

TD-EP

~~H20-2-21~~

H-6  
2  
19

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR

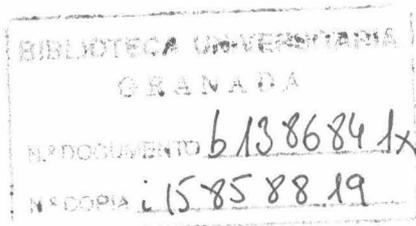


TESIS DOCTORAL

**INFLUENCIA DEL ETANOL  
SOBRE EL METABOLISMO LIPIDICO  
EN HEPATOCITOS DE RATA**

María Paz Carrasco Jiménez

1993



**Influencia del etanol sobre el metabolismo lipídico en hepatocitos de rata.**

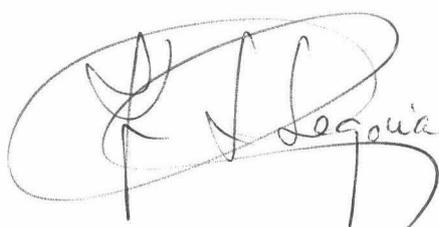
Memoria que presenta la Licenciada en Farmacia María Paz Carrasco Jiménez para optar al grado de Doctor.

Handwritten signature of María Paz Carrasco Jiménez in black ink. The signature is written in a cursive style with the name 'M<sup>a</sup> Paz Carrasco' clearly legible.

Fdo. María Paz Carrasco Jiménez.

V<sup>o</sup>B<sup>o</sup>

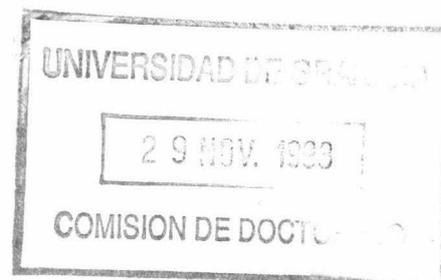
DIRECTORES DEL TRABAJO

Handwritten signature of Josefa L. Segovia Parra in black ink. The signature is written in a cursive style with the name 'Josefa L. Segovia' clearly legible.

Josefa L. Segovia Parra  
Dra. en Ciencias Químicas  
Catedrática de la Universidad de Granada

Handwritten signature of Carmen Marco de la Calle in black ink. The signature is written in a cursive style with the name 'Carmen Marco de la Calle' clearly legible.

Carmen Marco de la Calle  
Dra. en Ciencias Biológicas  
Profesora Titular de la  
Universidad de Granada



La presente Memoria ha sido realizada en su totalidad en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, con la ayuda de una Beca del Plan General de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Educación y Ciencia.

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento a las Profesoras D<sup>a</sup> J.L. Segovia Parra y D<sup>a</sup> Carmen Marco de la Calle, directoras de este trabajo, por su constante apoyo y orientación. Han supuesto en todo momento una ayuda, tanto científica como humana, con la que espero seguir contando en un futuro.

Quiero también recordar con especial cariño a mis compañeros de trabajo, M<sup>a</sup> Carmen y Jesús María, sin ellos nada hubiera sido igual. Han mostrado ser más que compañeros buenos amigos.

He de mencionar también a mis Profesores de Bioquímica, D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> Dolores Suárez, D. Fermín Sánchez de Medina y D. Antonio Sánchez Pozo, quienes me iniciaron en los conocimientos de Bioquímica y me introdujeron en esta materia.

Deseo expresar mi agradecimiento a los Profesores D. José M<sup>a</sup> Macarulla y D<sup>a</sup> Aida Marino, miembros del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, de la Universidad del País Vasco, por haberme acogido en su laboratorio para el aprendizaje del aislamiento y manipulación de hepatocitos, base de mi trabajo experimental. Tampoco puedo olvidarme de los miembros de aquel departamento que de forma desinteresada me ayudaron en todo momento e hicieron mi estancia muy agradable: Javi, Josune, Ana, Alberto, Julio, Iñaki y Natalia.

Deseo agradecer a todos y a cada uno de los miembros de este departamento que de alguna manera han ayudado a la realización de este trabajo. En especial a Dolores Franco y María Romero por su valiosa ayuda, así como a Andrés, Ramón y Mercedes.

A todos mis amigos, Rosalía, Loli, Encarnita, Nelsa, Abundio, Ana, Ana Azuaga, José María y José Alberto, que en todo momento me han mostrado su comprensión y ayuda.

Por último, a mi familia. A mis padres y hermanos, que siempre han puesto en mi trabajo y esfuerzo ilusión y esperanza. A Quico, que me ha ayudado, animado y acompañado en todo momento.



*A mis padres*

*A Quico*

## ABREVIATURAS

ACAT	.....	acil CoA: colesterol aciltransferasa
ACTH	.....	corticotropina
ADH	.....	alcohol deshidrogenasa
AdoMet	.....	S-adenosilmetionina
ADP	.....	adenosina difosfato
ALDH	.....	acetaldehido deshidrogenasa
AMP	.....	adenosina monofosfato
AMPc	.....	AMP cíclico
Apo A	.....	apolipoproteína A
ATP	.....	adenosina trifosfato
CDP	.....	citidina difosfato
CoA	.....	coenzima A
CPT	.....	carnitina palmitoiltransferasa
CTP	.....	citidina trifosfato
DG	.....	diacilglicéridos
d.p.m.	.....	desintegraciones por minuto
EDTA	.....	ácido etilendiammino teraacético
EGTA	.....	ácido etilenglicol-bis(β-aminoetileter) N,N,N',N'-tetraacético
HDL	.....	lipoproteína de alta densidad
HMG-CoA	.....	3-hidroxi-3-metilglutaril CoA
IP <sub>3</sub>	.....	inositol trifosfato
LCAT	.....	lecitina: colesterol aciltransferasa
LDL	.....	lipoproteína de baja densidad
LPL	.....	lipoproteína lipasa
MEOS	.....	sistema de oxidación microsomal del etanol
NAD <sup>+</sup>	.....	nicotinamida adenina dinucleótido (oxidado)
NADH	.....	nicotinamida adenina dinucleótido (reducido)
NADP <sup>+</sup>	.....	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (oxidado)
NADPH	.....	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (reducido)
NN-PE	.....	fosfatidil-NN-dimetiletanolamina
N-PE	.....	fosfatidil-N-monometiletanolamina
PC	.....	fosfatidilcolina
PE	.....	fosfatidiletanolamina
P <sub>i</sub>	.....	ortofosfato inorgánico
PI	.....	fosfatidilinositol
PIP	.....	fosfatidilinositol 4-fosfato
PIP <sub>2</sub>	.....	fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
PP <sub>i</sub>	.....	pirofosfato inorganico
PS	.....	fosfatidilserina
r.p.m.	.....	revoluciones por minuto
S.E.M.	.....	error estándar de la medida
TG	.....	triacilglicéridos
Tris	.....	tris(hidroximetil)-aminometano
TSH	.....	tirotropina
VLDL	.....	lipoproteína de muy baja densidad

**INDICE**

## INDICE

<b>INTRODUCCION</b> .....	1
<b>I. METABOLISMO DEL ETANOL</b> .....	2
<b>I.1. SISTEMAS DE OXIDACION DEL ETANOL</b> .....	2
I.1.1. Alcohol deshidrogenasa (ADH) .....	4
I.1.2. Acetaldehido deshidrogenasa (ALDH) .....	6
I.1.3. Sistema de oxidación microsomal del etanol (MEOS) .....	7
I.1.4. Catalasa .....	10
<b>II. METABOLISMO LIPIDICO</b> .....	12
<b>II.1. RUTAS IMPLICADAS EN LA BIOSINTESIS DE DIACILGLICERIDOS</b>	<b>3</b>
<b>II.2. DIACILGLICERIDOS COMO PRECURSORES DE</b>	
<b>TRIAcilGLICERIDOS</b> .....	18
<b>II.3. DIACILGLICERIDOS COMO PRECURSORES DE</b>	
<b>FOSFATIDILCOLINA</b> .....	20
II.3.1. Enzimas implicadas en la biosíntesis de fosfatidilcolina vía	
CDP-colina .....	21
II.3.2. Regulación de la biosíntesis de fosfatidilcolina vía	
CDP-colina .....	23
<b>II.4. DIACILGLICERIDOS COMO PRECURSORES DE</b>	
<b>FOSFATIDILETANOLAMINA</b> .....	29
II.4.1. Enzimas implicadas en la biosíntesis de fosfatidiletanolamina vía	
CDP-etanolamina .....	29
II.4.2. Regulación de la biosíntesis de fosfatidiletanolamina vía	
CDP-etanolamina .....	31
<b>II.5 OTRAS RUTAS PARA LA BIOSINTESIS DE FOSFATIDILCOLINA Y</b>	
<b>FOSFATIDILETANOLAMINA</b> .....	33
II.5.1 Biosíntesis de fosfatidilcolina por metilación de	
fosfatidiletanolamina .....	34
II.5.2 Biosíntesis de fosfatidiletanolamina por descarboxilación de	
fosfatidilserina .....	36
<b>II.6. OTRAS RUTAS</b> .....	39

II.6.1. Síntesis de fosfatidilgliceroles y fosfatidilinositoles . . . . .	39
II.6.2. Reacción de intercambio de bases: remodelado de fosfolípidos y biosíntesis de fosfatidilserina . . . . .	40
II.7. CATABOLISMO . . . . .	42
II.7.1. Catabolismo de glicerofosfolípidos . . . . .	42
II.7.2. Catabolismo de los triacilglicéridos . . . . .	45
III.EFECTO DEL ETANOL SOBRE EL METABOLISMO DE LOS FOSFOLIPIDOS	47
IV. INTERACCION ENTRE EL METABOLISMO DE ETANOL Y DE LIPIDOS . . . . .	53
IV.1. EFECTOS DE LA GENERACIÓN EXCESIVA DE NADH . . . . .	54
IV.2. INTERACCIÓN DEL ETANOL CON EL METABOLISMO LIPÍDICO EN LOS MICROSOMAS HEPÁTICOS . . . . .	55
IV.3. MECANISMOS IMPLICADOS EN LA ACUMULACIÓN HEPÁTICA DE TRIACILGLICÉRIDOS INDUCIDA POR EL ETANOL . . . . .	56
IV.4. EFECTO DEL ETANOL SOBRE LOS LÍPIDOS PLASMÁTICOS . . . . .	61
OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO . . . . .	66
MATERIALES Y METODOS . . . . .	69
I. MATERIAL . . . . .	70
I.1. REACTIVOS . . . . .	70
I.2. MATERIAL BIOLÓGICO: ANIMALES DE EXPERIMENTACION Y ACONDICIONAMIENTO . . . . .	70
I.3. DIETA Y TRATAMIENTO . . . . .	71
II. METODOS . . . . .	73
II.1. AISLAMIENTO DE HEPATOCITOS . . . . .	73
II.1.1. Sistema de perfusión . . . . .	73
II.1.2. Soluciones empleadas para el aislamiento de hepatocitos . . . . .	74
II.1.3. Operación quirúrgica y procedimiento de obtención de hepatocitos	75
II.1.4. Recuento y viabilidad celular . . . . .	79
II.2. ANALISIS DE LOS LIPIDOS . . . . .	80
II.2.1. Extracción de lípidos . . . . .	80

II.2.2. Determinación de colesterol .....	80
II.2.3. Determinación de triacilglicéridos .....	82
II.2.4. Separación de fosfolípidos .....	83
II.2.4.1. <i>Determinación del fósforo lipídico</i> .....	84
II.3. EFECTO DEL ETANOL SOBRE EL METABOLISMO LIPIDICO EN HEPATOCITOS .....	86
II.3.1. Incorporación de [1(3) <sup>3</sup> H] glicerol .....	88
II.3.2. Incorporación de <sup>3</sup> H oleato .....	89
II.3.3. Incorporación de L-[3- <sup>3</sup> H] serina .....	90
II.3.4. Incorporación de [1- <sup>3</sup> H] etanolamina .....	90
II.3.5. Incorporación de [metil- <sup>14</sup> C] colina .....	91
II.3.6. Determinación de la radiactividad incorporada a las diferentes especies lipídicas .....	92
II.3.7. Estudio del catabolismo de fosfatidilcolina .....	93
<b>RESULTADOS</b> .....	95
I. INFLUENCIA DEL ETANOL <i>IN VITRO</i> SOBRE EL METABOLISMO LIPIDICO EN HEPATOCITOS .....	96
I.1. COMPOSICION LIPIDICA .....	97
I.1.1. Niveles de colesterol y triacilglicéridos .....	97
I.1.2. Niveles de fosfolípidos .....	99
I.2. INCORPORACION DE PRECURSORES METABOLICOS A LOS DIFERENTES COMPONENTES LIPIDICOS .....	100
I.2.1. Incorporación de [1(3) <sup>3</sup> H] glicerol .....	101
I.2.2. Incorporación de <sup>3</sup> H-oleato .....	106
I.2.3. Incorporación de bases nitrogenadas .....	111
I.2.3.1. <i>Incorporación de L-[3-<sup>3</sup>H] serina</i> .....	111
I.2.3.2. <i>Incorporación de [1-<sup>3</sup>H] etanolamina</i> .....	117
I.2.3.3. <i>Incorporación de [metil-<sup>14</sup>C] colina</i> .....	123
II. INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO CRONICO CON ETANOL SOBRE EL METABOLISMO LIPIDICO EN HEPATOCITOS .....	128
II.1. COMPOSICION LIPIDICA .....	129

II.1.1. Niveles de colesterol y triacilglicéridos . . . . .	129
II.1.2. Niveles de fosfolípidos . . . . .	131
II.2. INCORPORACION DE PRECURSORES METABOLICOS A LOS DIFERENTES COMPONENTES LIPIDICOS . . . . .	133
II.2.1. Incorporación de [1(3) <sup>3</sup> H] glicerol . . . . .	133
II.2.2. Incorporación de <sup>3</sup> H oleato . . . . .	136
II.2.3. Incorporación de bases nitrogenadas . . . . .	138
II.2.3.1. <i>Incorporación de L-[3-<sup>3</sup>H] serina</i> . . . . .	138
II.2.3.2. <i>Incorporación de [1-<sup>3</sup>H] etanolamina</i> . . . . .	140
II.2.3.3. <i>Incorporación de [metil-<sup>14</sup>C] colina</i> . . . . .	143
III. EFECTO DE UN TRATAMIENTO DE 7 DIAS CON ETANOL: INCORPORACION DE PRECURSORES METABOLICOS A DIFERENTES COMPONENTES LIPIDICOS Y METABOLICOS . . . . .	144
III.1. Incorporación de [1- <sup>3</sup> H] etanolamina . . . . .	146
III.2. Incorporación de [metil- <sup>14</sup> C] colina . . . . .	152
IV. REVERSIBILIDAD DE LAS ALTERACIONES PRODUCIDAS POR EL ETANOL SOBRE EL METABOLISMO LIPIDICO EN HEPATOCITOS . . . . .	155
IV.1. Incorporación de L-[3- <sup>3</sup> H] serina . . . . .	155
IV.2. Incorporación de [1- <sup>3</sup> H] etanolamina . . . . .	159
IV.3. Incorporación de [metil- <sup>14</sup> C] colina . . . . .	162
V. ESTUDIO DE ADAPTACION DE HEPATOCITOS AL ETANOL . . . . .	166
V.1. COMPOSICION LIPIDICA . . . . .	167
V.1.1. Niveles de colesterol y triacilglicéridos . . . . .	167
V.1.2. Niveles de los distintos fosfolípidos . . . . .	169
V.2. INCORPORACION DE PRECURSORES METABOLICOS A LOS DIFERENTES COMPONENTES LIPIDICOS . . . . .	169
V.2.1. Incorporación de [1(3) <sup>3</sup> H] glicerol . . . . .	169
V.2.2. Incorporación de <sup>3</sup> H-oleato . . . . .	173
V.2.3. Incorporación de bases nitrogenadas . . . . .	176
V.2.3.1. <i>Incorporación de L-[3-<sup>3</sup>H] serina</i> . . . . .	176
V.2.3.2. <i>Incorporación de [1-<sup>3</sup>H] etanolamina</i> . . . . .	180
V.2.3.3. <i>Incorporación de [metil-<sup>14</sup>C] colina</i> . . . . .	182

<b>DISCUSION</b> .....	184
<b>I. INFLUENCIA DEL ETANOL <i>IN VITRO</i> SOBRE EL METABOLISMO LIPIDICO EN HEPATOCITOS DE HIGADO DE RATA</b> .....	186
<b>II. INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO PROLONGADO CON ETANOL SOBRE EL METABOLISMO LIPIDICO EN HEPATOCITOS DE HIGADO DE RATA</b> .....	191
<b>III. ESTUDIO DE ADAPTACION DE HEPATOCITOS AL ETANOL</b> .....	200
<b>CONCLUSIONES</b> .....	205
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	207

# **INTRODUCCION**

## **I. METABOLISMO DEL ETANOL**

El alcoholismo supone un problema social y de salud pública. El consumo crónico de alcohol está asociado a numerosos procesos degenerativos e inflamatorios en distintos órganos, tales como hígado, cerebro, corazón, músculo esquelético, páncreas y tracto gastrointestinal.

Los mecanismos patogénicos implicados en estas alteraciones aún no han sido aclarados. Existen pruebas de que el etanol penetra fácilmente en las membranas biológicas produciendo cambios en ellas y afectando de esta forma a la función de la mayoría de los órganos. Sin embargo, también son importantes los metabolitos que se originan como consecuencia de la oxidación del etanol.

### **I.1. SISTEMAS DE OXIDACION DEL ETANOL**

La mayor parte del alcohol ingerido es metabolizado en el hígado (80-95%). El resto se oxida en otros tejidos como riñón, músculo, mucosa estomacal e intestino, tejido nervioso central y periférico, órganos genitales, glándulas adrenales y páncreas (Von Wartburg and Bühler, 1984), o se elimina sin transformar, fundamentalmente a través de pulmones y riñones.

El hepatocito presenta tres vías principales para metabolizar el etanol, localizadas en compartimentos celulares diferentes. La alcohol deshidrogenasa (ADH) citosólica, el sistema de oxidación microsomal del etanol (MEOS) localizado en el retículo endoplasmático y la catalasa residente en los peroxisomas.

Por cualquiera de estas tres vías el etanol se metaboliza a acetaldehído, el cual por acción de la acetaldehído deshidrogenasa (ALDH) se convierte en acetato (Figura 1).

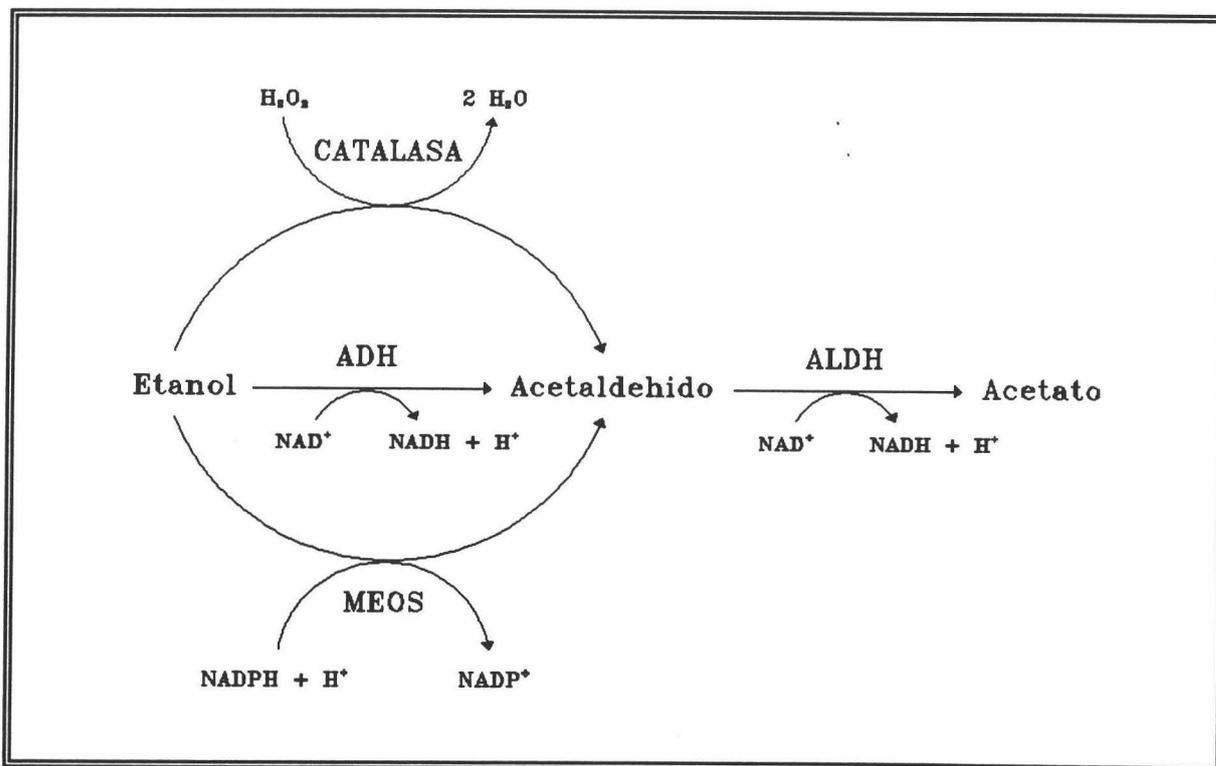


FIGURA 1.-Metabolismo del etanol.

### I.1.1. Alcohol deshidrogenasa (ADH)

Cuando el etanol se administra a bajas concentraciones, o su ingestión es moderada, la ADH (EC 1.1.1.1) es la vía más importante implicada en su oxidación, contribuyendo en un 90% o más a la oxidación de etanol a acetaldehído. Esta enzima está localizada en el citosol o fracción soluble de la célula.

La ADH es una enzima polimórfica, habiéndose demostrado la existencia de diversas isoenzimas. En humanos las isoenzimas de la ADH se han agrupado en tres clases (I, II, III) de acuerdo con sus propiedades funcionales y físico-químicas (Vallee and Bazzone, 1983).

Juliá et al. (1987) han demostrado que en ratas también existen isoenzimas de la ADH denominadas 1,2,3, las cuales están irregularmente distribuidas en órganos y tejidos. La ADH-1 (análoga a la ADH-II humana) está presente en el estómago, pulmón, mucosa nasal, auditiva y bucal, córnea, esófago y órganos genitales; la ADH-2 (similar a la ADH-III humana) se ha detectado en todos los órganos estudiados, y la ADH-3 (análoga a la ADH-I humana) se localiza principalmente en el hígado. Esta última ha sido la isoenzima más estudiada en ratas.

Las tres isoenzimas de la ADH de rata muestran diferentes características cinéticas así como de sensibilidad a determinados inhibidores, generalmente pirazol y sus derivados. La ADH-3 presenta una amplia especificidad de sustratos, una baja  $K_m$  para el etanol ( $K_m=1,4mM$ ) y una alta sensibilidad a la inhibición por pirazol. La ADH-2 puede usar eficientemente tan sólo alcoholes de cadena larga, presenta una  $K_m$  muy elevada para el etanol, de hecho no puede ser saturada por concentraciones molares de etanol, y no es inhibida prácticamente por el pirazol. La ADH-1 presenta valores intermedios de  $K_m$  ( $K_m=5M$ ) y a pH 10 muestra una sensibilidad media al pirazol.

Como se deduce de la Figura 1, durante la oxidación del etanol aumenta drásticamente en el citoplasma hepático la relación  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$ , este incremento en el poder reductor provoca numerosas alteraciones en el metabolismo lipídico y glucídico (Lieber and Savolainen, 1984).

Son dos las hipótesis propuestas para explicar qué factores regulan el metabolismo del etanol dependiente de la ADH. La primera es la de Dawson (1983), que propuso que la actividad ADH se encontraba limitada por "el aporte adecuado de  $\text{NAD}^+$ ", requiriendo por tanto de un sistema de lanzadera capaz de movilizar los equivalentes de reducción,  $\text{NADH}$ , que se producen en el citosol, desde el citosol a la mitocondria para ser de nuevo oxidados y reutilizados por la ADH. Crow, en el mismo año, rebatió esta hipótesis, indicando que, si bien se supone que la disminución en la relación  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  en el hígado durante el metabolismo del etanol puede producir una disminución significativa del  $\text{NAD}^+$  libre citosólico, ésta disminución no afecta a la actividad ADH. Este postulado se basa en que existe una gran diferencia de concentración entre las formas oxidadas y reducidas de este coenzima. En ausencia de etanol, los niveles de  $\text{NAD}^+$  libres citosólicos son aproximadamente 1000 veces superiores a los de  $\text{NADH}$  (Williamson et al., 1967; Veech et al., 1972), y en presencia de etanol los niveles de  $\text{NAD}^+$  descienden, siendo tan sólo 250-300 veces superiores a los de  $\text{NADH}$ . En presencia de etanol el  $\text{NADH}$  libre citosólico se incrementa por un factor de 3 ó 4. Sin embargo la correspondiente disminución en  $\text{NAD}^+$  es inapreciable. Crow (1983) concluye que el incremento en  $\text{NADH}$  libre sería suficiente para ejercer algún efecto inhibitor sobre la enzima (Cornell et al., 1979), pero la disminución del  $\text{NAD}^+$  libre no tendría un efecto importante sobre la actividad ADH. Este hecho llevó a Crow a proponer que el control en la oxidación del etanol viene determinado por los niveles de actividad de la ADH.

El pirazol y su derivado metilado en posición 4 han sido utilizados *in vitro* e *in vivo* como inhibidores de la ADH y del metabolismo del etanol (Theorell and Yonetani, 1969; Li and Theorell, 1969; Reynier, 1969), bloqueando los efectos dependientes de la oxidación del etanol.

### I.1.2.Acetaldehido deshidrogenasa (ALDH)

La conversión de acetaldehido a acetato en el hígado es catalizada por la ALDH (EC 1.2.1.3) en presencia de  $\text{NAD}^+$ , siendo ésta la ruta principal de eliminación de acetaldehido.

En ratas y mamíferos se han reconocido dos grupos claramente diferenciados de ALDH en base a sus constantes de Michaelis (grupos de baja y de alta Km). Recientemente, se ha indicado que las ALDH de varios mamíferos pueden dividirse en tres clases distintas (Clases 1, 2 y 3) (Weiner and Flynn, 1989). Los miembros de la clase 1 son ALDH citoplasmáticas, los miembros de la clase 2 son ALDH mitocondriales y los miembros de la clase 3 son ALDH citoplasmáticas inducibles por tumores específicos. Generalmente, se adjudica a la isoenzima de baja Km (ALDH-2) una localización preferentemente mitocondrial mientras que las otras isoenzimas se hallan localizadas en el citosol (Meier-Tackmann et al., 1988).

Es importante desde el punto de vista fisiológico el grado de oxidación del acetaldehido, ya que muchos de los efectos tóxicos directos del alcohol y muchas de las alteraciones fisiológicas relacionadas con el alcohol han sido atribuidas al acetaldehido más que al etanol en sí mismo (Salaspuro and Lindros, 1985). El acetaldehido es un producto tóxico que presenta una capacidad de unión covalente a una gran variedad de proteínas, tales como hemoglobina (Hoberman, 1980; Stevens et al., 1981), albúmina (Donohue et al., 1983), tubulina (Tuma et al., 1987), proteínas microsomales de hígado (Nomura and Lieber, 1981) y enzimas dependientes de lisina (Mauch et al., 1986), alterando de este modo la función y la estructura del hígado. Así, a causa de su unión con la tubulina, el acetaldehido disminuye la polimerización de los microtúbulos alterando la secreción de proteínas y favoreciendo su retención. Esto se asoció con el aumento de volumen de los hepatocitos. También el acetaldehido, directamente o por unión con el glutatión, favorece

la peroxidación de los lípidos. Varias funciones mitocondriales se encuentran también alteradas, particularmente después del consumo crónico de alcohol el cual sensibiliza a la mitocondria a los efectos adversos del acetaldehído. El acetaldehído, al dañar a la mitocondria, puede reducir el nivel de actividad de la ALDH, debido a que la reoxidación de NADH producido del  $\text{NAD}^+$  durante la oxidación del etanol ocurre principalmente en la mitocondria. Por esto cualquier cambio en el potencial redox intracelular puede producir profundas consecuencias metabólicas (Hsu et al., 1985; Matsuzaki and Lieber, 1977). Los notables cambios estructurales de la mitocondria están asociados con correspondientes anomalías funcionales que incluyen una capacidad disminuida de oxidar ácidos grasos produciendo como consecuencia una deposición grasa en el hígado (Hsu et al., 1985).

Otra consecuencia adversa debida al acetaldehído, se produce cuando los aductos acetaldehído-proteína estimulan la producción de anticuerpos dirigidos contra el acetaldehído (Israel et al., 1986; Hoerner et al., 1986). Esta respuesta inmune puede contribuir a agravar o perpetuar el daño hepático inducido por el alcohol.

Algunos efectos del acetaldehído, sin embargo, pueden considerarse como beneficiosos, tales como la estimulación de la liberación de prostaciclina vascular, la cual podría participar en el efecto "protector" del consumo moderado de alcohol contra algunas complicaciones cardiovasculares.

### I.1.3. Sistema de oxidación microsomal del etanol (MEOS)

La observación en ratas (Iseri et al., 1964; 1966) y en humanos (Lane and Lieber, 1966) de que el consumo crónico de etanol estaba asociado con una proliferación del retículo endoplasmático sugirió que los microsomas de hígado podrían constituir un lugar para un sistema distinto y adaptativo de oxidación del etanol. Tal sistema también se demostró *in vitro* y se denominó sistema de oxidación microsomal del etanol (Lieber

and DeCarli, 1968; 1970).

Otros hallazgos también sustentan el papel del MEOS en el metabolismo del etanol *in vivo*, como son la incompleta inhibición del metabolismo del etanol usando inhibidores de la ADH (Lieber and DeCarli, 1970), y purificación de componentes microsomales que aunque carentes de actividad ADH o catalasa tienen capacidad para la metabolización del etanol (Teschke et al., 1972; 1974).

El MEOS oxida el etanol a acetaldehído, utilizando NADPH como cofactor en presencia de oxígeno. La reacción se esquematiza en la Figura 2. Como se observa cuando el etanol es oxidado por el MEOS, los productos formados son  $\text{NADP}^+$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  y acetaldehído.

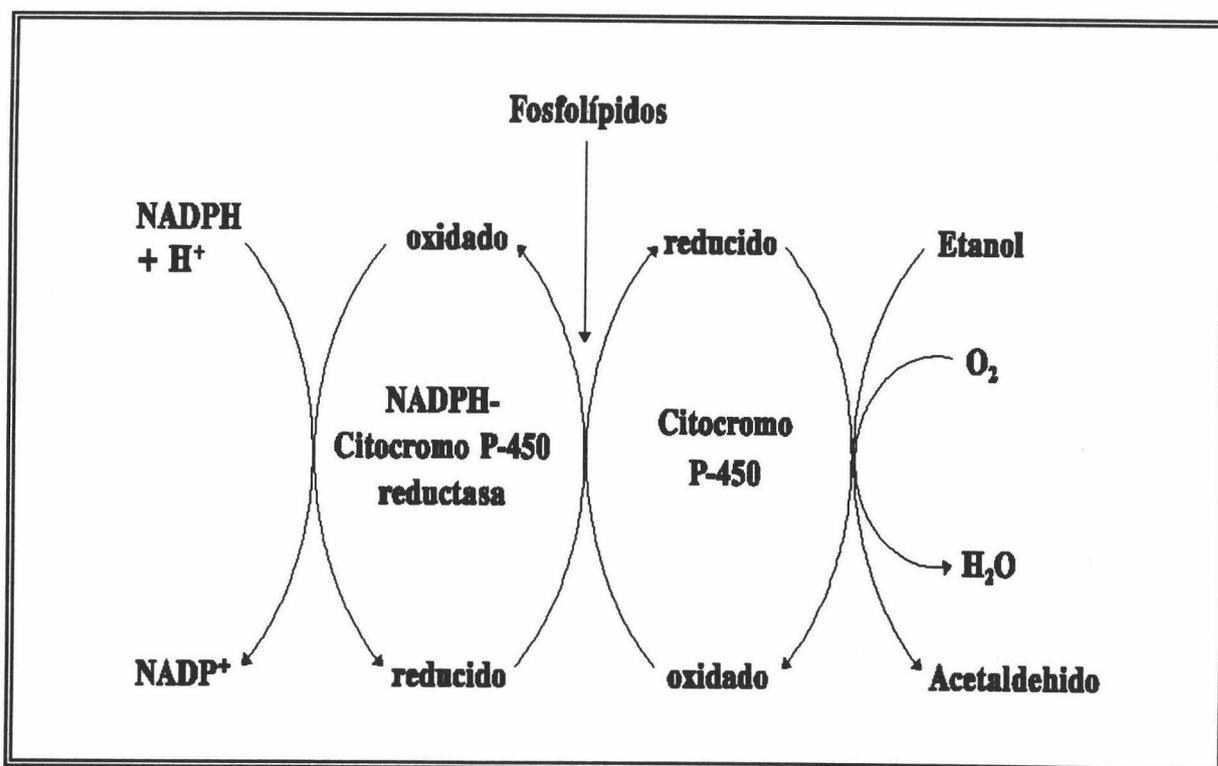


FIGURA 2.-Esquema de los componentes esenciales del MEOS.

Lieber et al., indicaron que en el sistema MEOS estaba implicado un

citocromo P<sub>450</sub> dependiente del sistema monooxigenasa (Figura 2). Esta propuesta originó un amplio debate que finalmente llegó a resolverse tras: a) el aislamiento de una fracción microsomal de hígado que contenía citocromo P<sub>450</sub>, la cual, aunque carente de actividad ADH o catalasa, aún podría oxidar al etanol así como a alcoholes alifáticos (por ejemplo el butanol, el cual no es un sustrato de la catalasa) (Teschke et al., 1972; 1974; Mezey et al., 1973); b) la reconstitución del sistema MEOS usando NADPH-citocromo P<sub>450</sub> reductasa, fosfolípidos y citocromo P<sub>450</sub> microsomal parcial o altamente purificado de ratas no tratadas (Ohnishi and Lieber, 1977) o tratadas con fenobarbital (Miwa et al., 1978); y c) la observación de que el consumo crónico de etanol estaba asociado con la inducción de una forma específica del citocromo P<sub>450</sub> y el aislamiento de este citocromo P<sub>450</sub> inducible por el etanol y otros xenobióticos tales como acetona, isoniazida, imidazol, pirazol... (Ohnishi and Lieber, 1977; Koop et al., 1985; Thomas et al., 1987), denominada P<sub>450</sub>IIEI, con una alta afinidad por el etanol en ratas (Ohnishi and Lieber, 1977), en conejos (Koop et al., 1982) e incluso en humanos (Wrighton et al., 1986).

El citocromo P<sub>450</sub>IIEI, desempeña un papel importante en la toxicidad de agentes tales como acetaminofeno, N-nitrosodimetilamina, y tetracloruro de carbono (Kubota et al., 1988), particularmente después del consumo crónico de etanol (Lieber, 1982), debido a que son metabolizados por esta isoenzima del citocromo P<sub>450</sub>.

En hígado de ratas, el MEOS posee una Km aparente más alta (7-11 mM) para el alcohol que la ADH (Lieber, 1982; Mezey, 1981). Este elevado valor de Km sugiere que la enzima sería activa *in vivo* sólo a altas concentraciones de etanol, contribuyendo a su oxidación cuando los niveles de alcohol en sangre son elevados. Trabajos recientes sugieren que el MEOS metaboliza *in vivo* altas concentraciones de etanol en ratones carentes de ADH (Shigeta et al., 1984).

Para cuantificar la contribución de las diversas rutas metabólicas se examinó la oxidación del etanol en hepatocitos aislados de ratón-ciervo en presencia o ausencia de 4-metilpirazol (Tagaki et al., 1985). El 4-metilpirazol redujo significativamente la

oxidación del etanol tanto en hepatocitos ADH<sup>+</sup> como en hepatocitos ADH<sup>-</sup>. El descenso observado en las células carentes de actividad ADH se usó como factor corrector del efecto inhibitor del 4-metilpirazol sobre las rutas no-ADH de oxidación del etanol en hepatocitos ADH<sup>+</sup>. Tras dicha corrección, se encontró que las rutas no-ADH contribuyen en un 28% al metabolismo del etanol a concentraciones de sustrato 10 mM, y en un 57% a concentraciones 50 mM.

Feierman y Cederbaum (1985) realizaron estudios *in vivo* con ratas controles y tratadas con pirazol y 4-metilpirazol, y analizaron las interacciones de estos compuestos con los microsomas hepáticos. Observaron que los efectos producidos por el pirazol son diferentes de los encontrados tras el tratamiento por 4-metilpirazol. Una de las principales diferencias es el efecto sobre el contenido de citocromo P<sub>450</sub>. Mientras el pirazol no afecta, el 4-metilpirazol produce un incremento en el contenido de citocromo P<sub>450</sub>. Ni el tratamiento con pirazol ni con 4-metilpirazol ejercen efecto alguno sobre la actividad NADPH-citocromo P<sub>450</sub> reductasa. El hecho de que el tratamiento con pirazol produzca un aumento en la oxidación de alcoholes por los microsomas, ha sugerido la posibilidad de que el tratamiento con pirazol pueda producir cambios cualitativos en la composición de isoenzimas del P<sub>450</sub>, así se ha planteado que el pirazol podría inducir a una isoenzima P<sub>450</sub> con preferencia por el alcohol. De igual modo se observó que la oxidación de alcoholes también incrementaba después del tratamiento con 4-metilpirazol, sin embargo, el efecto del tratamiento con 4-metilpirazol resultó más complejo que el efecto del pirazol, el incremento en la oxidación de alcoholes parecía ser debido principalmente a un aumento en el contenido de P<sub>450</sub> más que a la inducción de una forma del P<sub>450</sub> con preferencia para el alcohol.

#### I.1.4. Catalasa

Esta enzima está localizada en los peroxisomas y cataliza la oxidación del

etanol a acetaldehído en presencia de peróxido de hidrógeno:



La mayoría de los autores establecen que la contribución de este sistema a la eliminación del etanol en condiciones fisiológicas es insignificante (Kato et al., 1987), debido a que la concentración y generación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  *in vivo* es bastante baja (Oshino et al., 1973) y a que la eliminación del etanol *in vivo* no se afecta por el tratamiento con aminotriazol, un inhibidor de la catalasa (Kinnard et al., 1956; Nelson et al., 1957). Estudios realizados en la especie ratón-ciervo demuestran que mientras que el aminotriazol reduce la peroxidación del etanol mediada por catalasa en un 83-94%, sólo tiene un ligero efecto en la eliminación global del etanol de la sangre a concentraciones de etanol inferiores a 10mM, y ningún efecto a concentraciones de etanol entre 40-70 mM (Tagaki et al., 1986). De estas observaciones, se deduce que en la especie ratón-ciervo la catalasa desempeña sólo un papel minoritario en las rutas no-ADH de oxidación del etanol en condiciones fisiológicas, contribuyendo el MEOS de manera más importante.

Sin embargo, un grupo de autores, entre ellos Thurman y Handler (1989), difieren en el papel minoritario asignado a la catalasa en el metabolismo del etanol. Ellos indicaron que en estudios previos no se controló cuidadosamente el grado de inhibición de la catalasa por aminotriazol y que la actividad catalasa residual podría ser la responsable de la oxidación del etanol a una velocidad normal. Añadieron que después del pretratamiento con aminotriazol durante 1.5 horas la actividad catalasa estaba inhibida totalmente, así como el 80-90% de la actividad dependiente del citocromo  $\text{P}_{450}$ . Después de 6 horas del pretratamiento con aminotriazol, la actividad catalasa medida *in vitro* retornó a sus niveles normales, mientras que la actividad dependiente del citocromo  $\text{P}_{450}$  permanecía disminuida. Finalmente, Thurman y Handler concluyeron que bajo estas condiciones, en la especie ratón-ciervo carentes de ADH, la oxidación del etanol se cataliza preferentemente por la catalasa, esto contradice a las conclusiones obtenidas por Shigeta et al. (1984), y Tagaki et al. (1985).

## II. METABOLISMO LIPIDICO

La fosfatidilcolina (PC) y la fosfatidiletanolamina (PE) son los fosfolípidos mayoritarios de los tejidos de mamíferos. Estos lípidos anfipáticos son componentes esenciales de las membranas celulares, ejerciendo diversas funciones independientemente de su papel estructural. Los triacilglicéridos, constituyen la principal reserva de energía y su función puede considerarse predominantemente metabólica. Debido a sus diferentes funciones, parece lógico pensar que las síntesis de ambos compuestos se regula por mecanismos independientes, aunque se han descrito casos en donde se requiere un control coordinado de ambas síntesis, tales como la formación de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) por el hígado. La biosíntesis de triacilglicéridos y de fosfolípidos nitrogenados se lleva a cabo a través de rutas metabólicas que requieren un intermediario común, los diacilglicéridos. Por esta razón, tanto la formación como el metabolismo de este intermediario pueden constituir puntos importantes de control para la biosíntesis de estos compuestos.

## II.1. RUTAS IMPLICADAS EN LA BIOSÍNTESIS DE DIACILGLICERIDOS

En la Figura 3 se esquematizan las principales rutas implicadas en la síntesis de glicerolípidos. El precursor principal para la formación de diacilglicéridos es el ácido fosfatídico, el cual es sintetizado vía 1-acil glicerol 3-fosfato por sucesivos pasos de acilación del glicerol 3-fosfato. La acilación de la dihidroxiacetona fosfato y la posterior reducción de la acildihidroxiacetona fosfato también conduce a la formación de 1-acil glicerol 3-fosfato.

Los tejidos de mamíferos parecen contener tres aciltransferasas distintas implicadas en la acilación del glicerol 3-fosfato o de la dihidroxiacetona fosfato. De este modo, se ha sugerido la existencia de una glicerol 3-fosfato aciltransferasa (EC 2.3.1.15) microsomal, que cataliza la acilación del glicerol 3-fosfato (Nimmo, 1979). Esta misma enzima parece estar implicada en la acilación de la dihidroxiacetona fosfato, ya que la transferencia de radicales acilo a estos sustratos exhibe prácticamente la misma dependencia del pH y la misma sensibilidad a tratamientos por calor, reactivos con grupos tiol y otros agentes (Coleman and Haines, 1983).

La acilación del glicerol 3-fosfato está catalizada también por una glicerol 3-fosfato aciltransferasa mitocondrial. Esta enzima difiere de la isoenzima microsomal en su menor sensibilidad a reactivos con grupos tiol y al tratamiento por calor. Además, la enzima mitocondrial muestra preferencia por los acil-CoA saturados, mientras que la enzima microsomal exhibe la misma especificidad por acil-CoA de distintos grados de saturación (Yamada and Okuyama, 1978). Declercq et al. (1984) mostraron que la glicerol 3-fosfato aciltransferasa mitocondrial también presenta actividad con la dihidroxiacetona fosfato. Desafortunadamente, aún no se ha conseguido purificar la aciltransferasa de mamíferos.

