesterol llamados balsas lipídicas que juegan un papel fundamental en la regulación de proteínas de membrana, así como en la secreción y transducción de señales [3, 5, 9, 16, 18, 25, 28, 31].

La composición lipídica de membranas celulares de diversos organismos ha sido estudiada [2, 6, 9, 10-12], encontrándose que más del 50% de la membrana celular de eucariotas está constituida por glicerofosfolípidos, esfingolípidos, los cuales en asociación con el colesterol, forman interacciones fosfolípido/colesterol. Gloster y col. [10] determinaron la composición lipídica de las fracciones microsomales y mitocondriales de homogenizados de miocardio humano; Gray y col. [11] analizaron la composición lipídica de mitocondrias y núcleos de epidermis de cerdo y humano; Tuckey y col. [30] purificaron los fosfolípidos a partir de la fracción de membrana mitocondrial interna (mmi) de cuerpo lúteo bovino. Así mismo, Holland y col. [12] determinaron la composición de la mmi del cuerpo lúteo porcino; Hovius y col. [13] analizó la composición de fosfolípidos de la mitocondria intacta y de todas las sub-fracciones; Ardail y col. [2] estudiaron dos fracciones de membrana, de densidad intermedia (sitios de contacto) entre las membranas mitocondriales interna y externa de células hepáticas. Los resultados de estos estudios indican que colesterol, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, cardiolipina, lisofosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol son los fosfolípidos predominantes en la mmi de diferentes células, lo que hace sugerir que los lípidos presentes en este organelo se han conservado a través de la evolución [9].

El aislamiento, purificación y caracterización de los componentes de las membranas biológicas, dependen en gran medida de la composición lipídica de éstas, ya que para reproducir *in vitro* las actividades y funciones que exhibe *in vivo*, el componente en estudio debe ser incorporado en liposomas (vesículas artificiales de membrana) cuya composición lipídica sea lo más parecida posible a la membrana en estudio.

Hasta la fecha la composición lipídica de la mitocondria de helmintos no ha sido determinada. A partir de los años 80 el número de investigaciones en bioquímica de parásitos ha ido en ascenso y *Ascaris* ha sido ampliamente utilizado como el helminto modelo en estudios de bioquímica comparativa, de diversa índole.

Ascaris es el gusano cilíndrico no segmentado más grande que parasita el intestino delgado de humanos y cerdo. Se ha demostrado que este parásito no metaboliza los carbohidratos hasta CO₂ y H₂O como en el huésped mamífero, sino que su mitocondria funciona anaeróbicamente y la glucosa es metabolizada hasta ácidos grasos volátiles de cadena corta (butírico, valérico, metilbutírico, metilvalérico, etc.) [1, 14, 17, 21, 23, 24].

En 1992, Parra [19] y Rojas [22], aislaron respectivamente, los dominios F1 y Fo de la F1Fo ATP sintetasa de *Ascaris*; enzima multisubunidad presente en la mmi del parásito, que sintetiza ATP por fosforilación oxidativa. Para la reconstitución de este complejo enzimático a partir de sus dominios aislados por separados, se requiere conocer la composición lipídica de la mmi del parásito. En virtud de ello se propuso determinar, por primera vez en helmintos, la composición lipídica de la mitocondria de *Ascaris*.

El hallazgo de variaciones en la composición y/o funciones celulares entre huésped y parásito, constituyen además una herramienta valiosa para el diseño racional de drogas que permitan controlar la infección.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se utilizó *Ascaris suum* como animal de experimentación. Los helmintos fueron obtenidos del intestino delgado de cerdos procesados en los mataderos del Tuy (Santa Teresa de Tuy, Edo. Miranda) y de Caracas (carretera vieja de Los Teques, Edo. Miranda). Se mantuvieron en solución salina isotónica durante su traslado al laboratorio y en un período no mayor de 24 horas se les extrajo el tejido muscular mediante disección en frío.

Aislamiento de la fracción mitocondrial

La fracción mitocondrial proveniente de 41,6 g de músculo de *Ascaris* se obtuvo por el método de centrifugación diferencial en sacarosa, según describe Saz y Lascure [23].

Obtención de la membrana mitocondrial interna

Para obtener la fracción de membrana mitocondrial interna se utilizó una modificación del procedimiento descrito por Comte y Gantheron [7].

La fracción mitocondrial proveniente de 20 g de músculo del parásito se resuspendió en Buffer fosfato de K⁺ 10 mM, pH: 7,4 y se llevó a un volumen final de 4 mL, ésta se dejó por 20 minutos a 0°C. Se homogenizó y centrifugó a 105.000 × g durante 1 hora en una ultracentrífuga Beckman rotor Ty65, para separar la membrana mitocondrial externa y el espacio intermembranal, de la membrana mitocondrial interna contenida en el sedimento.