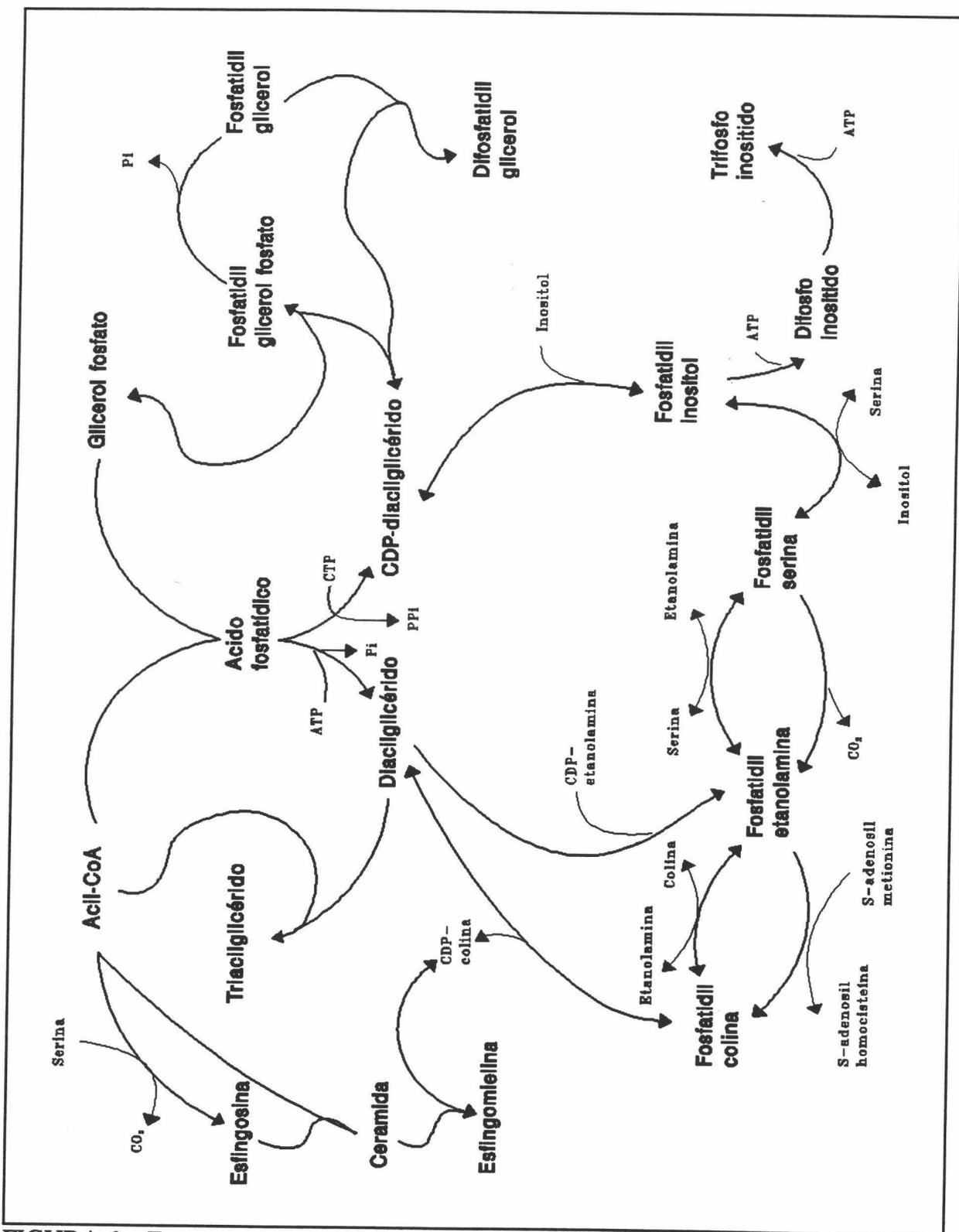


FIGURA 3.- Esquema resumen del metabolismo de fosfolípidos (tomado de Thompson and Martin, 1984).

Por último, existe una enzima peroxisomal que cataliza la acilación de la dihidroxiacetona fosfato. Esta aciltransferasa se ha aislado y purificado parcialmente de hígado de cobaya (Jones and Hajra, 1983). Hajra y Bishop (1982) demostraron que la enzima está exclusivamente localizada en la fracción peroxisomal, y atribuyeron la actividad dihidroxiacetona fosfato aciltransferasa encontrada por algunos autores en los microsomas a la contaminación peroxisomal de esta fracción.

Durante varios años fue un punto de controversia la contribución relativa de las vías glicerol 3-fosfato y acildihidroxiacetona fosfato a la síntesis de triacilglicéridos y fosfolípidos. Declercq et al. (1984) calcularon que la contribución de la vía acildihidroxiacetona fosfato, en el hígado, a la síntesis total de glicerolípidos era inferior al 10%. Un comportamiento similar se observó en tejidos extrahepáticos (Van Veldhoven and Mannaerts, 1985).

La conversión de 1-acil glicerol 3-fosfato a ácido fosfatídico es catalizada por la 1-acil glicerol 3-fosfato aciltransferasa (EC 2.3.1.51). En microsomas de hígado de rata, la actividad específica de esta enzima es considerablemente más alta que la de glicerol 3-fosfato aciltransferasa. Por ello, se sugiere que la acilación del glicerol 3-fosfato es limitante en la velocidad de biosíntesis del ácido fosfatídico (Brindley, 1984).

El ácido fosfatídico ocupa un lugar importante en la ruta de síntesis de los glicerolípidos. Puede ser convertido a CDP-diacilglicérido, que es el precursor para la síntesis de fosfolípidos aniónicos, fosfatidilinositol, fosfatidilglicérido y cardiolipinas. Además, el ácido fosfatídico puede ser hidrolizado a diacilglicérido por la fosfatidato fosfohidrolasa (EC 3.1.3.4). Los diacilglicéridos son los precursores comunes para la síntesis de fosfolípidos nitrogenados y para la biosíntesis de triacilglicéridos. Kennedy (1986) sugirió que la formación de diacilglicéridos a través de la vía del ácido fosfatídico resulta más ventajosa que la hipotética acilación directa del glicerol porque proporciona

un punto de control a nivel del ácido fosfatídico.

Esta enzima se distribuye entre la fracción soluble y particulada siendo éste importante en su mecanismo de control. Los resultados obtenidos en varios laboratorios sugieren que la actividad fosfatidato fosfohidrolasa implicada en la síntesis de glicerolípidos es dependiente de  $Mg^{++}$  (Martin et al., 1987). Aunque la actividad fosfatidato fosfohidrolasa soluble muestra mayores requerimientos de  $Mg^{++}$  que la actividad presente en la fracción particulada, la dependencia de  $Mg^{++}$  no se pierde cuando la enzima se une a las membranas del retículo endoplasmático (Martin et al., 1987). Aún queda por establecer si los requerimientos de  $Mg^{++}$  de esta enzima son absolutos o si este catión lo que hace es favorecer las interacciones entre el fosfatidato y la enzima a través de una modificación en el grado de orden de la membrana tal como sugirieron Brindley y Sturton (1982).

No se ha conseguido aún una buena purificación y caracterización de esta enzima. Butterwith et al. (1984) describieron un procedimiento de purificación que incrementó 400 veces la actividad específica. Sin embargo, la enzima purificada fue inestable y además fue marcadamente inhibida por un exceso de  $Mg^{++}$  o fosfatidato.

La fosfatidato fosfohidrolasa es considerada una enzima importante en la regulación de la síntesis hepática de los triacilglicéridos. Esta afirmación se basa principalmente en la observación de que los cambios que experimenta la actividad fosfatidato fosfohidrolasa, frente a distintas situaciones metabólicas o agentes exógenos, son más marcados que los producidos en otras enzimas implicadas en la biosíntesis de estos compuestos.

Han sido analizados los efectos de diferentes hormonas, a corto o largo plazo, sobre la actividad fosfatidato fosfohidrolasa hepática. En períodos largos de incubación de los hepatocitos con glucocorticoides, glucagon o AMPc se incrementa la

actividad de esta enzima, debido a cambios en su biosíntesis enzimática (Pittner et al., 1985). No obstante, el incremento en la actividad inducida por dexametasona no está acompañado por un incremento en la síntesis de triacilglicéridos (Mangiapane and Brindley, 1986). Por otra parte, períodos cortos de incubación de los hepatocitos con ácidos grasos (Cascales et al., 1984) o vasopresina (Pollard and Brindley, 1984) incrementan la actividad fosfatidato fosfohidrolasa observándose un aumento simultáneo en la síntesis de triacilglicéridos.

Como ya se ha mencionado, la fosfatidato fosfohidrolasa está presente tanto en el citosol como en el retículo endoplasmático. Hay pruebas evidentes de que la forma citosólica es fisiológicamente inactiva hasta que es translocada a las membranas, en donde el fosfatidato es convertido a diacilglicérido (Brindley, 1984). Este fenómeno se acentúa particularmente cuando homogenados hepáticos son tratados con ácidos grasos o poliaminas (Martín-Sanz et al., 1985). Por lo tanto, se ha sugerido que la unión de los ácidos grasos al retículo endoplasmático actúa como señal para la fosfatidato fosfohidrolasa, la cual se asocia con las membranas activando la síntesis de triacilglicéridos (Hopewell et al., 1985).

En períodos cortos de tratamiento con clorpromazina y otras drogas anfifílicas disminuye la síntesis de triacilglicéridos, determinada por cuantificación de la incorporación de glicerol o ácidos grasos marcados radiactivamente (Martín et al., 1986). Estos estudios mostraron que había una correlación alta entre la actividad fosfatidato fosfohidrolasa asociada a membrana y la conversión de ácido fosfatídico a diacilglicéridos, y entre la conversión de ácido fosfatídico a diacilglicéridos y el grado de síntesis de triacilglicéridos. Esto indica que la cantidad de enzima asociada a membrana es importante para la síntesis de triacilglicéridos (Martín et al., 1986). Sin embargo, se ha observado que a concentraciones bajas de clorpromazina se produce una leve estimulación en la acumulación de diacilglicéridos, aunque disminuye el flujo de ácido fosfatídico a diacilglicéridos. Esta observación podría implicar que el efecto de la clorpromazina es el

resultado de una inhibición coordinada de la fosfatidato fosfohidrolasa y de la última enzima que participa en la síntesis de triacilglicéridos, diacilglicérido aciltransferasa.

Aunque la actividad fosfatidato fosfohidrolasa es afectada, tanto en experimentos a largo como en experimentos a corto plazo, por la presencia de glucagon o análogos del AMPc, aún no se ha establecido si la actividad de esta enzima puede estar controlada por una fosforilación reversible de la proteína dependiente del AMPc.

## II.2. DIACILGLICERIDOS COMO PRECURSORES DE TRIACILGLICERIDOS

La conversión de diacilglicéridos a triacilglicéridos está catalizada por la diacilglicérido aciltransferasa (EC 2.3.1.20). Esta enzima al igual que aquellas que utilizan diacilglicéridos para la síntesis de PC y PE, está estrechamente asociada con las membranas del retículo endoplasmático (Van Golde et al., 1971).

Se ha observado que un incremento en la capacidad del hígado para sintetizar triacilglicéridos está acompañado de un incremento simultáneo en la actividad fosfatidato fosfohidrolasa. Sin embargo, los productos de la reacción catalizada por esta enzima, los diacilglicéridos, no son utilizados solamente para la síntesis de triacilglicéridos, sino que también participan en la formación de PC y PE. Debido a las diferentes funciones fisiológicas de los fosfolípidos y de los triacilglicéridos, es evidente la existencia de regulación después de este punto de ramificación

Goldberg et al. (1981) mostraron que en ratas tratadas con fenobarbital, el aumento observado en la síntesis de triacilglicéridos está acompañado por un incremento en la actividad diacilglicérido aciltransferasa, pero no de la fosfatidato fosfohidrolasa.

Sugirieron por tanto que, la actividad diacilglicérido aciltransferasa es limitante en la síntesis de triacilglicéridos. Haagsman y Van Golde (1981) obtuvieron pruebas que confirmaron esta hipótesis. Observaron que la incubación de hepatocitos aislados con oleato y palmitato produce un incremento en la síntesis de triacilglicéridos correlacionado con un considerable aumento en la actividad diacilglicérido aciltransferasa. Además, el tratamiento de los hepatocitos con el ácido graso 20:5(n-3) inhibe la formación de triacilglicéridos con una correspondiente inhibición de la actividad diacilglicérido aciltransferasa (Strum-Odin et al., 1987).

El posible papel limitante de la diacilglicerol aciltransferasa en la síntesis de triacilglicéridos, ha sido además investigado por Mayorek y Bar-Tana (1985). Observaron que en hepatocitos la presencia de 2-bromooctanoato reduce la síntesis del triacilglicéridos inhibiendo específicamente la etapa catalizada por la diacilglicérido aciltransferasa. Por ello, este inhibidor ha sido utilizado para determinar la correlación entre la actividad diacilglicérido aciltransferasa y síntesis de triacilglicéridos en hepatocitos permeabilizados. Mayorek y Bar-Tana (1987) concluyeron que la síntesis global de los triacilglicéridos parece ser muy sensible a alteraciones de la actividad diacilglicérido aciltransferasa, pudiendo considerar a ésta como la enzima limitante en la síntesis del triacilglicéridos.

Es más probable, sin embargo, que el grado de síntesis de los triacilglicéridos sea controlado por una regulación coordinada de las actividades fosfatidato fosfohidrolasa y diacilglicérido aciltransferasa y por la disponibilidad de los sustratos. Estudios sobre los efectos de glucocorticoides, alcohol o ácidos grasos sobre las enzimas implicadas en la síntesis hepática de los triacilglicéridos demostraron que determinados factores de estrés inducen una activación simultánea de la fosfatidato fosfohidrolasa y de la diacilglicérido aciltransferasa (Cascales et al., 1984; Tijburg et al., 1988). Por otra parte, cuando el aporte de ácidos grasos es bajo, es posible que el control de la biosíntesis de los glicerolípidos sea tal que permita mantener la síntesis de fosfolípidos a expensas de la formación del triacilglicéridos.

### II.3. DIACILGLICERIDOS COMO PRECURSORES DE FOSFATIDILCOLINA

La biosíntesis de PC en hígado se produce principalmente a través de dos rutas: La ruta CDP-colina o ruta de Kennedy , la más importante (Kennedy, 1956), y la metilación de PE, que se lleva a cabo en retículo endoplasmático.

Como se muestra en la Figura 4, la ruta de Kennedy requiere en primer lugar la formación de colina fosfato (fosfocolina), que se produce por fosforilación de colina. La colina fosfato se convierte posteriormente en CDP-colina. Finalmente, la PC se sintetiza por la reacción entre CDP-colina y diacilglicérido.

Recientemente, Infante propuso una nueva ruta para la síntesis *de novo* de estos fosfolípidos, en la que propone que CDP-colina y glicerol 3-fosfato formarían, por acción de la glicerol 3-fosfocolina sintetasa, glicerol 3-fosfocolina, que podría ser acilado específicamente (Infante and Huszagh, 1987). Recientemente, Veldhuizen et al., (1991), realizaron estudios en los que observaron que, en fracciones subcelulares de hígado y pulmón de rata, no se incorporaba radiactividad a glicerol 3-fosfocolina a partir de glicerol 3-fosfato o CDP-colina marcados radiactivamente, sugiriendo que los datos obtenidos por Infante sobre la existencia de esta vía eran debidos a una identificación incorrecta de los productos radiactivos formados en la reacción.



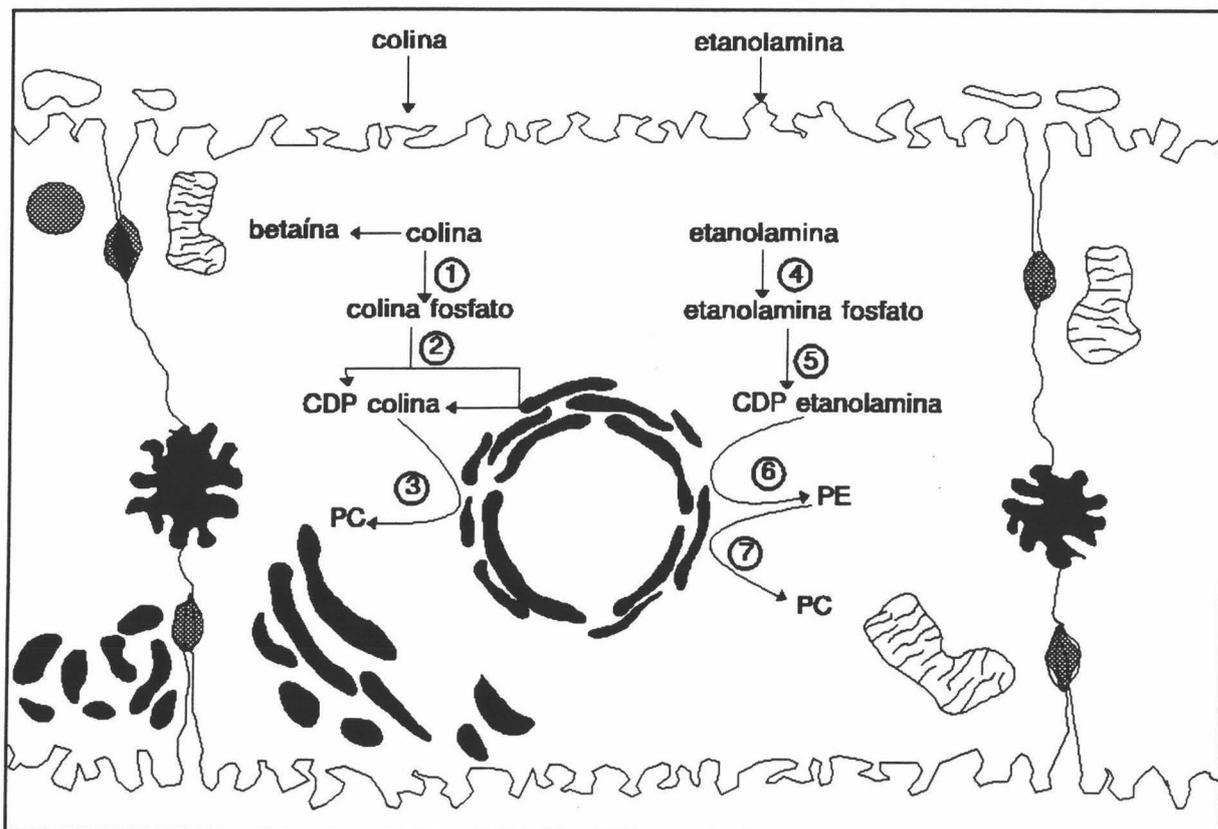


FIGURA 4.- Esquema de la biosíntesis de fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE) a través de la ruta de Kennedy. Los números indican las siguientes enzimas: (1) colina quinasa; (2) colina fosfato citidililtransferasa; (3) colina fosfotransferasa; (4) etanolamina quinasa; (5) etanolamina fosfato citidililtransferasa; (6) etanolamina fosfotransferasa; (7) fosfatidiletanolamina metiltransferasa.

### II.3.1. Enzimas implicadas en la biosíntesis de fosfatidilcolina vía CDP-colina

Para la mayoría de los mamíferos la colina es un componente esencial de la dieta. La incorporación de colina en hepatocitos de rata parece estar mediada por dos mecanismos, uno saturable y otro no saturable (Pelech et al., 1982). El componente no saturable de la incorporación de colina fue atribuido a una difusión a través de la membrana plasmática. Respecto al mecanismo saturable de incorporación, se ha sugerido

que éste estaba directamente vinculado con la actividad colina oxidasa (responsable de la formación de betaína). Zeisel et al. (1980), argumentaron que, aunque la mayoría de la colina transportada al hepatocito es convertida a betaína, fosfocolina o PC, también se produce una acumulación de colina libre en el citoplasma celular, sugiriendo que la colina oxidasa no siempre limita la incorporación de colina en el hepatocito. Además, estos autores sugirieron que en hígado de rata, el componente saturable de incorporación de colina presenta un valor de  $K_m$  aparente de 170  $\mu\text{M}$ .

En hígado de mamíferos, la colina puede ser oxidada a betaína o fosforilada. La **colina quinasa** (EC 2.7.1.32) cataliza la fosforilación de colina en presencia de ATP, produciendo colina fosfato y ADP. La enzima presenta una localización citosólica en una gran variedad de tejidos. La actividad de la colina quinasa puede ser inducida por diversos hepatotóxicos químicos como tetracloruro de carbono o 3-metilcolantreno. Así, se ha demostrado que la administración de estos compuestos a ratas produce una inducción selectiva de dos isoenzimas de la colina quinasa que difieren en su peso molecular, punto isoeléctrico y propiedades inmunoquímicas (Ishidate et al., 1984; Tadokoro et al., 1985).

Hay recogidos varios trabajos acerca de los parámetros cinéticos de la reacción catalizada por la colina quinasa. Se ha establecido que el pH óptimo para la reacción se encuentra en el rango de 8,0 a 9,0. La enzima purificada de riñón de rata presenta un valor de  $K_m$  aparente para colina y ATP de 0,1 mM y 1,5 mM respectivamente (Ishidate et al., 1985).

La **colina-fosfato citidililtransferasa** (EC 2.7.7.15) cataliza la síntesis de CDP-colina y pirofosfato a partir de colina fosfato y CTP. Está localizada en el citosol y en la fracción microsomal de diversos tejidos (Wilson, 1978). Estudios recientes sobre la localización de esta enzima demostraron que, la colina-fosfato citidililtransferasa también está presente en las membranas del aparato de Golgi (Vance and Vance, 1988). La distribución de esta enzima entre la fracción soluble y particulada es probablemente

importante en el mecanismo de control de su actividad. Existen pruebas claras de que la colina-fosfato citidililtransferasa es un punto clave en la regulación de la biosíntesis de PC en hígado y en otros tejidos (Sleight and Kent, 1980).

El paso final para la síntesis de novo de PC es la formación de PC y CMP a partir de CDPcolina y diacilglicéridos, reacción catalizada por **la colina fosfotransferasa** (EC 2.7.8.2). Van Golde et al. (1971) informaron que la colina fosfotransferasa está exclusivamente localizada en el retículo endoplasmático y que la actividad encontrada en el aparato de Golgi podría ser debida a una contaminación microsomal. Sin embargo, otros autores demostraron que la colina fosfotransferasa está localizada tanto en retículo endoplasmático como en la fracción de Golgi (Higgins et al., 1984; Vance and Vance, 1988). Estas discrepancias pueden ser debidas a los diferentes procedimientos usados para el aislamiento de la fracción de Golgi. La colina fosfotransferasa ha sido solubilizada y purificada de microsomas de hígado de rata (Kanoh et al., 1976). El pH óptimo de esta enzima en hígado de rata está establecido entre 8,0 y 8,5 y la Km aparente para CDPcolina es 0,04 mM y para diacilglicéridos 0,08 mM (Kanoh et al., 1976). Aunque existen pruebas de que la reacción es reversible, la importancia fisiológica de esta reversibilidad debe de ser aún establecida.

### II.3.2. Regulación de la biosíntesis de fosfatidilcolina vía CDP-colina

En los últimos años numerosas pruebas experimentales han indicado que la colina-fosfato citidililtransferasa es un importante punto de control en la síntesis de novo de PC. Así, determinando el pool de los precursores para la síntesis de PC en el hígado o en otros tejidos, se comprueba que la acumulación de colina fosfato es superior a la de colina y CDP-colina. Esto implica que la conversión de colina fosfato a CDP-colina es limitante en la síntesis de PC.

Es interesante el hecho de que la forma soluble de la colina-fosfato citidililtransferasa requiera de la presencia de lípidos para expresar su máxima actividad (Feldman et al., 1980), es decir, la unión de la enzima a membranas naturales o artificiales está asociada con una mayor actividad. El estudio de la unión de la forma soluble de la citidililtransferasa de pulmón a vesículas de membranas artificiales indicó que las vesículas constituidas por PC-ácido oleico eran capaces de ligar a la enzima produciendo un aumento de la actividad enzimática, mientras que las vesículas compuestas sólo por PC son inactivas a este respecto. Se ha sugerido que la estimulación de la citidililtransferasa se produce a través de su unión a la superficie aniónica de la membrana (Feldman et al., 1985). Por otra parte, más recientemente se ha sugerido que la unión de la citidililtransferasa de células Hella a membranas artificiales es mediada por mecanismos hidrofóbicos más que por interacciones iónicas.

Weinhold et al. (1991) han indicado que el ácido oleico estimula efectivamente a la citidililtransferasa de membrana mientras que el fosfatidilglicérido activa principalmente a la enzima citosólica (Weinhold et al., 1991). Estos autores realizaron otros estudios con objeto de clarificar la acción de los ácidos grasos sobre la actividad citidililtransferasa de membrana y síntesis de PC, concluyendo, que los ácidos grasos tienen un efecto directo sobre la citidililtransferasa localizada en la membrana, y que el ácido oleico provoca una disminución en la  $K_m$  para el CTP y un aumento en la  $V_{máx}$  de la reacción. Sugirieron por tanto, que la concentración de CTP puede regular a la actividad citidililtransferasa bajo ciertas condiciones.

Resumiendo, se puede concluir que la estimulación en la síntesis de PC es generalmente acompañada por un incremento de la actividad citidililtransferasa microsomal, mientras que no existen pruebas claras de la correspondiente disminución en la actividad de la forma citosólica de la enzima.

Vance et al. han demostrado que la translocación de la colina-fosfato citidililtransferasa podría estar inducida por la fosforilación reversible de proteínas o por la presencia de ácidos grasos (Vance and Pelech, 1984; Pelech and Vance, 1984). Se ha observado que en períodos cortos de incubación de hepatocitos con análogos de AMPc se produce una disminución de la incorporación de colina a PC (Pelech et al., 1981), acompañado de un descenso en la actividad citidililtransferasa microsomal, mientras que la actividad presente en la fracción soluble esta ligeramente aumentada. En incubaciones prolongadas con AMPc, el efecto inhibitor no se observa y al contrario, la síntesis de PC en células tratadas con AMPc se ve incrementada. La última observación podría estar correlacionada con un incremento en la actividad citidililtransferasa en microsomas.

Estudios realizados con citosol de hígado de rata demostraron que la incubación de esta fracción inducía una activación de la citidililtransferasa dependiente del tiempo (Pelech and Vance, 1982). Este efecto puede ser inhibido por adición de  $Mg^{++}$  y ATP, o por inhibidores de fosfatasas. La inhibición de la enzima dependiente de  $Mg^{++}$  puede ser impedida por la presencia de inhibidores de la proteín-quinasa dependiente del AMPc. Estudios recientes con la colina-fosfato citidililtransferasa purificada han proporcionado evidencias concluyentes de que la enzima puede estar regulada *in vitro* por la fosforilación-defosforilación dependiente del AMPc. Así, Sanghera y Vance (1989) demostraron que tras la incubación de esta enzima con microsomas de hígado en presencia de proteín-quinasa dependiente de AMPc, la actividad enzimática asociada con microsomas se reduce mientras que la correspondiente a la fracción citosólica aumenta. Este efecto está acompañado de un aumento en la cantidad de fosfato radiactivo incorporado a colina-fosfato citidililtransferasa. Por otra parte, el tratamiento con fosfatasa alcalina aumenta la actividad de la enzima en la fracción microsomal mientras que la del sobrenadante disminuye. Correspondientemente, también disminuye la incorporación de fosfato radiactivo a la enzima.

El ácido okadaico, un específico y potente inhibidor de la fosfoproteína

fosfatasa celular, inhibe la asociación dependiente del tiempo de la actividad citidililtransferasa citosólica a la membrana microsomal en el sobrenadante post-mitocondrial de hígado de rata (Hatch et al., 1990) (ver Figura 5).

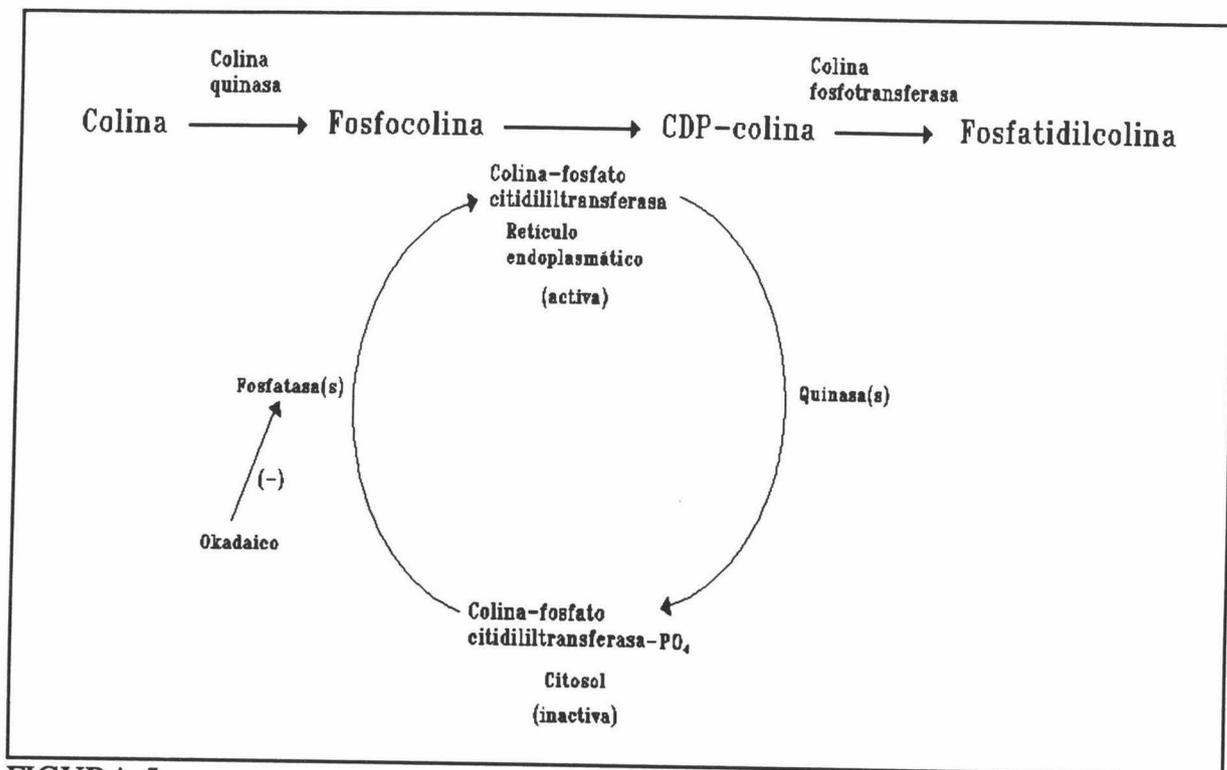


FIGURA 5.

Hatch et al. (1991) corroboraron que las fosfoproteínas fosfatasas 1 y 2A están implicadas en la regulación de la biosíntesis de PC, afectando a la distribución subcelular de la enzima, en hepatocitos aislados de rata. Realizaron experimentos en presencia de ácido okadaico y observaron una inhibición en la biosíntesis de PC en hepatocitos aislados.

Además, se ha sugerido que la enzima puede estar controlada por fosforilación dependiente de proteína quinasa C. Así, los ésteres de forbol pueden activar a la proteína quinasa C mimetizando los efectos del diacilglicérido (Nishizuka, 1986),

aunque posteriormente, Kent et al. (1990) han observado que el tratamiento de células HeLa con esteres de forbol no altera los niveles de fosforilación de la citidiltransferasa, sugiriendo que la estimulación de la proteína quinasa C por los ésteres de forbol conduce a la fosforilación de una proteína distinta de la citidiltransferasa.

Aunque la atención sobre la regulación de la biosíntesis de PC se ha enfocado en el aporte de CDP-colina, hay otros hechos que apuntan a una posible regulación a otros niveles diferentes de la actividad colina-fosfato citidiltransferasa.

Diversos estudios con líneas celulares demostraron una correlación entre la actividad colina quinasa y el grado de síntesis de PC (Warden and Friedkin, 1985). Nishijima et al. (1984) describieron una línea mutada de células ováricas deficiente en colina quinasa. El mutante mostraba una inhibición en la formación de colina fosfato, con una disminución consecuente en la formación de PC. Estas observaciones indicaron que, aunque la conversión de colina fosfato a CDP-colina es supuestamente el paso regulador en la síntesis de novo de PC, bajo ciertas condiciones la colina quinasa podría desempeñar un papel importante en la regulación.

La reacción entre CDP-colina y diacilglicérido es operante próxima al equilibrio y es, además, extremadamente susceptible a cambios en las concentraciones de ambos sustratos. Aunque la mayor parte de los trabajos realizados han indicado que la velocidad de la reacción catalizada por la colina fosfotransferasa está limitada por el aporte de CDP-colina, otros autores sugieren que la cantidad disponible de diacilglicérido puede determinar también el grado de síntesis de PC. El potencial papel regulador del diacilglicérido fue demostrado por Whitlon et al. (1985), quienes informaron que la estimulación en la formación de PC por ácidos grasos cis-insaturados puede estar correlacionada con una activación y traslocación de la colina-fosfato citidiltransferasa en linfocitos bovinos. El tratamiento de las células con ácido retinoico o ácido eicosatetraenoico, aunque produjo los mismos cambios provocados por los ácidos grasos

cis-insaturados en la actividad citidililtransferasa, no aceleró, sin embargo, la síntesis de PC. Estas diferencias pueden ser explicadas por la observación de que la incubación con ácido retinoico deprime ligeramente la actividad de la colina fosfotransferasa, mientras que la presencia de otros ácidos grasos insaturados induce un ligero incremento de la actividad enzimática. Whitlon et al. (1985) han concluido que aunque se requiere una activación de la citidililtransferasa, ésta no es suficiente para una estimulación en la biosíntesis de PC.

Experimentos con células HeLa tratadas con digitonina apoyan también la idea de que la disponibilidad del diacilglicérido puede ser determinante en la síntesis *de novo* de PC. Lim et al. (1986) mostraron que la incorporación de CDP-colina a PC aumenta en células permeabilizadas con digitonina cuando los niveles de diacilglicérido se ven aumentados por la presencia de glicerol 3-fosfato y acil-CoA. Como en células HeLa la concentración de diacilglicérido es muy inferior a la  $K_m$  aparente de la colina fosfotransferasa para el diacilglicérido, se sugirió que el diacilglicérido podría ser importante en la regulación de la síntesis de PC (Lim et al, 1986). Los estudios de Lim et al. (1986), con células HeLa permeabilizadas fueron corroborados por Rüstow and Künze (Rüstow and Künze, 1987) en microsomas aislados de pulmón. Ellos demostraron que el diacilglicérido sintetizado *de novo* a partir de glicerol 3-fosfato no se mezcla con el diacilglicérido endógeno y representa un pool de sustrato diferente para la colina fosfotransferasa. Un aumento en la proporción relativa del diacilglicérido sintetizado *de novo*, comparada con la cantidad total de diacilglicérido, está acompañado de un incremento en la síntesis de PC (Rüstow and Künze, 1987).

Se puede concluir que, aunque la actividad de la colina-fosfato citidililtransferasa es importante en la regulación de la síntesis de PC, la contribución de los factores anteriormente mencionados deben ser también considerados en estudios relacionados con el control de la síntesis de este fosfolípido.

## II.4. DIACILGLICERIDOS COMO PRECURSORES DE FOSFATIDILETANOLAMINA

Una de las rutas para la biosíntesis de PE utiliza diacilglicéridos y CDP-etanolamina como precursores. Esta última es sintetizada de manera similar a como se produce la formación de CDP colina a partir de colina (Figura 4).

### II.4.1. Enzimas implicadas en la biosíntesis de fosfatidiletanolamina vía CDP-etanolamina

La incorporación de etanolamina ha sido investigada en diversos tipos de células. Estudios con células humanas de retinoblastoma y con células de retina de conejo demostraron que estas células presentan sistemas de incorporación de alta afinidad para la etanolamina, distintos de los sistemas de transporte de colina (Yorek et al., 1985; 1986).

La fosforilación de etanolamina por ATP está catalizada por la **etanolamina quinasa** (E.C. 2.7.1.82). Existen pruebas de que la colina quinasa purificada de hígado de rata también es capaz de fosforilar a la etanolamina (Porter et al., 1988). Previamente, Ishidate et al. (1984) habían conseguido la co-purificación completa de la colina y etanolamina quinasa de riñón de rata. Además demostraron que los compuestos hepatotóxicos inducen con la misma magnitud ambas actividades enzimáticas y que presentan propiedades inmunológicas idénticas (Ishidate et al., 1985). Estas observaciones sugieren que la colina y etanolamina quinasa de riñón de rata podrían tener diferentes sitios activos, residentes en la misma proteína. En preparaciones de enzima altamente purificada, los valores de  $K_m$  aparente para etanolamina y ATP son de 0,6 y 1,5 mM

respectivamente.

El segundo paso en la síntesis de novo de PE implica la formación de CDP-etanolamina a partir de etanolamina fosfato y CTP. Se puede deducir de la relación de concentraciones de etanolamina fosfato y CDP-etanolamina en hígado de rata que, esta reacción catalizada por la **etanolamina-fosfato citidililtransferasa** (EC 2.7.7.14) puede ser importante en la regulación de la síntesis de PE vía CDP-etanolamina (Tijburg et al., 1988). A diferencia de la colina-fosfato citidililtransferasa, esta enzima parece estar localizada exclusivamente en el citosol de varios tejidos (Schneider et al., 1978).

La etanolamina-fosfato citidililtransferasa presenta un pH óptimo de 7,8 y otro con menor actividad alrededor de pH 6,0. La  $K_m$  aparente para la etanolamina fosfato es 0,053 mM y para el CTP es 0,065 mM.

La enzima implicada en la formación de PE a partir de CDP-etanolamina y diacilglicérido es la **etanolamina fosfotransferasa**. Esta enzima está firmemente ligada a las membranas del retículo endoplasmático (Butterwith et al., 1984). Sin embargo, posteriormente, Vance y Vance (1988) han demostrado la existencia de una considerable actividad etanolamina fosfotransferasa en el aparato de Golgi.

Polokoff et al. (1981) describieron una línea celular ovárica deficiente en etanolamina fosfotransferasa pero con una actividad colina fosfotransferasa intacta. Esta ha sido la primera prueba de que las reacciones fosfotransferasas son catalizadas por dos enzimas diferentes. Pruebas adicionales se obtuvieron en levaduras mutadas defectivas en actividad colina fosfotransferasa pero con actividad etanolamina fosfotransferasa (Hjelmstad and Bell, 1987; Hosaka and Yamashita, 1987)

El pH óptimo de la etanolamina fosfotransferasa se encuentra entre 8-9 (Vance and Vance, 1988). Los valores de  $K_m$  aparente para CDP-etanolamina y

diacilglicérido parecen ser altamente dependientes de la presencia de fosfolípidos y del grado de purificación de la enzima (Vecchini et al., 1987). De este modo, la etanolamina fosfotransferasa solubilizada y parcialmente purificada de hígado de rata muestra una  $K_m$  aparente para CDP-etanolamina 0,022 mM, mientras que valores considerablemente más altos se obtuvieron en microsomas de hígado y pulmón de rata.

#### II.4.2. Regulación de la biosíntesis de fosfatidiletanolamina vía CDP-etanolamina

Generalmente, se ha supuesto que la regulación en la formación de PE es similar y relacionada a la de PC, aunque los niveles hepáticos de PC y de los precursores que contienen colina son más susceptibles a alteraciones en el estado dietario de la rata que los niveles de PE y de sus precursores metabólicos (Tijburg et al., 1988).

Los estudios relacionados con la regulación hormonal de la biosíntesis PC y PE, apoyan fuertemente la idea de que la biosíntesis de estos fosfolípidos está bajo un control independiente. El tratamiento de los hepatocitos con norepinefrina (Haagsman et al., 1984) o vasopresina (Tijburg et al., 1987) inhibe la incorporación de colina marcada radiactivamente a PC, mientras que la formación de PE a partir de etanolamina marcada se ve aumentada.

Aunque la regulación en la síntesis *de novo* de PE no ha sido estudiada tan extensamente como la de PC, se han sugerido varios puntos de control. Infante (1977) concluyó a partir de datos cinéticos que la reacción catalizada por la etanolamina quinasa o por la etanolamina-fosfato citidililtransferasa, pueden ser las etapas reguladoras de la ruta. De acuerdo con esta conclusión, Zelinsky y Choy (1982), observaron que en corazón de hámster la presencia de colina inhibe la incorporación de [ $^{14}\text{C}$ ]etanolamina a PE como

resultado de la inhibición de la etanolamina quinasa.

Sundler y Akesson (1975) demostraron que la exposición de los hepatocitos a concentraciones crecientes de etanolamina aumenta la incorporación de glicerol marcado a PE. Este efecto está acompañado de un aumento considerable del tamaño del pool de la etanolamina fosfato, mientras que el tamaño del pool de la CDP-etanolamina permanece relativamente constante. Estas observaciones indican que la etanolamina-fosfato citidililtransferasa puede ser considerada como un posible punto de control en la biosíntesis de PE (Sundler and Akesson, 1975). \*Tijburg et al. (1987) proporcionaron también pruebas del papel regulador de la etanolamina-fosfato citidililtransferasa. Estudios realizados con hepatocitos aislados demostraron que el tratamiento de las células con ésteres del forbol incrementa la incorporación de etanolamina marcada a PE, con un consecuente incremento de la actividad etanolamina-fosfato citidililtransferasa, y una reducción del tamaño del pool de etanolamina fosfato. Además, la formación de PE a partir de CDP-etanolamina y diacilglicérido, el último paso de la ruta, también parece aumentar en presencia del acetato miristato forbol. Este último efecto puede ser explicado por un incremento en los niveles de diacilglicérido celular en presencia del éster del forbol.

En otros estudios se ha analizado la contribución a la regulación de la composición de ácidos grasos de los diacilglicéridos celulares. El tratamiento de los hepatocitos de rata con diferentes ácidos grasos demostró que el ácido mirístico y el ácido láurico inhiben la incorporación del glicerol marcado a PE (Sundler et al, 1974). La incubación de los hepatocitos con ácido oleico estimula la síntesis *de novo* de PE. La concentración de CDP-etanolamina en los hepatocitos incubados con ácido láurico fue considerablemente superior a la de los hepatocitos incubados con ácido oleico (Sundler and Akesson, 1975). Esto mostró que la composición en ácidos grasos de los diacilglicéridos recién formados podría regular la síntesis de PE.

Recientemente, Houweling et al. (1992) han estudiado el efecto de la

hepatectomía parcial (70%) sobre la síntesis de PE en hígado de ratas durante períodos post-operatorios. Observaron un aumento en la cantidad de PE hepática que fue acompañado de un incremento en la incorporación de [ $^{14}\text{C}$ -etanolamina] a PE. Sin embargo, no detectaron ningún cambio en las actividades etanolamina-fosfatidiltransferasa, etanolamina quinasa o etanolamina fosfotransferasa, aunque si comprobaron un considerable aumento en los niveles hepáticos de etanolamina y fosfoetanolamina, así como en los niveles de etanolamina del suero. Concluyeron que el incremento observado en el suero en la concentración de etanolamina después de la hepatectomía fue la responsable del incremento en la biosíntesis de PE y de la acumulación hepática de etanolamina y fosfoetanolamina. Quedaba, no obstante, una duda por resolver, concerniente al origen de la etanolamina extrahepática. Debido a que los niveles séricos de serina sólo se incrementaron ligeramente después de la hepatectomía, sugirieron que en estas circunstancias, en otra parte del organismo la serina sería continuamente movilizada y convertida en etanolamina.

## II.5 OTRAS RUTAS PARA LA BIOSÍNTESIS DE FOSFATIDILCOLINA Y FOSFATIDILETANOLAMINA

Además de las rutas anteriormente mencionadas para la síntesis *de novo* de PC y PE, la formación de estos fosfolípidos puede ser también realizada por la utilización de fosfolípidos preexistentes. En esta sección, se incluye la biosíntesis de PC por metilación de PE y la biosíntesis de PE por descarboxilación de fosfatidilserina (PS).

### II.5.1 Biosíntesis de fosfatidilcolina por metilación de fosfatidiletanolamina

Bremer y Greenberg (1961) fueron los primeros en describir la conversión enzimática de PE a PC vía S-adenosilmetionina (AdoMet) mediante sucesivas etapas de metilación. En este proceso, los grupos metilo son transferidos desde la S-adenosil-L-metionina por mediación de la enzima PE-metiltransferasa. La actividad metiltransferasa está localizada en microsomas de hígado y proporciona el 20-40% de la cantidad total de PC sintetizada por los hepatocitos (Sundler and Akesson, 1975).

Actualmente, existe aún controversia sobre el número de enzimas implicadas en las reacciones de metilación de PE y sus parámetros cinéticos. Aunque, se ha propuesto que son dos las enzimas implicadas en los tres pasos de metilación en microsomas de hígado (Hoffman and Cornatzer, 1981), se ha demostrado que los procesos de metilación de PE exhiben valores similares de PH óptimo y parámetros cinéticos, lo que sugiere la existencia de una misma proteína enzimática, con capacidad para catalizar las tres reacciones (Audubert and Vance, 1983; Marino et al., 1986). De hecho, la enzima se ha purificado y se ha comprobado que consta de una subunidad única con una masa molecular de 18,3 kDa que cataliza cada una de las tres etapas de metilación.

En el control de la biosíntesis de PC por metilación de PE están implicadas diferentes hormonas. Así, se ha comprobado que la incubación de los hepatocitos de rata con vasopresina incrementa la actividad de la PE metiltransferasa (Alemany et al., 1981), mientras que el glucagón y los análogos del AMPc, en períodos cortos de incubación, parecen inhibir la incorporación de etanolamina marcada a PC en hepatocitos (Pelech et 1984; Pritchard et al., 1981). Este efecto podría no estar correlacionado con una disminución de la actividad PE metiltransferasa *in vitro*. Por el contrario, otros autores observaron que después de incubar hepatocitos con análogos del AMPc, la actividad de

la enzima fue considerablemente superior (Merida and Mato, 1987). Estas discrepancias parecen indicar que otros factores están implicados en la regulación del grado de metilación de la PE. Existen pruebas de que el aporte de sustratos y la presencia de productos finales son de gran importancia para determinar la magnitud de la biosíntesis de PC por metilación de PE. El aporte de metionina es uno de los factores que desempeña un papel importante en la modulación del grado de metilación de PE. Cuando los hepatocitos de rata son incubados con concentraciones crecientes de metionina, se observa un aumento en la formación de PC desde PE. Observaciones similares se han obtenido con hepatocitos de ratas deficientes en colina (Yao and Vance, 1988). La incubación de estos hepatocitos en un medio deficiente de colina y metionina provocó una acumulación considerable de triacilglicéridos debido a una secreción disminuida en VLDL, al añadir metionina al medio incrementa marcadamente la síntesis de PC, observando al mismo tiempo una reducción en los niveles celulares de PE.

Por otra parte, otros estudios han demostrado que la incubación de los hepatocitos con 3-deazoadenosina inhibe fuertemente la incorporación de etanolamina a PC (Vance and Vance, 1986). La 3-deazoadenosina es un potente inhibidor de la S-adenosilhomocisteína hidrolasa, y consecuentemente, incrementa los niveles celulares de S-adenosilhomocisteína, conduciendo a una fuerte inhibición de la metilación de PE. De ello, se propone que la relación AdoMet/adenosilhomocisteína parece ser un factor importante en la regulación del grado de metilación de PE. También se sugiere que la cantidad de PE celular puede ser importante en la regulación de la metilación (Akesson, 1978), así se observa que cuando la concentración de PE en hepatocitos de rata se incrementa por adición de etanolamina o por ausencia de metionina, se incrementa también el grado de metilación de PE. Ridgway et al. (1989) obtuvieron pruebas de que la actividad de la PE metiltransferasa en hepatocitos de ratas deficientes en colina y metionina se correlaciona fuertemente con la concentración de PE. En definitiva, se puede concluir que existen suficientes pruebas acerca de la regulación de la PE metiltransferasa por la presencia de sustratos o productos y no por la regulación directa de la actividad

enzimática.

En cerebro, sólo un 5% de la producción total de PC es sintetizada a partir de la metilación de PE (Vance and Kruifjh, 1980), debido a que la PE metiltransferasa en cerebro presenta una actividad muy baja comparada con la de hígado (Crews et al., 1980). Sin embargo, se ha postulado una posible ruta alternativa para la producción de colina libre y compuestos que contienen colina. Así, estudios realizados por Andriamampandry et al. (1990) proporcionaron pruebas de que en cerebro de rata existe una N-metiltransferasa citosólica capaz de metilar a la fosfoetanolamina, fosfomonometiletanolamina y fosfodimetiletanolamina en presencia de S-adenosilmetionina. Esta enzima, también existe en citosol de hígado (Salerno and Beeler, 1973), aunque su actividad es mucho menor a la de cerebro. Finalmente, se ha concluido que en hígado está favorecida la metilación de PE para producir PC, mientras que en cerebro está favorecida la metilación de fosfoetanolamina.

#### **II.5.2 Biosíntesis de fosfatidiletanolamina por descarboxilación de fosfatidilserina**

La PE se puede sintetizar por tres rutas diferentes. La contribución relativa de cada una a la cantidad total de PE formada en diferentes tejidos no ha sido aún aclarada. Además de la vía CDPetanolamina, la PE puede ser sintetizada por un intercambio estimulado por  $\text{Ca}^{++}$  de la etanolamina con la base nitrogenada de los fosfolípidos preexistentes y por descarboxilación de PS. Se piensa que la biosíntesis de PS en tejidos de animales se produce a través de un intercambio de serina con la cabeza polar de PC y PE.

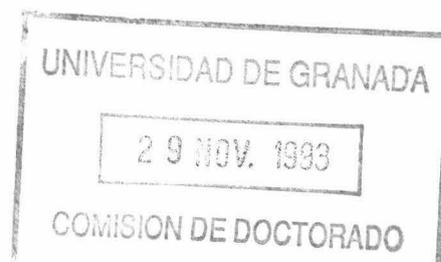
## II.6. OTRAS RUTAS

### II.6.1. Síntesis de fosfatidilgliceroles y fosfatidilinositales

El ácido fosfatídico puede ser transformado a CDP-diacilglicérido mediante la fosfatidato:CTP citidililtransferasa (EC 2.7.7.41). Esta reacción es importante para la síntesis de fosfatidilgliceroles cargados negativamente, difosfatidilgliceroles, y fosfatidilinositales.

En animales (Bell and Coleman, 1980) y probablemente en otros eucariotas (Harwood, 1985) las enzimas para la síntesis de fosfatidilgliceroles y difosfatidilgliceroles son predominantemente mitocondriales. La fosfatidilglicerol fosfato sintetasa se encuentra en la membrana interna mitocondrial, mientras que la fosfatasa probablemente es soluble. En tejidos de animales y plantas el fosfatidilglicerol y CDP-diacilglicérido son co-sustratos para la síntesis de difosfatidilgliceroles.

El fosfatidilinositol también se puede formar a partir de CDP-diacilglicérido, aunque en este caso sólo un paso enzimático está implicado. La mayoría de inositidos, difosfoinositidos y trifosfoinositidos, son formados a partir de fosfatidilinositol mediante actividades quinasas. Estas actividades son particularmente elevadas en el tejido nervioso.



Se considera que la descarboxilación de la PS contribuye significativamente a la biosíntesis de PE en células de mamíferos (Bell and Coleman, 1980). Así, Voelker (1984) demostró que en células de riñón de hámster recién nacido cultivadas en ausencia de etanolamina, la descarboxilación de PS podría responder aproximadamente a toda la PE formada. La incubación de estas células con [ $^3\text{H}$ ]serina y el consiguiente análisis de la PS y PE sintetizada, mostró que el 96% de la radiactividad recogida en PS y PE está presente en la cabeza polar de estos fosfolípidos. Esto indica que en células de riñón de hámster recién nacido, la PE es sintetizada primordialmente por descarboxilación de PS. El papel propuesto para la PS como principal precursor de PE fue confirmado en otros experimentos realizados con varias líneas celulares mutadas (Voelker and Frazier, 1986; Miller and Kent, 1986). Miller y Kent (1986) aislaron un linaje mutado de células ováricas de hámster con una actividad etanolamina-fosfato citidililtransferasa reducida en un factor de 2. La comparación de este mutante con la línea celular parental mostró, que a pesar del defecto en la ruta CDP-etanolamina, los niveles celulares de PE no se alteraban en el mutante. Como esta observación no podría ser explicada por una aceleración en la formación de PE a partir de PS, estos investigadores concluyeron que la PS es el principal precursor para PE en células ováricas de hámster.

Se debe tener en cuenta que las líneas celulares mencionadas anteriormente fueron cultivadas en ausencia de etanolamina, mientras que la concentración de etanolamina en el suero de ratas es aproximadamente 0,025 mM. Esto implica que *in vivo* las células están expuestas a un aporte constante de etanolamina. Cuando los hepatocitos frescos aislados de ratas fueron incubados con [ $^3\text{H}$ ]serina durante 90 min, el 56% de la radiactividad total asociada a la PE se localiza en la base y un 44% en la porción diacilglicérido (Tijburg et al., 1989). La adición de etanolamina al medio de incubación incrementó la radiactividad recogida en la porción diacilglicérido comparada con la fracción polar de PE. Esto confirma que en los hepatocitos, a diferencia de lo que ocurre en otras líneas celulares cultivadas, hay una considerable incorporación de radiactividad desde serina a la fracción diacilglicérido de PE vía CDP-etanolamina.

Arthur y Page (1991) obtuvieron resultados que demostraron que en corazón, hígado y riñón de rata, tanto la PE como el plasmalógeno de etanolamina son sintetizados por la ruta CDP-etanolamina, y por lo tanto en estos tejidos la PE no deriva exclusivamente de la descarboxilación de PS. Los resultados obtenidos por Arthur y Page corroboran los estudios realizados por Tijburg et al. (1989) con hepatocitos aislados. Añadieron además que la ruta de descarboxilación es utilizada únicamente para la síntesis de PE y no para la síntesis del plasmalógeno de etanolamina.

En cerebro también es viable la formación de PE por descarboxilación de PS, siendo esta vía responsable del 7% de la PE formada en el cerebro. En el hígado, la PE sintetizada por descarboxilación de PS es transportada a las membranas del retículo endoplasmático donde es metilada a PC. El metabolismo de los fosfolípidos en cerebro difiere en varios aspectos al del hígado, por ejemplo las reacciones de metilación que forman PC a partir de PE son muy poco activas en cerebro, como consecuencia, el significado metabólico de la descarboxilación puede ser diferente en hígado y cerebro. En los trabajos realizados por Carlini et al. (1993) se estudió el destino de la PE formada por descarboxilación de PS en mitocondrias de cerebro de rata, observándose que aunque la PE formada puede ser trasladada desde su lugar de síntesis (membrana interna mitocondrial) a las membranas del retículo, este fenómeno es muy lento y puede estar limitado en el cerebro. Estos descubrimientos confirman los resultados obtenidos por Corazzi et al. (1993) y conducen a la conclusión de que la reacción catalizada por la PS descarboxilasa tiene un papel diferente en hígado y cerebro. En hígado, participa en la formación de PC y PS, mientras que en cerebro, se asocia principalmente a la biosíntesis de PE en membranas mitocondriales.

## II.6.2. Reacción de intercambio de bases: remodelado de fosfolípidos y biosíntesis de fosfatidilserina

Las enzimas que intercambian bases entre los fosfolípidos (base: fosfolípido fosfatidiltransferasa) cataliza la incorporación de colina, etanolamina y serina exógenas a los fosfolípidos preexistentes, y han sido estudiadas en diferentes fracciones celulares de distintos tejidos animales.

Estas reacciones de intercambio de bases representan una ruta minoritaria para la síntesis de la mayoría de los fosfolípidos, excepto para la PS. Así, se ha observado al estudiar la contribución del intercambio de bases en la biosíntesis de PE en hepatocitos de rata, que en presencia de concentraciones fisiológicas de etanolamina, sólo un 8-9% de la etanolamina incorporada a PE puede ser atribuida a una reacción de intercambio de bases (Sundler et al., 1974). Por ello las reacciones de intercambio de bases no producen una síntesis neta de los fosfolípidos mayoritarios, sino que producen una remodelación de la porción amino alcohol de los ya existentes (Kanfer, 1989). Por otra parte, podrían proporcionar un mecanismo rápido e independiente de energía para reponer a los fosfolípidos agotados, manteniendo así la integridad de la membrana.

Dichas enzimas son estimuladas por elevadas concentraciones de  $\text{Ca}^{++}$ , muy alejadas de los niveles fisiológicos de  $\text{Ca}^{++}$  en el citosol ( $0.1-1 \mu\text{M}$ ), por lo que puede ser cuestionada la relevancia fisiológica de este efecto. Otros cationes divalentes (Mori et al., 1989) también afectan su actividad. Siddiqui et al. (1992) observaron en membranas plasmáticas de hígado de rata que, el ión  $\text{Mg}^{++}$  estimula la incorporación de colina, mientras que el  $\text{Mn}^{++}$  estimula la incorporación de inositol. Las diferencias observadas en los efectos de los cationes apoya la sugerencia de que las reacciones de intercambio de bases puedan ser catalizadas por enzimas diferentes (Kanfer, 1980).

Hemos mencionado anteriormente que la biosíntesis de PS en tejidos de animales se produce a través de un intercambio de serina con la cabeza polar de PC y PE (Figura 6). Recientes estudios con una línea de células ováricas defectivas en biosíntesis de PS sugieren que la PC funciona como el precursor principal de PS (Kuge et al., 1985; Voelker and Frazier, 1986). Kuge et al. (1985; 1986) proporcionaron pruebas de que hay al menos dos especies de enzimas que intercambian serina, una puede catalizar la reacción de intercambio de base de fosfolípidos con colina, serina y etanolamina, mientras que la otra no utiliza colina como sustrato.

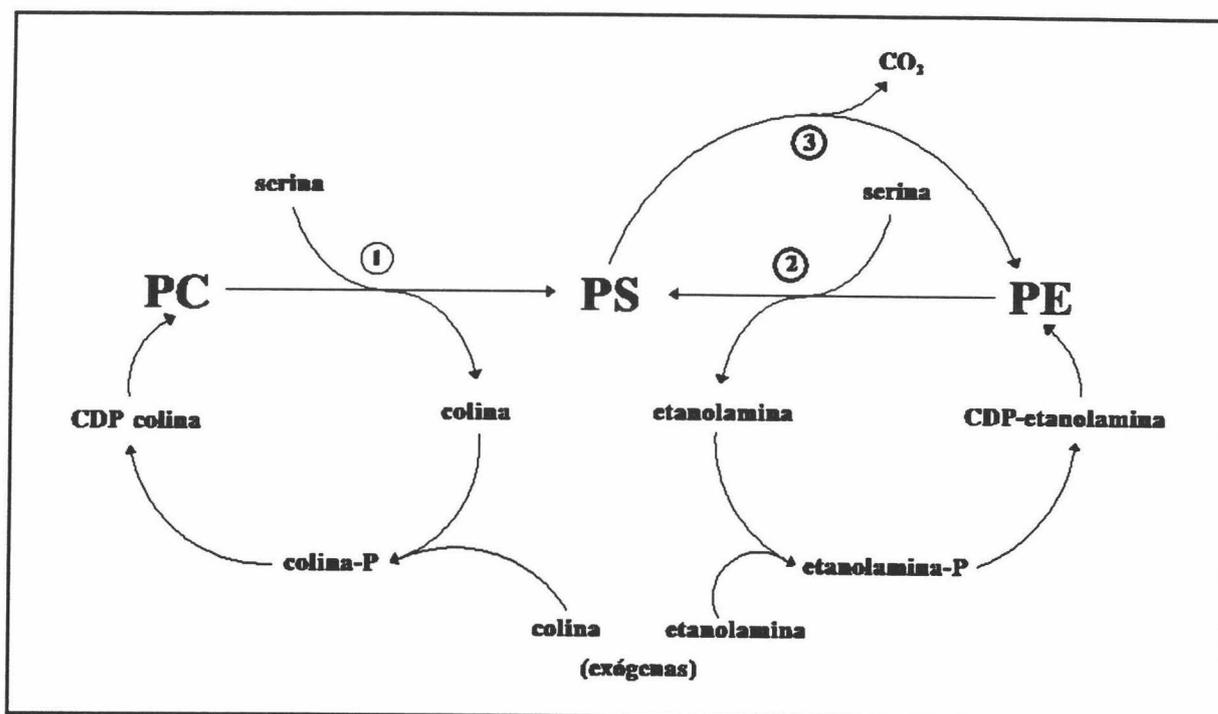


FIGURA 6.- Interconversiones en la biosíntesis de fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina. (1) y (2) enzimas de intercambio base-serina; (3) fosfatidilserina descarboxilasa.

La PS formada a partir de la serina exógena es translocada a la mitocondria. Un mecanismo propuesto para este movimiento requiere en primer lugar ATP y puede implicar la formación de vesículas procedentes del retículo endoplasmático (Voelker, 1985;

<sup>a</sup>1989). La segunda etapa es independiente de ATP y puede requerir la formación de complejos de colisión entre el orgánulo donador y la mitocondria. La PS translocada es rápidamente descarboxilada a PE en la membrana interna mitocondrial (Butler and Morell, 1983). La síntesis de PS a partir de serina, su translocación de los microsomas a la mitocondria, y su descarboxilación a PE, puede ser reconstituida con membranas celulares aisladas y orgánulos (Voelker, 1989).

Sin embargo, también existen pruebas de sistemas reconstituidos *in vitro* carentes de factores solubles o ATP exógeno que pueden transportar PS entre microsomas y mitocondrias (Voelker, 1989; Vance, 1991). Corazzi et al. (1993) han dado pruebas que demuestran que, la síntesis de PS y su posterior descarboxilación se produce en mezclas de incubación que contienen microsomas y mitocondrias purificadas de tejido cerebral de ratas, indicando que no es necesaria la presencia de factores solubles para la síntesis y descarboxilación de PS. Postularon que durante la transferencia de PS, se transfiere cierto material entre las membranas aunque no se produce un proceso real de fusión. Corazzi et al., añadieron que el ión  $\text{Ca}^{++}$  favorece la transferencia de la PS desde los microsomas a las mitocondrias. Observaron además que la radiactividad específica de la PS transferida a la mitocondria es mayor que la de la PS microsomal.

## II.7. CATABOLISMO

### II.7.1. Catabolismo de glicerofosfolípidos

El catabolismo de los glicerofosfolípidos está catalizado por una serie de fosfolipasas denominadas A, B, C y D dependiendo de la posición del enlace sobre el cual ejercen su acción enzimática (Figura 7).



La fosfolipasa B es conocida como monoacilfosfolipasa (lisofosfolipasa). Actúa sobre los monoacil derivados 1-acil y 2-acil de la PC y PE. Los ácidos grasos insaturados son los sustratos preferidos por estas fosfolipasas (Van den Bosch et al., 1968).

Puesto que la PC es un constituyente principal de las membranas de células eucariotas, es importante considerar el catabolismo de este fosfolípido. Los estudios propuestos sobre la regulación del catabolismo de la PC presentan problemas difíciles de superar, debido a que las fosfolipasas implicadas en el *turnover* de PC están distribuidas en varios compartimentos celulares (Waite, 1987), y porque además los productos del catabolismo de PC (glicerolfosfocolina, fosfocolina, lisoPC, colina) podrían ser metabolizados y reutilizados para la síntesis de PC, complicando la interpretación de los experimentos. Se han presentado pruebas (Morash et al., 1988) de que en varias líneas de células neuronales la principal ruta degradativa de la PC consiste en la eliminación de ácidos grasos, siendo la glicerolfosfocolina el principal metabolito intracelular de la ruta degradativa. Esto indica que en general el catabolismo de PC se inicia por la acción de la fosfolipasa A<sub>1</sub> o fosfolipasa A<sub>2</sub>. Un estudio posterior (Morash et al., 1989) indicó que la fosfolipasa A<sub>2</sub> es más importante en la degradación completa de la PC que la fosfolipasa A<sub>1</sub>.

Tijburg et al. (1991) informaron que los hepatocitos de ratas deficientes en colina proporcionaban un modelo adecuado para estudiar el catabolismo de PC. La principal ventaja de este sistema es que permite una biosíntesis rápida de PC sin acumulación de marcaje en los precursores biosintéticos, especialmente fosfocolina, permitiendo al mismo tiempo observar cambios en la cantidad de radiactividad del producto principal de degradación, glicerolfosfocolina. La conclusión principal del estudio realizado por Tijburg et al. (1991) fue que, el catabolismo de PC puede ser regulado en hepatocitos, presentando pruebas de que la concentración de PC en los hepatocitos podría constituir un factor importante en la regulación del catabolismo de PC. Fueron capaces de alterar el catabolismo de PC cambiando la concentración de PC celular por suplementación

de las células con colina. Observaron un incremento significativo en la acumulación de glicerolfosfocolina marcada en las células suplementadas con colina como consecuencia del aumento en el catabolismo del fosfolípido. Concluyeron finalmente que la biosíntesis y catabolismo de PC están sujetas a un control coordinado.

Posteriormente, Tijburg y Vance (1991) observaron que la suplementación de los hepatocitos de rata deficientes en colina con dimetiletanolamina incrementaba el catabolismo de PC, efecto que se vio acompañado por un aumento en la producción de glicerolfosfocolina. Sin embargo, no fue observado ningún efecto cuando las células se incubaron con monometiletanolamina. La razón propuesta por estos autores fue que la formación de fosfatidil-NN-dimetiletanolamina a partir de su correspondiente base, vía CDP-derivado, imita el efecto de la síntesis de PC a partir de colina incrementando el catabolismo de PC.

### II.7.2. Catabolismo de los triacilglicéridos

El catabolismo de los triacilglicéridos está catalizado por lipasas. Un amplio número de tales enzimas han sido purificadas de animales, plantas y microorganismos. El término lipasa se usa mal frecuentemente. Una verdadera lipasa es la que ataca a los triacilglicéridos y actúa sólo en la interfase lípido-agua. Esta definición excluye a las enzimas que actúan sobre los ésteres solubles en agua (esterasas) o a aquellas hidrolizantes preferentemente de otros lípidos (acil hidrolasas).

La actividad en los tejidos de la lipasa sensible a hormonas es estimulada por adrenalina (epinefrina), glucagón, ACTH (corticotropina), TSH (tirotropina) y serotonina (Jensen, 1971). Estas hormonas supuestamente ejercen sus efectos sobre el tejido adiposo por estimulación de la adenilato ciclasa. Ciertamente, el aumento en la

formación de AMPc se produce por hormonas lipolíticas, y se ha demostrado que el AMPc estimula la actividad lipasa en preparaciones celulares (O'Doherty, 1978). La fosforilación/defosforilación también parece estar implicada (Belfrage et al., 1983).

### **III. EFECTO DEL ETANOL SOBRE EL METABOLISMO DE LOS FOSFOLIPIDOS**

Los fosfolípidos son moléculas integrantes de las membranas cuya función principal es servir como componentes estructurales de las membranas plasmáticas y de los orgánulos subcelulares. También están implicados en el funcionamiento de ciertos receptores, además de desempeñar un papel importante en la activación de algunas enzimas ligadas a membrana.

Uno de los efectos farmacológicos más importante de la ingestión del etanol es la alteración de las funciones hepáticas. Muchos de estos efectos son debidos a las consecuencias metabólicas de la oxidación del etanol (Baraona and Lieber, 1979). Sin embargo, se ha observado que el etanol altera la organización celular de las membranas (Chin and Goldstein, 1977). Así, se ha publicado que las membranas microsomales, mitocondriales y plasmáticas del hepatocito se adaptan a la presencia del etanol (Ponnappa et al., 1982; Polokoff et al., 1985, Sánchez-Amate, 1991). Esta adaptación de las membranas a la ingesta crónica de etanol produce cambios en las actividades enzimáticas ligadas a membrana (Zysset et al., 1985; Sánchez-Amate, 1991). El efecto del etanol sobre las membranas también se asocia a alteraciones en el funcionamiento de receptores, flujo de iones, liberación de neurotransmisores y generación de segundos mensajeros, en hígado o en cerebro. Estos cambios pueden ser explicados como consecuencia de los efectos del etanol sobre la organización estructural y funcional de lípidos y proteínas de membrana.

La PC y la PE son los fosfolípidos mayoritarios en tejidos de mamíferos, por ello las alteraciones en su metabolismo como resultado de la ingesta de etanol pueden ser muy importantes, sin embargo han sido escasos los estudios realizados sobre el efecto del etanol en el metabolismo de estos fosfolípidos.

Uthus et al. (1976) observaron que la administración de etanol estimula significativamente la actividad específica de la PE metiltransferasa de la ruta de biosíntesis de PC en microsomas de hígado de rata. Este aumento en la actividad puede ser el resultado del efecto del etanol sobre la proliferación del retículo endoplasmático hepático (Iseri et al., 1966) y la estimulación de actividades enzimáticas ligadas al retículo de hígado, así el etanol actuaría como el fenobarbital, el cual estimula las enzimas del retículo endoplasmático y la biosíntesis de fosfolípidos (Holtzman and Gillete, 1968).

Más recientemente, Magruder et al. (1984) encontraron el mismo efecto cuando analizaron las alteraciones inducidas por el etanol en los fosfolípidos de las membranas plasmáticas sinaptosomales de rata. Ellos cuantificaron los fosfolípidos a los 3, 6, 10 y 14 días de tratamiento, y observaron que a los 14 días se producía un incremento significativo en PC así como una disminución en PE, como resultado del incremento inducido por el etanol en la ruta de síntesis de PC por metilación de la PE. Estos resultados eran concordantes con los obtenidos por Nhamburo et al. (1982) quienes mostraron que el etanol administrado por inhalación producía un incremento en la incorporación de grupos metilo en los fosfolípidos sinaptosomales de rata.

Los datos de Magruder et al. (1984) mostraron que la incorporación de grupos metilo en los sinaptosomas permanecía elevada durante los tres días siguientes de la retirada de etanol y retornaba a sus valores normales a los siete días, contradiciendo los resultados de Nhamburo et al. (1982) quienes mostraron que la incorporación de grupos metilo retornaba a los niveles controles a las 6-8 horas de la retirada. Los distintos diseños experimentales en ambos trabajos pueden justificar las discrepancias obtenidas.

Funciones hepáticas, tales como la glucogenolisis, están reguladas por una variedad de hormonas circulantes que actúan a través de receptores localizados en la superficie celular. La activación de los receptores alfa<sub>1</sub>-adrenérgicos y de vasopresina V<sub>1</sub> inician una cascada de reacciones que controlan la concentración de calcio intracelular mediante la liberación del inositol trisfosfato (IP<sub>3</sub>) a partir del catabolismo fosfodiésterico del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) (Kirk et al., 1981; Lynch et al., 1985). El aumento producido en las concentraciones de calcio citosólico libre, a partir de la movilización del calcio del retículo endoplasmático mediada por el IP<sub>3</sub>, puede modular la actividad de la fosforilasa hepática y respuestas celulares como la glucogenolisis en el hepatocito (Thomas et al., 1983; Joseph et al., 1984).

Gonzales y Crews (1991), investigaron en ratas los efectos de la ingestión crónica del etanol sobre la acumulación de los <sup>3</sup>H-inositoles fosfatos en cortes de hígado, expuestos a norepinefrina y arginina-vasopresina. Además analizaron si el etanol es capaz de alterar las señales de traducción ligadas a fosfoinositidos en las células de hígado. Sus resultados indicaron que el tratamiento crónico con etanol puede interferir con la hidrólisis de fosfoinositidos mediada por receptores alfa<sub>1</sub>-adrenérgicos y de vasopresina. Así, observaron una disminución en la hidrólisis de fosfoinositidos estimulada por ambos neurotransmisores en ratas tratadas con una dieta líquida alcohólica durante cinco meses. El tratamiento con etanol no produjo ningún efecto sobre los parámetros de unión de prazosina o arginina-vasopresina en las membranas plasmáticas de hígado, sugiriendo que los efectos del etanol se ejercen en un lugar distinto del receptor. Estos descubrimientos contradicen a los de Smith et al. (1983) quienes informaron de un incremento en la síntesis de fosfoinositidos en hepatocitos de ratas alimentadas con etanol. Sin embargo, tales discrepancias pueden ser debidas a diferencias en la dieta crónica, preparación del tejido, o al hecho de que Gonzales and Crews (1991) midieron la hidrólisis de fosfoinositidos directamente en lugar de su síntesis.

Gonzales y Crews (1991) añaden que la relación entre la inhibición

producida por el etanol sobre la hidrólisis de fosfoinosítidos mediada por hormonas en cortes de hígado de rata después del tratamiento crónico con etanol y las posteriores respuestas celulares tales como movilización de calcio o activación de la fosforilasa no son conocidas. Se especula que aunque el acoplamiento de los receptores a la fosfolipasa C que media la hidrólisis de fosfoinosítidos es 1:1, parece que existan receptores de reserva para la movilización del calcio mediada por receptores alfa<sub>1</sub>-adrenérgicos y arginina-vasopresina (Kirk et al., 1981; Lynch et al., 1985).

Se conoce que los receptores alfa<sub>1</sub>-adrenérgicos y de vasopresina están acoplados a la fosfodiesterasa específica de fosfoinosítidos a través de una proteína que une nucleótidos de guanina (Uhing et al., 1986). El etanol puede ejercer sus efectos sobre el acoplamiento de los receptores a la proteína y/o sobre la interacción del complejo receptor activado con la fosfodiesterasa. Recientemente, Hoek et al. (1987; 1988), presentaron pruebas de que el etanol *in vitro* puede activar transitoriamente a la fosfodiesterasa en hígado produciendo la movilización de calcio y activación de la fosforilasa. Estudios realizados con hepatocitos aislados de rata mostraron que el etanol *in vitro* incrementa la concentración intracelular de calcio en menos de un minuto, aunque la respuesta rápidamente se desensibiliza en otro minuto aparentemente debido a la activación de la proteína quinasa C (Hoek et al., 1988) que podría causar una inhibición *feedback* de la interacción receptor-fosfolipasa C.

Aunque la adición de alcoholes a hepatocitos estimula temporalmente la fosfolipasa C específica de fosfoinosítidos, no se ha demostrado sin embargo una activación directa de la fosfolipasa C específica de fosfoinosítidos por alcoholes en hepatocitos permeabilizados o en membranas de hepatocitos (Rubin et al., 1988; Thomas et al., 1989).

Los efectos del etanol sobre la hidrólisis de los fosfolípidos acídicos, especialmente el de los poli fosfoinosítidos, han sido ampliamente estudiados por muchos

autores, sin embargo es poca la información referente al efecto del etanol sobre el catabolismo de los fosfolípidos neutros. La formación de fosfatidiletanol se ha usado como índice de activación específica de la fosfolipasa D (Liscovitch, 1989; Martin and Michaelis, 1989), ya que el etanol sustituye al agua durante la ruptura de la PC y otros fosfolípidos para producir fosfatidiletanol en lugar de fosfatidato.

La regulación del catabolismo de la PC por las fosfolipasas C y D ha sido estudiada recientemente (Exton, 1990; Billah and Anthes, 1990). Se conoce que el etanol estimula la hidrólisis de PE mediada por la fosfolipasa D en células NIH 373 (Kiss and Anderson, 1989). Sin embargo, los efectos directos del etanol sobre el catabolismo de la PC han sido poco estudiados. Recientemente, Pittner y Fain (1992), estudiaron el efecto del etanol sobre el catabolismo de la PC en hepatocitos de rata cultivados. Ellos informaron que la adición de etanol, a una concentración 17 mM, a las células previamente marcadas radiactivamente con colina, producía un incremento en la acumulación de colina y fosfocolina. La acumulación de ambos sustratos se estimuló en el mismo grado tras la adición de 340 mM de etanol. El incremento en la liberación de colina sugería una estimulación del catabolismo de PC por la fosfolipasa D, mientras que la liberación de fosfocolina se relacionó con el catabolismo de la PC por la fosfolipasa C (Cabot et al., 1988; Grillone et al., 1988). Añadieron que la colina medida no derivaba de la fosfocolina, con lo cual concluyeron que ambas fosfolipasa estaban activadas por el etanol.

Pittner y Fain (1992) prosiguieron sus estudios coincubando a los hepatocitos con etanol (340 mM) y una variedad de estimuladores de la fosfolipasa D específica de PC, tales como glucagon, vasopresina, norepinefrina, y A23187. Observaron que la estimulación debida sólo al etanol sobre la liberación de colina y fosfocolina fue similar a la observada con vasopresina, demostrando que el etanol es un potente estimulador de las fosfolipasas C y D específicas de PC. Los efectos del etanol fueron completamente aditivos, y en algunos casos más que aditivos con la estimulación producida por los agonistas. El mecanismo por el cual el etanol activa el catabolismo de la PC es

desconocido, puede ser que tal estimulación sea producida por la acción solvente del etanol, ya que el efecto es aditivo al observado con ligandos tales como el ionóforo. Sin embargo, la estimulación del etanol en el catabolismo de la PC podría implicar cambios biofísicos no específicos en las membranas plasmáticas del hepatocito, ya que puede ser mimetizado por dimetilsulfóxido o propanol. Queda por establecer si estos efectos son debidos a la activación directa de las fosfolipasas, acceso incrementado de sustratos a las lipasas o liberación de los productos al medio.

#### **IV. INTERACCION ENTRE EL METABOLISMO DE ETANOL Y DE LIPIDOS**

El hígado ha sido el tejido más extensamente estudiado para evaluar el efecto del etanol sobre el metabolismo lipídico, debido a que este órgano desempeña un papel central en la síntesis y secreción de triacilglicéridos así como de otros lípidos. Los tejidos extrahepáticos, tales como tejido adiposo, han sido estudiados por el papel complementario que éstos desempeñan en el desarrollo de las alteraciones hepáticas producidas por el etanol.

La mayoría de los efectos producidos en el hígado por efecto del etanol son debidos fundamentalmente a la generación excesiva de NADH por la oxidación citoplasmática del etanol, y a las interacciones del etanol con la función microsomal. Ciertos efectos son causados por la acción directa del etanol o sus metabolitos, acetaldehido y acetato, y parte de los efectos son mediados también por cambios hormonales. Las alteraciones observadas dependen del estado nutricional de los animales, las dosis de etanol administrado y la duración de la ingesta.

#### IV.1 EFECTOS DE LA GENERACIÓN EXCESIVA DE NADH

Como mencionamos en el capítulo dedicado al metabolismo del etanol, la oxidación del alcohol produce una transferencia de equivalentes de reducción al  $\text{NAD}^+$ . El exceso de NADH produce alteraciones en el flujo de sustratos y en la concentración de ciertos metabolitos.

En ausencia de etanol, los equivalentes de reducción utilizados en la cadena respiratoria provienen principalmente de la oxidación de ácidos grasos. Durante la oxidación del etanol, disminuye la actividad del ciclo del ácido cítrico (Grunet and Kondrup, 1983), y la mitocondria entonces usa preferentemente los equivalentes de reducción procedentes de la oxidación del etanol. De esta forma, los ácidos grasos que normalmente sirven como fuente principal de energía para el hígado son suplantados por el etanol. Esta disminución en la oxidación de ácidos grasos produce un depósito de triacilglicéridos en el hígado procedentes de la dieta, o de los ácidos grasos producidos por la síntesis endógena en ausencia de una dieta grasa (Lieber et al, 1966; Mendenhall, 1972).

El incremento en la relación  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  está también asociado con un aumento en la concentración glicerol 3-fosfato (Lieber, 1974) que favorece la acumulación hepática de triacilglicéridos. Concluyendo, la lipogénesis a todos los niveles (aumento en la síntesis de ácidos grasos, triacilglicéridos, y colesterol y/o sus ésteres) se puede considerar como un sistema metabólico por medio del cual se puede utilizar el exceso de equivalentes de reducción formado durante la oxidación del etanol.

## IV.2. INTERACCIÓN DEL ETANOL CON EL METABOLISMO LIPÍDICO EN LOS MICROSOMAS HEPÁTICOS

La mayoría de las enzimas implicadas en la síntesis de lípidos complejos (tales como triacilglicéridos y fosfolípidos) y lipoproteínas están ligadas a las membranas del retículo endoplásmico. Puesto que el etanol también es metabolizado por el sistema MEOS (Lieber and De Carli, 1970), puede interferir también en el metabolismo lipídico por un mecanismo independiente de los cambios redox que acontecen en el citoplasma o en la mitocondria. Así, se conoce que la administración crónica de etanol produce una proliferación de las membranas del retículo (Lane and Lieber, 1966), que puede ser responsable en parte de la capacidad aumentada del hígado para sintetizar lípidos, aunque también se ha demostrado que la administración aguda y crónica de etanol produce alteraciones específicas en las actividades de enzimas implicadas en la síntesis de lípidos complejos y lipoproteínas (Brindley, 1987).

Además, la oxidación microsomal del etanol interfiere con el metabolismo lipídico al generar radicales libres, que pueden iniciar una cascada de reacciones de peroxidación autocatalíticas y dañar las membranas celulares. También, la inducción microsomal producida por la ingestión crónica de etanol puede incrementar las actividades de enzimas tales como la NADPH oxidasa, produciendo un aumento en  $H_2O_2$ , por medio del cual se favorece la peroxidación lipídica.

Las dos alteraciones principales en el metabolismo lipídico asociadas con la ingestión de etanol son hígado graso e hiperlipidemia.

El **hígado graso** o esteatosis, caracterizado por una acumulación de triacilglicéridos en el hepatocito, se desarrolla en pocas horas después de la ingesta de

etanol y es dependiente de la dosis ingerida (Savolainen and Hassinen, 1980). El aumento de triacilglicéridos ocurre progresivamente durante el primer mes de administración de etanol y persiste si la ingesta de etanol continúa. También se ha observado en ratas tratadas con etanol una acumulación en el hígado de ésteres de colesterol (Lefevre et al., 1972).

Los lípidos se acumulan también en otros tejidos, tales como corazón, pulmón, páncreas y sangre. En este último caso la alteración se denomina **hiperlipidemia**. En parte, estas acumulaciones de lípidos en otros tejidos son secundarias a las alteraciones inducidas por el etanol sobre el metabolismo lipídico hepático, aunque también son debidas a una acción directa del etanol y sus metabolitos sobre el metabolismo lipídico de los tejidos periféricos.

#### IV.3. MECANISMOS IMPLICADOS EN LA ACUMULACIÓN HEPÁTICA DE TRIACILGLICÉRIDOS INDUCIDA POR EL ETANOL

Al analizar el papel etiológico del etanol, se establece que este agente *per se* es responsable del desarrollo del hígado graso alcohólico. Así, se ha observado que con una dieta nutricionalmente adecuada, al reemplazar isocalóricamente la sacarosa u otros carbohidratos por etanol se produce un incremento en los triacilglicéridos hepáticos, mientras que el reemplazamiento isocalórico de carbohidratos por grasa en lugar de etanol no produce esteatosis (De Carli and Lieber, 1967). Sin embargo, la dieta grasa influye en el desarrollo del hígado graso. Lieber y De Carli (1970) observaron que la reducción de la grasa de la dieta en un 25% o menos de las calorías totales está acompañado por una disminución significativa en la esteatosis inducida por el etanol.

Los lípidos acumulados en el hígado proceden principalmente de tres fuentes: lípidos de la dieta (que alcanzan el torrente circulatorio como quilomicrones); lípidos del tejido adiposo (que son transportados al hígado como ácidos grasos libres); y lípidos sintetizados en el hígado. Detallaremos a continuación los mecanismos implicados en la acumulación de triacilglicéridos en el hígado.

El etanol interfiere con rutas metabólicas que aportan sustratos para la lipogénesis, incrementando la disponibilidad de precursores para la síntesis hepática de triacilglicéridos: ácidos grasos y glicerol 3-fosfato. Además, la oxidación de etanol proporciona equivalentes de reducción y unidades de dos átomos de carbono para la síntesis de lípidos.

Uno de los mecanismos por los que el etanol aumenta la concentración de ácidos grasos en sangre es mediado por la estimulación de la lipólisis en el tejido adiposo, vía catecolaminas por la reacción de estrés que puede provocar el etanol (Pohorecky, 1984; Brick and Pohorecky, 1985).

Lieber et al. (1967) publicaron que el etanol inhibe la formación de  $\text{CO}_2$  a partir de ácidos grasos marcados radiactivamente y sugirieron que la inhibición en la oxidación de ácidos grasos podría contribuir al desarrollo de un hígado graso inducido por el etanol. Estos descubrimientos fueron confirmados por Ontko en 1973, quien observó además que la conversión de ácidos grasos a cuerpos cetónicos también está inhibida. Cerdebaum et al. (1975), comprobaron que la oxidación total de ácidos grasos disminuye por la ingestión crónica de alcohol. Resultados similares obtuvieron Grunnet and Kondrup (1986), quienes incubaron hepatocitos aislados de ratas con palmitato marcado y en presencia o ausencia de etanol 10 mM. Los resultados obtenidos mostraron que en hepatocitos aislados de ratas privadas de alimento la  $\beta$ -oxidación se inhibe por el etanol en un 22%, mientras que en hepatocitos aislados de ratas alimentadas, ésta se inhibe en un 25%.

Uno de los mecanismos más citados que podría justificar esta inhibición en la  $\beta$ -oxidación es el cambio inducido por el etanol en el estado redox, el cual limita la disponibilidad de  $\text{NAD}^+$  para las deshidrogenasas en el ciclo de los ácidos tricarbónicos y en la secuencia de la  $\beta$ -oxidación, disminuyendo la oxidación completa de los ácidos grasos (Baraona and Lieber, 1979). Sin embargo, otros factores implicados en la regulación de los procesos oxidativos de ácidos grasos podrían también verse afectados por el etanol. Investigaciones recientes sugieren que la actividad carnitina palmitoiltransferasa I (CPT-I) desempeña un papel importante en la generación de un hígado graso inducido por el etanol, constituyendo un mecanismo adicional para explicar la inhibición inducida por el etanol en la oxidación hepática de ácidos grasos (Guzmán and Geelen, 1988).

La CPT-I constituye el paso limitante en el transporte de ácidos grasos de cadena larga al interior de la matriz mitocondrial, tanto en hígado como en tejidos extrahepáticos (Saggerson, 1986). Guzmán et al. (1987) observaron en ratas alimentadas crónicamente con etanol una disminución en la actividad CPT-I y un aumento en la sensibilidad de la enzima a malonil-CoA, el inhibidor intracelular fisiológico de esta enzima. La modulación de la actividad de la CPT-I por el etanol a corto plazo fue estudiada por Guzmán y Geelen en 1988. Estos autores observaron que por efecto del etanol a corto plazo también se inhibe la actividad CPT-I, y propusieron un mecanismo para explicar esta inhibición, indicando que la presencia de etanol incrementa los niveles intracelulares del malonil-CoA, efecto que puede ser el responsable del aumento de la sensibilidad de esta enzima a este inhibidor.

Aunque los primeros estudios *in vitro* demostraron que en ratas y en humanos la presencia de etanol incrementa la síntesis hepática de ácidos grasos, posteriores estudios *in vivo* proporcionaron resultados más conflictivos. El estudio del efecto del etanol sobre la síntesis hepática de ácidos grasos presenta dificultades, principalmente por dos razones: La primera es que el etanol y sus metabolitos causan una fuerte dilución isotópica cuando se analiza la incorporación de acetato o  $\text{H}_2\text{O}$ , marcados radiactivamente, a ácidos

grasos, y segundo, debido a que la síntesis de ácidos grasos *in vivo* es muy sensible al contenido de carbohidratos y grasa de la dieta, y es difícil añadir una gran cantidad de alcohol a la dieta sin modificar la relación carbohidrato/grasa.