El sedimento se resuspendió en Buffer Tris/HCl 10 mM; sacarosa 0,25 M; pH 7,4 y se centrifugó a $11.500 \times g$ durante 15 minutos en una centrifuga Sorvall rotor SS34 para precipitar los mitoplastos y mitocondrias que no se rompieron. El sedimento de $11.500 \times g$ fue resuspendido en Buffer Tris/HCl 10 mM; sacarosa 0,25 M; pH 7,4 (10 mg/mL de proteínas) y sonificado 2 veces en frío a 30 watts durante 15 segundos en un sonicador de Microtip (P-1, 3, 2mm) marca Microson con intervalos de enfriamiento de 1 minuto.

El sonicado fue centrifugado a $48.000 \times g$ por 30 minutos a 4°C para obtener en el sedimento la fracción de membrana mitocondrial interna.

Extracción de lípidos

Los lípidos de la mmi fueron extraídos utilizando el procedimiento de Folch [8] modificado por Shaikh [26].

Análisis químicos

Se realizaron determinaciones químicas a las preparaciones de mmi y el extracto de Folch.

Fosfatasa alcalina. Se determinó la actividad de la fosfatasa alcalina por el método monoéster ortofosfórico fosfohidrolasa de HUMAN. Se agregaron 10 μL de muestra a 500 μL del buffer (Dietanolamina 1.000 mmol/L, cloruro de magnesio 0,5 mmol/L), se mezcló e incubó por un minuto a 37°C y se agregó 125 μL del sustrato. Se mezcló y midió el cambio de absorbancia por minuto durante 4 minutos en un espectrofotómetro Microlab 2000 de MERCK. El ΔA 405nm/min se multiplicó por el factor de conversión 2757 que provee la casa comercial para expresar la concentración en U/L.

Colesterol. Se determinó la concentración de colesterol por el método CHOP-PAP de HUMAN, Para el ensayo se agregaron 5 μL de muestra y estándar de colesterol (200 mg/dL), a 500 μL del reactivo enzimático (Buffer fosfato pH 6,5 100 mmol/L, 4-aminoantipirina 0,3 mmol/L, Fenol 5 mmol/L, Peroxidasa 5 KU/L, Colesterolesterasa >150 U/L, Colesteroloxidasas >100 U/L, Azida de sodio 0,05%), se mezcló e incubó por 5 minutos a 37°C y se leyó la absorbancia a 546 nm contra blanco de reactivo enzimático en espectrofotómetro Microlab 2000 de MERCK. Se calculó la concentración de colesterol (mg/dL) multiplicando la absorbancia de la muestra por el factor de calibración (obtenido al dividir la concentración del estándar por la absorbancia del mismo).

Triacilglicéridos. Para la prueba se agregaron 5 μL de muestra y estándar de triacilglicéridos (200 mg/dL) a 500 μL del reactivo enzimático de HUMAN (Buffer PIPES 40 mmol/L pH 7,5, 4-clorofenol 5 mmol/L, iones de magnesio 5 mmol/L, ATP 1 mmol/L, lipasa ≥ 150 U/mL, peroxidasa $\geq 0,5$ U/mL, glicerolquinasa $\geq 0,4$ U/mL, sodium azide 0,05%). Se incubó la mezcla por 5 minutos a 37°C . La absorbancia del estándar y de la muestra se leyeron frente al blanco del reactivo enzimático a una longitud de onda de 546 nm en espectrofotómetro Mi-

croLab 2000 de MERCK. Se calculó la concentración de triacilglicéridos (mg/dL) multiplicando la absorbancia de la muestra por el factor de calibración (obtenido al dividir la concentración del estándar por la absorbancia del mismo).

Separación de los lípidos por Cromatografía en Capa Fina (CCF)

La CCF se realizó siguiendo la técnica descrita por Tuckey y Stevenson [30]. La fracción de lípidos obtenida en la extracción descrita en la sección anterior, se aplicó 4 veces en placas cubiertas con sílica gel H. de 0,25 mm. La CCF se desarrolló en hexano: éter dietílico: ácido acético (80:20:1, V/V). Las placas se nebulizaron con 50% H_2SO_4 y secaron en estufa a 100°C durante 10 minutos. Los componentes presentes se identificaron mediante comparación de sus Rf con los de soluciones estándares de colesterol, triacilglicéridos y fosfolípidos (HUMAN) aplicados en la misma placa. Se corrieron 4 cromatoplasmas para cada muestra y se incluyó además un control (extracto lipídico de yema de huevo) por cada placa.