Por otra parte, tanto el aumento de la lipólisis periférica como la oxidación hepática del etanol, producen un incremento en la concentración de glicerol 3-fosfato (Baraona and Lieber, 1979). La mayor disponibilidad de ácidos grasos y el incremento en los niveles de glicerol 3-fosfato podrían producir un aumento en la síntesis de triacilglicéridos.

Respecto a este punto, Castro et al. (1987) realizaron estudios *in vitro*, utilizando hepatocitos aislados de ratas ayunadas o alimentadas, con objeto de analizar si el efecto activador del etanol sobre la síntesis de triacilglicéridos es dependiente de los niveles de glicerol 3-fosfato. Observaron que, aunque en ambos grupos de animales el etanol produce un aumento en la concentración de glicerol 3-fosfato, sólo en hepatocitos aislados de ratas que ayunaron este aumento es determinante para la estimulación de la síntesis de triacilglicéridos en presencia de etanol. Sugirieron que bajo la situación de oxidación de ácidos grasos inhibida por el etanol, el aumento inducido por el alcohol en la síntesis de triacilglicéridos es dependiente del incremento en los niveles de glicerol 3-fosfato. En estas condiciones de privación de comida es importante considerar el hecho de que la actividad glicerol 3-fosfato aciltransferasa mitocondrial de hígado se encuentra disminuida (Declercq et al., 1982). Se ha observado, sin embargo, que en cultivos de hepatocitos de ratas, la acumulación de triacilglicéridos inducida por el etanol no está mediada por un incremento en la concentración de glicerol 3-fosfato (Dich et al., 1983).

<sup>a</sup>Castro et al. (1987) realizaron nuevos trabajos en los que observaron que la administración prolongada de etanol a ratas elimina completamente tanto el incremento en la síntesis de triacilglicéridos como el incremento en glicerol 3-fosfato inducidos por el etanol *in vitro* en hepatocitos aislados de ratas ayunadas. La atenuación de este efecto

es dependiente de la duración de la administración crónica. La activación inducida por el etanol en la síntesis de triacilglicéridos desciende rápidamente tras 10 días de alimentación con etanol. En este cambio adaptativo pueden estar implicados una serie de factores tales como la atenuación del cambio inducido por el etanol en el estado redox del hígado, junto con una menor producción de glicerol 3-fosfato y una mayor oxidación de ácidos grasos. Todo ésto causaría una disminución en el aporte de estos precursores para la síntesis de triacilglicéridos (Savolainen et al., 1984).

El etanol también produce cambios en actividades enzimáticas asociadas con la síntesis de triacilglicéridos. Savolainen (1977) y Lamb et al. (1979), observaron que la administración a ratas o hámsters de una dosis aguda de etanol produce un incremento de la actividad fosfatidato fosfohidrolasa hepática, no alterándose otras actividades enzimáticas implicadas directamente en la síntesis de triacilglicéridos (Pritchard et al., 1977; Björkhem and Ostlung, 1979). La administración crónica de etanol a hámsters (Lamb et al., 1979) y monos (Savolainen et al., 1984) también produce un incremento de la actividad fosfatidato fosfohidrolasa. En este caso también incrementa la actividad diacilglicérido aciltransferasa. <sup>a</sup>Castro et al. (1987) añadieron que los cambios más importantes en la esterificación de palmitato exógeno a triacilglicéridos se producen en los primeros 10 días de la administración de una dieta líquida alcohólica, como resultado del incremento en la actividad fosfatidato fosfohidrolasa producido tras el tratamiento con etanol.

Por todo ésto, hay un acuerdo general de que el consumo agudo y crónico del etanol incrementa la actividad fosfatidato fosfohidrolasa. El incremento en esta actividad junto con el aumento, en el caso de ingesta crónica, de la diacilglicérido aciltransferasa podría a su vez incrementar el potencial del hígado para sintetizar triacilglicéridos. La expresión de este potencial depende del aporte de sustratos al hígado (Brindley, 1987), que son claramente superiores por la presencia de etanol. También se ha sugerido que los cambios inducidos por el etanol en el estado redox podrían ser importantes en el incremento de la actividad fosfatidato fosfohidrolasa (Savolainen and

Hassinen, 1978). Esta hipótesis la apoya el hecho de que el pirazol, inhibidor de la alcohol deshidrogenasa, parcialmente previene el incremento inducido por el etanol en la actividad fosfohidrolasa en hepatocitos cultivados (Wood and Lamb, 1979). La fosfatidato fosfohidrolasa está asociada a la fracción soluble y particulada de las células de los mamíferos, la actividad citosólica es inactiva y se vuelve fisiológicamente activa cuando se transfiere a los microsomas. Respecto a este punto, Ide y Nakazawa (1987), en un estudio posterior, observaron que el etanol incrementa la actividad de la enzima citosólica y microsomal, mientras que el acetaldehído puede estar implicado selectivamente en la estimulación de la fosfatidato fosfohidrolasa citosólica.

Es posible que la esteatosis producida por el etanol sea parcialmente debida a una disminución en la liberación de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) por el hígado, como apuntaron Lieber (1974) y Estler (1975). Es probable que una disminución en la secreción de triacilglicéridos desde el hígado sea más acusada a altas dosis de etanol debido a los efectos hepatotóxicos del etanol y del acetaldehído. Sin embargo, el etanol puede también estimular la secreción de VLDL (Titov and Pitsin, 1978), cuando se administra en dosis moderadas y de manera continuada. Entonces el consumo del alcohol se asocia con la **hiperlipidemia**.

#### IV.4. EFECTO DEL ETANOL SOBRE LOS LÍPIDOS PLASMÁTICOS

Los efectos del etanol sobre los lípidos del suero y lipoproteínas son dependientes de la dosis y modo de administración, susceptibilidad individual al etanol, variables genéticas y factores dietarios. La mayoría de los estudios se han realizado en voluntarios humanos alcohólicos y no alcohólicos que ingieren alcohol aguda o moderadamente.

Taskinen et al. (1982) informaron del patrón de lipoproteínas que caracteriza a individuos alcohólicos con un hígado morfológico y funcionalmente normal. Describieron que en estos sujetos el patrón se caracteriza por unos niveles normales o ligeramente disminuidos de lipoproteínas de muy baja densidad-triacilglicéridos (VLDL-TG), niveles bajos de lipoproteínas de baja densidad (LDL)-colesterol, y unos niveles elevados de lipoproteínas de alta densidad (HDL)-colesterol. Durante la retirada de alcohol los niveles de HDL-colesterol retornan a los valores normales en dos semanas, mientras que los niveles de LDL-colesterol comienzan a incrementarse ligeramente sin alcanzar los valores normales. Inmediatamente después de la ingesta de alcohol, se observa un claro aumento en las concentraciones de HDL<sub>2</sub> y HDL<sub>3</sub> de sujetos alcohólicos. Los niveles de HDL<sub>2</sub> se incrementaron en un 60% y los de HDL<sub>3</sub> en un 20% (Taskinen et al., 1982). Consecuentemente, el aumento en las HDL-colesterol es debido principalmente a las HDL<sub>2</sub>-colesterol.

Son varios los mecanismos implicados en los cambios observados en los niveles de lipoproteínas. Por ejemplo, uno de ellos implica a las actividades de dos enzimas lipolíticas que regulan las concentraciones de HDL totales y de las HDL<sub>2</sub> en plasma. Estas enzimas son la lipoproteín lipasa (LPL) y lipasa hepática. Taskinen et al. (1982) observaron que inmediatamente después de la ingesta de alcohol, la actividad LPL en la fracción post-heparina del plasma es superior en un 80% en sujetos alcohólicos comparados respecto a los no alcohólicos. La actividad de la enzima desciende significativamente después de dos días de abstinencia y alcanza su valor normal en una semana. También la actividad lipasa hepática incrementa significativamente en sujetos alcohólicos inmediatamente después de beber, aunque los cambios fueron menos marcados que los de la LPL (Taskinen et al., 1982). La actividad desciende durante la abstinencia, aunque más débilmente que la actividad LPL, alcanzando su valor normal en una semana.

Debido a que la actividad LPL regula los niveles de HDL total y HDL<sub>2</sub> en plasma, es posible que el incremento observado en las HDL<sub>2</sub> en sujetos alcohólicos

crónicos sea mediado por la inducción de la actividad LPL (Taskinen et al., 1982). Además, la alta actividad de la LPL observada en alcohólicos crónicos, se asocia con un aumento en el metabolismo y en la velocidad de transporte de las VLDL, y consecuentemente la velocidad de transferencia de los componentes de la superficie de las VLDL a las HDL también se ve aumentada. Después de la ingesta de alcohol, el alcohólico presenta un catabolismo más elevado de la fracción VLDL-TG, que disminuye en el período de abstinencia.

La ingesta crónica de etanol puede ejercer ciertos efectos directos sobre el metabolismo de las LDL. Se han encontrado bajos niveles de LDL-colesterol en alcohólicos crónicos (Sane et al., 1984). Una posible explicación es que las VLDL no sean convertidas tan fácilmente en LDL en sujetos alcohólicos.

Otros estudios se han realizado en sujetos no alcohólicos que ingieren alcohol de forma aguda, observándose resultados diferentes a los comentados en los alcohólicos crónicos. De este modo, se ha comprobado que la ingesta de una dosis aguda de alcohol a corto plazo produce un incremento en las VLDL-TG, en ayunas, (Taskinen et al., 1985), paralelamente se observa un aumento en los TG de las LDL y HDL. Una respuesta similar se produce en los niveles de fosfolípidos de las VLDL, LDL, y HDL. Sin embargo, el contenido en colesterol de las VLDL no se altera tan rápidamente, y los niveles de colesterol de las HDL y LDL no se afectan durante la ingesta de alcohol. Sin embargo, se observa que, aunque los niveles de HDL totales permanecen constantes, las subfracciones de esta lipoproteína si presentan cambios, incrementándose los niveles de HDL<sub>2</sub>, mientras que la concentración de HDL<sub>3</sub> permanece invariable (Taskinen et al., 1985). La respuesta en el incremento de las HDL<sub>2</sub> fue el resultado de un aumento en el contenido de sus fosfolípidos, TG, apo-I y apo-II, sin embargo, no se altera su contenido en colesterol. Para analizar el mecanismo implicado en este resultado se midió la actividad LPL, y se observó un aumento de la misma, mientras que la actividad lipasa hepática descende notablemente. El efecto opuesto de ambas enzimas promueve el incremento de

la fracción HDL<sub>2</sub>.

Los datos sugirieron que la ingesta de alcohol inicialmente estimula la secreción de partículas de VLDL que están cargadas de TG y fosfolípidos y son pobres en colesterol (Taskinen et al., 1985). La inducción en la actividad LPL produce una rápida hidrólisis de las VLDL secretadas y una transferencia de su material de superficie a las HDL. Este fenómeno se refleja en el aumento en los fosfolípidos de las HDL<sub>2</sub>.

Los estudios realizados en sujetos no alcohólicos que ingieren alcohol moderadamente mostraron que, la ingesta de alcohol incrementa la concentración de apo AI y apo AII, que se asocia con el aumento observado en los niveles plasmáticos de HDL<sub>3</sub>, sin embargo los niveles de las restantes lipoproteínas no parecen afectarse. Los resultados están en concordancia con los obtenidos por Camargo et al. (1985), y sugieren que la ingesta moderada de alcohol esta asociada con un aumento en los niveles de HDL<sub>3</sub>.

Zimmerman et al. (1986), informaron además que las concentraciones de etanol que se alcanzan en el intestino después de la bebida moderada, inhiben marcadamente la síntesis y secreción intestinal de triacilglicéridos, sin afectar a la incorporación de ácidos grasos. Esto puede explicar en parte la falta de efecto observada en los niveles de VLDL plasmáticos después del consumo moderado.

Muchos estudios epidemiológicos encontraron una correlación inversa entre el bajo y moderado consumo de alcohol y el factor de riesgo coronario. Este efecto protector del alcohol contra la aterosclerosis se asocia con el aumento observado en la concentración de las HDL-colesterol, aumento que habilita un vehículo para el transporte de colesterol desde los tejidos periféricos al hígado, en el llamado *transporte inverso del colesterol* (Gwynne, 1989). En este transporte inverso participa la lecitina: colesterol aciltransferasa (LCAT). Estudios realizados en primates por Mulligan et al. (1985) mostraron que el alcohol (12% de las calorías) aumenta la actividad LCAT, mientras que

una dosis al 24% inhibe la reacción de transesterificación, probablemente como resultado de cambios en los niveles de sustratos o productos.

Los mecanismos por los que el alcohol incrementa los niveles de HDL-colesterol han sido comentados con anterioridad. Sin embargo, cabe mencionar en este momento los trabajos realizados por otros autores considerando otros aspectos. Maruyama et al. (1986) estudiaron los efectos de la administración crónica del etanol en ratas sobre la síntesis hepática de colesterol y su relación con el colesterol de las HDL. Concluyeron que el incremento observado en las HDL-colesterol es principalmente regulado por la síntesis hepática de colesterol. Esto lo explica el incremento en la actividad de la 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA reductasa (HMG-CoA).

De este modo, los niveles aumentados de HDL-colesterol pueden utilizarse como un instrumento de diagnóstico para detectar alcoholismo. Sin embargo, si los consumidores habituales de alcohol continúan ingiriendo etanol durante largo tiempo, las alteraciones causadas por el daño hepático disminuyen los niveles de HDL-colesterol. La actividad LCAT, que participa en el *transporte inverso del colesterol*, desciende progresivamente durante el deterioro hepático como resultado de una alteración en la síntesis de enzimas hepáticas. También se produce una reducción en la concentración de apo AI, un importante cofactor en la reacción catalizada por la LCAT (Sabesin, 1981; Weidman et al., 1982), que en parte contribuye a un descenso en la concentración de las HDL-colesterol. Se ha encontrado (Duhamel et al., 1984) que la relación HDL<sub>2</sub>/HDL<sub>3</sub> incrementa paralelamente con la función hepática alterada.

## **OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO**

El presente trabajo ha tenido como objetivo principal profundizar en las acciones bioquímicas del etanol a nivel del metabolismo lipídico hepático. Para ello, se han utilizado diferentes sustratos lipogénicos que nos permitirán determinar distintas etapas de las rutas de biosíntesis de lípidos neutros y fosfolípidos.

Se llevará a cabo el análisis de la influencia del etanol sobre hepatocitos aislados de rata en las siguientes situaciones experimentales:

a) Exposición de los hepatocitos a la presencia de una concentración de etanol 100 mM, muy próxima a la existente tras una ingesta aguda de alcohol.

b) Ingestión prolongada de etanol durante 31 días, período que como ha sido descrito, es suficiente para la consecución de un modelo experimental de alcoholismo crónico.

c) Acción diferencial del etanol *in vitro* sobre hepatocitos aislados de ratas controles y de animales sometidos al tratamiento prolongado de etanol.

En cada caso se determinará la composición lipídica del hepatocito, en cuanto a niveles de colesterol, triacilglicéridos y fosfolípidos. Además, se abordará el estudio de las diferentes rutas biosintéticas de estos componentes lipídicos a partir de diferentes precursores metabólicos. Para ello, se seleccionarán sustratos que nos permitan obtener información acerca de la influencia del etanol sobre el recambio de las bases nitrogenadas de los fosfolípidos, así como de los ácidos grasos y glicerol, constituyentes



## **MATERIAL Y METODOS**

## **I. MATERIAL**

### **I.1. REACTIVOS**

Todos los reactivos utilizados, de alto grado de pureza, fueron adquiridos a Merck, Sigma, Boehringer y Fluka mientras no se especifique lo contrario. El material radiactivo fue suministrado por Amersham International plc.

### **I.2. MATERIAL BIOLÓGICO: ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y ACONDICIONAMIENTO**

Para los estudios descritos en esta memoria se han utilizado ratas macho de la raza *Wistar* de aproximadamente 200-250 gramos, adquiridas en el estabulario de la Universidad de Granada. Los animales fueron alimentados *ad libitum* con una dieta estándar sólida de mantenimiento AO4 (Panlab).

Las ratas se acondicionaron en una habitación termostaticada a 25°C, alojándose en jaulas que contenían 4 animales cada una. El ciclo de iluminación se controló mediante un temporizador, programado para mantener ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. La renovación del aire se mantuvo mediante un extractor automático.

### I.3. DIETA Y TRATAMIENTO

Para el estudio de los efectos de una administración prolongada de etanol, las ratas fueron tratadas con la denominada dieta de Miller (Miller et al., 1980), de la que está perfectamente descrito que produce dependencia al etanol.

En todos los casos, las ratas que recibieron el tratamiento presentaban un peso inicial comprendido entre 150 y 170 gramos. El etanol fue suministrado como dieta líquida, durante un período de 31 días, aportando el 36% de las calorías totales de la dieta. Las ratas controles recibieron una dieta similar, con la única excepción de que el etanol fue reemplazado isocalóricamente por carbohidratos (dextri-maltosa). La dieta de Miller, basada en la formulación de la dieta de Lieber y DeCarli (1970), contiene ingredientes más económicos que ésta, aunque mantiene la misma calidad calórica y nutricional. Una de las principales ventajas de ésta dieta es la elevada ingesta de alcohol de los animales tratados, y la posibilidad de control del alimento ingerido por las ratas controles y tratadas. Los lotes de ratas que recibieron dieta control alcanzaron un peso comprendido entre 250 y 300 gramos, mientras que las que ingirieron una de elevado contenido en etanol no sobrepasaron los 200 gramos.

Las dietas líquidas se prepararon en nuestro laboratorio diariamente, y por razones de estabilidad fueron renovadas dos veces al día para evitar la degradación y el enranciamiento de sus componentes.

A continuación se especifica la composición de la dieta de Miller:

Dieta Control

Caseina . . . . .	42 g/l
L-Metionina . . . . .	0,6 g/l
Aceite de maíz . . . . .	10,5 g/l
Mezcla de vitaminas AIN 76A . . . . .	2,1 g/l
Mezcla de minerales AIN 76 . . . . .	7,3 g/l
Sacarosa . . . . .	25 g/l
Dextri-maltosa . . . . .	110 g/l
Carragenato sódico . . . . .	3 g/l
Bitartrato de colina . . . . .	0,4 g/l

Dieta Etanol

Caseina . . . . .	42 g/l
L-Metionina . . . . .	0,6 g/l
Aceite de maíz . . . . .	10,5 g/l
Mezcla de vitaminas AIN 76A . . . . .	2,1 g/l
Mezcla de minerales AIN 76 . . . . .	7,3 g/l
Sacarosa . . . . .	25 g/l
Dextri-maltosa . . . . .	35,4 g/l
Carragenato sódico . . . . .	3 g/l
Bitartrato de colina . . . . .	0,4 g/l
Etanol (96%) . . . . .	41,6 g/l

Las mezclas de vitaminas AIN 76A y la de minerales AIN 76, fueron suministradas por ICN.

## II. METODOS

### II.1. AISLAMIENTO DE HEPATOCITOS

#### II.1.1. Sistema de perfusión

El sistema de perfusión consta de una bomba peristáltica, dos reservorios (superior e inferior), y un sistema oxigenador constituido por carbógeno (5% CO<sub>2</sub> : 95% O<sub>2</sub>). Previo a su utilización, el circuito debe lavarse con EDTA 20 mM (pH=7,4) a 37°C durante unos 20 minutos. El objeto de este lavado es eliminar los restos de calcio y colagenasa de perfusiones anteriores. Posteriormente, se limpiará con abundante agua destilada.

Tal como se muestra en la Figura 1, la perfusión transcurre del siguiente modo: mediante una bomba peristáltica, el medio se eleva desde un reservorio inferior hasta un reservorio superior, donde se oxigena mediante carbógeno. Los dos reservorios se hallan provistos de una doble pared por donde circula agua a 37°C, lo que permite el mantenimiento continuo de los medios a esta temperatura. Del reservorio superior desciende el medio hasta el hígado a través de la cánula de entrada (vena portal), atraviesa el hígado y tiene salida por la vena cava inferior (perfusión acíclica), o por la vena cava superior (perfusión cíclica). La perfusión acíclica se realiza en el lavado y la cíclica en la digestión enzimática del hígado.

### II.1.2. Soluciones empleadas para el aislamiento de hepatocitos

En el aislamiento de hepatocitos se han utilizado tres medios distintos: Krebs-Henseleit de lavado, Krebs-Henseleit de perfusión y Krebs-Henseleit de resuspensión. Básicamente poseen la misma composición que detallamos a continuación. Los valores de la tabla muestran los volúmenes necesarios para una perfusión hepática.

Soluciones (ml)	Krebs-Henseleit lavado ( 400 ml )	Krebs-Henseleit perfusión ( 88 ml )	Krebs-Henseleit resuspensión ( 800 ml )
CINa 0,9%	288,3	63,4	576,6
NaHCO <sub>3</sub> 1,3%	64,6	14,2	129,2
KCl 1,15%	12,2	2,7	24,4
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2,11%	3,1	0,7	6,2
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 3,82%	3,1	0,7	6,2
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O 1,62%	---	3,3	9,1
H <sub>2</sub> O destilada	28,7	3,0	48,3
EGTA 8 mM	4	---	---

A todos los medios se les añadió Hepes hasta una concentración final 10 mM, con el objeto de facilitar el mantenimiento del pH a 7,4. El medio Krebs-Henseleit de resuspensión fue suplementado además con glucosa 10 mM.

Todas las soluciones utilizadas fueron gaseadas previamente con carbógeno a 37° C hasta alcanzar el pH 7,4.

### **II.1.3. Operación quirúrgica y procedimiento de obtención de hepatocitos**

El método seguido para el aislamiento de células de hígado de rata es una modificación del descrito por Seglen (1976).

En un primer paso el hígado es perfundido con un medio libre de calcio, con el fin de eliminar el calcio intercelular y facilitar la desconexión celular. Posteriormente el hígado es perfundido de nuevo con un medio que contiene colagenasa, con el objeto de disolver la matriz intercelular. La colagenasa es una enzima disgregante que requiere calcio, y por ello este ión ha de estar presente en el medio de perfusión.

Los animales fueron sacrificados normalmente a las 10:00 horas, habiendo permanecido previamente en ayuno durante 12 horas. Se anestesiaron con ketamina mediante una inyección por vía intraperitoneal de 0,5 ml de una solución de 100 mg de ketamina por ml de suero salino al 0,9%. Una vez dormido (aproximadamente en 5 minutos), el animal fue colocado y atado sobre una mesa de operación.

Tras practicar una incisión abdominal, se desplazaron las asas abdominales hacia la izquierda para facilitar las posteriores canulaciones. Se pasó un hilo, sin anudar, por la vena cava inferior, justo por encima de la vena renal, y la vena esplénica fue anudada para evitar reflujo desde el estómago y posibles pérdidas de colagenasa.

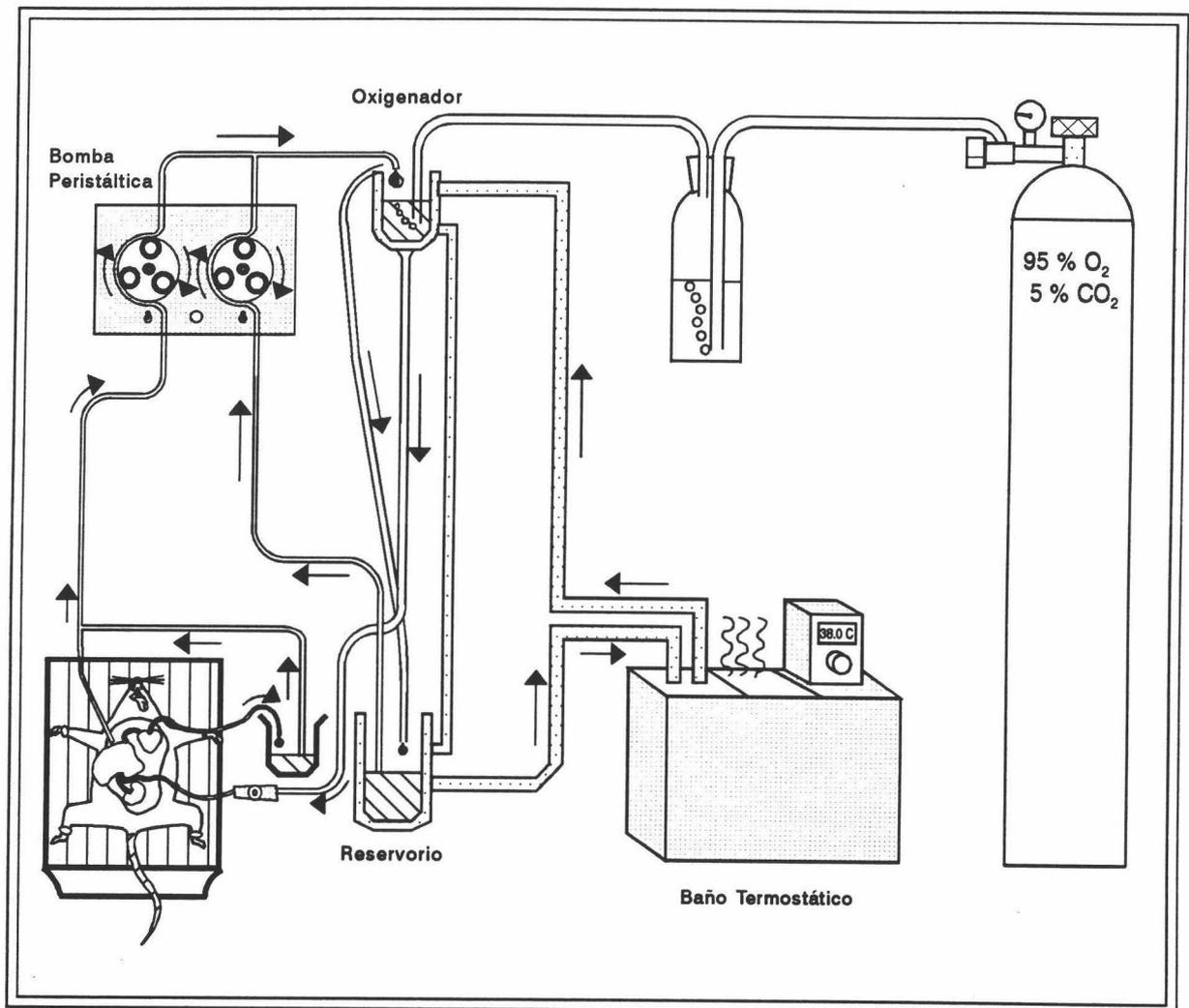


FIGURA 1: Esquema del montaje utilizado para la perfusión del hígado de rata.

Una vez canulada la vena porta, se realizó el lavado del hígado con la solución de Krebs-Henseleit de lavado, libre de calcio y con EGTA, a un flujo de 20-25 ml por minuto. Este primer lavado se llevó a cabo mediante perfusión acíclica durante unos diez minutos. Es aconsejable un ligero masaje de los lóbulos del hígado, para permitir un completo lavado del mismo, aunque en todo momento, es necesario que los lóbulos sean manipulados con sumo cuidado para evitar daño alguno.

Antes de finalizar este lavado, se abrió la cavidad torácica con rotura previa del diafragma, y se cánuló la vena cava superior a través de la aurícula derecha. Cuando el hígado quedó limpio de sangre, la solución de lavado fue sustituida por el medio de perfusión, que contiene calcio, colagenasa A (cuya cantidad varía de acuerdo con el peso de la rata), e inhibidor de tripsina (aproximadamente 7.5 mg/88 ml de medio de perfusión). Aunque este último componente no es esencial en el proceso, es conveniente su utilización para evitar posibles daños de receptores hormonales de la membrana plasmática celular por proteasas liberadas durante la disgregación. A continuación, se ligó la vena cava inferior por encima de la desviación renal, y se estableció una perfusión cíclica. Con el objeto de evitar la pérdida del líquido de perfusión filtrado a la cavidad abdominal, éste se recicló de nuevo hasta el reservorio superior. La completa digestión del hígado se realizó habitualmente en un período de 10-15 minutos.

Terminada la perfusión, el hígado fue separado de la cavidad abdominal, y depositado con sumo cuidado en una placa Petri (90 mm de diámetro) que contenía medio de resuspensión. Con la ayuda de un peine de plástico, se rasgó cuidadosamente la cápsula de Glisson permitiendo la liberación de las células. Las partes no disgregadas fueron eliminadas.

La suspensión de células se filtró dos veces a través de una malla de nylon de 250  $\mu$ metro de diámetro de poro. Con el objeto de obtener una suspensión de hepatocitos más purificada, el filtrado fue sometido a un gradiente de Percoll (Pharmacia). Para ello, sobre el filtrado de hepatocitos se aplicó el Percoll (1,08 mg/ml), en una relación

10 ml filtrado/20 ml Percoll. Las células viables se separaron de las no viables después de una centrifugación a 30000xg durante 15-30 minutos, en una centrífuga refrigerada Beckman J2-21. Las células viables, que aparecen en la parte inferior del tubo de centrifuga (Figura 2), fueron recogidas por aspiración con una pipeta de plástico y lavadas dos veces con el medio de resuspensión a 50xg durante 3 minutos en una centrífuga de mesa (Beckman, modelo TJ-6), para la eliminación total del Percoll.

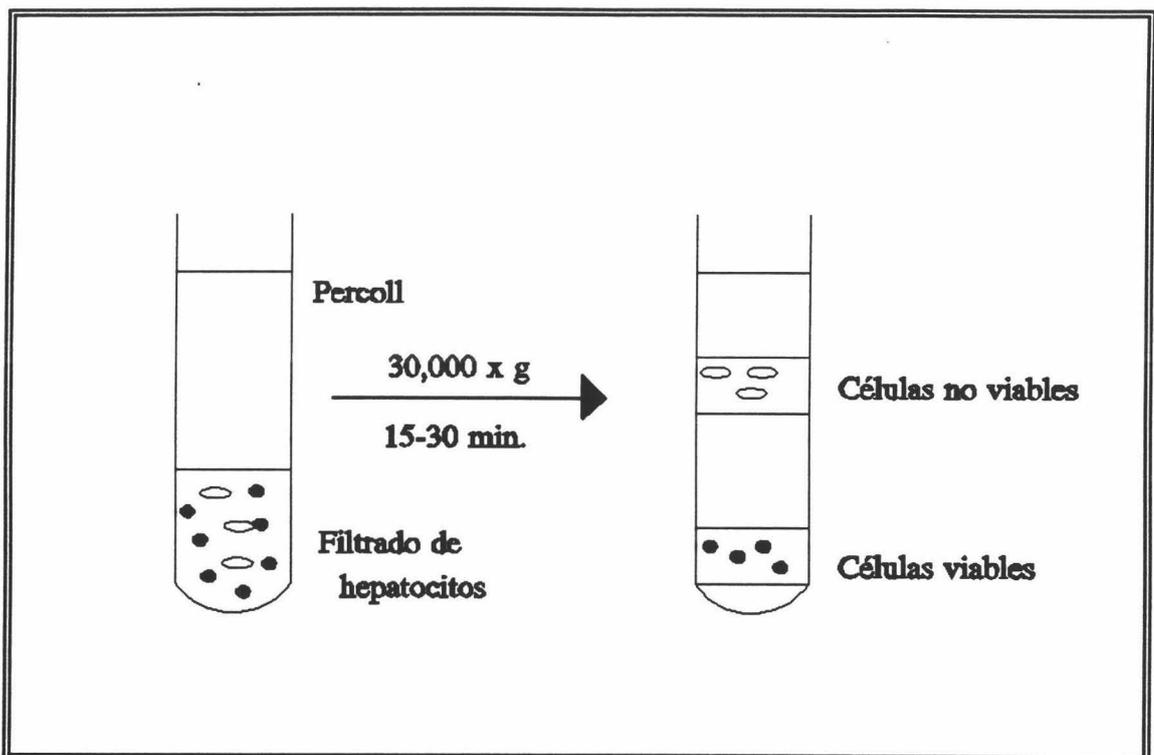


FIGURA 2: Purificación de los hepatocitos viables por centrifugación en gradiente de Percoll.

Tras conseguir la suspensión de hepatocitos más purificada, las células fueron resuspendidas en el medio de incubación, gaseadas y colocadas en un frasco de cultivo. Seguidamente se procedió a su recuento.

#### II.1.4. Recuento y viabilidad celular

Cuando las células se aíslan a partir de un tejido, es necesario determinar su viabilidad antes de su uso. La mayoría de los ensayos de viabilidad se basan en la determinación de la permeabilidad de la membrana, ya que es evidente que una célula con una membrana permeabilizada ha sufrido un daño severo e irreversible.

La viabilidad de la suspensión de hepatocitos fue determinada mediante el test de exclusión del azul de tripán. Para realizarlo se añadieron 50  $\mu$ l de una solución al 0,1 % de azul de tripán preparado en PBS a 50  $\mu$ l de la suspensión celular. Tras esperar 5 minutos, las células se dispusieron en una cámara de recuento.

Las células no viables presentaron una elevada coloración azul, con los núcleos fuertemente teñidos. La viabilidad se midió como el porcentaje de células que excluyeron el azul tripán.

Para la determinación de número de células por ml, se usó la siguiente fórmula (válida para cualquier cámara de recuento):

$$Células / ml = \frac{Ct}{S \times P \times D}$$

En donde:

*Ct*: Células totales contadas

*S*: Superficie contada (cm<sup>2</sup>)

*P*: Profundidad de la cámara (cm)

*D*: Dilución

En todos los casos se rechazaron las suspensiones cuya viabilidad no fue superior al 90 %. Finalmente, tras el conteo se ajustó la concentración celular hasta  $5 \times 10^6$  de células/ml de medio de Krebs-Henseleit de incubación.

## II.2. ANALISIS DE LOS LIPIDOS

### II.2.1. Extracción de lípidos

La extracción de lípidos se realizó según el método de Folch et al. (1957). A las células sedimentadas se les añadió 3 ml de una mezcla cloroformo:metanol (2:1). Los tubos se agitaron vigorosamente durante 2 minutos y se les añadió 2 ml de CIH 0,1N. El CIH facilita la perfecta separación entre la fase acuosa y clorofórmica. Los tubos se agitaron de nuevo y se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 minutos en una centrífuga de mesa refrigerada. Tras la centrifugación aparecen dos fases claramente diferenciadas separadas por una interfase proteica. La fase acuosa (superior) se desechó, y la fase clorofórmica (inferior) se separó de la interfase de proteínas mediante decantación, y se llevó a sequedad bajo corriente de nitrógeno. El extracto lipídico se resuspendió en un volumen adecuado de cloroformo que contenía 2,6-diter-butil-4-metilfenol al 0,05%, con objeto de prevenir la peroxidación de los lípidos. Las muestras fueron guardadas a  $-30^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

### II.2.2. Determinación de colesterol

Para la determinación del colesterol, tanto libre como total, se utilizaron test comerciales de la firma Boehringer-Mannheim. Esta técnica se basa en una serie de reacciones enzimáticas. Para la determinación del colesterol total, se utiliza la colesterol esterasa, que actúa sobre los ésteres del colesterol, permitiendo que todo el colesterol

presente en la muestra aparezca de forma libre, el cual en presencia de colesterol oxidasa producirá 4-colestenona y peróxido de hidrógeno. Este en presencia de 4-aminofenazona y fenol, y por la acción de una peroxidasa da lugar a un compuesto coloreado denominado (4-(p-benzoquinona-monoamino)-fenazona), cuya absorbancia medida a 500 nm es proporcional a la cantidad de colesterol presente en la muestra.

El fundamento utilizado para la cuantificación del colesterol libre es el mismo, sólo que, en este caso, la muestra no se somete a la acción de la colesterol esterasa.

Para la determinación del colesterol total o libre, se tomaron alicuotas de 25 y 50  $\mu\text{l}$  del extracto lipídico. Debido a que el reactivo usado para las determinaciones es insoluble en un medio apolar, las alicuotas lipídicas se evaporaron bajo corriente de nitrógeno y se resuspendieron en 25  $\mu\text{l}$  de isopropanol. Simultáneamente, se prepararon tres tubos con 12, 25 y 50  $\mu\text{g}$  de una solución estándar de colesterol (1 mg/ml), que fueron procesados de forma idéntica a los problemas. Posteriormente, se añadieron 2 ml del reactivo correspondiente a cada tubo y se incubaron 10 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo se midió la absorbancia del compuesto coloreado a 500 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-70.

La concentración de colesterol total o libre, se calculó a partir de la fórmula siguiente:

$$\mu\text{g colesterol}/10^6\text{célula} = \frac{DO \times a \times V_l}{V_t \times P}$$

En donde:

*DO*: Densidad óptica media de la muestra problema.

*a*: Pendiente de la recta de regresión obtenida para la curva patrón por mínimos cuadrados ( $\mu\text{g}/DO$ ).

*Vl*: Volumen del extracto lipídico expresado en ml.

*Vt*: Alícuota del extracto lipídico utilizado en la colorimetría expresado en ml.

*P*: Concentración de células expresada en millones de la que se parte para la extracción de lípidos.

La concentración de colesterol esterificado se calculó restando el colesterol libre al colesterol total.

### II.2.3. Determinación de triacilglicéridos

Para la determinación de triacilglicéridos se utilizó un test comercial de la firma Boehringer-Mannheim. Esta técnica se basa en la hidrólisis enzimática de los triacilglicéridos y la subsiguiente determinación enzimática del glicerol formado mediante reacción colorimétrica. Para ello, se utiliza la lipasa, que actúa sobre los triglicéridos produciendo glicerol. Este reacciona con la glicerol quinasa y se transforma en glicerol 3-fosfato, el cual en presencia de la glicerol 3-fosfato oxidasa formará dihidroxiacetona fosfato. El peróxido de hidrógeno formado en la reacción anterior en presencia de 4-aminofenazona y 4-clorofenol y debido a una peroxidasa, da lugar a un compuesto coloreado denominado 4-(p-benzoquinona-monoimino)-fenazona que se cuantifica mediante espectrofotometría a 500 nm, siendo la absorbancia proporcional a la cantidad de triglicéridos presentes en la muestra.

Para la determinación de triglicéridos, se tomaron alícuotas de 25 y 50  $\mu\text{l}$  del extracto lipídico, que fueron evaporadas bajo corriente de nitrógeno y resuspendidas en 25  $\mu\text{l}$  de isopropanol. Simultáneamente, se prepararon tres tubos con 15, 25 y 50  $\mu\text{g}$

de un patrón de triglicéridos (2 mg/ml), que fueron procesados de forma idéntica a los problemas. A continuación, se añadieron 2 ml de reactivo a cada tubo y se incubaron a 25°C durante 10 minutos. Posteriormente, se determinó la absorbancia del compuesto coloreado a 500 nm.

La concentración de triglicéridos se calculó a partir de la fórmula siguiente:

$$\mu\text{g triglicéridos}/10^6\text{célula} = \frac{DO \times a \times VI}{Vt \times P}$$

En donde:

*DO*: Densidad óptica media de la muestra problema.

*a*: Pendiente de la recta de regresión obtenida para la curva patrón por mínimos cuadrados ( $\mu\text{g}/DO$ ).

*VI*: Volumen del extracto lipídico expresado en ml.

*Vt*: Alícuota del extracto lipídico utilizado en la colorimetría expresado en ml.

*P*: Concentración de células expresada en millones de la que se parte para la extracción de lípidos.

#### II.2.4. Separación de fosfolípidos

La separación de los diferentes fosfolípidos se realizó mediante cromatografía en capa fina, según la técnica de Higgins (1987).

Se utilizaron placas de silica gel sobre cristal de 20x20 cm de tipo 60 G. Las muestras se colocaron a 1,5 cm del borde inferior de la placa. El desarrollo de las placas se llevó a cabo en cubetas de vidrio previamente saturadas con el líquido de desarrollo

constituido por la mezcla cloroformo:metanol:ácido acético glacial:agua desionizada (60:50:1:4). Se realizó una cromatografía ascendente convencional, dejando que el solvente llegara al extremo superior de la placa. Posteriormente, fueron reveladas en una campana saturada con yodo. Tras el revelado, se rasparon las zonas correspondientes a los distintos fosfolípidos y se almacenaron para su análisis posterior.

#### II.2.4.1. *Determinación del fósforo lipídico*

Para la determinación del fósforo lipídico total y de fosfolípidos, se siguió el método de Fiske y Subbarow (1925) modificado por Bartlett (1959).

Este método se basa en la reacción del fosfato presente en la muestra con el ácido molíbdico para formar el ácido fosfomolíbdico. Este se reduce selectivamente por adición del ácido 1-amino-2-naftol-3-sulfónico para dar un color azul oscuro, cuya intensidad medida a 830 nm es proporcional a la cantidad de fósforo presente en el extracto lipídico.

Para poder extrapolar las concentraciones a partir de las densidades ópticas de la muestra, se utilizó una solución patrón de fosfato disódico en agua desionizada para conseguir una concentración de 10 µg/ml de fósforo.

Para la determinación del fósforo total, se tomaron alícuotas de 25 y 50 µl del extracto lipídico que se dispusieron en tubos graduados de 10 ml, lavados previamente con un detergente especial exento de fosfatos. Para la curva patrón se prepararon tres tubos con 0,15, 0,3 y 0,6 ml respectivamente de la solución patrón de fósforo. A todos los tubos se les añadió 1,2 ml de ácido perclórico al 70% y dos gotas de una solución de molibdato amónico al 5% en ácido sulfúrico 2 M. A continuación, los tubos se completaron hasta 2 ml con agua desionizada. Los tubos se agitaron con suavidad y se dispusieron tapados con bolas de cristal en un baño de arena (Selecta) a 180°C durante 30 minutos. Transcurrido

este tiempo, se sacaron los tubos del baño y se dejaron enfriar, se les añadió 0.4 ml de una solución de molibdato amónico al 5% en ácido sulfúrico 2 M y 0,4 ml del reactivo de Fiske y Subbarrow, preparado de la siguiente forma:

1-Amino-2-naftol-3-sulfónico . . . . .	0,5 g
Metabisulfito sódico . . . . .	30 g
Sulfito sódico anhidro . . . . .	3 g
Agua desionizada (csp) . . . . .	250 ml

Para facilitar la disolución de este reactivo es preciso calentar al baño maría.

Finalmente, se completaron los tubos hasta 5 ml con agua desionizada. Se agitaron suavemente y se colocaron (tapados con bolas de vidrio) a baño maría a 100°C durante 15 minutos hasta la completa aparición del color azul. Una vez fríos los tubos, se determinaron las densidades ópticas en un espectrofotómetro Coleman  $\sigma/20$  a 830 nm.

Para la determinación del fósforo correspondiente a cada uno de los fosfolípidos, se rasparon de las placas de silica gel cada una de las zonas correspondientes a los fosfolípidos, y sobre el silica gel se añadieron los reactivos procediendo de igual manera que en el caso de la determinación del fósforo total. En este caso es conveniente centrifugar los tubos a 2500 rpm durante 10 minutos, con el objeto de sedimentar el silica gel antes de medir densidades ópticas en el espectrofotómetro.

Las concentraciones de fósforo total y de los distintos fosfolípidos se han expresado como  $\mu\text{g}$  de fósforo lipídico por  $10^6$  de célula, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\mu\text{g fósforo}/10^6\text{célula} = \frac{DO \times a \times VI}{Vt \times P}$$

En donde:

*DO*: Densidad óptica media de la muestra problema.

*a*: Pendiente de la recta de regresión obtenida para la curva patrón por mínimos cuadrados ( $\mu\text{g}/DO$ ).

*VI*: Volumen del extracto lipídico expresado en ml.

*Vt*: Alícuota del extracto lipídico utilizado en la colorimetría expresado en ml.

*P*: Concentración de células expresada en millones de la que se parte para la extracción de lípidos.

### II.3. EFECTO DEL ETANOL SOBRE EL METABOLISMO LIPIDICO EN HEPATOCITOS

En este apartado se ha llevado a cabo el estudio del metabolismo lipídico en el hepatocito, así como de los efectos del etanol sobre dichos procesos. Para ello, se ha estudiado la incorporación de distintos tipos de precursores metabólicos marcados radiactivamente a las diferentes especies lipídicas.

En todos los casos las incubaciones fueron efectuadas de la siguiente manera: se colocaron alícuotas de 1 ml de la suspensión celular inicial de  $5 \times 10^6$  células/ml en frascos de cultivo de  $25 \text{ cm}^2$  y se les adicionó 0,7 ml de Krebs-Henseleit de incubación y 0,5 ml de una solución de albúmina bovina exenta de ácidos grasos (BSA) hasta una concentración final del 1,5%. Paralelamente, y con objeto de determinar el efecto del etanol *in vitro* sobre la incorporación de sustratos marcados a las distintas especies lipídicas, se realizaron incubaciones según la forma indicada anteriormente, pero añadiendo

0,2 ml de Krebs-Henseleit de incubación y 0,5 ml de una solución 0,5 M de etanol, de modo que la concentración final de etanol en el medio fuera 100 mM.

Los frascos así preparados se gasearon con carbógeno y se cerraron, preincubándose a 37°C durante 2 horas y media en una baño Gallenkamp con agitación constante (80 oscilaciones por minuto).

Transcurrido este tiempo, la reacciones individuales se iniciaron con los diferentes sustratos marcados isotópicamente, añadiendo los volúmenes adecuados de cada uno de los sustratos radiactivos para conseguir un volumen final de 2,5 ml en la mezcla de incubación. Los frascos de cultivo se volvieron a gasear de nuevo con carbógeno y se incubaron a 37°C durante 30 minutos.

A continuación, se especifican las concentraciones de los sustratos para cada incubación en concreto:

Sustrato marcado

*[1(3)<sup>3</sup>H] glicerol* . . . 200000 dpm/nmol a una concentración final en el medio de incubación 50 μM.

*<sup>3</sup>H oleato* . . . . . 26500 dpm/nmol a una concentración final en el medio de incubación 100 μM.

*L-[3-<sup>3</sup>H] serina* . . . 150968 dpm/nmol a una concentración final en el medio de incubación 50 μM.

*[1-<sup>3</sup>H] etanolamina* 119920 dpm/nmol a una concentración final en el medio de incubación 40 μM.

*[metil-<sup>14</sup>C] colina* . . 32667 dpm/nmol a una concentración final en el medio de incubación 50 μM.

En los tres últimos casos, la reacción se inició además con el volumen adecuado de metionina para conseguir una concentración final 50 μM.

Las reacciones se detuvieron introduciendo los frascos de cultivo en un baño de agua-hielo y añadiendo 7,5 ml de medio Krebs-Henseleit frío. Las células se recogieron centrifugando a 50xg durante 5 minutos en una centrífuga de mesa refrigerada. Con objeto de eliminar la radiactividad no incorporada, las células fueron lavadas dos veces con 10 ml de medio, realizándose a continuación una extracción de lípidos y cuantificando posteriormente la radiactividad asociada a las distintas fracciones lipídicas.

A continuación indicamos detalladamente y para cada incubación en particular, las distintas fracciones lipídicas a las que se incorpora cada sustrato marcado, así como la metodología utilizada para la separación de los distintos componentes de interés en cada caso.

### **II.3.1. Incorporación de [1(3)<sup>3</sup>H] glicerol**

El glicerol marcado se incorpora tanto a lípidos neutros como a fosfolípidos. Por ello, se realizaron, tras la extracción de lípidos, las correspondientes cromatografías en capa fina con el objeto de separar los distintos componentes lipídicos a los que se incorpora este sustrato y que por lo tanto aparecen marcados radiactivamente.

Para la separación de los fosfolípidos se siguió el método cromatográfico descrito con anterioridad en el apartado II.B.2.4.

La separación de los lípidos neutros se realizó mediante cromatografía en capa fina, según la técnica de Lichtenstein y Brecher (1980).

Se utilizaron placas de silica gel 60G sobre cristal de 20x20 cm. El desarrollo de las placas se llevó a cabo en cubetas de vidrio previamente saturadas con el líquido de desarrollo constituido por la mezcla n-hexano:éter etílico:ácido acético glacial (70:30:1). Se realizó una cromatografía ascendente convencional, dejando que el solvente

llegara al extremo superior de la placas. Posteriormente, las placas se revelaron en una campana saturada con yodo. Tras eliminar el yodo, las zonas correspondientes a los distintos lípidos neutros se rasparon y se recogieron para su análisis posterior.

### II.3.2. Incorporación de $^3\text{H}$ oleato

En este apartado, hemos de considerar en primer lugar la preparación del oleato marcado, a partir del ácido graso libre marcado isotópicamente. Para ello, se siguió el método descrito por Stremmel and Berk (1986). A 14  $\mu\text{l}$  de ácido oleico no radiactivo (100 mg/ml) se añadió 3,3 ml de ácido  $^3\text{H}$  oleico ( $40 \times 10^6$  dpm/ml). La mezcla se agitó con cuidado y se evaporó bajo corriente de nitrógeno. El sedimento se resuspendió con 500  $\mu\text{l}$  de NaOH 0.02 M, para conseguir una relación de 5  $\mu\text{mol}$  de oleico/10  $\mu\text{mol}$  de NaOH. Se agitó con precaución y se adicionó 500  $\mu\text{l}$  de BSA a una concentración adecuada para obtener la relación oleato:albúmina deseada (en este caso 1:1). La mezcla así preparada, contenía oleato con una actividad específica de 26500 dpm/nmol.

Transcurrido el tiempo de incubación, la reacción se detuvo, como hemos mencionado anteriormente, introduciendo los frascos en una baño de agua-hielo y añadiendo 7,5 ml de Krebs-Henseleit suplementado con floretina 250  $\mu\text{M}$  y BSA al 0,1%. La floretina es un inhibidor eficiente de los sistemas de transporte celular, y en nuestro caso es utilizado para detener el influjo y eflujo del ácido graso, eliminando de esta manera el ligando asociado a membrana pero no el transportado. De este modo la radiactividad detectada en el ácido graso se corresponde exclusivamente con el introducido en la célula.

Las células fueron sedimentadas centrifugando a 50xg durante 10 minutos. Posteriormente fueron lavadas dos veces, como en el resto de las otras incubaciones, con la única excepción de que el primer lavado se realizó con 10 ml de la misma solución de parada, y el segundo lavado se llevó a cabo con 10 ml de Krebs-Henseleit exento de BSA

y floretina. A continuación, se efectuó la extracción e identificación de los lípidos celulares, realizando las correspondientes cromatografías en capa fina para la separación de los distintos fosfolípidos y lípidos neutros.

### II.3.3. Incorporación de L-[3-<sup>3</sup>H] serina

Tras finalizar la incubación, se realizó la extracción de los lípidos, y debido a que la serina marcada se incorpora tanto a lípidos neutros como a fosfolípidos, se realizaron las correspondientes cromatografías en capa fina.

### II.3.4. Incorporación de [1-<sup>3</sup>H] etanolamina

Tras finalizar la incubación, se procedió a realizar la extracción lipídica, según el protocolo anterior con alguna modificación. La variación reside en que se añade 0,5 ml de ClH 0,1 N (en lugar de 2 ml), con objeto de concentrar las fases acuosas, puesto que en el caso de incorporación de etanolamina marcada, también se cuantifica la radiactividad incorporada a los intermediarios solubles de la reacción: CDP-etanolamina, fosfoetanolamina y etanolamina.

Para ésto último, se ha seguido el procedimiento descrito por Wang y Moore (1991) ligeramente modificado. En primer lugar se recogieron las fases acuosas y se les añadieron portadores de los distintos compuestos a separar, con objeto de facilitar su separación y posterior identificación. Así, a 0,2 ml de fase acuosa se añadieron 0,8 mg de etanolamina y de fosfoetanolamina, y 0,3 mg de CDP-etanolamina. De la mezcla así preparada, se tomaron 50 µl que se dispusieron en el borde inferior de una placa de silica gel 60 G (Whatman). El desarrollo de las placas se llevó a cabo con el líquido de desarrollo constituido por una mezcla de 96% etanol: 3% amoníaco (1:2). Tras revelar en una campana de yodo, se identificaron las bandas correspondientes a los diferentes

compuestos solubles y se rasparon, guardándose para su posterior análisis.

También, se desarrollaron cromatografías para separar a los diferentes fosfolípidos pero no a los lípidos neutros, debido a que la etanolamina se incorpora exclusivamente a fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina. Para la determinación y cuantificación de la incorporación a cada fosfolípido se procedió igual que en incubaciones anteriores.

Además, puesto que la fosfatidiletanolamina puede convertirse en fosfatidilcolina por sucesivas etapas de metilación, se determinó también la actividad fosfatidiletanolamina-metiltransferasa. Para ello, se realizaron cromatografías para separar a los productos iniciales, intermedios y finales de esta reacción: fosfatidiletanolamina, fosfatidil-N-monometiletanolamina, fosfatidil-NN-dimetiletanolamina y fosfatidilcolina, según el método de Marino et al. (1986). Se utilizó una alícuota del extracto lipídico (100  $\mu$ l), a la que se le añadió 0,04 mg de fosfatidil-NN-dimetiletanolamina y 0,08 mg de fosfatidil-N-monometiletanolamina como portadores, con el objeto de facilitar el desarrollo de la placa y la posterior identificación de los compuestos por revelado con yodo. De la muestra así preparada, se tomó 50  $\mu$ l y se realizó una cromatografía en capa fina con el líquido de desarrollo constituido por la mezcla cloroformo: metanol: ácido acético glaciar (70:30:4). Posteriormente, se identificaron y se rasparon las bandas correspondientes a los productos que se deseaban aislar.

### II.3.5. Incorporación de [metil- $^{14}$ C] colina

La colina marcada se incorpora a fosfatidilcolina y a los intermediarios solubles de la ruta de Kennedy. Por ello, se realizaron cromatografías para la separación de fosfolípidos (de las cuales se raspó exclusivamente la fosfatidilcolina), y para la separación de los compuestos solubles de la reacción. Estas últimas, se realizaron según el método propuesto por Vance et al. (1981) ligeramente modificado. En primer lugar se

prepararon las fases acuosas con portadores apropiados para favorecer la separación de los distintos compuestos. Para ello, a 0,5 ml de fase acuosa se añadieron 2 mg de fosfocolina y 1,5 mg de colina y de betaína. De la mezcla así preparada, se tomaron 50 µl que se dispusieron en el borde inferior de una placa de silica gel 60 G (Whatman). Se desarrollaron mediante un líquido de desarrollo constituido por la mezcla metanol: ClNa 0,6%: amoníaco (50:50:5), y se rasparon las zonas correspondientes a los diferentes compuestos solubles.

### II.3.6. Determinación de la radiactividad incorporada a las diferentes especies lipídicas

Para la determinación de la incorporación de los distintos sustratos marcados radiactivamente a cada fracción lipídica se procedió de la siguiente manera: Las bandas raspadas de las placas correspondientes a las diferentes especies lipídicas y sustratos solubles, se colocaron en viales de centelleo, y se les añadió 3 ml del líquido de centelleo Ready Safe (Beckman).

Los viales se agitaron vigorosamente y fueron colocados en un contador de centelleo líquido (Beckman 6000-TA), donde se procedió a la medida del contenido en  $^3\text{H}$  o  $^{14}\text{C}$  de cada una de las muestras.

Para la cuantificación de la incorporación a cada fosfolípido o lípido neutro se utilizó la siguiente expresión:

$$A.e. = \frac{dpm [^3H] m \times VI}{Vt \times Re \times t \times P}$$

En donde:

*A.e.*: actividad específica expresada como pmol de sustrato incorporados por minuto y  $10^6$  célula.

*dpm [ $^3H$ ]m*: desintegraciones por minuto de la medida del  $^3H$  contenido en la muestra.

*Vl*: Volumen del extracto lipídico expresado en ml.

*Vt*: Alícuota del extracto lipídico utilizado en las cromatografías expresado en ml.

*Re*: Radiactividad específica del sustrato expresada en dpm/pmol.

*t*: Tiempo de incubación expresado en minutos.

*P*: Concentración de células expresada en millones de la que se parte para la extracción de lípidos.

### II.3.7. Estudio del catabolismo de fosfatidilcolina

Se realizaron una serie de experimentos en los que se incubaron durante 1 hora y media a  $37^{\circ}\text{C}$ ,  $70 \times 10^6$  de hepatocitos junto con BSA (1,5%), [metil- $^{14}\text{C}$ ]colina (67690 dpm/nmol a una concentración final de  $50 \mu\text{M}$ ) y metionina  $50 \mu\text{M}$ , en un Krebs-Henseleit de incubación. Todo se adiciona en volúmenes apropiados para tener 14 ml de incubación. Transcurrido el tiempo de esta incubación, se detuvo la reacción y las células fueron lavadas dos veces. Las células sedimentadas tras el segundo lavado, se resuspendieron en un medio de Krebs-Henseleit de incubación con 3 mM de metilpirazol. De estas células, se tomaron alícuotas de  $4 \times 10^6$  y se colocaron en frascos de cultivo, a los cuales se les adicionó un volumen determinado de Krebs-Henseleit con metilpirazol para conseguir un volumen final de incubación de 2 ml. Simultáneamente, se realizaron incubaciones en las mismas condiciones, pero con etanol a una concentración final de 100 mM. Los frascos de cultivo así preparados, se incubaron durante 30 minutos, 1 y 2 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ . Transcurridos los correspondientes tiempos, las células fueron sedimentadas a  $50 \times g$  durante 5 minutos, se guardaron los sobrenadantes de esta centrifugación para su posterior análisis. Sobre el sedimento celular se realizó una extracción de lípidos con 3 ml del

reactivo de Folch y 1 ml de CIH 0,1 N. Se recogieron para su posterior análisis las fases acuosas de las extracciones lipídicas. Las fases clorofórmicas se evaporaron bajo corriente de nitrógeno y se resuspendieron en un volumen apropiado de cloroformo, del cual se tomaran alícuotas para su posterior procesamiento.

A continuación, se determinaron las dpm correspondientes a colina presente en el medio de incubación, colina intracelular y fosfatidilcolina.

## **RESULTADOS**

## I. INFLUENCIA DEL ETANOL *IN VITRO* SOBRE EL METABOLISMO LIPIDICO EN HEPATOCITOS

El hígado juega un papel central en el metabolismo lipídico, siendo el tejido más adecuado para el estudio de los mecanismos de control de estos procesos. La incubación de suspensiones de células aisladas en presencia de diferentes precursores metabólicos permite el estudio de las principales rutas del metabolismo lipídico. En el presente trabajo, destinado a elucidar las acciones específicas del etanol *in vitro* sobre diversas rutas del metabolismo lipídico, hemos utilizado como material de trabajo hepatocitos aislados de ratas macho Wistar, las cuales recibieron una dieta estándar. La utilización de suspensiones celulares presenta grandes ventajas para el estudio de las interacciones bioquímicas a nivel celular producidas por agentes exógenos. Además, el empleo de células intactas supone una gran ventaja, a la hora de interpretar los resultados, respecto a la utilización de fracciones subcelulares, ya que pueden ser consideradas sistemas cuyo comportamiento sería extrapolable al que presenta el órgano completo *in vivo*. Sin embargo, el estudio de etapas metabólicas individuales ofrece dificultades por la diversidad de rutas que ocurren simultáneamente, en conexión con la etapa de estudio. Por ello, se ha abordado el estudio del efecto que produce el etanol *in vitro* sobre la regulación global de diferentes rutas.

La viabilidad celular en todos los experimentos fue superior al 90%. Los hepatocitos se preincubaron en las condiciones especificadas en el capítulo de Material y Métodos en presencia o ausencia de etanol. La concentración de etanol usada fue de 100

mM, ya que experimentos previos llevados a cabo en nuestro laboratorio mostraron que ésta es una concentración no tóxica para las células durante el período de incubación al que son sometidas. Posteriormente, se realizaron las incubaciones con los distintos sustratos metabólicos marcados radiactivamente con  $^3\text{H}$  o  $^{14}\text{C}$ . Tras finalizar el período de incubación, se llevó a cabo la separación de los lípidos correspondientes, analizando el efecto del etanol sobre la incorporación de los diferentes precursores metabólicos a los distintos componentes lipídicos de la célula.

Este estudio se ha ampliado al análisis del efecto del etanol sobre los niveles de los componentes lipídicos mayoritarios del hepatocito.

## I.1. COMPOSICION LIPIDICA

Exponemos en primer lugar, los resultados obtenidos acerca de la influencia del etanol *in vitro* sobre la composición lipídica en hepatocitos aislados de hígado de rata. Concretamente, se han determinado los niveles de colesterol total, libre y esterificado, así como los niveles de triacilglicéridos y de los fosfolípidos individuales.

### I.1.1. Niveles de colesterol y triacilglicéridos

En la Tabla I se muestra el efecto del etanol *in vitro* sobre los niveles de colesterol y triacilglicéridos en hepatocitos aislados de hígado de rata, expresados como  $\mu\text{g}$  de colesterol o triacilglicéridos por millón de células.

Se puede apreciar que el etanol, a concentración 100 mM, tras un período de incubación de 150 minutos, produce un notable aumento en los niveles de

triacilglicéridos, que varían desde 24 hasta valores de 33  $\mu\text{g}/10^6$  de células. Sin embargo, no se observa variación alguna en los niveles de colesterol total, libre o esterificado por efecto del etanol.

TABLA I

EFFECTO DEL ETANOL *IN VITRO* SOBRE LOS NIVELES DE COLESTEROL Y TRIACILGLICERIDOS EN HEPATOCITOS AISLADOS DE HIGADO DE RATA

	Concentración Etanol (mM)	
	0	100
Colesterol total	11,89 $\pm$ 0,94	13,08 $\pm$ 0,80
Colesterol libre	8,74 $\pm$ 0,51	9,03 $\pm$ 0,40
Colesterol esterificado	3,16 $\pm$ 0,78	4,05 $\pm$ 0,69
Triacilglicéridos	24,27 $\pm$ 1,78	33,38 $\pm$ 2,66 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $p \leq 0,0100$ .

<sup>a</sup> $p$ =niveles de significación de la t de Student respecto a los controles. Los resultados son media de dieciocho determinaciones  $\pm$  S.E.M., expresados como  $\mu\text{g}$  de colesterol o triacilglicéridos por millón de células.

### I.1.2. Niveles de fosfolípidos

Según se observa, la fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina son los dos fosfolípidos mayoritarios (40% y 30% respectivamente), mientras que la fosfatidilserina y el fosfatidilinositol representan un 15% cada uno de los fosfolípidos hepáticos totales.

En la Tabla II, se muestran los valores obtenidos tras la determinación de fósforo lipídico de los distintos fosfolípidos en hepatocitos incubados en presencia o ausencia de etanol, expresados como  $\mu\text{g}$  de fósforo lipídico por millón de células. Según se puede observar, la exposición de hepatocitos al etanol no afecta de modo significativo a los niveles de ninguno de los fosfolípidos analizados.

**TABLA II**

**EFFECTO DEL ETANOL *IN VITRO* SOBRE LOS NIVELES DE FOSFOLIPIDOS EN HEPATOCITOS AISLADOS DE HIGADO DE RATA**

	Concentración Etanol (mM)	
	0	100
Fosfatidilcolina	3,30 $\pm$ 0,12	3,05 $\pm$ 0,11
Fosfatidilserina	1,25 $\pm$ 0,13	1,01 $\pm$ 0,12
Fosfatidilinositol	1,26 $\pm$ 0,06	1,13 $\pm$ 0,05
Fosfatidiletanolamina	2,47 $\pm$ 0,04	2,58 $\pm$ 0,06

Los resultados son media de doce determinaciones  $\pm$  S.E.M., expresados como  $\mu\text{g}$  de fósforo lipídico por millón de células.

## I.2. INCORPORACION DE PRECURSORES METABOLICOS A LOS DIFERENTES COMPONENTES LIPIDICOS

Se ha llevado a cabo el estudio de los efectos del etanol *in vitro* sobre la incorporación de distintos sustratos lipogénicos marcados radiactivamente a diferentes componentes lipídicos. Para ello, se han utilizado sustratos de diferentes características que permiten determinar un aspecto particular de las rutas de biosíntesis de lípidos neutros y fosfolípidos.

Como componente esencial de lípidos complejos se ha utilizado glicerol marcado, puesto que la incorporación de este sustrato permitirá determinar de modo global la velocidad de biosíntesis de fosfolípidos y triacilglicéridos. Para el estudio específico de los procesos de desacilación/reacilación de los diferentes componentes lipídicos, se ha elegido como sustrato marcado el ácido oleico.

Finalmente, se han realizado incubaciones con bases polares específicas, con el objeto de clarificar la acción que ejerce el etanol sobre determinados aspectos de las principales rutas de biosíntesis de fosfolípidos. De este modo, las incubaciones realizadas con etanolamina o colina marcada, constituyen un modelo adecuado para el estudio de la ruta de Kennedy que sintetiza fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina, vía CDP-etanolamina o CDP-colina respectivamente. Al utilizar como sustrato marcado etanolamina, se obtendrá además información del proceso de síntesis de fosfatidilcolina por metilación sucesiva de la fosfatidiletanolamina. La serina marcada se ha utilizado principalmente para el análisis de la ruta que sintetiza fosfatidiserina a través de una reacción de intercambio de bases, aunque al mismo tiempo proporciona datos experimentales acerca de la descarboxilación mitocondrial de fosfatidilserina para producir fosfatidiletanolamina, y de la metilación microsomal de esta fosfatidiletanolamina.

### I.2.1. Incorporación de [1(3)<sup>3</sup>H] glicerol

Se ha comentado ampliamente en el capítulo de Introducción que a partir del glicerol, vía acil glicerol 3-fosfato, se forma ácido fosfatídico, que posteriormente se transforma en diacilglicéridos. Estos, son los precursores comunes para la biosíntesis de fosfolípidos y triacilglicéridos, y por ello al incubar con glicerol marcado aparece radiactividad asociada a un gran número de componentes lipídicos.

Se ha analizado el efecto del etanol *in vitro* sobre la incorporación de glicerol marcado isotópicamente a lípidos neutros y fosfolípidos en hepatocitos. Los resultados obtenidos aparecen recogidos en la Tabla III, expresados como pmoles incorporados de glicerol por minuto y millón de células.

Cuando se analiza la incorporación de glicerol a la fracción de lípidos neutros, en ausencia de etanol, se puede observar como la incorporación de este precursor a la fracción de triacilglicéridos es claramente superior a la existente en diacilglicéridos. El etanol, por otra parte, incrementa de manera significativa la incorporación a diacilglicéridos y triacilglicéridos, aunque este aumento es especialmente marcado en esta última fracción, que exhibe niveles de incorporación netamente superiores en presencia de etanol.

En la misma tabla, aparecen recogidos los valores de radiactividad asociada a los distintos fosfolípidos tras la incubación con glicerol, en presencia o ausencia de etanol. Especialmente importante resulta la incorporación de glicerol a fosfatidilcolina, que es muy superior a la encontrada en fosfatidiletanolamina. Por otra parte, es de destacar que el marcaje de fosfatidilinositol es claramente inferior al existente en los fosfolípidos mayoritarios, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, así como que no se observa incorporación alguna en la fracción de fosfatidilserina del hepatocito. Puesto que este

fosfolípido se sintetiza en hígado fundamentalmente por reacción de intercambio de bases, especialmente con la fosfatidiletanolamina, la ausencia de incorporación de radiactividad se puede atribuir a una limitación en la concentración endógena de serina que impide una síntesis cuantitativamente importante del fosfolípido correspondiente.

TABLA III

EFFECTO DEL ETANOL *IN VITRO* SOBRE LA INCORPORACION DE [1(3)<sup>3</sup>H] GLICEROL A LIPIDOS NEUTROS Y FOSFOLIPIDOS EN HEPATOCITOS AISLADOS DE HIGADO DE RATA

	Concentración etanol (mM)	
	0	100
<u>LIPIDOS NEUTROS</u>		
Monoacilglicéridos	n.d	n.d
Diacilglicéridos	0,25 ± 0,01	0,47 ± 0,01 <sup>b</sup>
Triacilglicéridos	6,05 ± 0,33	16,30 ± 0,31 <sup>b</sup>
<u>FOSFOLIPIDOS</u>		
Fosfatidilcolina	3,67 ± 0,13	5,52 ± 0,17 <sup>a</sup>
Fosfatidilserina	n.d	n.d
Fosfatidilinositol	0,14 ± 0,01	0,27 ± 0,01 <sup>a</sup>
Fosfatidiletanolamina	1,10 ± 0,02	1,81 ± 0,05 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>p ≤ 0,0010; <sup>b</sup>p ≤ 0,0001.

p=niveles de significación de la t de Student de los hepatocitos incubados con etanol respecto a los controles. Los resultados son media de tres determinaciones ± S.E.M., expresados como pmoles incorporados de glicerol por minuto y millón de células.

La presencia de etanol en el medio de incubación provoca un incremento considerable en la utilización de glicerol para la síntesis *de novo* de los distintos fosfolípidos (Tabla III). De hecho, en hepatocitos incubados en presencia de etanol se observa un aumento significativo en la incorporación de glicerol a fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, y fosfatidilinositol. En presencia de etanol no llega a producirse incorporación detectable de radiactividad a fosfatidilserina.

Por otra parte y puesto que el etanol es metabolizado en hepatocitos mediante la alcohol deshidrogenasa, hemos determinado el efecto del etanol *in vitro* sobre la incorporación de glicerol a lípidos neutros (Tabla IV) y fosfolípidos (Tabla V) tras la adición de 4-metilpirazol, un inhibidor específico de esta enzima. Como se observa, en presencia de dicho agente, el efecto producido por el etanol sobre la biosíntesis de lípidos neutros prácticamente desaparece, con la excepción de un aumento (43%) en la incorporación a triacilglicéridos. Por otra parte, en presencia de 4-metilpirazol no se observan diferencias apreciables en la incorporación de glicerol a ninguno de los fosfolípidos analizados.

TABLA IV

EFFECTO DEL ETANOL *IN VITRO* SOBRE LA INCORPORACION DE  $[1(3)^3\text{H}]$  GLICEROL A LIPIDOS NEUTROS EN HEPATOCITOS AISLADOS DE HIGADO DE RATA. INFLUENCIA DEL 4-METILPIRAZOL

	<u>[Etanol]</u>	<u>Sin 4-metilpirazol</u>	<u>Con 4-metilpirazol</u>
<u>LIPIDOS NEUTROS</u>			
Diacilglicéridos	0 mM	0,25 ± 0,01	0,20 ± 0,01
	100 mM	0,47 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,22 ± 0,01
Triacilglicéridos	0 mM	6,05 ± 0,33	4,55 ± 0,30
	100 mM	16,31 ± 0,31 <sup>b</sup>	6,49 ± 0,06 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>p ≤ 0,0050; <sup>b</sup>p ≤ 0,0001.

p=niveles de significación de la t de Student de los hepatocitos incubados con etanol respecto a sus controles. Los resultados son media de tres determinaciones ± S.E.M. expresados como pmoles incorporados de glicerol por minuto y millón de células.

TABLA V

EFFECTO DEL ETANOL *IN VITRO* SOBRE LA INCORPORACION DE [1(3)<sup>3</sup>H] GLICEROL A FOSFOLIPIDOS EN HEPATOCITOS AISLADOS DE HIGADO DE RATA. INFLUENCIA DEL 4-METILPIRAZOL

	<u>[Etanol]</u>	<u>Sin 4-metilpirazol</u>	<u>Con 4-metilpirazol</u>
<u>FOSFOLIPIDOS</u>			
Fosfatidilcolina	0 mM	3,67 ± 0,13	2,99 ± 0,33
	100 mM	5,52 ± 0,17 <sup>a</sup>	3,20 ± 0,04
Fosfatidilinositol	0 mM	0,14 ± 0,01	0,13 ± 0,01
	100 mM	0,27 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,12 ± 0,01
Fosfatidiletanolamina	0 mM	1,10 ± 0,02	1,00 ± 0,12
	100 mM	1,81 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,27 ± 0,04

<sup>a</sup>p ≤ 0,0010.

p = niveles de significación de la t de Student de los hepatocitos incubados con etanol respecto a sus controles. Los resultados son media de tres determinaciones ± S.E.M. expresados como pmoles incorporados de glicerol por minuto y millón de células.

### I.2.2. Incorporación de $^3\text{H}$ -oleato

Se ha estudiado la incorporación de ácido oleico a lípidos neutros y fosfolípidos en hepatocitos incubados en ausencia o presencia de etanol 100 mM. Los resultados obtenidos aparecen recogidos en la Tabla VI, expresados como pmoles incorporados de oleato por minuto y millón de células.

Como se puede apreciar, en ausencia de etanol, el ácido graso marcado se incorpora a distintos lípidos neutros (excepto a monoacilglicéridos), aunque preferentemente lo hace a triacilglicéridos, de hecho un porcentaje mayoritario de la radiactividad aparece asociada a esta fracción lipídica.

En presencia de etanol se produce un fuerte aumento en la incorporación a diacilglicéridos y triacilglicéridos, aumentando además, en estas condiciones, los niveles intracelulares del ácido graso marcado. Se observa también una disminución significativa (27%) en la síntesis de colesterol esterificado a partir de ácido oleico en hepatocitos incubados en presencia de etanol.

En la Tabla VI aparecen igualmente recogidos los valores de incorporación de oleato marcado a los distintos fosfolípidos. En ella se pone de manifiesto que, en ausencia de etanol, el ácido graso marcado se incorpora a todos los fosfolípidos analizados, aunque preferentemente a fosfatidilcolina. Por otra parte, es destacable la baja incorporación del ácido graso marcado a fosfatidilserina respecto a fosfatidilinositol, a pesar de que ambos fosfolípidos se encuentran en proporciones similares en el hepatocito.

En cuanto al efecto del etanol *in vitro*, nuestros resultados demuestran que por efecto del etanol, se produce un claro aumento en la incorporación de ácido oleico exógeno a todos los fosfolípidos estudiados.

TABLA VI

EFFECTO DEL ETANOL *IN VITRO* SOBRE LA INCORPORACION DE  $^3\text{H}$ -OLEATO A LIPIDOS NEUTROS Y FOSFOLIPIDOS EN HEPATOCITOS AISLADOS DE HIGADO DE RATA

	Concentración Etanol (mM)	
	0	100
<b><u>LIPIDOS NEUTROS</u></b>		
Monoacilglicéridos	n.d.	n.d.
Diacilglicéridos	3,08 ± 0,06	8,91 ± 0,40 <sup>c</sup>
Acido oleico	0,86 ± 0,04	1,53 ± 0,07 <sup>b</sup>
Triacilglicéridos	126,09 ± 4,54	308,47 ± 4,34 <sup>c</sup>
Colesterol esterificado	9,48 ± 0,33	6,90 ± 0,33 <sup>a</sup>
<b><u>FOSFOLIPIDOS</u></b>		
Fosfatidilcolina	18,54 ± 0,82	29,88 ± 1,68 <sup>b</sup>
Fosfatidilserina	0,40 ± 0,04	0,71 ± 0,06 <sup>a</sup>
Fosfatidilinositol	1,81 ± 0,03	3,52 ± 0,10 <sup>c</sup>
Fosfatidiletanolamina	5,67 ± 0,21	9,74 ± 0,06 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>p ≤ 0,0150; <sup>b</sup>p ≤ 0,0050; <sup>c</sup>p ≤ 0,0001.

p=niveles de significación de la t de Student de los hepatocitos incubados con etanol respecto a los controles. Los resultados son media de tres determinaciones ± S.E.M., expresados como pmoles incorporados de oleato por minuto y millón de células.



De igual manera a lo observado cuando el precursor utilizado es el glicerol, en presencia de 4-metilpirazol el efecto producido por el etanol sobre la incorporación de oleico a lípidos neutros (Tabla VII) y fosfolípidos (Tabla VIII) prácticamente desaparece, la única excepción se advierte a nivel de la fosfatidiletanolamina que muestra, aun en presencia de metilpirazol, niveles de incorporación significativamente superiores por efecto del etanol.

TABLA VII

EFFECTO DEL ETANOL *IN VITRO* SOBRE LA INCORPORACION DE  $^3\text{H}$ -OLEATO A LIPIDOS NEUTROS EN HEPATOCITOS AISLADOS DE HIGADO DE RATA. INFLUENCIA DEL 4-METILPIRAZOL

	<u>[Etanol]</u>	<u>Sin 4-metilpirazol</u>	<u>Con 4-metilpirazol</u>
<u>LIPIDOS NEUTROS</u>			
Diacilglicéridos	0 mM	3,08 ± 0,06	3,08 ± 0,04
	100 mM	8,91 ± 0,40 <sup>c</sup>	3,15 ± 0,19
Acido oleico	0 mM	0,86 ± 0,04	0,72 ± 0,03
	100 mM	1,53 ± 0,07 <sup>b</sup>	0,79 ± 0,07
Triacilglicéridos	0 mM	126,09 ± 4,54	110,52 ± 3,16
	100 mM	308,47 ± 4,34 <sup>c</sup>	115,68 ± 3,53
Colesterol esterificado	0 mM	9,48 ± 0,33	8,07 ± 0,46
	100 mM	6,90 ± 0,33 <sup>a</sup>	6,87 ± 0,48

<sup>a</sup>p≤0,0100; <sup>b</sup>p≤0,0050; <sup>c</sup>p≤0,0001.

p=niveles de significación de la t de Student de los hepatocitos incubados con etanol respecto a sus controles. Los resultados son media de tres determinaciones ± S.E.M. expresados como pmoles incorporados de oleato por minuto y millón de células.

TABLA VIII

EFFECTO DEL ETANOL *IN VITRO* SOBRE LA INCORPORACION DE  $^3\text{H}$ -OLEATO A FOSFOLIPIDOS EN HEPATOCITOS AISLADOS DE HIGADO DE RATA. INFLUENCIA DEL 4-METILPIRAZOL

	<u>[Etanol]</u>	<u>Sin 4-metilpirazol</u>	<u>Con 4-metilpirazol</u>
<u>FOSFOLIPIDOS</u>			
Fosfatidilcolina	0mM	18,54 ± 0,82	23,07 ± 1,38
	100mM	29,88 ± 1,68 <sup>c</sup>	21,86 ± 0,26
Fosfatidilserina	0mM	0,40 ± 0,04	0,44 ± 0,05
	100mM	0,71 ± 0,06 <sup>b</sup>	0,36 ± 0,07
Fosfatidilinositol	0mM	1,81 ± 0,03	2,19 ± 0,35
	100mM	3,52 ± 0,10 <sup>d</sup>	2,30 ± 0,12
Fosfatidiletanolamina	0mM	5,67 ± 0,21	6,83 ± 0,32
	100mM	9,74 ± 0,06 <sup>d</sup>	7,72 ± 0,01 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>p≤0,0500; <sup>b</sup>p≤0,0150; <sup>c</sup>p≤0,0050; <sup>d</sup>p≤0,0001.

p=niveles de significación de la t de Student de los hepatocitos incubados con etanol respecto a sus controles. Los resultados son media de tres determinaciones ± S.E.M. expresados como pmoles incorporados de oleato por minuto y millón de células.

### I.2.3. Incorporación de bases nitrogenadas

En éste y en los dos siguientes apartados, se muestran los resultados obtenidos tras la incorporación de diferentes bases nitrogenadas a los distintos fosfolípidos, y como se altera la incorporación de estos sustratos por la presencia de etanol. Los resultados se expresan en todos los casos como pmoles incorporados de base por minuto y millón de células.

#### I.2.3.1. *Incorporación de L-[3-<sup>3</sup>H] serina*

Las reacciones de intercambio de bases representan una ruta minoritaria para la síntesis de la mayoría de los fosfolípidos, excepto para la fosfatidilserina (Kanfer, 1980). De este modo, se acepta que la biosíntesis de este fosfolípido en tejidos animales se produce a través de un intercambio de serina con la cabeza polar de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina. La fosfatidilserina formada puede sufrir una posterior descarboxilación dando lugar a fosfatidiletanolamina. Esta vía contribuye junto con la ruta de Kennedy a la síntesis total de fosfatidiletanolamina. La fosfatidilcolina se forma principalmente a través de la ruta de Kennedy, aunque es también importante la contribución de la ruta que genera fosfatidilcolina por sucesivas etapas de metilación a partir de la fosfatidiletanolamina.

Como se ha indicado anteriormente, la radiactividad de la serina marcada puede aparecer en fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina. Sin embargo, también hemos observado incorporación de radiactividad a distintos lípidos neutros. Ello puede ser explicado en base a la degradación de la serina vía desaminación deshidratante que produce piruvato, el cual es transformado en acetil-CoA, sustrato utilizado para la síntesis de ácidos grasos y colesterol. Por ello, la incorporación de serina a lípidos neutros

puede ser indicativa de la magnitud del proceso lipogénico utilizando como sustrato específico la serina.

En la Tabla IX se exponen los resultados obtenidos tras la incorporación de serina marcada isotópicamente a los distintos lípidos neutros y fosfolípidos en hepatocitos incubados en ausencia o presencia de etanol. Según se puede comprobar en hepatocitos controles, y a diferencia de lo observado cuando se utiliza ácido oleico, sólo aparece radiactividad asociada a la fracción de diacilglicéridos o triacilglicéridos. Por otra parte, y al igual que ocurre cuando se utilizan otros sustratos lipogénicos, el etanol produce un notable aumento en la incorporación a diacilglicéridos, triacilglicéridos y colesterol esterificado, aunque hemos de destacar que este último compuesto no es detectado en ausencia de etanol.

TABLA IX

EFFECTO DEL ETANOL *IN VITRO* SOBRE LA INCORPORACION DE L-[3-<sup>3</sup>H] SERINA A LIPIDOS NEUTROS Y FOSFOLIPIDOS EN HEPATOCITOS AISLADOS DE HIGADO DE RATA

	Concentración etanol (mM)	
	0	100
<u>LIPIDOS NEUTROS</u>		
Monoacilglicéridos	n.d.	n.d.
Diacilglicéridos	0,189 ± 0,018	0,384 ± 0,023 <sup>d</sup>
Triacilglicéridos	0,100 ± 0,001	0,644 ± 0,019 <sup>d</sup>
Colesterol esterificado	n.d.	0,116 ± 0,019 <sup>d</sup>
<u>FOSFOLIPIDOS</u>		
Fosfatidilcolina	0,42 ± 0,03	0,78 ± 0,08 <sup>c</sup>
Fosfatidilserina	1,90 ± 0,21	2,36 ± 0,22
Fosfatidilinositol	n.d.	n.d.
Fosfatidiletanolamina	0,49 ± 0,05	0,72 ± 0,07 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>p ≤ 0,0200; <sup>b</sup>p ≤ 0,0050; <sup>c</sup>p ≤ 0,0010; <sup>d</sup>p ≤ 0,0001.

p=niveles de significación de la t de Student de los hepatocitos incubados con etanol respecto a los controles. Los resultados son media de nueve determinaciones ± S.E.M., expresados como pmoles incorporados de serina por minuto y millón de células.

Cuando se analiza la radiactividad asociada a los distintos fosfolípidos, se observa que, lógicamente, el nivel máximo de incorporación aparece en la fracción de fosfatidilserina, mientras que la radiactividad asociada a fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina es claramente inferior. No obstante, el hecho de detectar radiactividad asociada a los fosfolípidos, fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina, indica que en hepatocitos de rata la descarboxilación mitocondrial de fosfatidiletanolamina, así como la metilación posterior de fosfatidiletanolamina en retículo endoplasmático, se lleva a cabo de modo eficiente. En cuanto al fosfatidilinositol, fosfolípido que se sintetiza por una ruta diferente, como cabría esperar no aparece marcado radiactivamente.

De nuevo, la incubación de hepatocitos con etanol produce un marcado incremento en la incorporación de radiactividad a fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina y fosfatidilserina, aunque en este último fosfolípido el aumento observado no llegó a ser significativo.

Puesto que es posible que la radiactividad incorporada a estos fosfolípidos se deba al marcaje radiactivo de las bases polares y de sus ácidos grasos constituyentes, se llevó a cabo en este experimento simultáneamente la determinación de la radiactividad existente en la porción polar y en la porción hidrofóbica de estos fosfolípidos. Nuestros resultados indican que un porcentaje mayoritario de la radiactividad aparece asociada a las bases nitrogenadas de la fracción de fosfolípidos (más de un 99%) (Tabla X). Por tanto, podemos considerar que la incorporación de serina marcada procede de modo fundamental de la reacción de intercambio de bases de fosfolípidos preexistentes, y no es debida a reacciones de reutilización de ácidos grasos marcados producidos de la degradación de la serina radiactiva.

TABLA X

EFFECTO DEL ETANOL *IN VITRO* SOBRE LA DISTRIBUCION DE RADIATIVIDAD TRAS LA INCUBACION CON L-[3-<sup>3</sup>H] SERINA EN HEPATOCITOS AISLADOS DE HIGADO DE RATA

	<u>Con. etanol</u>	<u>Fase acuosa</u>	<u>Fase orgánica</u>
Lípidos totales	0 mM	92	8
	100 mM	81	19
Fosfolípidos	0 mM	99	1
	100 mM	94	6

Los resultados son media de cuatro determinaciones, expresados como porcentaje de radiactividad incorporada a cada fase.

En la Tabla XI aparecen recogidos los resultados obtenidos tras la incubación de los hepatocitos en presencia o ausencia de 4-metilpirazol. Nuestros resultados indican que el incremento en la incorporación de radiactividad a la fracción de fosfolípidos en presencia de etanol, es absolutamente dependiente de su metabolismo hepático, puesto que cuando se utiliza 4-metilpirazol el etanol no ejerce efecto alguno sobre la incorporación de este precursor radiactivo.

TABLA XI

EFFECTO DEL ETANOL *IN VITRO* SOBRE LA INCORPORACION DE L-[<sup>3</sup>H] SERINA A FOSFOLIPIDOS EN HEPATOCITOS AISLADOS DE HIGADO DE RATA. INFLUENCIA DEL 4-METILPIRAZOL

	<u>[Etanol]</u>	<u>Sin 4-metilpirazol</u>	<u>Con 4-metilpirazol</u>
<u>FOSFOLIPIDOS</u>			
Fosfatidilcolina	0mM	0,42 ± 0,03	0,39 ± 0,03
	100mM	0,78 ± 0,08 <sup>c</sup>	0,35 ± 0,03
Fosfatidilserina	0mM	1,90 ± 0,21	2,01 ± 0,15
	100mM	2,36 ± 0,22	2,06 ± 0,11
Fosfatidiletanolamina	0mM	0,49 ± 0,05	0,38 ± 0,03
	100mM	0,72 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,38 ± 0,03

<sup>a</sup>p≤0,0200; <sup>b</sup>p≤0,0050; <sup>c</sup>p≤0,0010.

p=niveles de significación de la t de Student de los hepatocitos incubados con etanol respecto a sus controles. Los resultados son media de nueve determinaciones ± S.E.M. expresados como pmoles incorporados de serina por minuto y millón de células.

### I.2.3.2. Incorporación de $[1-^3\text{H}]$ etanolamina

La síntesis de fosfatidiletanolamina, uno de los principales fosfolípidos de las células eucariotas, se produce por dos rutas diferentes: la ruta de Kennedy a través del intermediario CDP-etanolamina y la descarboxilación mitocondrial de fosfatidilserina. Cuando incubamos con etanolamina marcada isotópicamente, es exclusivamente la vía CDP-etanolamina la que se determina experimentalmente. Esta ruta utiliza diacilglicerol y CDP-etanolamina como precursores de la fosfatidiletanolamina. El intermediario CDP-etanolamina es sintetizado a partir de la etanolamina y CTP por la acción sucesiva de la etanolamina quinasa y de la etanolamina-fosfato citidililtransferasa.