Extracción de fosfolípidos

El componente identificado en CCF como fosfolípidos fue separado raspando el área de la sílica que los contiene. Esta fracción fue extraída con 3 volúmenes de 5 mL cada uno, de $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (30:50:20), se juntaron los tres extractos y se agregó 10,5 mL de CHCl_3 y 2,7 mL de KCl 0,88%. Se agitó y dejó reposar hasta la separación en dos fases, la fase acuosa se descartó, y la fase orgánica, que contiene los fosfolípidos, se evaporó a sequedad bajo corriente de N_2 a 40°C y se le agregó 0,3 mL de CHCl_3 . A los viales se les aplicó una corriente de nitrógeno, se sellaron y se guardaron en refrigeración a -20°C hasta su uso.

Perfil de ácidos grasos. Cromatografía de Gases (CG)

Se determinó la composición de ácidos grasos mediante CG, de las fracciones de mmi, extracto de Folch y fosfolípidos extraídos de CCF. Para esto, las muestras fueron metiladas como sigue:

Las preparaciones se evaporaron a sequedad y se agregaron 2 mL de KOH 0,5N y 10 mL de metanol. Posteriormente se calentó a 70°C en baño María por 15 minutos, se agregó 4 mL de trifluoruro de boro en metanol ($\text{BF}_3\text{CH}_3\text{OH}$) al 20% y se taparon los tubos.

Cada tubo cerrado se calentó a 70°C por 30 minutos, se dejó enfriar para después añadir 4 mL de agua deionizada. Luego se agregaron 8 mL de hexano, y se agitó por 10 minutos. De la capa orgánica se midieron 10 mL y a esto se agregó 8 mL de hexano, se agitó por 10 minutos. Posteriormente se le agregó a la mezcla 0,8 g de Na_2SO_4 y se agitó. Luego se filtró y el sulfato de sodio remanente se reextrajo con 2 mL de hexano. Los dos filtrados se juntaron, se evaporó a sequedad y se reconstituyó con 1 mL de hexano. De cada preparación se inyectaron 4 μL (por triplicado) en un cromatógrafo marca Shi-

madzu GC-14B, equipado con un inyector, Splitt-Splittess, una columna capilar de sílica fundida Omega Wax Supelco 320 (30 m, 0,25 m) y un detector de ionización a la llama.

Las condiciones cromatográficas fueron: temperatura del inyector: 250°C, temperatura del detector: 260°C, temperatura de la columna: temperatura inicial: 200°C; a los 15 minutos se aumentó 4°C por minuto hasta alcanzar 240°C, el tiempo final de corrida fue de 35 min. Los tiempos de retención y áreas de los picos, fueron registrados utilizando Software Shimadzu Class-vp.

Los ácidos grasos se identificaron y cuantificaron usando como referencia los tiempos de retención y área de los picos de los estándares: RM-3 (N° catálogo 1086 marca Matreya) y PUFA N° 1 (N° catálogo 4-7033 marca Supelco). La concentración de los ácidos grasos se expresó de manera porcentual.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis químicos

En la TABLA I se muestran las concentraciones de fosfatasa alcalina, colesterol y triacilglicéridos del preparado de mmi y extracto de Folch.

La actividad de la fosfatasa alcalina ha sido utilizada previamente como marcador de la membrana mitocondrial externa (mme) en diferentes tejidos [27]. No se detectó actividad de la fosfatasa alcalina en la preparación de mmi ni en el extracto de Folch lo que indica que la metodología utilizada fue adecuada para obtener una preparación libre de mme, resultados que se asemejan a los reportados en investigación realizada por Tuckey [30] al purificar la mmi de cuerpo lúteo de bovino. Sin embargo, no se descarta que dichas preparaciones pudieran contener cantidades mínimas de proteínas unidas covalentemente a lípidos, ya que la pureza de las preparaciones no fue completamente evaluada a razón de las cantidades de extracto obtenido.

La concentración de colesterol en la preparación de mmi cruda fue 58 mg% (40%) mientras que en el extracto de Folch de dicha membrana, se encontró solo 9 mg% (100%). Los resultados obtenidos se corresponden con los reportados en di-

versos estudios donde han demostrado la presencia de colesterol en membranas biológicas, como la mmi. En tal sentido, Gloster y Harris [10] encontraron 8 mg% de colesterol en la fracción mitocondrial de homogenados de miocardio humano, mientras que Gray y Yardley [11] encontraron 60% colesterol en mitocondria de epidermis humana; 47% de colesterol en mitocondria de epidermis de cerdo.

Por otro lado, en mmi de corteza adrenal de bovino, Cheng y Kimura [6] reportaron entre 2,2 a 3,4 mol% de colesterol, mientras que Holland y Stevenson [12] reportaron 28,4 nmol de colesterol por mg de proteína, en mmi del cuerpo lúteo porcino.

Estos resultados hacen sugerir que el colesterol está presente en la mmi de diversos organismos pero que probablemente su concentración varíe dependiendo de cada especie y/o tipo celular.

Aunque los triacilglicéridos no son considerados lípidos importantes en la composición de las membranas biológicas, el hallazgo de este lípido en las preparaciones crudas de mmi de *Ascaris* (87mg%) y no en el extracto de Folch parecen contradictorias, si embargo esto posiblemente represente una reacción con glicerol endógeno o fosfoglicéridos ya que el ensayo utilizado para su determinación se basa en una reacción colorimétrica del glicerol 3-P después de la hidrólisis enzimática de los enlaces ésteres de los ácidos grasos y el glicerol. Otros autores también han reportado presencia de triacilglicéridos en preparaciones mitocondriales [10, 11].

Lee y col. [15] en un estudio acerca de los lípidos de huevos de *A. suum*, han reportado cantidades considerables de triacilglicéridos que aumentan proporcionalmente con el desarrollo embrionario de los huevos.

Cromatografía en capa fina

Cuando el extracto de Folch obtenido de mmi fue aplicado a cromatoplasas de sílica gel, se observaron tres componentes: uno de color marrón en el borde inferior de la placa (componente 1) con un Rf de 0,04; un segundo componente de color morado con un Rf de 0,35 (componente 2) y un tercer componente de color amarillo pálido con un Rf de 0,44 (componente 3) (TABLA II).

TABLA I

VALORES PROMEDIO* DE FOSFATASA ALCALINA, COLESTEROL Y TRIACILGLICÉRIDOS EN LA MEMBRANA MITOCONDRIAL INTERNA DE *Ascaris suum* / MEAN VALUES OF ALCALINE PHOSPHATASE CHOLESTEROL AND TRIACILGLICERYDES FROM INNER MITOCHONDRIAL MEMBRANE OF *Ascaris suum*

Preparación	Ensayo Químico				
	Fosfatasa Alcalina (U/L)	Colesterol		Triacilglicérido	
		(mg%)	%	(mg%)	%
mmi cruda	0 ± 0,00	58 ± 0,02	40	87 ± 0,01	60
Extracto de lípidos	0 ± 0,00	9 ± 0,01	100	0 ± 0,00	0

* Promedio de 2 determinaciones ± 1DE. DE: desviación estándar.

TABLA II
VALORES DE R_f DE LOS LÍPIDOS EXTRAÍDOS DE LA MEMBRANA MITOCONDRIAL INTERNA DE *Ascaris suum* SEPARADOS POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA /
RF* VALUES OF EXTRACTED LIPIDS FROM INNER MITOCHONDRIAL MEMBRANE OF *Ascaris suum* SEPARATED BY THIN LAYER CHROMATOGRAPHY

Preparaciones	CCF Valores de R _f
Estándares	
Colesterol	0,32 ± 0,001
Triacilglicéridos	0,90 ± 0,001
Fosfolípidos	0,04 ± 0,001
Control yema de huevo	
Componente 1	0,03 ± 0,001
Componente 2	0,30 ± 0,002
Componente 3	0,92 ± 0,001
mmi	
Componente 1	0,04 ± 0,001
Componente 2	0,35 ± 0,002
Componente 3	0,44 ± 0,003

* Promedio de cuatro (4) cromatografías.

Los R_f de los estándares de colesterol, triglicéridos y fosfolípidos fueron 0,32; 0,90 y 0,04, respectivamente. Se observaron asimismo los tres lípidos constituyentes de la yema de huevo (control): fosfolípidos, colesterol y triacilglicéridos con R_f de 0,03; 0,30 y 0,92, respectivamente.

Los componentes 1 y 2 presentes en la mmi se identificaron respectivamente como fosfolípidos y colesterol ya que sus R_f se corresponden completamente con el R_f de los estándares. Además las características físicas (color y forma de migración) de los componentes observados fueron idénticos a la de los estándares.

Por otro lado, el R_f del componente 3 no se corresponde con ninguno de los estándares, por lo que no fue identificado; sin embargo, se supone que puedan constituir ácidos grasos

libres ya que hay reportes en la literatura que señalan que en CCF, éstos migran entre el colesterol y los triacilglicéridos [30].