Además y como ya se ha comentado anteriormente en el capítulo de Introducción, la fosfatidilcolina puede ser sintetizada a partir de la fosfatidiletanolamina tras sucesivas etapas de metilación. Los intermediarios metabólicos de esta vía son fosfatidil-N-monometiletanolamina y fosfatidil-NN-dimetiletanolamina, que han sido aislados cromatográficamente y cuantificada su radiactividad asociada.

En la Tabla XII aparecen recogidos los datos representativos de la biosíntesis de fosfatidiletanolamina, así como de los intermediarios metabólicos de esta ruta, al utilizar como precursor etanolamina marcada. Se aprecia que, en hepatocitos controles, la formación de CDP-etanolamina es inferior a la de fosfoetanolamina, como cabía esperar dado el carácter limitante de la reacción catalizada por la etanolamina-fosfato citidililtransferasa, aunque los niveles superiores de radiactividad aparecen asociados al producto final de la ruta, fosfatidiletanolamina.

Es interesante destacar que, en presencia de etanol se produce una disminución significativa en la radiactividad asociada a los intermediarios metabólicos, fosfoetanolamina y CDP-etanolamina. Por el contrario, el producto final, fosfatidiletanolamina, presenta niveles de radiactividad superiores a los de los hepatocitos

controles.

**TABLA XII**

EFFECTO DEL ETANOL *IN VITRO* SOBRE LA INCORPORACION DE [1-<sup>3</sup>H] ETANOLAMINA A LOS INTERMEDIARIOS DE LA RUTA DE KENNEDY EN HEPATOCITOS AISLADOS DE HIGADO DE RATA

	Concentración etanol (mM)	
	0	100
Fosfoetanolamina	7,33 ± 0,36	5,14 ± 0,59 <sup>b</sup>
CDP-etanolamina	2,29 ± 0,23	1,55 ± 0,18 <sup>a</sup>
Fosfatidiletanolamina	51,40 ± 1,46	57,89 ± 1,07 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>p≤0,0350; <sup>b</sup>p≤0,0100; <sup>c</sup>p≤0,0050.

p=niveles de significación de la t de Student de los hepatocitos incubados con etanol respecto a los controles. Los resultados son media de seis determinaciones ± S.E.M., expresados como pmoles incorporados de etanolamina por minuto y millón de células.

TABLA XIII

EFFECTO DEL ETANOL *IN VITRO* SOBRE LA INCORPORACION DE [1-<sup>3</sup>H] ETANOLAMINA A LOS INTERMEDIARIOS DE LA RUTA DE KENNEDY EN HEPATOCITOS AISLADOS DE HIGADO DE RATA. INFLUENCIA DEL 4-METILPIRAZOL

	[Etanol]	Sin 4-metilpirazol	Con 4-metilpirazol
Fosfoetanolamina	0 mM	7,33 ± 0,36	7,29 ± 0,18
	100 mM	5,14 ± 0,59 <sup>b</sup>	4,99 ± 0,25 <sup>d</sup>
CDP-etanolamina	0 mM	2,29 ± 0,23	3,29 ± 0,16
	100 mM	1,55 ± 0,18 <sup>a</sup>	3,74 ± 0,35
Fosfatidiletanolamina	0 mM	51,40 ± 1,46	47,86 ± 0,75
	100 mM	57,89 ± 1,07 <sup>c</sup>	38,39 ± 1,05 <sup>d</sup>

<sup>a</sup>p ≤ 0,0350; <sup>b</sup>p ≤ 0,0100; <sup>c</sup>p ≤ 0,0050; <sup>d</sup>p ≤ 0,0001.

p = niveles de significación de la t de Student de los hepatocitos incubados con etanol respecto a sus controles. Los resultados son media de seis determinaciones ± S.E.M. expresados como pmoles incorporados de etanolamina por minuto y millón de células.

En presencia de 4-metilpirazol (Tabla XIII) se mantiene la reducción, producida por el etanol, de radiactividad asociada a fosfoetanolamina, mientras que se restauran valores análogos a los controles en la radiactividad del intermediario, CDP-etanolamina. Además, sorprendentemente, en presencia de etanol y en condiciones en que se halla impedido su metabolismo debido a la inhibición de la alcohol deshidrogenasa por la presencia de 4-metilpirazol, los valores de la fosfatidiletanolamina sintetizada *de novo*

son marcadamente inferiores a los mostrados por sus respectivos controles, lo que podría indicar una inhibición específica de la etanolamina fosfotransferasa por acción directa del etanol.

Puesto que en hígado parte de la fosfatidilcolina es sintetizada mediante metilación de la fosfatidiletanolamina, se han determinado los intermediarios de dicha ruta biosintética, fosfatidil-N-monometiletanolamina y fosfatidil-NN-dimetiletanolamina, así como fosfatidilcolina, y los resultados obtenidos aparecen recogidos en la Tabla XIV. Según se observa, la fosfatidiletanolamina es metilada eficientemente produciendo los N-metil y NN-dimetil derivados que, en último término, se transforman en fosfatidilcolina. En presencia de etanol, la mayor síntesis de fosfatidiletanolamina observada, no se acompaña por un incremento similar en la producción de metilderivados o fosfatidilcolina, sino que, por el contrario, se observa un claro descenso en la radiactividad asociada a estos fosfolípidos, probablemente como consecuencia de la inhibición específica de las metiltransferasas que participan en la ruta biosintética.

El hecho de que en presencia de 4-metilpirazol, el etanol siga produciendo disminución en la incorporación de radiactividad a los distintos intermediarios metilados, así como a fosfatidilcolina (Tabla XV), demuestra que la inhibición ejercida por el alcohol sobre la biosíntesis de fosfatidilcolina a partir de fosfatidiletanolamina es independiente de su metabolismo hepático, es decir, se puede atribuir a un efecto específico del etanol sobre el proceso de metilación.

TABLA XIV

EFFECTO DEL ETANOL *IN VITRO* SOBRE LA INCORPORACION DE [1-<sup>3</sup>H] ETANOLAMINA A FOSFOLIPIDOS EN HEPATOCITOS AISLADOS DE HIGADO DE RATA

	Concentración etanol (mM)	
	0	100
<b>FOSFOLIPIDOS</b>		
Fosfatidilcolina	1,71 ± 0,07	1,33 ± 0,06 <sup>b</sup>
Fosfatidil-NN-dimetiletanolamina	0,27 ± 0,01	0,26 ± 0,03
Fosfatidil-N-monometiletanolamina	6,46 ± 0,54	4,33 ± 0,47 <sup>a</sup>
Fosfatidiletanolamina	51,40 ± 1,46	57,89 ± 1,07 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>p≤0,0150; <sup>b</sup>p≤0,0050.

p=niveles de significación de la t de Student de los hepatocitos incubados con etanol respecto a los controles. Los resultados son media de seis determinaciones ± S.E.M., expresados como pmoles incorporados de etanolamina por minuto y millón de células.

TABLA XV

EFFECTO DEL ETANOL *IN VITRO* SOBRE LA INCORPORACION DE [1-<sup>3</sup>H] ETANOLAMINA A FOSFOLIPIDOS EN HEPATOCITOS AISLADOS DE HIGADO DE RATA. INFLUENCIA DEL 4-METILPIRAZOL

	<u>[Etanol]</u>	<u>Sin 4-metilpirazol</u>	<u>Con 4-metilpirazol</u>
<u>FOSFOLIPIDOS</u>			
Fosfatidilcolina	0 mM	1,71 ± 0,07	1,61 ± 0,02
	100 mM	1,33 ± 0,06 <sup>c</sup>	0,71 ± 0,04 <sup>d</sup>
Fosfatidil-NN-dimetiletanolamina	0 mM	0,27 ± 0,01	0,27 ± 0,03
	100 mM	0,26 ± 0,03	0,17 ± 0,02 <sup>a</sup>
Fosfatidil-N-monometiletanolamina	0 mM	6,46 ± 0,54	7,04 ± 0,66
	100 mM	4,33 ± 0,47 <sup>b</sup>	6,07 ± 0,46
Fosfatidiletanolamina	0 mM	51,40 ± 1,46	47,86 ± 0,75
	100 mM	57,89 ± 1,07 <sup>c</sup>	38,39 ± 1,41 <sup>d</sup>

<sup>a</sup>p≤0,0200; <sup>b</sup>p≤0,0150; <sup>c</sup>p≤0,0050; <sup>d</sup>p≤0,0001.

p=niveles de significación de la t de Student de los hepatocitos incubados con etanol respecto a sus controles. Los resultados son media de seis determinaciones ± S.E.M. expresados como pmoles incorporados de etanolamina por minuto y millón de células.

### I.2.3.3. Incorporación de [metil-<sup>14</sup>C] colina

La fosfatidilcolina, fosfolípido mayoritario, es sintetizado principalmente por la ruta de Kennedy a través de la síntesis de CDP-colina y por metilación progresiva de la fosfatidiletanolamina. Cuando incubamos con colina marcada es exclusivamente la ruta CDP-colina la que se determina experimentalmente. Esta vía utiliza CDP-colina y diacilglicérido como precursores, de manera que la síntesis de fosfatidilcolina se lleva a cabo de manera similar a como se produce la síntesis de fosfatidiletanolamina. En este caso las enzimas que participan en la ruta son colina quinasa y colina-fosfato citidililtransferasa, que generan los intermediarios correspondientes, fosfocolina y CDP-colina.

En la Tabla XVI se analiza el efecto del etanol sobre la incorporación de colina a los distintos intermediarios metabólicos y al producto final de la ruta de biosíntesis de fosfatidilcolina. Se observa que los niveles de CDP-colina son netamente inferiores a los de fosfocolina y fosfatidilcolina, lo que indica la baja velocidad de la reacción catalizada por la colina-fosfato citidililtransferasa. En presencia de etanol, se produce una clara disminución en la incorporación de radiactividad a fosfocolina y CDP-colina. Igualmente, bajo estas condiciones, disminuyen los niveles de fosfatidilcolina marcada, aunque en este caso la diferencia no resultó ser significativa. Por el contrario, la formación de betaína, producto de la oxidación de colina, no es modificada de modo significativo tras la incubación de los hepatocitos en presencia del etanol.

Los resultados obtenidos tras la incorporación de colina a fosfatidilcolina y a los intermediarios de la ruta, en presencia de 4-metilpirazol y/o etanol 100 mM, se expresan en la Tabla XVII. Podemos observar que, en presencia del inhibidor de la alcohol deshidrogenasa, el etanol produce un notable descenso en la incorporación a fosfatidilcolina. En estas condiciones, el efecto producido por el etanol sobre la formación de los diferentes intermediarios de la ruta prácticamente desaparece, excepto un aumento

significativo observado en la degradación de colina a betaína.

**TABLA XVI**

EFFECTO DEL ETANOL *IN VITRO* SOBRE LA INCORPORACION DE [METIL-<sup>14</sup>C] COLINA A LOS INTERMEDIARIOS DE LA RUTA DE KENNEDY EN HEPATOCITOS AISLADOS DE HIGADO DE RATA

	Concentración etanol (mM)	
	0	100
Betaína	17,73 ± 0,35	19,46 ± 1,11
Fosfocolina	43,61 ± 1,08	37,47 ± 1,96 <sup>b</sup>
CDP-colina	1,42 ± 0,07	1,21 ± 0,04 <sup>a</sup>
Fosfatidilcolina	69,53 ± 1,15	63,19 ± 3,18

<sup>a</sup>p ≤ 0,0350; <sup>b</sup>p ≤ 0,0250.

p=niveles de significación de la t de Student de los hepatocitos incubados con etanol respecto a los controles. Los resultados son media de seis determinaciones ± S.E.M., expresados como pmoles incorporados de colina por minuto y millón de células.

TABLA XVII

EFFECTO DEL ETANOL *IN VITRO* SOBRE LA INCORPORACION DE [METIL-<sup>14</sup>C] COLINA A LOS INTERMEDIARIOS DE LA RUTA DE KENNEDY EN HEPATOCITOS AISLADOS DE HIGADO DE RATA. INFLUENCIA DEL 4-METILPIRAZOL

	[Etanol]	Sin 4-metilpirazol	Con 4-metilpirazol
Betaína	0 mM	17,73 ± 0,35	18,28 ± 0,99
	100 mM	19,46 ± 1,11	25,78 ± 1,54 <sup>d</sup>
Fosfocolina	0 mM	43,61 ± 1,08	46,83 ± 2,39
	100 mM	37,47 ± 1,96 <sup>b</sup>	43,59 ± 0,25
CDP-colina	0 mM	1,42 ± 0,07	1,91 ± 0,06
	100 mM	1,21 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,96 ± 0,07
Fosfatidilcolina	0 mM	69,53 ± 1,15	52,62 ± 2,14
	100 mM	63,19 ± 3,18	36,51 ± 2,30 <sup>e</sup>

<sup>a</sup>p≤0,0350; <sup>b</sup>p≤0,0250; <sup>c</sup>p≤0,0150; <sup>d</sup>p≤0,0050; <sup>e</sup>p≤0,0010.

p=niveles de significación de la t de Student de los hepatocitos incubados con etanol respecto a sus controles. Los resultados son media de seis determinaciones ± S.E.M. expresados como pmoles de colina incorporados por minuto y millón de células.

Muy recientemente se ha indicado que el etanol *in vitro* actúa disminuyendo los niveles de fosfatidilcolina intracelular a través de una activación en las fosfolipasas A y C específicas para fosfatidilcolina y favoreciendo, por tanto, la degradación de la fosfatidilcolina preexistente.

Con objeto de comprobar si la disminución observada en la radiactividad asociada a fosfatidilcolina por efecto del etanol podría ser debida a una activación en la degradación del fosfolípido y no a un descenso en su biosíntesis, se llevó a cabo un análisis de la acción del etanol sobre los niveles de fosfatidilcolina endógena. Para ello, una vez marcada radiactivamente la fosfatidilcolina del hepatocito, se eliminó la [metil- $^{14}\text{C}$ ] colina del medio mediante lavados y se incubaron las células con etanol 100 mM en presencia de 4-metilpirazol, durante períodos de 0, 30, 60 y 120 minutos, analizándose en cada caso la radiactividad perteneciente a la colina liberada al medio, colina intracelular y fosfatidilcolina del hepatocito.

Los resultados obtenidos indican que la cantidad de colina liberada al medio aumenta de un modo lineal con el tiempo de incubación, aunque el etanol no ejerce ningún efecto sobre este proceso (Figura 1A). Por otra parte, a lo largo del mismo período se observa un descenso en los niveles de colina intracelular, que es similar en hepatocitos controles e incubados con etanol (Figura 1B). Es interesante indicar que los niveles de fosfatidilcolina endógena no varían en ningún caso a lo largo del tiempo, como se puede apreciar en la Figura 1C. Estos resultados, por lo tanto, nos permiten descartar cualquier efecto del etanol sobre la degradación de la fosfatidilcolina endógena, y sugieren un efecto específico del alcohol sobre el proceso de biosíntesis de fosfatidilcolina a través de la ruta de Kennedy.

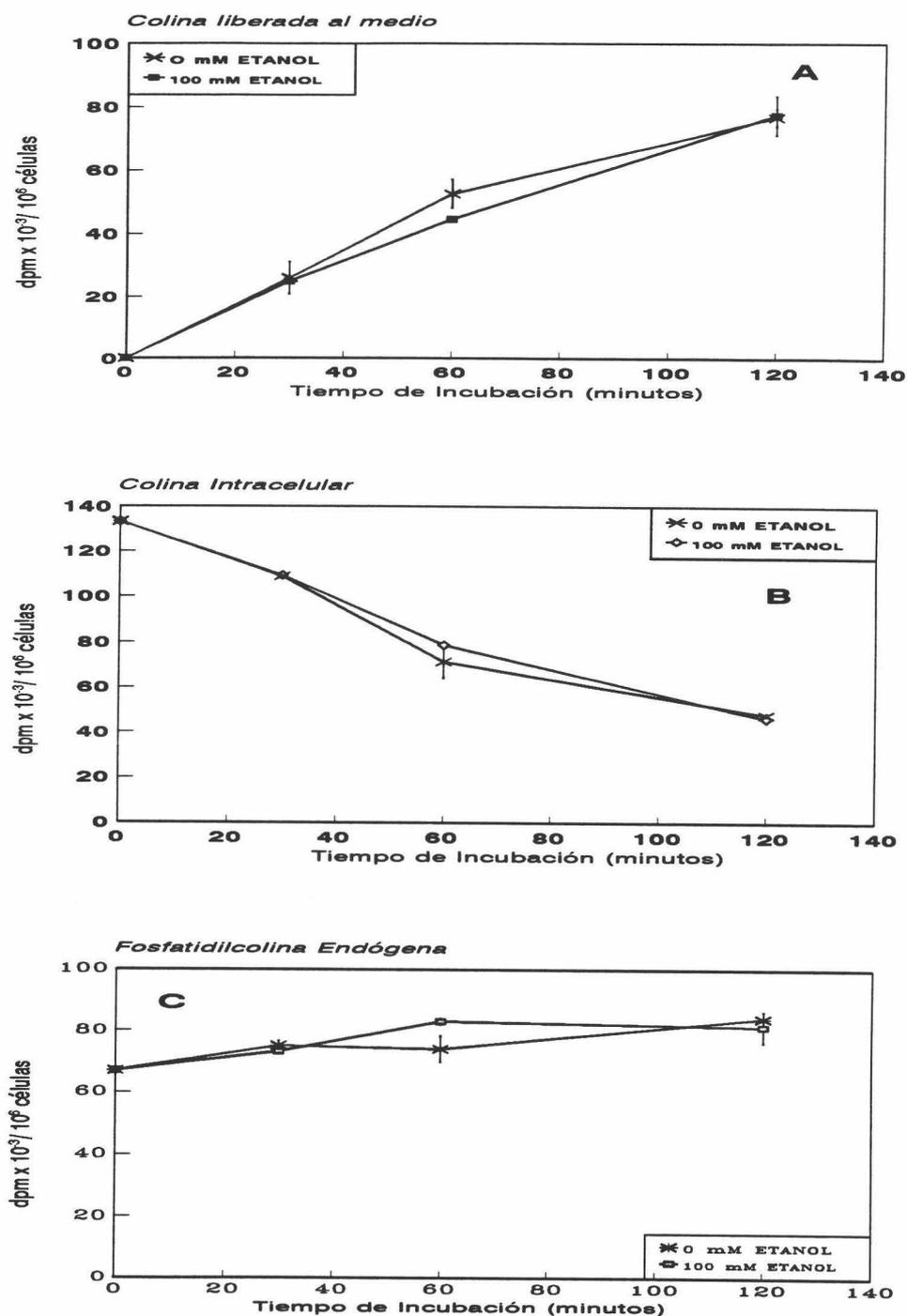


FIGURA 1.- Efecto del etanol *in vitro* sobre los niveles de colina liberada al medio (A), colina intracelular (B) o fosfatidilcolina endógena (C). Los resultados son media de dos determinaciones  $\pm$  S.E.M., expresados como dpm x 10<sup>-3</sup>/10<sup>6</sup> células.

## II. INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO CRONICO CON ETANOL SOBRE EL METABOLISMO LIPIDICO EN HEPATOCITOS

En el presente trabajo, destinado a elucidar los efectos producidos por el tratamiento prolongado de etanol sobre las principales rutas del metabolismo lipídico, hemos utilizado hepatocitos aislados de ratas macho Wistar, las cuales recibieron un tratamiento prolongado de alcohol durante 31 días. El etanol fue administrado como dieta líquida (dieta de Miller), proporcionando el 36% de las calorías totales de la misma. Simultáneamente, se utilizaron ratas controles que recibieron una dieta similar, excepto que el etanol fue reemplazado por dextrimaltosa a concentración adecuada para que la dieta resultase isocalórica. Es importante destacar el alto contenido en lípidos (11,3%) de las dietas control y etanólica que se administraron a las ratas de forma continuada.

Tras finalizar el período de tratamiento, se llevó a cabo el aislamiento de hepatocitos de ratas controles y tratadas crónicamente con etanol, y únicamente se utilizaron las suspensiones de células que presentaron una viabilidad superior al 90%. Los hepatocitos fueron incubados con diferentes sustratos metabólicos marcados radiactivamente con  $^3\text{H}$  o  $^{14}\text{C}$ , según el protocolo especificado en Material y Métodos. Posteriormente, se procedió a la identificación y cuantificación de los lípidos correspondientes a los que cada sustrato en particular es incorporado.

Se ha abordado el estudio del efecto que produce el tratamiento prolongado

con etanol sobre la regulación global de diferentes rutas biosintéticas.

Igualmente, bajo estas condiciones se ha analizado la composición lipídica del hepatocito y como se ve afectada por el tratamiento con etanol.

## II.1. COMPOSICION LIPIDICA

En primer lugar se ha llevado a cabo el estudio de los cambios inducidos por el tratamiento crónico con etanol sobre los niveles de colesterol, triacilglicéridos y fosfolípidos individuales.

### II.1.1. Niveles de colesterol y triacilglicéridos

Los resultados obtenidos acerca del efecto de la administración de etanol durante 31 días sobre los niveles de colesterol total, libre y esterificado, y triacilglicéridos, se muestran en la Tabla XVIII. Los resultados se expresan como  $\mu\text{g}$  de colesterol o triacilglicéridos por minuto y millón de células.

Se observa que el tratamiento crónico con etanol lleva consigo una disminución significativa en los niveles de colesterol total, debida fundamentalmente a un menor contenido en colesterol libre. Se puede apreciar además, que dicho tratamiento produce un notable aumento en los valores de triacilglicéridos, que prácticamente se duplican en hepatocitos de animales que ingieren etanol durante un período prolongado de tiempo.

Hemos de señalar que se detectan algunas diferencias en los niveles de

ciertos componentes lipídicos entre hepatocitos aislados de ratas que recibieron distintas dietas control, dieta estándar utilizada en todos los experimentos previos o dieta de Miller utilizada en tratamientos prolongados con etanol. Esto puede ser debido fundamentalmente a la distinta composición lipídica de ambas dietas. Así, se observa un menor contenido en colesterol esterificado en las células de ratas que recibieron la dieta control de Miller, respecto a las que recibieron la estándar. Sin embargo, los niveles de triacilglicéridos en hepatocitos de ratas que recibieron dieta de Miller son netamente superiores a los de animales que recibieron una dieta estándar, probablemente debido al menor contenido lipídico de esta dieta (Tablas I y XVIII).

**TABLA XVIII**

**EFFECTO DE LA ADMINISTRACION CRONICA DE ETANOL SOBRE LOS NIVELES DE COLESTEROL Y TRIACILGLICERIDOS EN HEPATOCITOS AISLADOS DE HIGADO DE RATA**

	<u>Controles</u>	<u>Tratadas</u>
Colesterol total	10,50 ± 0,51	7,75 ± 0,67 <sup>b</sup>
Colesterol libre	9,66 ± 0,48	7,14 ± 0,63 <sup>b</sup>
Colesterol esterificado	0,84 ± 0,17	0,60 ± 0,23
Triacilglicéridos	97,96 ± 10,94	176,59 ± 31,83 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>p ≤ 0,0300; <sup>b</sup>p ≤ 0,0050.

p=niveles de significación de la t de Student respecto a los controles. Los resultados son media de doce determinaciones ± S.E.M., expresados como µg de colesterol o triacilglicéridos por millón de células.

### II.1.2. Niveles de fosfolípidos

En la Tabla XIX se muestran los resultados obtenidos tras el análisis cuantitativo de los distintos fosfolípidos en hepatocitos aislados de animales controles y tratados. Los valores se expresan como  $\mu\text{g}$  de fósforo lipídico por millón de células.

En la citada tabla se aprecia que, en células procedentes de ratas tratadas, los niveles de fosfatidilcolina se encuentran significativamente disminuidos, respecto a los controles, mientras que los niveles de los restantes fosfolípidos analizados no se modifican de un modo apreciable por efecto del tratamiento crónico con etanol.

Por otra parte, si comparamos las Tablas II y XIX, se puede observar que los niveles de cada uno de los fosfolípidos individuales en hepatocitos de animales que fueron alimentados con una dieta con un alto contenido en lípidos, fueron claramente inferiores a los existentes en hepatocitos de animales a los que se administró una dieta estándar.

TABLA XIX

EFFECTO DE LA ADMINISTRACION CRONICA DE ETANOL SOBRE LOS NIVELES DE FOSFOLIPIDOS EN HEPATOCITOS AISLADOS DE HIGADO DE RATA

	Controles	Tratados
Fosfatidilcolina	3,05 ± 0,13	2,40 ± 0,16 <sup>a</sup>
Fosfatidilserina	0,84 ± 0,07	0,76 ± 0,09
Fosfatidilinositol	1,05 ± 0,07	0,99 ± 0,11
Fosfatidiletanolamina	2,14 ± 0,16	1,78 ± 0,17

<sup>a</sup>p≤0,0150.

p=niveles de significación de la t de Student respecto a los controles. Los resultados son media de seis determinaciones ± S.E.M., expresados como µg de fósforo lipídico por millón de células.

## II.2. INCORPORACION DE PRECURSORES METABOLICOS A LOS DIFERENTES COMPONENTES LIPIDICOS

En este apartado hemos analizado el efecto del tratamiento crónico con etanol sobre la incorporación de distintos sustratos lipogénicos, marcados radiactivamente, a los diferentes componentes lipídicos. Los resultados se expresan, en todos los casos, como pmoles incorporados de sustrato por minuto y millón de células.

Es importante indicar que en los estudios de incorporación realizados hemos comprobado la existencia, en la mayoría de los casos, de notables diferencias en los valores de incorporación de los precursores marcados isotópicamente a las distintas moléculas lipídicas entre células de animales que recibieron los dos tipos de dietas controles (dieta de Miller o dieta estándar). Esta diferencia es debida a la distinta composición lipídica de ambas dietas, y por tanto a diferencias en el estado metabólico del hepatocito. Puesto que nuestro estudio no consiste en analizar las diferencias en los niveles de incorporación de distintos sustratos en respuesta a las distintas composiciones dietarias, no se comentarán tales diferencias.

### II.2.1. Incorporación de $[1(3)^3\text{H}]$ glicerol

Se ha estudiado la influencia de la suplementación prolongada de etanol sobre la incorporación de glicerol marcado a lípidos neutros y fosfolípidos. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla XX.

En células aisladas de animales controles incubadas con glicerol, de los valores de radiactividad asociada a la fracción de lípidos neutros se observa de nuevo que

las fracciones de diacilglicéridos y triacilglicéridos incorporan glicerol mayoritariamente, pero no la fracción de monoacilglicéridos. Se produce por efecto del tratamiento un notable incremento en la incorporación a diacilglicéridos y triacilglicéridos, siendo especialmente marcado en este último compuesto. De este modo, observamos como la incorporación a triacilglicéridos experimenta en hepatocitos de animales tratados un incremento tal que se alcanzan valores 16 veces superiores a los existentes en células de animales controles.

Los resultados obtenidos tras la medida de la radiactividad asociada a los distintos fosfolípidos tras la incubación con glicerol, aparecen recogidos en la Tabla XX. En células controles, de nuevo se observa que la incorporación a fosfatidilcolina, fosfolípido mayoritario, es superior a la encontrada en fosfatidilinositol y fosfatidiletanolamina. Por otra parte, es de destacar que no se observa tampoco incorporación de radiactividad a fosfatidilserina.

Como consecuencia del tratamiento prolongado con etanol aumenta de modo marcado la incorporación a fosfatidilcolina y fosfatidilinositol, aunque no se observa efecto alguno sobre la incorporación a fosfatidiletanolamina. Por otra parte, tampoco en presencia de etanol se aprecia radiactividad asociada a la fracción de fosfatidilserina.

TABLA XX

EFFECTO DE LA ADMINISTRACION CRONICA DE ETANOL SOBRE LA INCORPORACION DE [1(3)<sup>3</sup>H] GLICEROL A LIPIDOS NEUTROS Y FOSFOLIPIDOS EN HEPATOCITOS AISLADOS DE HIGADO DE RATA

	Controles	Tratados
<b><u>LIPIDOS NEUTROS</u></b>		
Monoacilglicéridos	n.d	n.d
Diacilglicéridos	0,21 ± 0,02	1,50 ± 0,05 <sup>b</sup>
Triacilglicéridos	0,96 ± 0,02	15,99 ± 0,45 <sup>b</sup>
<b><u>FOSFOLIPIDOS</u></b>		
Fosfatidilcolina	1,788 ± 0,044	2,875 ± 0,011 <sup>b</sup>
Fosfatidilserina	n.d	n.d
Fosfatidilinositol	0,088 ± 0,009	0,151 ± 0,003 <sup>a</sup>
Fosfatidiletanolamina	1,127 ± 0,038	1,096 ± 0,009

<sup>a</sup>p ≤ 0,0050; <sup>b</sup>p ≤ 0,0001.

p=niveles de significación de la t de Student respecto a los controles. Los resultados son media de tres determinaciones ± S.E.M., expresados como pmoles incorporados de glicerol por minuto y millón de células.

### II.2.2. Incorporación de $^3\text{H}$ oleato

Con objeto de determinar la influencia del etanol sobre el remodelado de distintos componentes lipídicos en el hepatocito, se ha estudiado la influencia del tratamiento prolongado de etanol sobre la incorporación de oleato marcado isotópicamente a lípidos neutros y fosfolípidos.

Como se puede apreciar en la Tabla XXI, de nuevo comprobamos que, en células controles el ácido graso marcado se incorpora a distintos lípidos neutros (excepto a monoacilglicéridos), aunque preferentemente lo hace a triacilglicéridos. Los resultados obtenidos muestran que, por efecto del tratamiento prolongado con etanol, se produce un claro aumento en la incorporación a diacilglicéridos, triacilglicéridos y esteres del colesterol. Sin embargo, en estas mismas condiciones disminuye notablemente la radiactividad asociada a la fracción de ácidos grasos libres.

Se observa que el tratamiento prolongado con etanol claramente aumenta el marcaje de fosfatidilcolina, fosfatidilinositol y fosfatidiletanolamina. Es importante señalar que, aunque es la fosfatidilcolina la que presenta mayor nivel de incorporación, el mayor incremento observado en la incorporación por efecto del tratamiento prolongado con etanol se produce en fosfatidilinositol, quien duplica su incorporación de ácido oleico.

TABLA XXI

EFFECTO DE LA ADMINISTRACION CRONICA DE ETANOL SOBRE LA INCORPORACION DE  $^3\text{H}$ -OLEATO A LIPIDOS NEUTROS Y FOSFOLIPIDOS EN HEPATOCITOS AISLADOS DE HIGADO DE RATA

	Controles	Tratados
<u>LIPIDOS NEUTROS</u>		
Monoacilglicéridos	n.d.	n.d.
Diacilglicéridos	1,04 ± 0,08	1,74 ± 0,11 <sup>a</sup>
Acido oleico	2,13 ± 0,20	0,87 ± 0,05 <sup>b</sup>
Triacilglicéridos	53,77 ± 2,35	77,20 ± 0,89 <sup>c</sup>
Colesterol esterificado	11,62 ± 0,28	19,75 ± 1,44 <sup>a</sup>
TG/DG	51,70 ± 4,62	44,37 ± 2,84
<u>FOSFOLIPIDOS</u>		
Fosfatidilcolina	10,99 ± 0,16	13,08 ± 0,18 <sup>c</sup>
Fosfatidilserina	0,20 ± 0,01	0,22 ± 0,02
Fosfatidilinositol	1,30 ± 0,05	2,71 ± 0,05 <sup>d</sup>
Fosfatidiletanolamina	3,59 ± 0,13	5,16 ± 0,03 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>p ≤ 0,0100; <sup>b</sup>p ≤ 0,0050; <sup>c</sup>p ≤ 0,0010; <sup>d</sup>p ≤ 0,0001.

p=niveles de significación de la t de Student respecto a los controles. Los resultados son media de tres determinaciones ± S.E.M., expresados como pmoles incorporados de oleato por minuto y millón de células.

### II.2.3. Incorporación de bases nitrogenadas

A continuación se muestran los resultados obtenidos tras la incorporación de diferentes bases nitrogenadas, marcadas isotópicamente, a los distintos fosfolípidos, en hepatocitos de animales controles y tratados crónicamente con etanol.

#### II.2.3.1. Incorporación de *L*-[3-<sup>3</sup>H] serina

De nuevo se comprueba que en hepatocitos aislados de rata, la serina se incorpora a fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina. También se observa incorporación de radiactividad a distintos lípidos neutros, lo cual puede ser explicado en base a la degradación de la serina vía desaminación deshidratante y a la posterior utilización de su esqueleto carbonado para síntesis de ácidos grasos.

En la Tabla XXII aparecen recogidos los resultados obtenidos acerca de la influencia del tratamiento prolongado de etanol sobre la incorporación de serina, marcada isotópicamente, a lípidos neutros y fosfolípidos.

En lo que respecta a lípidos neutros, los resultados obtenidos muestran que en células controles solamente un 6% de la radiactividad total se distribuye entre los triacilglicéridos y colesterol esterificado, habiéndose comprobado además la ausencia de radiactividad asociada a la fracciones de monoacilglicéridos y diacilglicéridos.

Se puede observar como el tratamiento prolongado de etanol aumenta notablemente la incorporación a diacilglicéridos, triacilglicéridos y colesterol esterificado. El incremento más importante se observa en diacilglicéridos que no incorporan radiactividad en células controles y muestran un alto nivel de incorporación en las tratadas.

Los datos obtenidos de la incorporación a los distintos fosfolípidos se muestran igualmente en la Tabla XXII. El tratamiento prolongado de etanol produce un claro aumento en el marcaje radiactivo de todos los fosfolípidos analizados, siendo la fosfatidilserina el que presenta un aumento cuantitativamente más importante de incorporación.

**TABLA XXII**

**EFECTO DE LA ADMINISTRACION CRONICA DE ETANOL SOBRE LA INCORPORACION DE L-[3-<sup>3</sup>H] SERINA A LIPIDOS NEUTROS Y FOSFOLIPIDOS EN HEPATOCITOS AISLADOS DE HIGADO DE RATA**

	<u>Controles</u>	<u>Tratados</u>
<b><u>LIPIDOS NEUTROS</u></b>		
Monoacilglicéridos	n.d.	n.d.
Diacilglicéridos	n.d.	0,623 ± 0,082 <sup>d</sup>
Triacilglicéridos	0,119 ± 0,012	0,714 ± 0,056 <sup>c</sup>
Colesterol esterificado	0,054 ± 0,005	1,222 ± 0,129 <sup>c</sup>
<b><u>FOSFOLIPIDOS</u></b>		
Fosfatidilcolina	0,52 ± 0,02	0,79 ± 0,08 <sup>a</sup>
Fosfatidilserina	1,79 ± 0,05	4,45 ± 0,19 <sup>c</sup>
Fosfatidilinositol	n.d.	n.d.
Fosfatidiletanolamina	0,28 ± 0,02	0,48 ± 0,02 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>p≤0,0350; <sup>b</sup>p≤0,0050; <sup>c</sup>p≤0,0010; <sup>d</sup>p≤0,0001.

p=niveles de significación de la t de Student respecto a los controles. Los resultados son media de tres determinaciones ± S.E.M., expresados como pmoles incorporados de serina por minuto y millón de células.

### II.2.3.2. Incorporación de [1-<sup>3</sup>H] etanolamina

Cuando incubamos con etanolamina marcada isotópicamente aparece radiactividad asociada a los distintos intermediarios metabólicos de la ruta de Kennedy y a los intermediarios de la vía que sintetiza fosfatidilcolina mediante sucesivas metilaciones de la fosfatidiletanolamina, determinando la radiactividad correspondiente a cada uno de los intermediarios metabólicos y lipídicos, se obtiene información acerca del efecto del tratamiento prolongado de etanol sobre la ruta de Kennedy que sintetiza fosfatidiletanolamina y sobre la vía de formación de fosfatidilcolina a partir de fosfatidiletanolamina.

Los resultados obtenidos tras la incorporación de etanolamina a los diferentes intermediarios metabólicos de la ruta CDP-etanolamina, se muestran en la Tabla XXIII. Según se observa, la administración prolongada de alcohol produce una disminución en el marcaje de fosfoetanolamina y CDP-etanolamina. Sin embargo, en estas condiciones se observa un marcado aumento en la incorporación a fosfatidiletanolamina.

Por otra parte, en la Tabla XXIV aparecen indicados los valores obtenidos acerca del efecto del tratamiento prolongado de etanol sobre la radiactividad asociada a fosfatidilcolina, y a los N-metilderivados.

Según se observa, en células controles el nivel de incorporación a fosfatidilcolina es mínimo comparado con el fosfatidiletanolamina. Además, por efecto del tratamiento prolongado de etanol, se produce un notable aumento en la incorporación a fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, su sustrato precursor. También la incorporación al intermediario metabólico fosfatidil-NN-dimetiletanolamina es superior en animales tratados.

TABLA XXIII

EFFECTO DE LA ADMINISTRACION CRONICA DE ETANOL SOBRE LA INCORPORACION DE [1-<sup>3</sup>H] ETANOLAMINA A LOS INTERMEDIARIOS DE LA RUTA DE KENNEDY EN HEPATOCITOS AISLADOS DE HIGADO DE RATA

	Controles	Tratados
Fosfoetanolamina	14,15 ± 0,31	3,87 ± 0,29 <sup>b</sup>
CDP-etanolamina	0,91 ± 0,12	0,59 ± 0,01 <sup>a</sup>
Fosfatidiletanolamina	13,91 ± 0,14	41,95 ± 0,95 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>p ≤ 0,0400; <sup>b</sup>p ≤ 0,0001.

p=niveles de significación de la t de Student de respecto a los controles. Los resultados son media de cuatro determinaciones ± S.E.M., expresados como pmoles incorporados de etanolamina por minuto y millón de células.

TABLA XXIV

EFFECTO DE LA ADMINISTRACION PROLONGADA DE ETANOL SOBRE LA INCORPORACION DE [1-<sup>3</sup>H] ETANOLAMINA A FOSFOLIPIDOS EN HEPATOCITOS AISLADOS DE HIGADO DE RATA

	Controles	Tratados
Fosfatidilcolina	0,49 ± 0,04	1,43 ± 0,05 <sup>b</sup>
Fosfatidil-NN-dimetiletanolamina	0,16 ± 0,01	0,40 ± 0,03 <sup>a</sup>
Fosfatidil-N-monometiletanolamina	3,28 ± 0,22	2,70 ± 0,16
Fosfatidiletanolamina	13,91 ± 0,14	41,95 ± 0,95 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>p≤0,0010; <sup>b</sup>p≤0,0001.

p=niveles de significación de la t de Student respecto a los controles. Los resultados son media de cuatro determinaciones ± S.E.M., expresados como pmoles incorporados de etanolamina por minuto y millón de células.

### II.2.3.3. Incorporación de [metil-<sup>14</sup>C] colina

Cuando incubamos con colina ésta se incorpora a fosfatidilcolina a través de la ruta de Kennedy. Por tanto, cuando se incuban los hepatocitos en presencia de metil colina marcada radiactivamente, la radiactividad aparece asociada al fosfolípido fosfatidilcolina, a los intermediarios metabólicos de la ruta CDP-colina y a betaína, el principal producto de la oxidación de colina.

Se ha determinado la influencia del tratamiento prolongado de etanol sobre la incorporación de colina marcada a fosfatidilcolina y a los intermediarios metabólicos de la ruta CDP-colina y los resultados obtenidos aparecen representados en la Tabla XXV.

De los valores relativos de incorporación de radiactividad a los diferentes metabolitos se deduce que, en hepatocitos controles, la desviación de colina a betaína por la ruta oxidativa es cuantitativamente elevada. Además, la baja incorporación al intermediario CDP-colina es consistente con el hecho de que su formación constituye la etapa limitante que determina la velocidad de síntesis de fosfatidilcolina.

En la misma tabla, podemos observar como el tratamiento crónico con etanol produce un considerable descenso en la incorporación de colina marcada a fosfatidilcolina y una marcada disminución en el marcaje de betaína, aunque los niveles de incorporación a fosfocolina y CDP-colina no varían de un modo apreciable.

TABLA XXV

EFFECTO DE LA ADMINISTRACION PROLONGADA DE ETANOL SOBRE LA INCORPORACION DE [METIL-<sup>14</sup>C] COLINA A LOS INTERMEDIARIOS DE LA RUTA DE KENNEDY EN HEPATOCITOS AISLADOS DE HIGADO DE RATA

	Controles	Tratados
Betaína	29,32 ± 3,27	7,62 ± 1,43 <sup>a</sup>
Fosfocolina	37,52 ± 1,07	38,87 ± 0,66
CDP-colina	0,86 ± 0,07	0,72 ± 0,04
Fosfatidilcolina	97,28 ± 2,35	73,49 ± 1,43 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>p≤0,0010; <sup>b</sup>p≤0,0001.

p=niveles de significación de la t de Student respecto a los controles. Los resultados son media de cuatro determinaciones ± S.E.M., expresados como pmoles incorporados de colina por minuto y millón de célula.

### III. EFECTO DE UN TRATAMIENTO DE 7 DIAS CON ETANOL: INCORPORACION DE PRECURSORES METABOLICOS A DIFERENTES COMPONENTES LIPIDICOS Y METABOLICOS

Una vez comprobado, en previos experimentos, que el tratamiento prolongado con alcohol durante 31 días, es responsable de la modificación de diferentes aspectos del metabolismo lipídico en el hepatocito, se ha llevado a cabo el análisis de la incorporación de distintos sustratos metabólicos a los 7 días de tratamiento con etanol. Esta nueva situación experimental fue diseñada con objeto de analizar si un tratamiento con etanol durante un período de tiempo tan corto como 7 días, es capaz de modificar el metabolismo lipídico del hepatocito de modo similar al que se observa en tratamientos más prolongados.

De este modo, se han incubado células aisladas de ratas controles y tratadas con alcohol durante 7 días, con colina y etanolamina marcadas isotópicamente, y se ha determinado la incorporación de estos dos sustratos, en estas condiciones, a diferentes componentes lipídicos y metabólicos. Se han seleccionado estos dos precursores metabólicos para el estudio de las rutas de Kennedy que sintetizan fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina, vía CDP-etanolamina o CDP-colina respectivamente, puesto que el tratamiento crónico con etanol parece ejercer acciones diferenciales a nivel de la biosíntesis *de novo* de estos dos fosfolípidos.

### III.1. Incorporación de [1-<sup>3</sup>H] etanolamina

En la Tabla XXVI se muestra la incorporación de la radiactividad procedente de etanolamina marcada isotópicamente a los distintos intermediarios metabólicos de la ruta de Kennedy, en hepatocitos controles y tratados con alcohol durante 7 días. Los resultados se expresan como pmoles incorporados de etanolamina por minuto y millón de células.

Según se observa en la tabla, a los 7 días de tratamiento se produce un notable aumento en la incorporación de etanolamina a fosfoetanolamina, CDP-etanolamina y fosfatidiletanolamina. Nuestros resultados indican, por tanto, que, ya a los 7 días de administración de etanol se observa un patente incremento en la síntesis de fosfatidiletanolamina.

En la Tabla XXVII se han representado los valores de incorporación a los fosfolípidos, en células controles y tratadas con alcohol durante 7 días, cuando se utiliza etanolamina marcada isotópicamente como sustrato lipogénico.