Estos hallazgos se correlacionan con los resultados de los análisis químicos: presencia de colesterol, fosfolípidos y ausencia de triacilglicéridos en el extracto de Folch obtenido de mmi.

El área ocupada por cada uno de los componentes separados en CCF, sugiere que en la mmi de *Ascaris* los lípidos están presentes en la siguiente proporción: fosfolípidos > componente 3 > colesterol.

Mediante CCF, Gloster y Harris [10] encontraron en la fracción mitocondrial de homogenados de miocardio humano ésteres de colesterol, colesterol libre, triacilglicéridos y fosfolípidos, así mismo, Gray y Yardley [11] separaron a través de este método, colesterol, triacilglicéridos y ácidos grasos libres de la mitocondria de epidermis de cerdo y humano; mientras que Holland y Stevenson [12] aislaron a través de CCF colesterol y fosfolípidos de la mmi de cuerpo lúteo porcino.

Es notorio que colesterol y fosfolípidos constituyen un denominador común en la determinación de la composición lipídica de la membrana mitocondrial en diversos organismos, además que la mmi de *Ascaris* se asemeja en cuanto a sus lípidos constituyentes, a la de mitocondrias aisladas de diferentes tejidos del hospedador.

Cromatografía de gases

La composición en ácidos grasos de las fracciones de mmi, extracto de Folch y extracto de fosfolípidos, se muestran en la TABLA III y FIG. 1.

En la fracción de fosfolípidos de *Ascaris* los ácidos oléico y palmítico mostraron los más altos porcentajes (8,38% y 7,98%, respectivamente). Diversos estudios han reportado la presencia de estos ácidos grasos en extracciones de fosfolípidos de mitocondria y/o mmi. En tal sentido, Gloster y Harris [10] reportan 14,45% de ácido oleico y 17,7% de ácido palmítico en fosfolípidos extraídos de la mitocondria de homogenados de

TABLA III
PORCENTAJE [†] DE ACIDOS GRASOS EN FOSFOLÍPIDOS DE LA MEMBRANA MITOCONDRIAL INTERNA DE *Ascaris suum* /
PERCENTAGE OF FATTY ACIDS IN PHOSPHOLIPIDS FROM INNER MITOCHONDRIAL MEMBRANE OF *Ascaris suum*

Ácidos Grasos	Número de pico	mmi cruda	Extracto de Folch	Extracto de Fosfolípidos
Mirístico (14:0)	1	ND ± 0,00	ND ± 0,00	0,50 ± 0,58
Palmítico (16:0)	2	10,74 ± 1,23	9,41 ± 0,07	7,98 ± 4,92
Esteárico (18:0)	3	14,14 ± 0,10	5,66 ± 0,30	6,28 ± 2,91
Oleico (18:1)	4	26,30 ± 0,39	10,65 ± 0,90	8,38 ± 6,09
Linoleico (18:2)	5	11,47 ± 0,31	ND ± 0,00	6,39 ± 3,78
Linolénico (18:3)	6	15,77 ± 0,01	ND ± 0,00	1,65 ± 1,91
Otros no identificados	NI	31,58 ± 0,01	74,28 ± 0,01	68,82 ± 0,01

*Promedio de tres determinaciones ± 1 D.E. ND: No detectado. DE: desviación estándar.

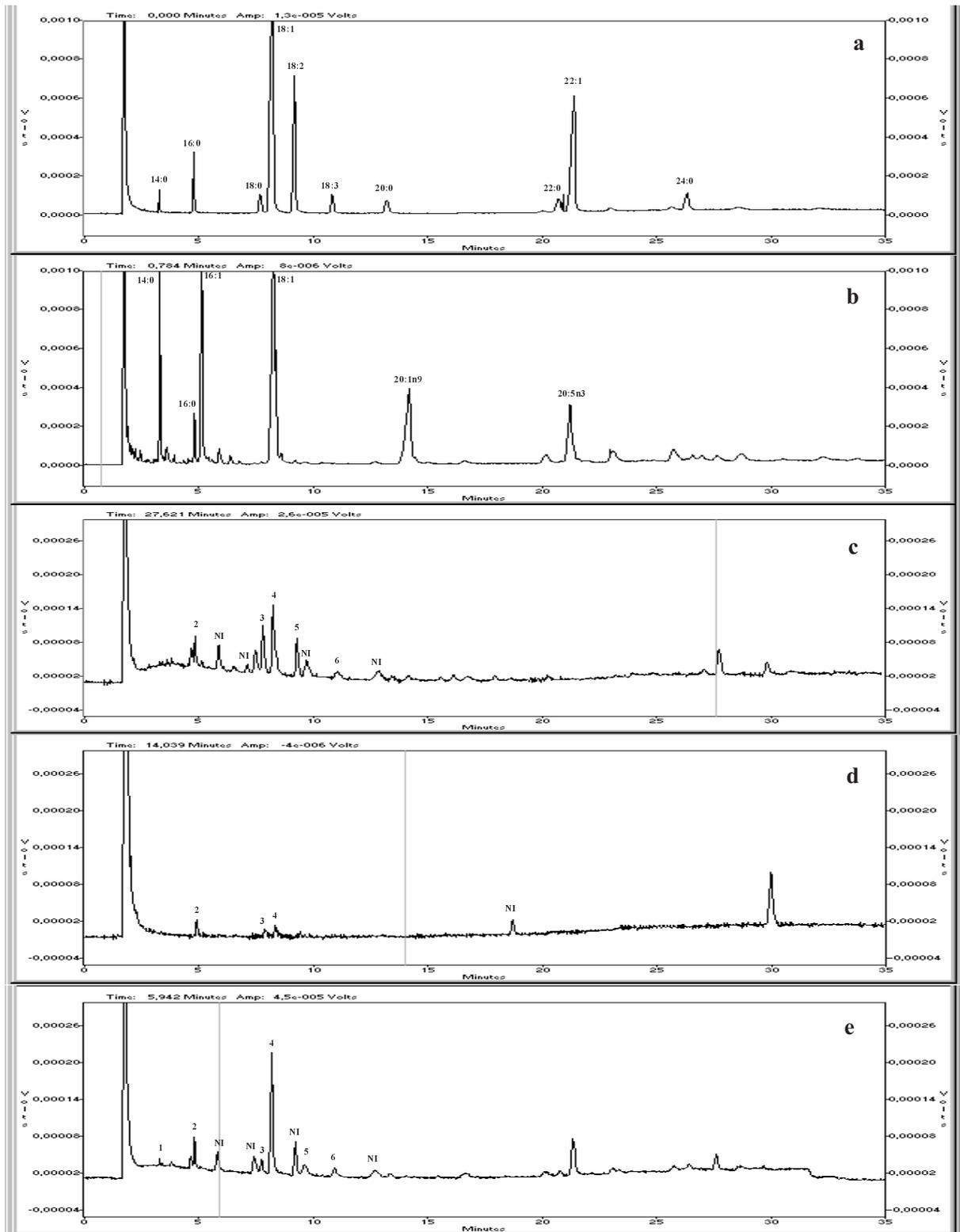


FIGURA 1. PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES EN EL EXTRACTO DE FOSFOLÍPIDOS DE LA MMI DE *Ascaris suum*. A. ESTÁNDAR DE ÁCIDOS GRASOS PUFA Nº 1 SUPELCO; B. ESTÁNDAR DE ÁCIDOS GRASOS RM-3 MATREYA; C. MMI; D. EXTRACTO DE FOLCH; E. EXTRACTO DE FOSFOLÍPIDOS. LOS NÚMEROS CORRESPONDEN A LOS ÁCIDOS GRASOS IDENTIFICADOS. NI: ÁCIDOS GRASOS NO IDENTIFICADOS / CANTITATION OF FATTY ACIDS BY GAS CHROMATOGRAPHY IN PHOSPHOLIPIDS EXTRACT FROM INNER MITOCHONDRIAL MEMBRANE OF *Ascaris suum* A. FATTY ACIDS STANDARD PUFA Nº 1 SUPELCO; B. FATTY ACIDS STANDARD RM-3 MATREYA; C. MMI; D. FOLCH EXTRACT; E. PHOSPHOLIPIDS EXTRACT. NUMBERS CORRESPOND TO IDENTIFIED FATTY ACIDS. NI= NOT IDENTIFIED FATTY ACIDS.

miocardio humano, mientras que Tuckey y Stevenson [30] encontraron 17,08% y 12,38% de ácidos oleico y palmítico respectivamente, en fosfolípidos de mmi de cuerpo lúteo bovino.

Por otro lado, Holland y Stevenson [12] encontraron porcentajes de 12,70; 15,54 y 10,11 de ácido oleico y 17,15; 11,19 y 10,39 de ácido palmítico en fosfolípidos de mmi de cuerpo lúteo, corazón e hígado de cerdo, respectivamente.

El porcentaje de ácido linoleico en mitocondria de *Ascaris* fue de 6,39%, a diferencia de otras investigaciones donde reportan 15,8% [10] y 14,98% [30] para este ácido en fosfolípidos de mitocondria. El porcentaje de ácido esteárico fue de 6,28 % diferente también a lo reportado de este ácido en mitocondria de otros organismos; 23,61% [10]; 27,9% [30] y 17,91; 10,40; 30,59 [12].