Se aprecia que la administración de etanol durante 7 días produce un marcado incremento en la incorporación de radiactividad a fosfatidiletanolamina, metilderivados y fosfatidilcolina. Por lo tanto, a los 7 días de tratamiento se observa ya una activación en la biosíntesis de fosfatidilcolina a partir de fosfatidiletanolamina.

TABLA XXVI

EFFECTO DE LA ADMINISTRACION DE ETANOL DURANTE 7 DIAS SOBRE LA INCORPORACION DE [1-<sup>3</sup>H] ETANOLAMINA A LOS INTERMEDIARIOS DE LA RUTA DE KENNEDY EN HEPATOCITOS AISLADOS DE HIGADO DE RATA

	Controles	Tratados
Fosfoetanolamina	6,10 ± 0,21	9,98 ± 0,68 <sup>a</sup>
CDP-etanolamina	0,91 ± 0,06	1,26 ± 0,17
Fosfatidiletanolamina	24,79 ± 1,19	50,01 ± 0,90 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>p ≤ 0,0050; <sup>b</sup>p ≤ 0,0001.

p=niveles de significación de la t de Student de respecto a los controles. Los resultados son media de cuatro determinaciones ± S.E.M., expresados como pmoles incorporados de etanolamina por minuto y millón de células.

TABLA XXVII

EFFECTO DE LA ADMINISTRACION DE ETANOL DURANTE 7 DIAS SOBRE LA INCORPORACION DE [1-<sup>3</sup>H] ETANOLAMINA A FOSFOLIPIDOS EN HEPATOCITOS AISLADOS DE HIGADO DE RATA

	Controles	Tratados
Fosfatidilcolina	0,66 ± 0,03	1,39 ± 0,05 <sup>d</sup>
Fosfatidil-NN-dimetiletanolamina	0,14 ± 0,01	0,25 ± 0,02 <sup>b</sup>
Fosfatidil-N-monometiletanolamina	0,98 ± 0,14	2,16 ± 0,37 <sup>a</sup>
Fosfatidiletanolamina	24,79 ± 1,19	50,01 ± 0,90 <sup>d</sup>

<sup>a</sup>p ≤ 0,0250; <sup>b</sup>p ≤ 0,0100; <sup>c</sup>p ≤ 0,0010; <sup>d</sup>p ≤ 0,0001.

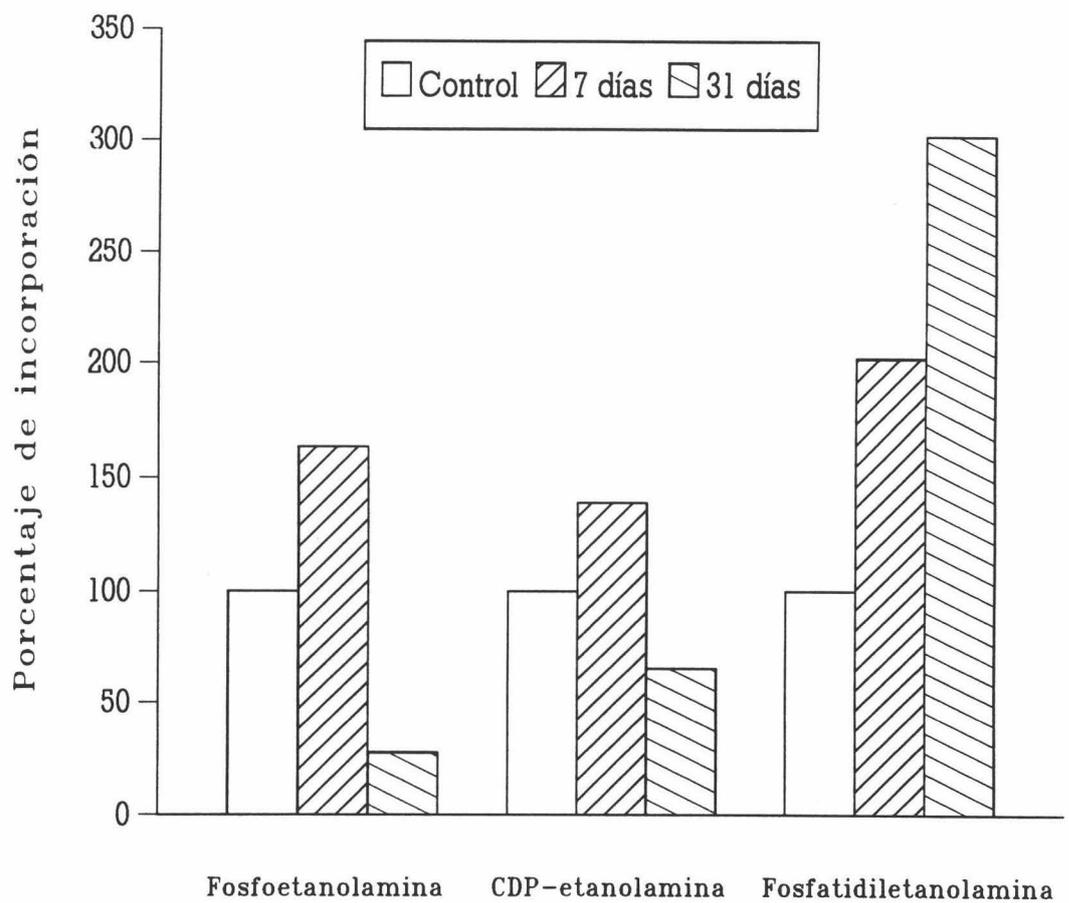
p=niveles de significación de la t de Student respecto a los controles. Los resultados son media de cuatro determinaciones ± S.E.M., expresados como pmoles incorporados de etanolamina por minuto y millón de células.

Con el objeto de realizar un estudio comparativo de los efectos producidos por el etanol tras su administración durante 7 ó 31 días, sobre la incorporación de etanolamina a los diferentes metabolitos, se han representado en las Figuras 2 y 3 los valores de incorporación de etanolamina a los distintos componentes tras los períodos de tratamiento indicados, expresados como porcentajes de incorporación respecto a los controles, considerados éstos como el valor 100.

Según se observa en la Figura 2, el incremento de radiactividad asociada a fosfoetanolamina y CDP-etanolamina obtenido tras 7 días de tratamiento, contrastan con el marcado descenso en los niveles de estos intermediarios metabólicos cuando se prolonga el tratamiento durante 31 días. Es interesante, además, que tanto a los 7 como a los 31 días, se aprecia un marcado incremento en la síntesis de fosfatidiletanolamina, más patente tras los 31 días de tratamiento.

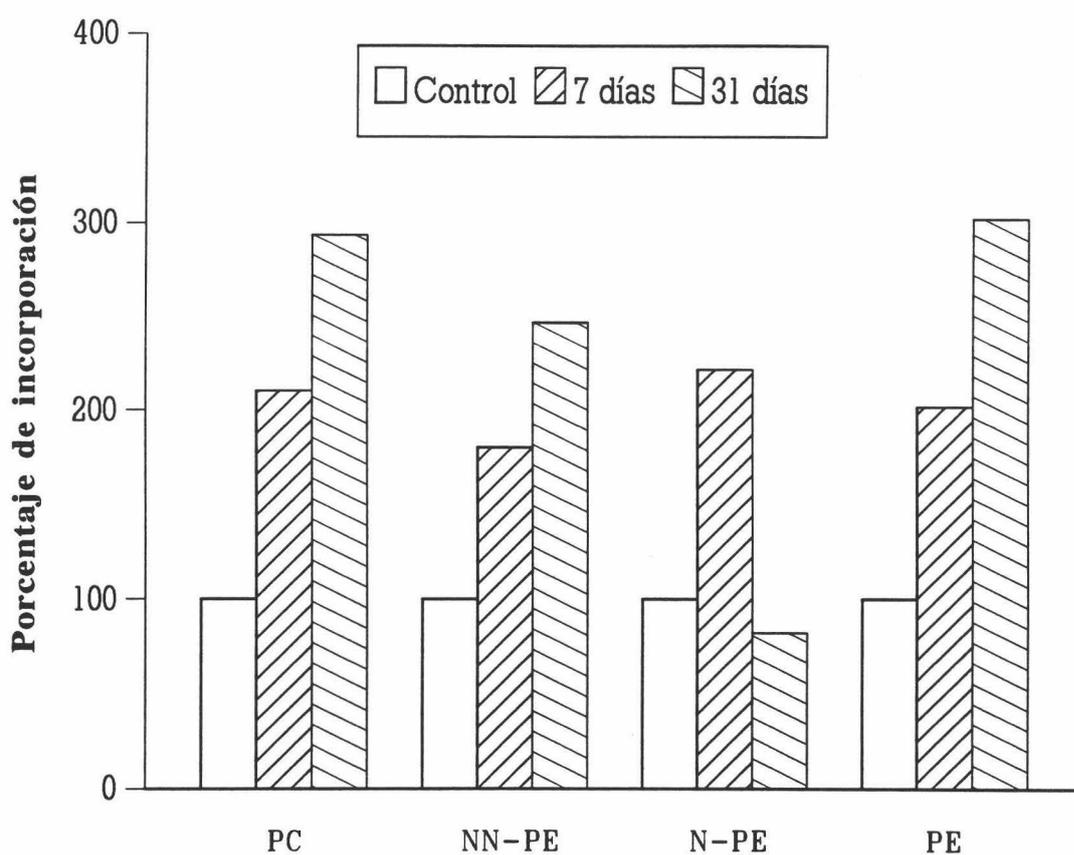
Por otra parte, en la Figura 3 se observa que, ambos tratamientos (7 ó 31 días) producen efectos similares, incrementando la síntesis de fosfatidilcolina, fosfatidil-NN-dimetiletanolamina y fosfatidiletanolamina. La única diferencia se observa a nivel del fosfatidil-N-monometiletanolamina, que aunque incrementa significativamente tras 7 días de tratamiento, cuando éste se prolonga durante 31 días se observan similares niveles de este intermediario en hepatocitos controles o tratados.

FIGURA 2: Estudio comparativo de los efectos del tratamiento de etanol durante 7 y 31 días sobre la incorporación de [1-<sup>3</sup>H] etanolamina a los intermediarios de la ruta de Kennedy en hepatocitos de rata



Los resultados son expresados como porcentaje de incorporación respecto a controles considerados como valor 100.

FIGURA 3: Estudio comparativo de los efectos del tratamiento de etanol durante 7 y 31 días sobre la incorporación de  $[1-^3\text{H}]$  etanolamina a los diferentes fosfolípidos en hepatocitos de rata



PC: fosfatidilcolina; NN-PE: fosfatidil-NN-dimetiletanolamina;  
N-PE: fosfatidil-N-monetiletanolamina; PE: fosfatidiletanolamina

Los resultados son expresados como porcentaje de incorporación respecto a controles considerados como valor 100.

### III.2. Incorporación de [metil-<sup>14</sup>C] colina

En la tabla XXVIII se muestran los valores de incorporación de colina marcada isotópicamente a fosfatidilcolina y a los intermediarios metabólicos de la ruta de Kennedy, a los 7 de tratamiento con etanol. Los resultados se expresan como pmoles incorporados de colina por minuto y millón de células.

Según se observa, a los 7 días, el tratamiento con etanol produce un aumento en la incorporación de colina a fosfocolina, CDP-colina, y fosfatidilcolina. Además, se observa una marcada inhibición en la producción de betaína.

También en este caso, se ha realizado un estudio comparativo de los efectos producidos por el etanol tras la administración durante 7 ó 31 días sobre la incorporación de colina a los diferentes intermediarios de la ruta de Kennedy. Los resultados, expresados como porcentajes de incorporación respecto a los controles, se han representado en la Figura 4.

Según se observa, el incremento detectado tras los 7 días de tratamiento en la síntesis de fosfatidilcolina, contrasta claramente con la significativa inhibición producida en la síntesis de este fosfolípido tras 31 días de administración de etanol. Independientemente de la duración del tratamiento, el etanol inhibe drásticamente la producción de betaína, producto de la degradación intracelular de colina.

TABLA XXVIII

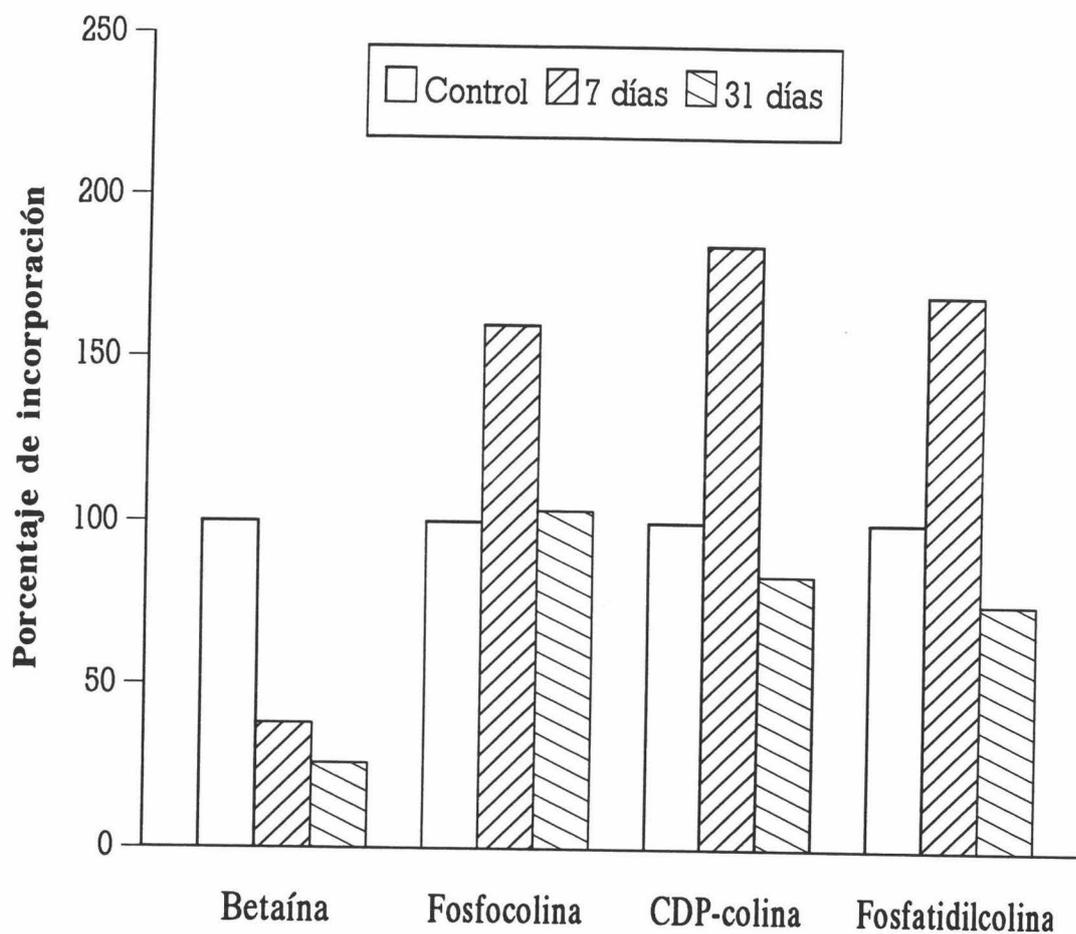
EFFECTO DE LA ADMINISTRACION DE ETANOL DURANTE 7 DIAS SOBRE LA INCORPORACION DE [METIL-<sup>14</sup>C] COLINA A LOS INTEMEDIARIOS DE LA RUTA DE KENNEDY EN HEPATOCITOS AISLADOS DE HIGADO DE RATA

	Controles	Tratados
Betaína	29,31 ± 2,79	11,16 ± 1,76 <sup>b</sup>
Fosfocolina	21,06 ± 2,24	33,59 ± 3,87 <sup>a</sup>
CDP-colina	0,54 ± 0,03	0,99 ± 0,05 <sup>c</sup>
Fosfatidilcolina	36,44 ± 0,46	61,59 ± 0,69 <sup>d</sup>

<sup>a</sup>p≤0,0350; <sup>b</sup>p≤0,0050; <sup>c</sup>p≤0,0010; <sup>d</sup>p≤0,0001.

p=niveles de significación de la t de Student respecto a los controles. Los resultados son media de cuatro determinaciones ± S.E.M., expresados como pmoles incorporados de colina por minuto y millón de células.

FIGURA 4: Estudio comparativo de los efectos del tratamiento de etanol durante 7 y 31 días sobre la incorporación de [metil-<sup>14</sup>C] colina a los intermediarios de la ruta de Kennedy en hepatocitos de rata



Los resultados son expresados como porcentaje de incorporación respecto a controles considerados como valor 100.

#### **IV. REVERSIBILIDAD DE LAS ALTERACIONES PRODUCIDAS POR EL ETANOL SOBRE EL METABOLISMO LIPIDICO EN HEPATOCITOS**

Según se ha podido comprobar, el tratamiento prolongado con alcohol durante 31 días produce notables alteraciones en el metabolismo lipídico hepático. Con objeto de comprobar la persistencia del efecto del etanol sobre la incorporación de distintas bases nitrogenadas, hemos analizado como afecta la supresión de etanol durante 3 días a la incorporación de serina, etanolamina y colina marcadas radiactivamente a los diferentes intermediarios metabólicos y componentes lipídicos del hepatocito. Para ello, tras 31 días de tratamiento se suprimió el etanol de la dieta, y tras 3 días de supresión, se llevaron a cabo los correspondientes análisis.

##### **IV.1. Incorporación de L-[3-<sup>3</sup>H] serina**

Se ha analizado el efecto de la retirada del etanol sobre la incorporación de serina a lípidos neutros y fosfolípidos, y se han comparado los resultados con los obtenidos tras 31 días de tratamiento prolongado de etanol.

En la Figura 5 aparecen representados los valores de incorporación de radiactividad a diferentes lípidos neutros, en hepatocitos aislados de animales sometidos a un tratamiento crónico con etanol y en hepatocitos procedentes de animales a los que se les retiró el etanol durante 3 días. Los resultados aparecen expresados como porcentaje de

incorporación con respecto a los correspondientes hepatocitos controles, considerados como valor 100.

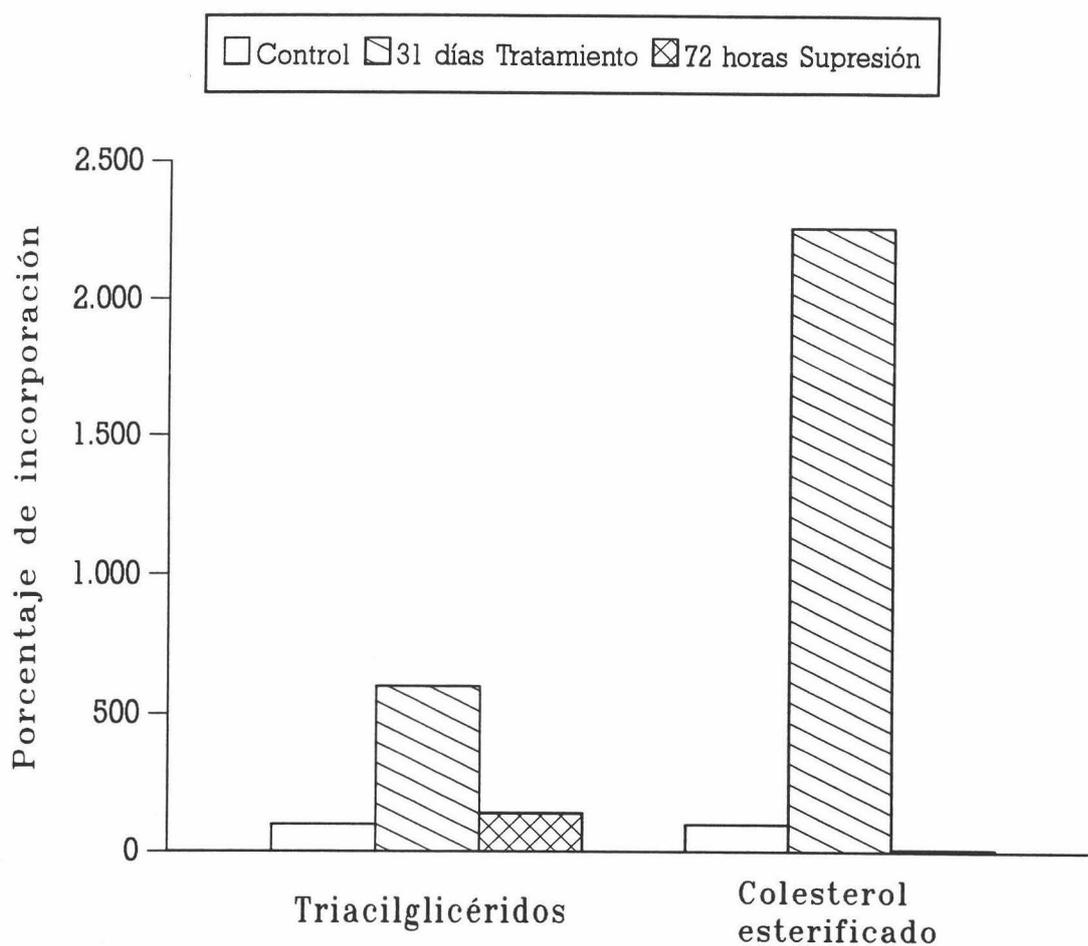
Según se puede apreciar, tras la retirada del etanol se observa aún un aumento en la incorporación de radiactividad a triacilglicéridos, tal y como se observó a los 31 días de tratamiento (Figura 5), aunque la supresión del alcohol atenúa en gran medida los incrementos producidos. Respecto a los diacilglicéridos, no incorporan radiactividad en hepatocitos controles, sin embargo si aparecen marcados tanto tras 31 días de tratamiento como tras la supresión del mismo, aunque la retirada del alcohol disminuye marcadamente los niveles de incorporación a estos compuestos. Por otra parte, los resultados indican que en hepatocitos aislados de animales a los que se les suprimió el etanol durante 3 días no se detecta radiactividad asociada a la fracción de esteres del colesterol, contrastando por lo tanto con el enorme incremento en el marcaje radiactivo de esta fracción lipídica producido tras el tratamiento crónico con etanol.

En la Figura 6, aparecen representados los resultados obtenidos acerca de la incorporación de radiactividad procedente de la serina a fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina, en hepatocitos de animales sometidos a un tratamiento crónico con etanol y en hepatocitos procedentes de animales a los que se les retiró el etanol durante 3 días.

Según se puede observar, la retirada de etanol afecta de modo marcado al perfil de incorporación a los diferentes fosfolípidos. Así, tras la supresión del tratamiento, la radiactividad asociada a fosfatidilcolina es significativamente superior a la observada en las células controles, aunque este aumento de incorporación no es tan marcado como tras 31 días de tratamiento. Por otra parte, resulta de gran interés el efecto que la retirada de etanol produce sobre la incorporación del sustrato a fosfatidilserina o fosfatidiletanolamina. De hecho, una vez suprimido el etanol de la dieta se observa una marcada inhibición en la incorporación de radiactividad a fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina, que contrasta

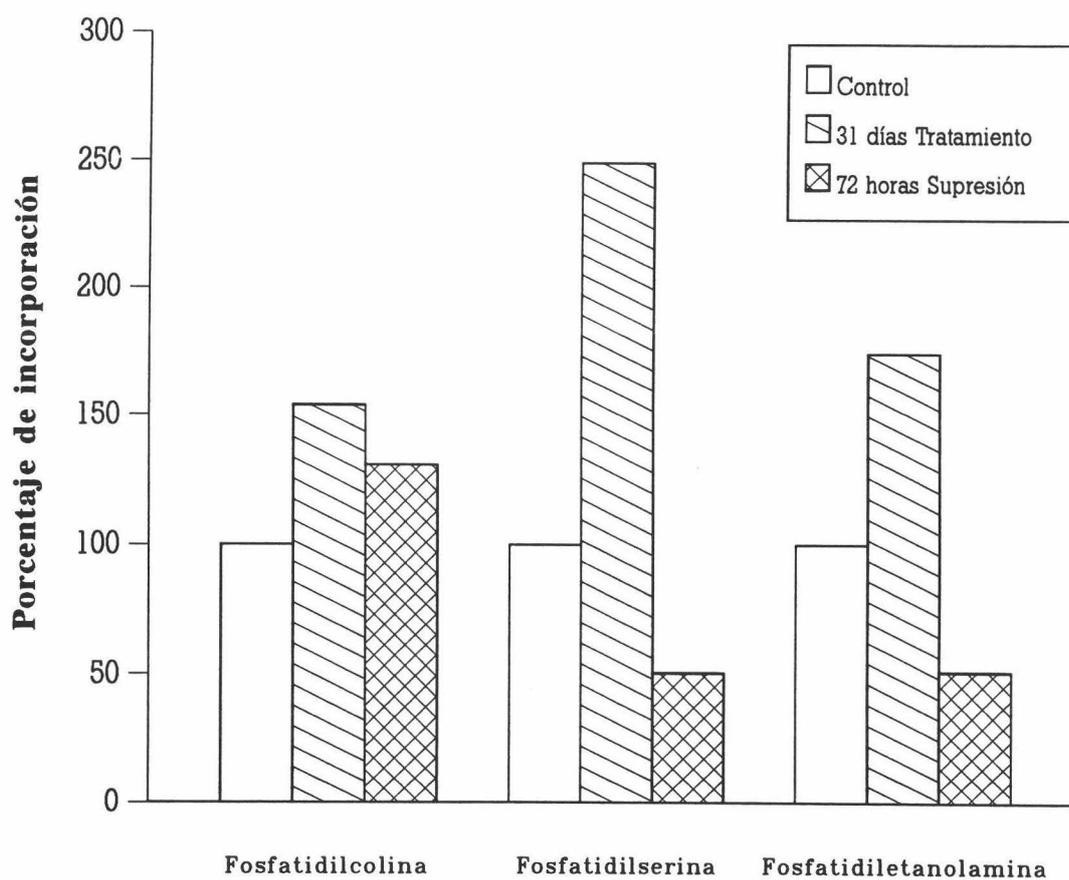
con la enorme activación en la síntesis de estos fosfolípidos tras un tratamiento prolongado.

FIGURA 5: Efecto del tratamiento durante 31 días y de su posterior supresión sobre la incorporación de L-[3-<sup>3</sup>H] serina a los diferentes lípidos neutros en hepatocitos de rata



Los resultados son expresados como porcentaje de incorporación respecto a controles, considerados como valor 100.

FIGURA 6: Efecto del tratamiento durante 31 días y de su posterior supresión sobre la incorporación de L-[3-<sup>3</sup>H] serina a los diferentes fosfolípidos en hepatocitos de rata



Los resultados son expresados como porcentaje de incorporación respecto a controles, considerados como valor 100.

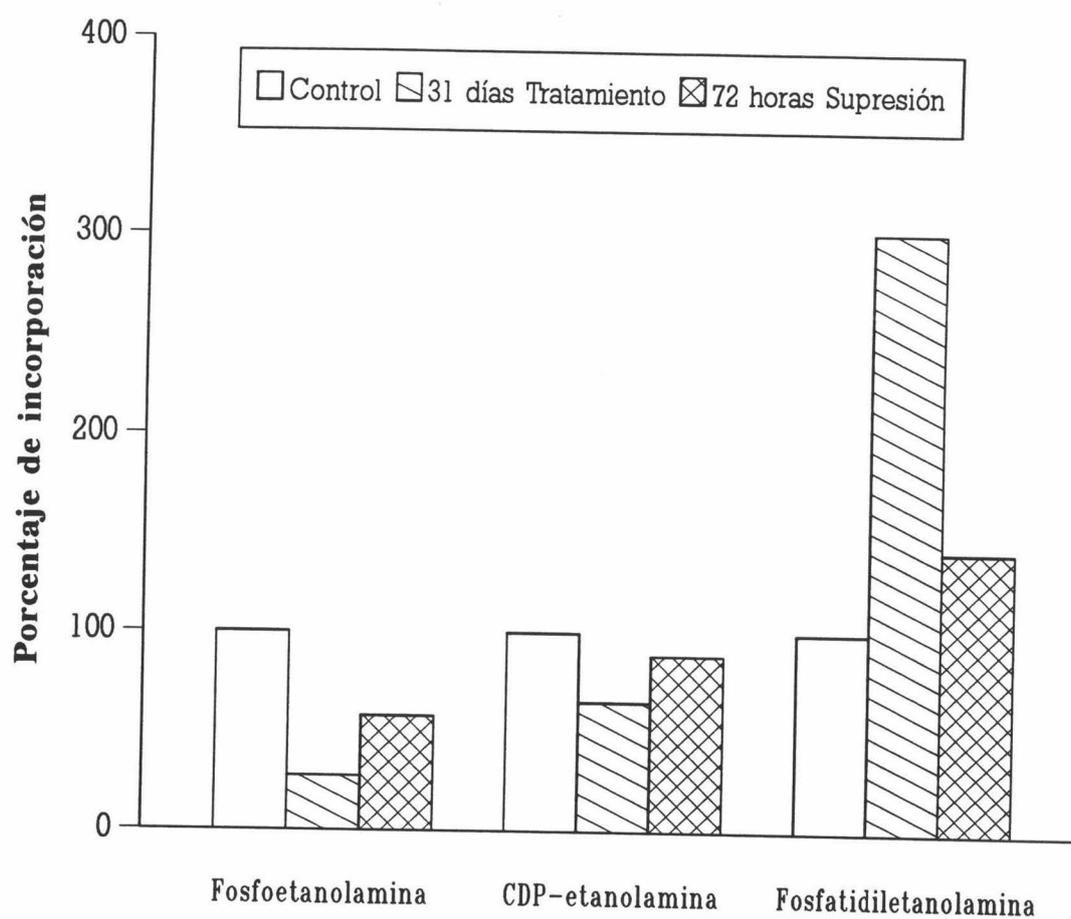
#### IV.2. Incorporación de [1-<sup>3</sup>H] etanolamina

Los resultados obtenidos tras la incorporación de etanolamina marcada a los intermediarios metabólicos de la ruta CDP-etanolamina, y a los intermediarios metilados del proceso de síntesis de fosfatidilcolina a partir de fosfatidiletanolamina, en hepatocitos aislados de ratas a las que se les administró etanol durante 31 días y de animales a los que se les suprimió el etanol durante 3 días, aparecen reflejados en las Figuras 7 y 8 respectivamente. Los valores son expresados como porcentaje de incorporación con respecto a los correspondientes hepatocitos controles, considerados como valor 100.

Según se muestra en la Figura 7, tras la retirada del etanol se sigue observando un descenso en la incorporación de etanolamina a fosfoetanolamina y un aumento en la incorporación a fosfatidiletanolamina, aunque este último es de magnitud muy inferior al observado tras 31 días de tratamiento. Sin embargo, el descenso en la incorporación a CDP-etanolamina producida como consecuencia del tratamiento prolongado con alcohol desaparece a los 3 días de la retirada del mismo. De este modo, la supresión de etanol de la dieta amortigua los efectos producidos por el etanol, de modo que se tienden a alcanzar valores similares a los controles.

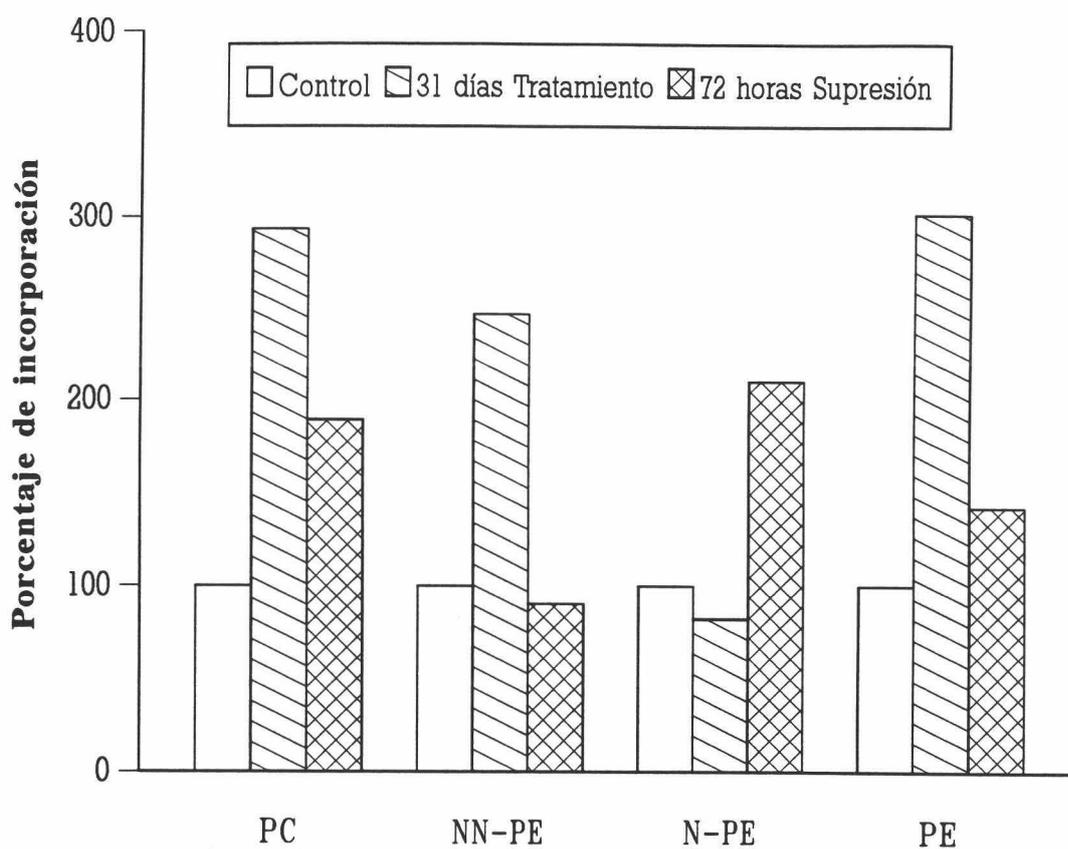
Un comportamiento similar puede observarse en la Figura 8, en donde aparecen representados los resultados obtenidos tras la incorporación de etanolamina a fosfatidilcolina, a los N-metilderivados y fosfatidiletanolamina, bajo estas condiciones experimentales. Como se aprecia en la figura, tras la retirada del etanol durante 3 días, se sigue manteniendo el aumento en la incorporación a los compuestos anteriormente citados, aunque, de nuevo, las diferencias se atenúan en gran medida aproximándose en parte a los valores controles. La única excepción se observa a nivel de la fosfatidil-N-monometiletanolamina, en donde la supresión del tratamiento produce un marcado aumento en sus niveles de radiactividad.

FIGURA 7: Efecto del tratamiento durante 31 días y de su posterior supresión sobre la incorporación de [1-<sup>3</sup>H] etanolamina a los intermediarios de la ruta de Kennedy en hepatocitos de rata



Los resultados son expresados como porcentaje de incorporación respecto a controles, considerados como valor 100.

FIGURA 8: Efecto del tratamiento durante 31 días y de su posterior supresión sobre la incorporación de [1-<sup>3</sup>H] etanolamina a los diferentes fosfolípidos en hepatocitos de rata



PC: fosfatidilcolina; NN-PE: fosfatidil-NN-dimetiletanolamina;  
N-PE: fosfatidil-N-monometiletanolamina; PE: fosfatidiletanolamina

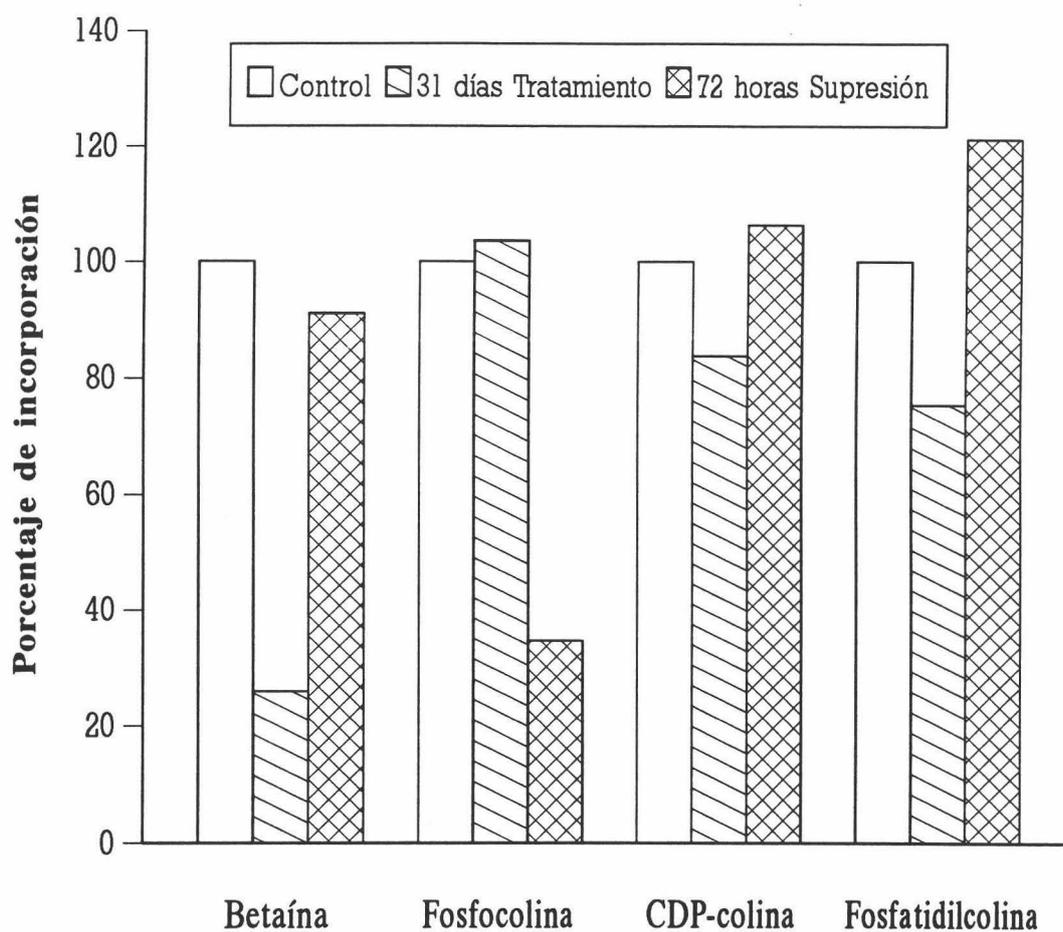
Los resultados son expresados como porcentaje de incorporación respecto a controles, considerados como valor 100.

### IV.3. Incorporación de [metil-<sup>14</sup>C] colina

Los resultados obtenidos del estudio comparativo acerca de la incorporación de colina marcada a los intermediarios metabólicos de la ruta CDP-colina, tras un tratamiento crónico con etanol y su posterior supresión, aparecen reflejados en la Figura 9. Los resultados son expresados como porcentaje de incorporación con respecto a los correspondientes controles, considerados como valor 100.

Según se observa, tras la retirada del etanol de la dieta, desaparece la inhibición en la síntesis de fosfatidilcolina, que se observa tras 31 días de tratamiento, incluso se aprecian mayores niveles de incorporación a este fosfolípido en células aisladas de ratas a las que se les retira el alcohol, que en hepatocitos controles. Además, desaparece la inhibición en el marcaje a betaína que se observó a los 31 días de tratamiento, y se produce un marcado descenso en la incorporación a fosfocolina.

FIGURA 9: Efecto del tratamiento durante 31 días y de su posterior supresión sobre la incorporación de [metil- $^{14}\text{C}$ ] colina a los intermediarios de la ruta de Kennedy en hepatocitos de rata



Los resultados son expresados como porcentaje de incorporación respecto a controles, considerados como valor 100.

Puesto que la fosfatidilcolina sintetizada en la célula puede ser exportada fuera de ella, hemos analizado también el efecto del etanol a los 7 y 31 días de tratamiento, así como el efecto de la supresión del etanol de la dieta durante 3 días, sobre la fosfatidilcolina liberada al medio de incubación. Los resultados expresados en pmoles de colina incorporados por minuto y millón de células, se muestran en la Tabla IXXX.

Según se observa, tanto a los 7 y 31 días de tratamiento con etanol, como a la retirada del mismo, se produce un aumento en la liberación de fosfatidilcolina marcada al medio de incubación.

TABLA IXXX

EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON ETANOL DURANTE 7 Y 31 DIAS Y DE SU POSTERIOR SUPRESION SOBRE LA LIBERACION DE FOSFATIDILCOLINA AL MEDIO TRAS LA INCUBACION DE LOS HEPATOCITOS AISLADOS DE HIGADO DE RATAS CONTROLES Y TRATADAS CON [METIL-<sup>14</sup>C] COLINA

	Controles	Tratados
<u>7 días</u>		
Fosfatidilcolina	4,83 ± 0,07	6,52 ± 0,32 <sup>b</sup>
<u>31 días</u>		
Fosfatidilcolina	7,36 ± 0,28	9,63 ± 0,37 <sup>b</sup>
<u>Supresión etanol</u>		
Fosfatidilcolina	0,80 ± 0,06	1,59 ± 0,28 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>p ≤ 0,0350; <sup>b</sup>p ≤ 0,0050.

p=niveles de significación de la t de Student respecto a los controles. Los resultados son media de cuatro determinaciones ± S.E.M., expresados como pmoles liberados de fosfatidilcolina por minuto y millón de células.

## V. ESTUDIO DE ADAPTACION DE HEPATOCITOS AL ETANOL

Según se ha observado a lo largo de este estudio, el etanol, tanto tras un tratamiento prolongado como *in vitro*, altera de modo marcado el metabolismo lipídico del hepatocito. Sin embargo, tal y como se define el fenómeno de tolerancia al alcohol, presenta gran interés analizar la respuesta al alcohol *in vitro* de los hepatocitos aislados de animales crónicamente tratados con etanol, respecto a la exhibida por hepatocitos de animales controles, con el fin de investigar la existencia de una posible adaptación de la célula durante el tratamiento prolongado de etanol.

Por ello, en este apartado se ha realizado un estudio comparativo de los efectos producidos por el etanol *in vitro* sobre los niveles de componentes lipídicos celulares y sobre la incorporación de diferentes sustratos lipogénicos, marcados radiactivamente, a las fracciones lipídicas, en células de animales controles y tratados crónicamente con etanol.

Hemos de indicar que estos experimentos se han realizado en células aisladas de animales controles y tratados que recibieron respectivamente la dieta de Miller con o sin etanol.

## V.1. COMPOSICION LIPIDICA

En primer lugar se ha llevado a cabo el estudio del efecto del etanol *in vitro* sobre los niveles de colesterol, triacilglicéridos, y fosfolípidos, en hepatocitos aislados de animales controles y tratados crónicamente con etanol.

### V.1.1. Niveles de colesterol y triacilglicéridos

Los resultados representados como  $\mu\text{g}$  de colesterol o triacilglicéridos por millón de células, se muestran en la Figura 10. Según se puede observar, la incubación con etanol 100 mM no produce cambios significativos en los niveles de los componentes analizados (Figuras 10-A, 10-B, 10-C y 10-D) ni en células controles ni en las procedentes de animales tratados crónicamente con alcohol, y por tanto no se aprecian diferencias significativas en ambos tipos de células. De hecho, aunque los niveles de colesterol esterificado aumentan en hepatocitos controles, y sufren un ligero descenso en los hepatocitos procedentes de animales tratados con etanol (Figura 10-C), las variaciones no llegan a ser significativas, probablemente debido a la gran dispersión de los resultados experimentales obtenidos.