Los ácidos linolénico y mirístico mostraron los porcentajes más bajos (1,65% y 0,50% respectivamente) esto se corresponde con estudios realizados anteriormente los cuales reportan cantidades bajas o trazas de estos ácidos grasos en mitocondrias [10, 12].

Es importante señalar que en los cromatogramas de mmi, extracto de Folch y extracto de fosfolípidos, se observaron otros picos de ácidos grasos que no fueron identificados con los estándares incluidos en este ensayo. En este trabajo, solo el 31,18% de los ácidos grasos del extracto de fosfolípidos fueron identificados. Sin embargo, a pesar de haber utilizado métodos de extracción diferentes a los descritos en los trabajos citados en la discusión, se observa cierta correlación en los resultados, lo que supone que los ácidos oleico, palmítico, linoleico y esteárico constituyen componentes importantes para la función de las membranas de las mitocondrias. Piccotti y col. [20]; Brand, y col. [4]; Tillman y Cascio [29] han observado una correlación entre el tipo de ácido graso que compone la mmi con la conductancia de protones y la alteración en el potencial de membrana.

CONCLUSIONES

La metodología utilizada resultó adecuada en la obtención de una preparación libre de mme. Esto se evidenció con la ausencia de actividad de fosfatasa alcalina en estas preparaciones.

La mmi de *Ascaris suum* contiene colesterol y fosfolípidos, componentes que están presentes en la membrana mitocondrial de otros organismos, lo que indica que dicha composición se ha mantenido a través de la evolución.

La composición lipídica encontrada en la mmi de *Ascaris* se asemeja a los lípidos reportados por otros investigadores, en la mmi de diversas células del cerdo, hospedador mamífero de este parásito.

La fracción fosfolipídica de la mmi de *Ascaris* contiene en mayor proporción los ácidos grasos oleico, palmítico, lino-

leico y esteárico lo que sugiere una función importante de estos ácidos en la dinámica de membrana de la mitocondria del parásito.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ANDERSON, T. Ascaris infections in humans from North America: molecule evidence for cross-infection. **Parasitol.** 110: 215-219. 1995.
- [2] ARDAIL, D.; PRIVAT, J.P.; EGRET-CHARLIER, M.; LEVRAT, C.; LERME, F.; LOISOT, P. Mitochondrial contact sites. Lipid composition and dynamics. **J Biol Chem.** 265: 18797-18802. 1990.
- [3] ARLENE, D.A.; KATHLEEN, B.B. The role of cholesterol in rod outer segment membranes. **Progress in Lipid Res.** 44 (2-3):99-124.2005.
- [4] BRAND, M.D.; TURNER, N.; OCLOO, A.; ELSE, P.I.; HULBERT, A.J. Proton conductance and acid fatty acyl composition of liver mitochondria correlate with body mass in birds. **Biochem. J.** 15:376(Pt3):741-8. 2003.
- [5] BROWN, D. Structure and function of membrane rafts. **Int. J. Med. Microbiol.** 291(6-7): 433-437. 2002.
- [6] CHENG, B.; KIMURA, T. The distribution of cholesterol and phospholipids composition in submitochondrial membranes from bovine adrenal cortex: fundamental studies of steroidogenic mitochondria. **Lipids.** 18: 577-84. 1983.
- [7] COMTE, J.; GANTHERON, D.C. Preparation of outer membrane from pig heart mitochondria. **Methods Enzymol.** 55:98-104. 1979.
- [8] FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G.H. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J. Biol. Chem.** 226: 497-509. 1957.
- [9] GALLET, P.F.; ZACHOWSKI, A.; JULIEN, R.; FELLMANN, P.; DEVAUX, P. F.; MAFTAH, A. Transbilayer movement and distribution of spin-labelled phospholipids in the inner mitochondrial membrane. **Biochim. Biophys. Acta.** 1418: 61-70. 1999.
- [10] GLOSTER, J.; HARRIS, P. The lipid composition of mitochondrial and microsomal fractions of human myocardial homogenates. **Cardiovasc. Res.** 3: 45-51. 1969.
- [11] GRAY, G.M.; YARDLEY, H.J. Mitochondria and nuclei of pig and human epidermis: isolation and lipid composition. **J. Invest. Dermatol.** 64: 423-430. 1975.
- [12] HOLLAND, J.W.; STEVENSON, P. M. Composition of the inner mitochondrial membrane of porcine corpus luteum. **Bioch. Biophys. Acta.** 1022: 401-407. 1990.
- [13] HOVIUS, R.; LAMBRESCHTS, H.; NICOLAY, K.; DE KRUIJFF, B. Improved methods to isolate subfractionate rat liver mitochondria. Lipid composition of the inner and

- outer membrane. **Biochim. Biophys Acta.** 1021: 217-26. 1990.
- [14] KIGHTLINGER, L.; SEED, J.; KIGHTLINGER, M. The epidemiology of *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* and hookworm in the children in the Ranomafana rainforest. Madagascar. **J. Parasitol.** 81: 159-169. 1995.
- [15] LEE, S.H.; SONG, C.; LEE K.B.; LEE, H.S. A study on the lipids of *Ascaris suum* ova. **Kisaengchunghak Chapchi.** 15(1):43-50. 1977.
- [16] LENAIZ, G. The role of lipids in the structure and function of membranes. **Subcell. Biochem.** 6: 233-343. 1979.
- [17] MARUYANA, H.; NAWA, Y.; NODA, T.; MIMORY, T.; CHOI, W. An outbreak of visceral larva migrans due to *Ascaris suum* in Kyussha, Japan. **Lancet.** 347: 766-767. 1996.
- [18] OHVO-REKILA, H.; RAMSTETEDT, B.; LEPPIMAKI, P.; SLOTTE, J. P. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. **Prog.Lipid. Res.** 41(1): 66-97. 2002.
- [19] PARRA, K. La F1-ATPasa de *Ascaris suum*: **Estudios estructurales, enzimáticos y sobre el core de la enzima purificada.** Universidad Simón Bolívar, Caracas, Venezuela. (Tesis de Grado). 98pp. 1992.
- [20] PICCOTTI, L.; BURATTA, M.; GIANNINI, S.; GRESELE, P.; ROBERTI, R.; CORAZZ, L. Binding and release of cytochrome c in brain mitochondria is influenced by membrane potential and hydrophobic interactions with cardiolipin. **J. Membr.Biol.** 198(1):43-53. 2004.
- [21] REW, R.; SAZ, H. Enzyme location in the anaerobic mitochondria of *Ascaris lumbricoides*. **J. Cell. Biol.** 63: 125-135. 1974.
- [22] ROJAS, E. Purificación y caracterización del dominio Fo de la F1Fo ATP sintetasa mitocondrial de *Ascaris suum*. Universidad Simón Bolívar. Caracas. Venezuela. (Tesis de Grado) 201pp. 2001.
- [23] SAZ, H.; LASCURE, O. The functions of phosphoenol pyruvate carboxikinase and malic enzyme in the anaerobic formation of succinate by *Ascaris lumbricoides*. **Comp. Biochem. Physiol.** 30: 49-60. 1969.
- [24] SAZ, H.; WEIL, A. The mechanism of the formation of methylbutirate from carbohydrate by *Ascaris lumbricoides* muscle. **J. Biol. Chem.** 235: 914-918. 1960.
- [25] SCHROEDER, F.; GALLEGOS, A.M.; ATSHAVES, B.P.; STOREY, S.M.; MCINSTOSH, A.L.; PETRESCU, A.D.; HUANG, H.; STARODUB, O; CHAO, H; YANG, H.; FROLOV, A.; KIER, A. B. Recent advances in membrane microdomains; rafts, caveolae, and intracellular cholesterol trafficking. **Exp. Biol. Med.** 226(10): 873-890. 2001.
- [26] SHAIKH, N. Assessment of various techniques for the quantitative extraction of lysophospholipids from myocardial tissues. **Analyt. Biochem.** 216:313-321. 1994.
- [27] SCHNAITMAN, C.; GREENAWALT, J. Enzimatic properties of the inner and outer membranes of rat liver mitochondria. **J. Cell. Biol.** 38: 158-175. 1968.
- [28] SIMONS, K.; VAZ, W.L. Model systems, lipid rafts, and cell membranes. **Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.**33:269-95. 2004.
- [29] TILLMAN, T.S.; CASCIO, M. Effects of membrane lipids on ion channel structure and function. **Cell Biochem. Biophys.** 38(2):161-90. 2003.
- [30] TUCKEY, R.; STEVENSON, P.M. Purification and analysis of phospholipids in the inner mitochondrial membrane fraction of bovine corpus luteum, and properties of cytochrome P-450scc incorporated into vesicles prepared from these phospholipids. **Eur. J. Biochem.** 148: 379-384. 1985.
- [31] ZAZUETA, C.; RAMIREZ, J.; GARCIA, N.; BAEZA, I. Cardiolipin regulates the activity of reconstituted mitochondrial calcium importer by modifying the structure of the liposome bilayer. **J. Member Biol.** 191:113-122. 2003.