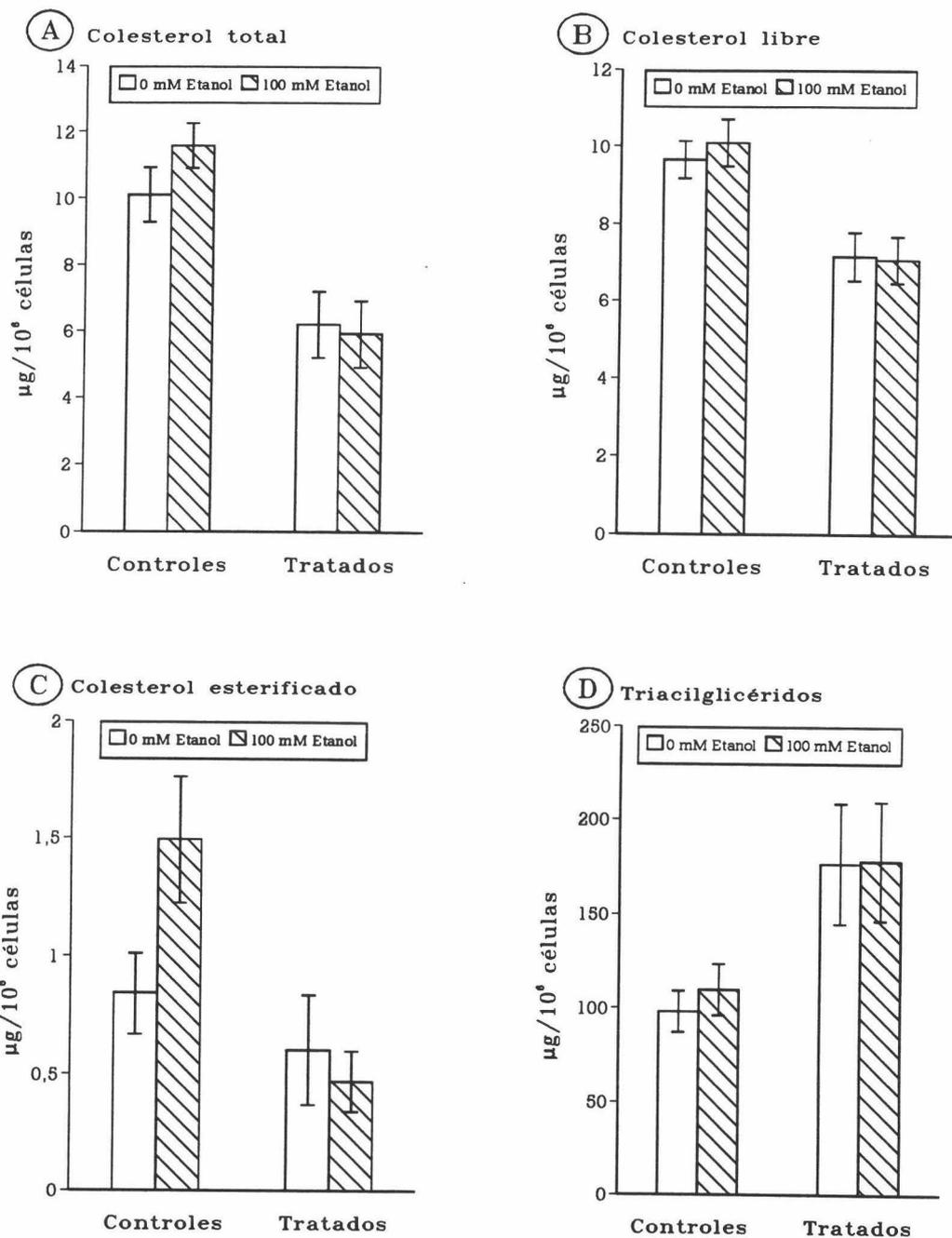


FIGURA 10: Efecto del etanol *in vitro* sobre los niveles de colesterol total (A), colesterol libre (B), colesterol esterificado (C) y triacilglicéridos (D) en hepatocitos aislados de ratas controles y tratadas. Los resultados son media de doce determinaciones  $\pm$  S.E.M., expresados  $\mu\text{g}$  de colesterol o triacilglicéridos por millón de células.

### V.1.2. Niveles de los distintos fosfolípidos

Los resultados obtenidos acerca de los efectos del etanol *in vitro* sobre los niveles de los distintos fosfolípidos, demuestran que no existe variación alguna en los niveles de los fosfolípidos individuales por efecto del etanol *in vitro*, ni en hepatocitos controles ni en las células de animales crónicamente tratados con etanol, por lo tanto, los resultados no se han representado gráficamente.

## V.2. INCORPORACION DE PRECURSORES METABOLICOS A LOS DIFERENTES COMPONENTES LIPIDICOS

A continuación, se comentarán los resultados obtenidos del estudio comparativo, en hepatocitos aislados de animales controles y tratados crónicamente con alcohol, acerca de los efectos producidos por el etanol *in vitro* sobre la incorporación de distintos sustratos metabólicos, marcados isotópicamente, a los diferentes componentes lipídicos.

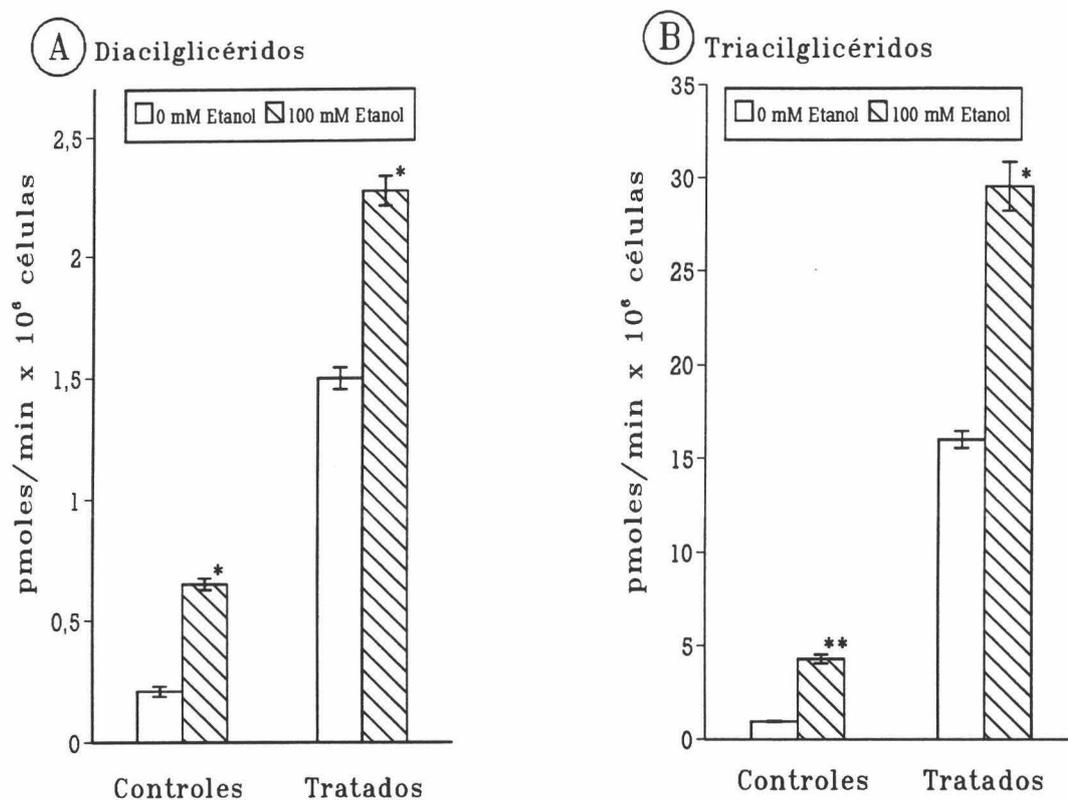
En todos los casos, los resultados obtenidos se expresan como pmoles incorporados de sustrato por minuto y millón de células.

### V.2.1. Incorporación de [1(3)<sup>3</sup>H] glicerol

En la Figura 11 se representan los efectos producidos por el etanol *in vitro* sobre la incorporación de glicerol marcado isotópicamente a distintos lípidos neutros, en células aisladas de animales controles y tratados crónicamente con alcohol.

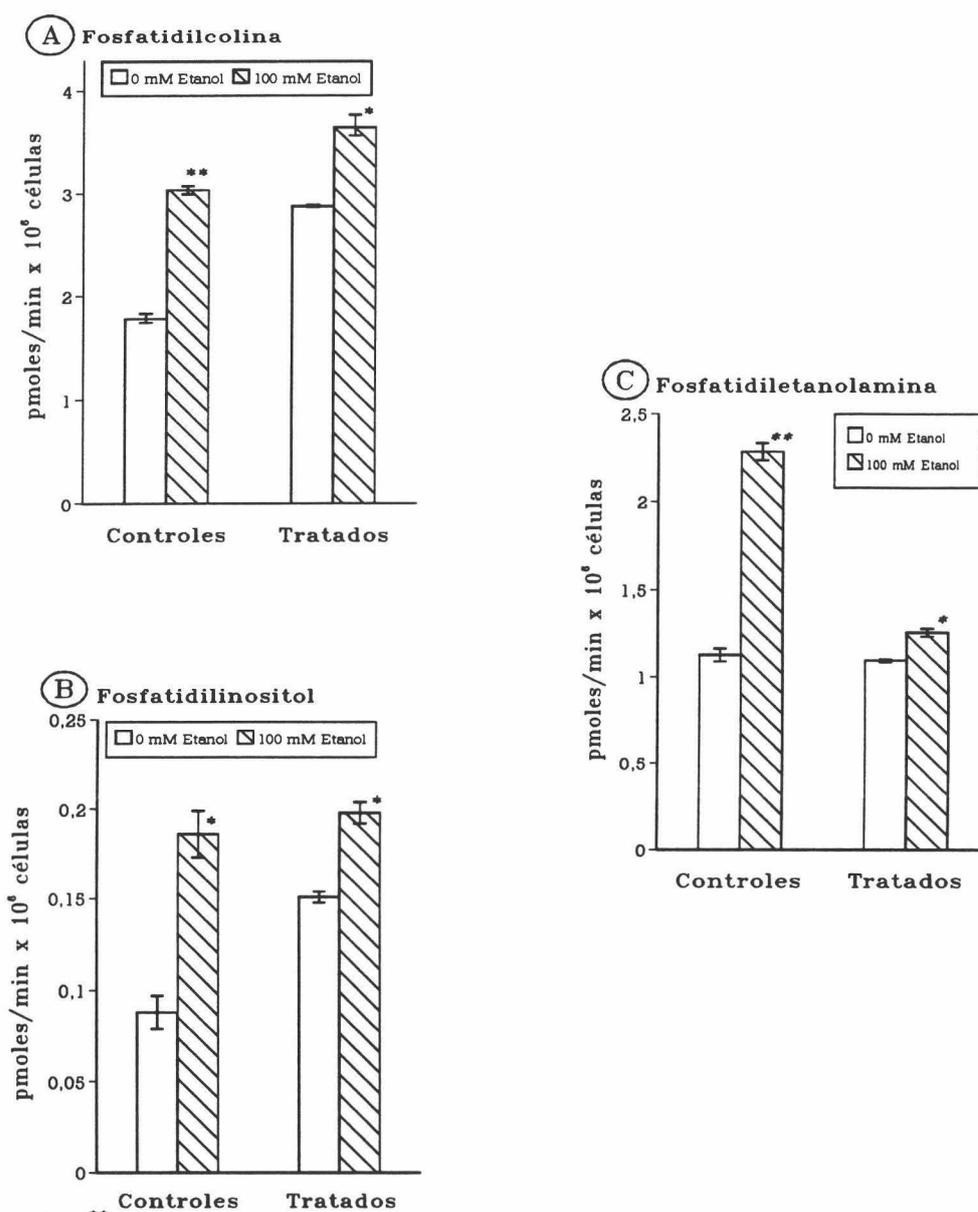
Se observa que el etanol *in vitro* produce, tanto en hepatocitos aislados de animales controles como tratados, un patente aumento en la radiactividad asociada a diacilglicéridos (Figura 11-A) y triacilglicéridos (Figura 11-B). Sin embargo, al comparar los efectos producidos por el etanol *in vitro* sobre la incorporación de glicerol a las fracciones lipídicas mencionadas en ambos tipos de células, observamos que, en todos los casos, el aumento producido por el etanol sobre la incorporación de glicerol es significativamente menor en células procedentes de animales tratados crónicamente con alcohol, que en los controles.

En la Figura 12 se representan los efectos producido por el etanol *in vitro* sobre la incorporación de glicerol marcado isotópicamente a los distintos fosfolípidos, en células aisladas de animales controles y tratados crónicamente con alcohol. Según se puede apreciar, el etanol *in vitro* aumenta la incorporación a fosfatidilcolina (Figura 12-A), fosfatidilinositol (Figura 12-B) y fosfatidiletanolamina (Figura 12-C), aunque dichos aumentos son significativamente superiores en células controles. Por otra parte, en ningún caso se ha observado radiactividad asociada a la fracción de fosfatidilserina.



\* $p \leq 0,0010$ ; \*\* $p \leq 0,0001$ .

FIGURA 11: Efecto del etanol *in vitro* sobre la incorporación de  $[1(3)^3\text{H}]$  glicerol a diacilglicéridos (A) y triacilglicéridos (B) en hepatocitos aislados de ratas controles y tratadas. Los resultados son media de tres determinaciones  $\pm$  S.E.M., expresados como pmoles incorporados de glicerol por minuto y millón de células.  $p$ =niveles de significación de la  $t$  de Student de los valores obtenidos en presencia de etanol *in vitro* con respecto a los hallados en ausencia de etanol.



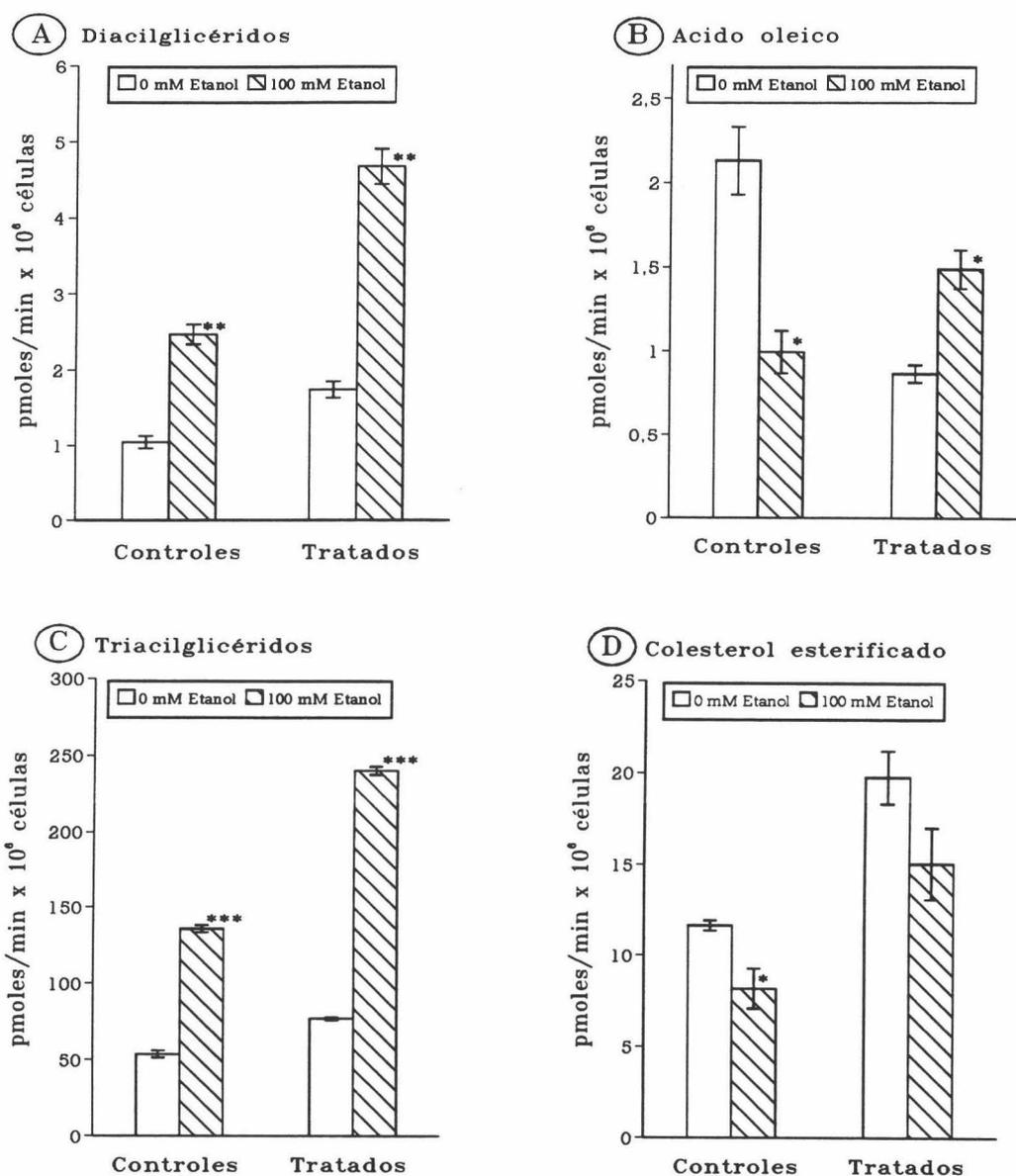
\* $p \leq 0,0050$ ; \*\* $p \leq 0,0001$ .

FIGURA 12: Efecto del etanol *in vitro* sobre la incorporación de  $[1(3)^3\text{H}]$  glicerol a fosfatidilcolina (A), fosfatidilinositol (B) y fosfatidiletanolamina (C) en hepatocitos aislados de ratas controles y tratadas. Los resultados son media de tres determinaciones  $\pm$  S.E.M., expresados como pmoles incorporados de glicerol por minuto y millón de células.  $p$ =niveles de significación de la  $t$  de Student de los valores obtenidos en presencia de etanol *in vitro* con respecto a los hallados en ausencia de etanol.

### V.2.2. Incorporación de $^3\text{H}$ -oleato

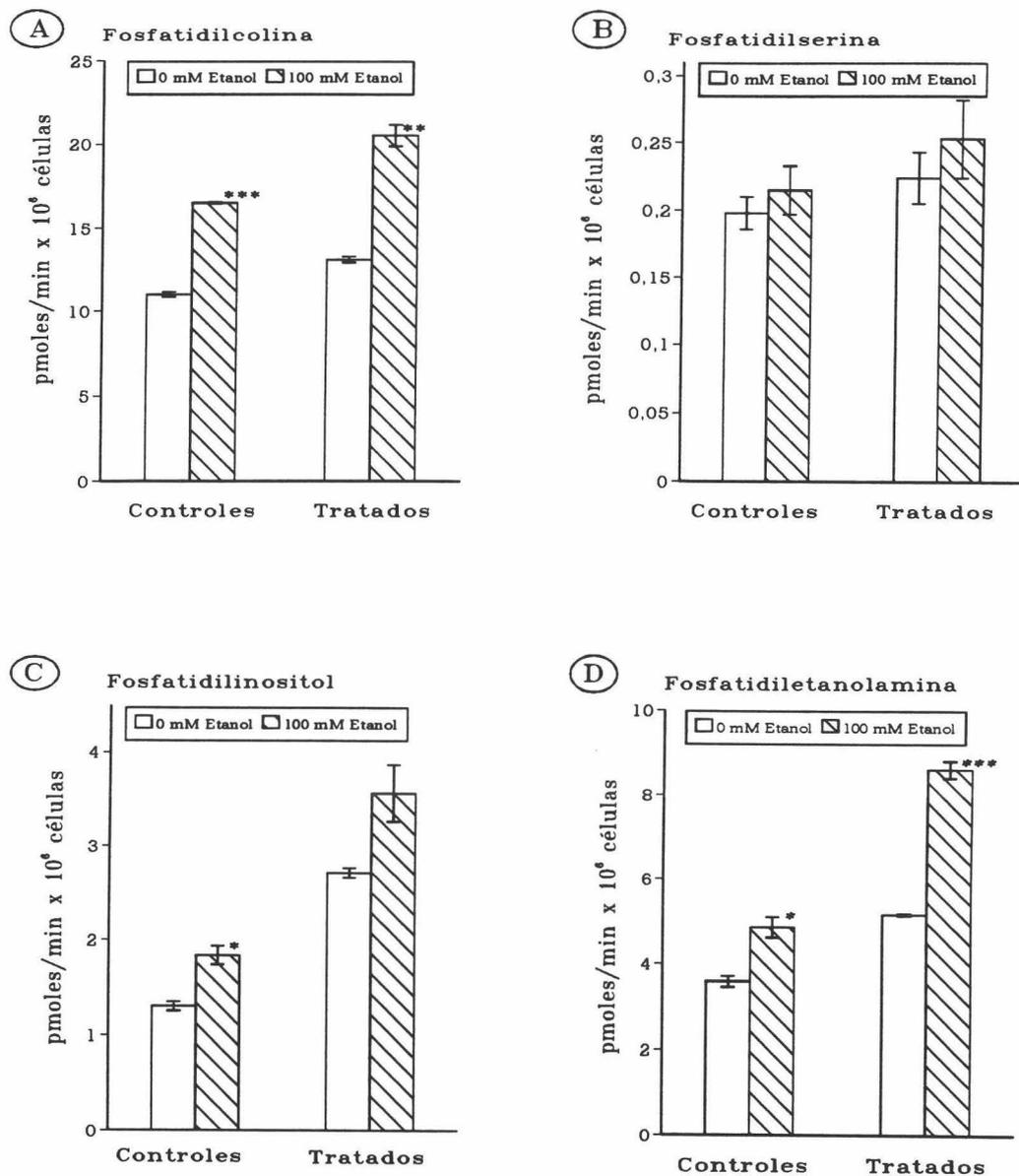
Al comparar los efectos producidos por el etanol *in vitro* sobre la incorporación de oleato a lípidos neutros, en células aisladas de animales controles y tratados crónicamente con alcohol (Figura 13), se observa que la incubación con alcohol produce un incremento considerable en la incorporación a triacilglicéridos (Figura 13-C) y diacilglicéridos (Figura 13-A), aunque este efecto es netamente superior en células aisladas de animales tratados. Además, el etanol *in vitro* ejerce efectos contrarios sobre el contenido intracelular de oleato libre (Figura 13-B). Así, en células aisladas de animales controles el etanol disminuye la concentración intracelular de oleico, mientras que en hepatocitos de animales tratados, el etanol aumenta el contenido intracelular de este ácido graso. Por otra parte, el etanol *in vitro* reduce la incorporación del ácido graso a colesterol esterificado de un modo similar en hepatocitos aislados de animales controles o tratados (Figura 13-D).

Respecto a los fosfolípidos (Figura 14), el etanol *in vitro* produce un aumento en la incorporación de oleato a fosfatidilcolina (Figura 14-A), fosfatidilinositol (Figura 14-C) y fosfatidiletanolamina (Figura 14-D), pero no a fosfatidilserina (Figura 14-B), tanto en hepatocitos controles como en hepatocitos aislados de animales tratados crónicamente con etanol. Es interesante destacar que en ambos tipos de células, la magnitud de los incrementos observados son similares para todos los fosfolípidos analizados, excepto para fosfatidiletanolamina, en donde se aprecia un aumento de incorporación significativamente más marcado en células tratadas que en los hepatocitos controles.



\* $p \leq 0,0400$ ; \*\* $p \leq 0,0010$ ; \*\*\* $p \leq 0,0001$ .

FIGURA 13: Efecto del etanol *in vitro* sobre la incorporación de  $^3\text{H}$ -oleato a diacilglicéridos (A), triacilglicéridos (C) y colesterol esterificado (D), y sobre los niveles de ácido oleico (B) en hepatocitos aislados de ratas controles y tratadas. Los resultados son media de tres determinaciones  $\pm$  S.E.M., expresados como pmoles incorporados de oleato por minuto y millón de células.  $p$ =niveles de significación de la  $t$  de Student de los valores obtenidos en presencia de etanol *in vitro* con respecto a los hallados en ausencia de etanol.



\*  $p \leq 0,0100$ ; \*\*  $p \leq 0,0010$ ; \*\*\*  $p \leq 0,0001$ .

FIGURA 14: Efecto del etanol *in vitro* sobre la incorporación de  $^3\text{H}$ -oleato a fosfatidilcolina (A), fosfatidilserina (B), fosfatidilinositol (C) y fosfatidiletanolamina (D) en hepatocitos aislados de ratas controles y tratadas. Los resultados son media de tres determinaciones  $\pm$  S.E.M., expresados como pmoles incorporados de oleato por minuto y millón de células.  $p$ =niveles de significación de la  $t$  de Student de los valores obtenidos en presencia de etanol *in vitro* con respecto a los hallados en ausencia de etanol.

### V.2.3. Incorporación de bases nitrogenadas

En éste y en los dos siguientes apartados, se muestran los resultados obtenidos sobre la incorporación de diferentes bases nitrogenadas a los distintos fosfolípidos, tras la incubación con etanol *in vitro* de hepatocitos procedentes de animales controles y tratados crónicamente con alcohol.

#### V.2.3.1. Incorporación de L-[3-<sup>3</sup>H] serina

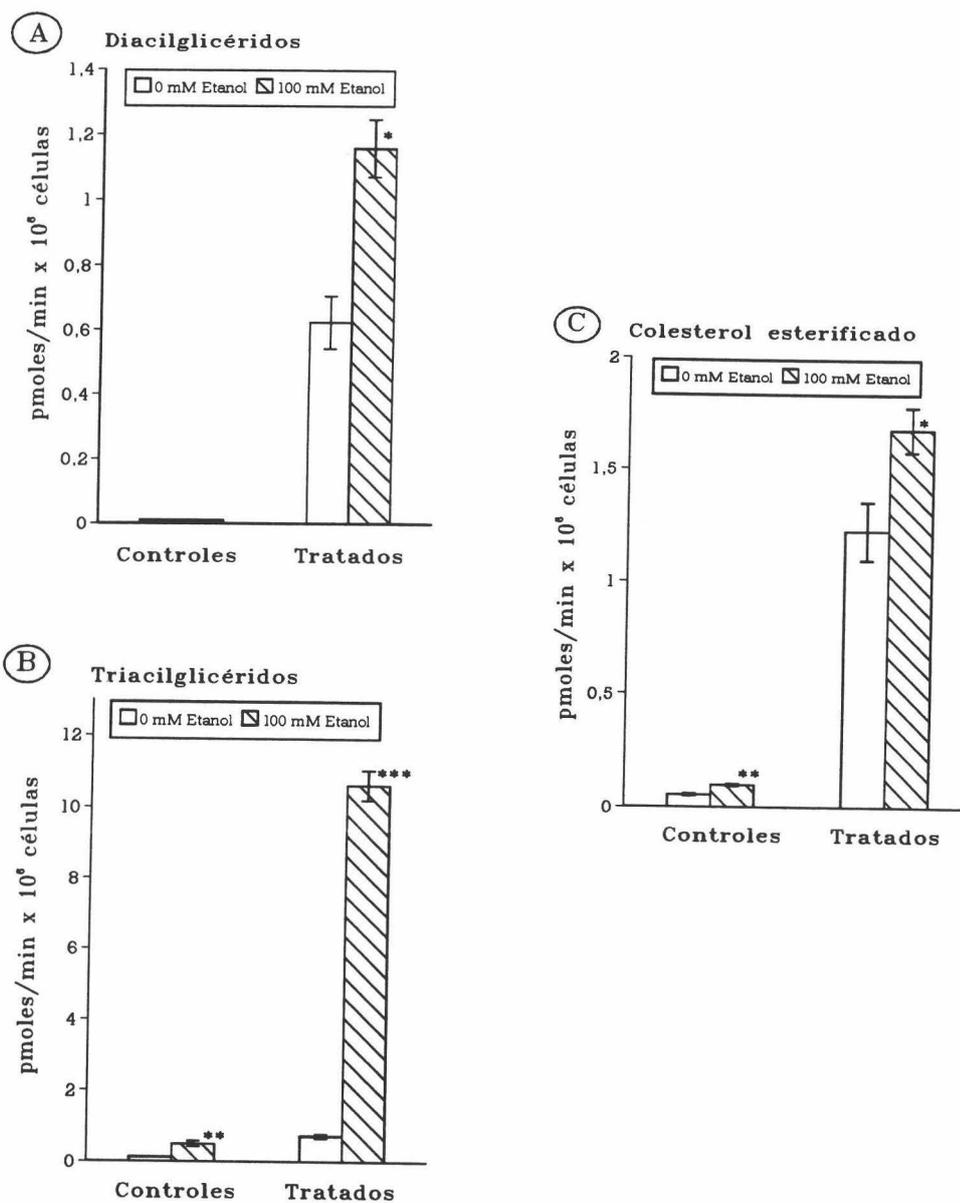
En la Figura 15 se representan los efectos producidos por el etanol *in vitro* sobre la incorporación de serina marcada isotópicamente a los distintos lípidos neutros, en células aisladas de animales controles y tratados crónicamente con alcohol.

El etanol *in vitro* produce un aumento significativo en la radiactividad asociada a triacilglicéridos (Figura 15-B) y colesterol esterificado (Figura 15-C). Es interesante que, en células aisladas de animales tratados, en presencia de etanol se observa incorporación de radiactividad a diacilglicéridos, que no aparecen, sin embargo, marcados en células controles (Figura 15-A). Por otra parte, el incremento producido por el etanol *in vitro* sobre la incorporación a triacilglicéridos, es claramente superior en células aisladas de animales tratados crónicamente con alcohol, mientras que las magnitudes de los incrementos observados en colesterol esterificado son similares en ambos hepatocitos.

Respecto a los fosfolípidos (Figura 16), se observa que el etanol *in vitro* ejerce un efecto diferencial sobre la incorporación a fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina, en células aisladas de animales controles y tratados. Así, mientras que en células aisladas de animales tratados incrementa la incorporación a fosfatidilcolina (Figura 16-A) y fosfatidiletanolamina (figura 16-C), pero no a fosfatidilserina (Figura 16-

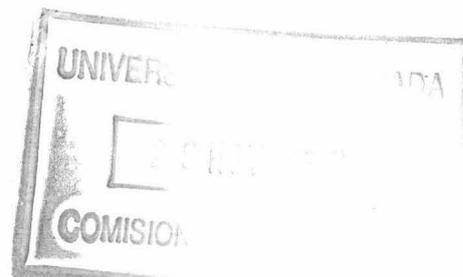
---

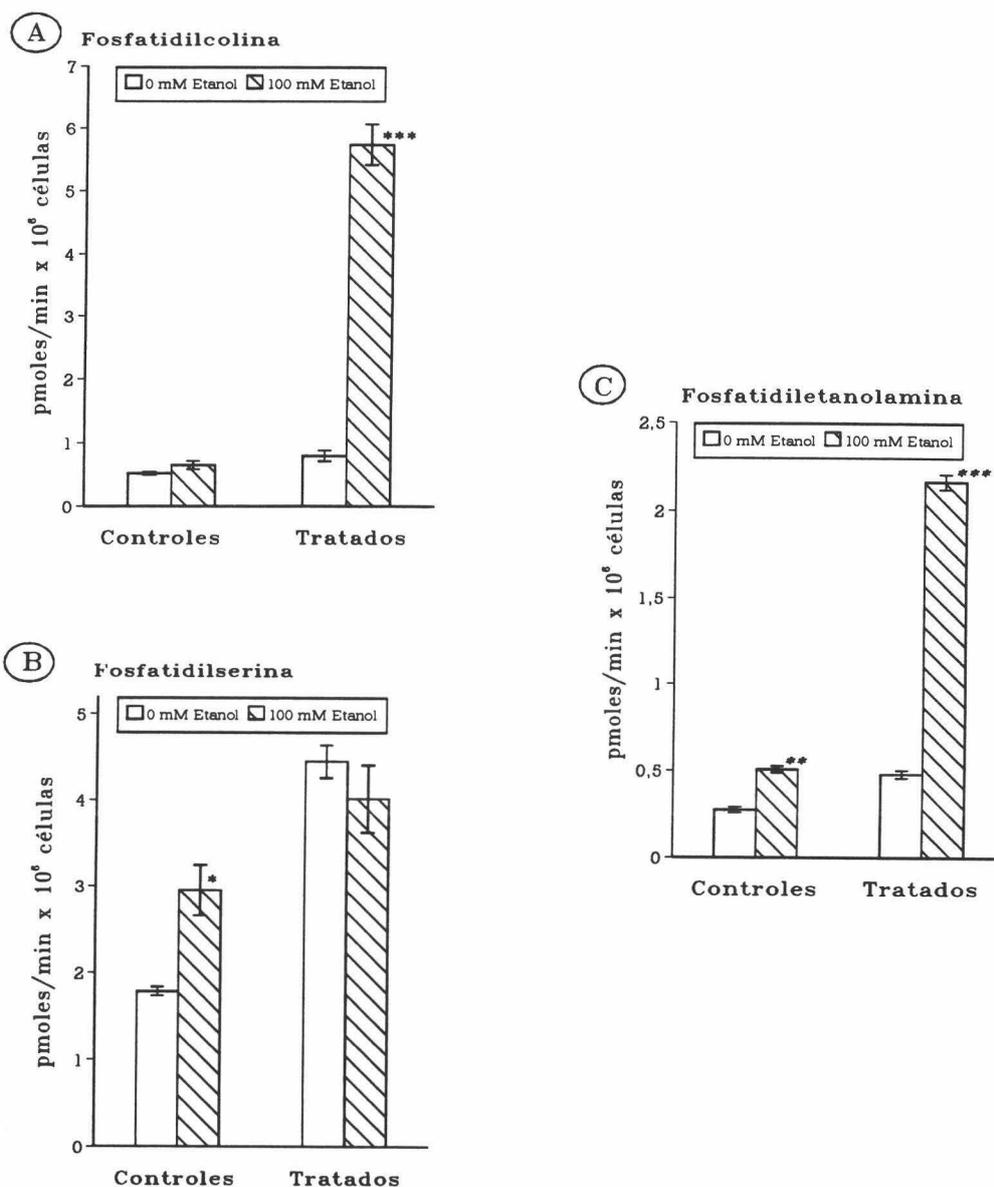
B), en hepatocitos aislados de animales controles el etanol *in vitro* aumenta significativamente la incorporación de radiactividad tan sólo a fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina.



\* $p \leq 0,0500$ ; \*\* $p \leq 0,0100$ ; \*\*\* $p \leq 0,0001$ .

FIGURA 15: Efecto del etanol *in vitro* sobre la incorporación de L-[<sup>3</sup>H] serina a diacilglicéridos (A), triacilglicéridos (B) y colesterol esterificado (C) en hepatocitos aislados de ratas controles y tratada. Los resultados son media de tres determinaciones  $\pm$  S.E.M., expresados como pmoles incorporados de serina por minuto y millón de células.  $p$ =niveles de significación de la  $t$  de Student de los valores obtenidos en presencia de etanol con respecto a los hallados en ausencia de etanol.





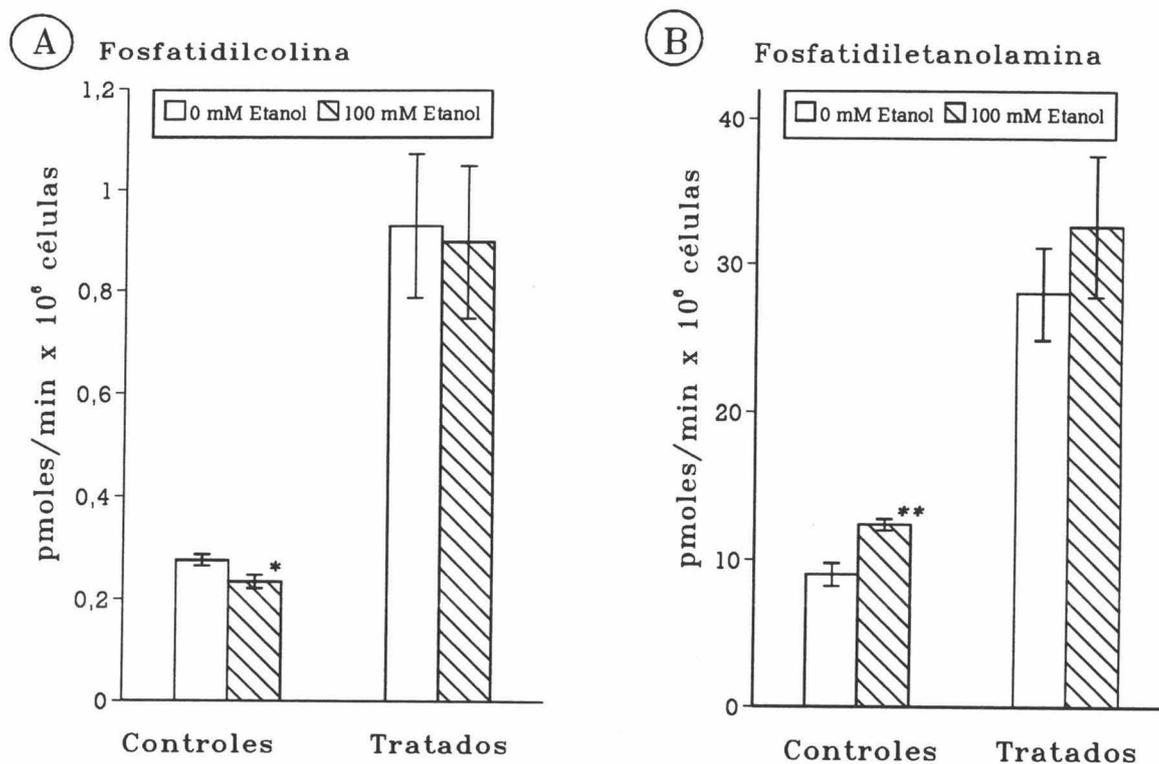
\* $p \leq 0,0200$ ; \*\* $p \leq 0,0010$ ; \*\*\* $p \leq 0,0001$ .

FIGURA 16: Efecto del etanol *in vitro* sobre la incorporación de L-[ $^3\text{H}$ ] serina a fosfatidilcolina (A), fosfatidilserina (B) y fosfatidiletanolamina (C) en hepatocitos aislados de ratas controles y tratadas. Los resultados son media de tres determinaciones  $\pm$  S.E.M., expresados como pmoles incorporados de serina por minuto y millón de células.  $p$ =niveles de significación de la  $t$  de Student de los valores obtenidos en presencia de etanol con respecto a los hallados en ausencia de etanol.

### V.2.3.2. Incorporación de $[1-^3H]$ etanolamina

En la Figura 17 se representan los efectos producidos por el etanol *in vitro* sobre la incorporación de etanolamina marcada isotópicamente a fosfatidilcolina (Figura 17-A) y fosfatidiletanolamina (Figura 17-B), en células aisladas de animales controles y tratados crónicamente con alcohol.

Según se puede observar, el etanol *in vitro* produce un marcado aumento en la incorporación de etanolamina a fosfatidiletanolamina y un descenso en la incorporación a fosfatidilcolina. Estas variaciones, aunque cuantitativamente superiores en hepatocitos aislados de animales controles, no resultan ser significativamente diferentes de los encontrados en hepatocitos aislados de animales crónicamente tratados con etanol.

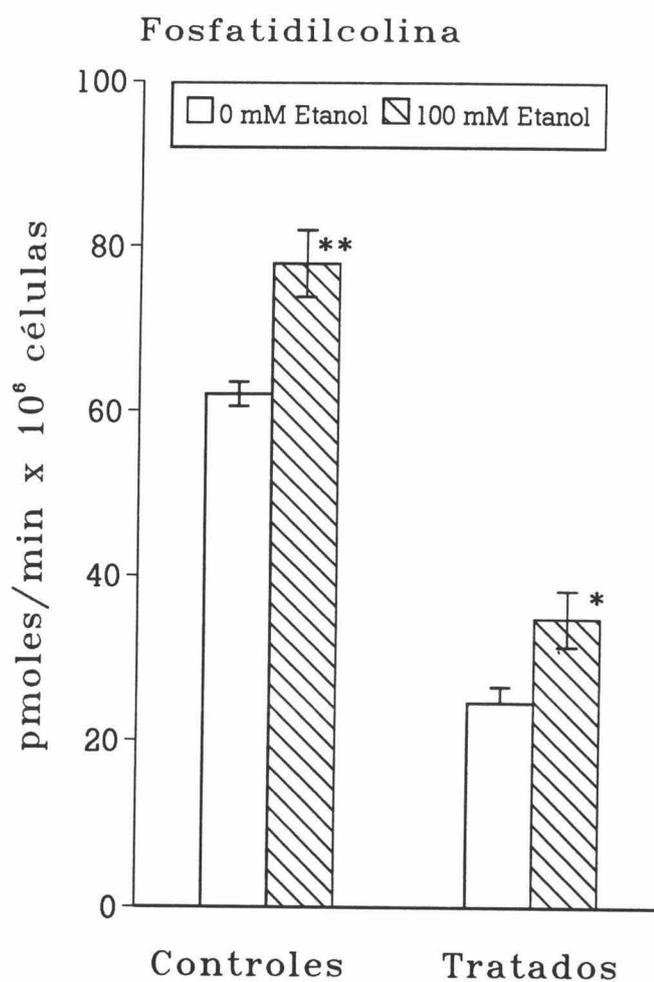


\* $p \leq 0,0400$ ; \*\* $p \leq 0,0050$ .

FIGURA 17: Efecto del etanol *in vitro* sobre la incorporación de  $[1-^3\text{H}]$  etanolamina a fosfatidilcolina (A) y fosfatidiletanolamina (B) en hepatocitos aislados de ratas controles y tratadas. Los resultados son media de seis determinaciones  $\pm$  S.E.M., expresados como pmoles incorporados de etanolamina por minuto y millón de células.  $p$ =niveles de significación de la  $t$  de Student de los valores obtenidos en presencia de etanol con respecto a los hallados en ausencia de etanol.

### V.2.3.3. Incorporación de [metil-<sup>14</sup>C] colina

En cuanto a los efectos producidos por el etanol *in vitro* sobre la incorporación de colina marcada isotópicamente a fosfatidilcolina. Nuestros resultados, representados en la Figura 18, indican que el etanol *in vitro* produce un aumento en la incorporación de colina a fosfatidilcolina, que es similar en células aisladas de animales controles y tratados crónicamente con etanol.



\* $p \leq 0,0300$ ; \*\* $p \leq 0,0050$ .

FIGURA 18: Efecto del etanol *in vitro* sobre la incorporación de [metil- $^{14}\text{C}$ ] colina a fosfatidilcolina en hepatocitos aislados de ratas controles y tratadas. Los resultados son media de seis determinaciones  $\pm$  S.E.M., expresados como pmoles incorporados de colina por minuto y millón de células.  $p$ =niveles de significación de la  $t$  de Student de los valores obtenidos en presencia de etanol con respecto a los hallados en ausencia de etanol.

## **DISCUSSION**

Diferentes estudios metabólicos han puesto de manifiesto que el hígado desempeña un papel central en el metabolismo lipídico. Asimismo, son numerosos los trabajos realizados sobre la regulación de las principales rutas del metabolismo de fosfolípidos y triacilglicéridos en órgano completo y en hepatocitos aislados.

Por otra parte, se ha comprobado que el etanol interfiere con rutas específicas del metabolismo lipídico (Dich et al., 1983; Hu et al., 1992), de tal manera que hemos considerado que el hígado, y en particular los hepatocitos aislados constituyen un sistema apropiado para estudiar los efectos del etanol sobre el metabolismo lipídico.

Los mecanismos por los cuales el etanol interfiere con las diferentes vías metabólicas no son bien conocidos. Sin embargo, existen pruebas experimentales de que las principales acciones ejercidas por el etanol ocurren a nivel de distintas membranas biológicas interaccionando con diferentes áreas de la bicapa lipídica. De esta manera, el etanol puede actuar sobre diferentes componentes estructurales de las membranas, provocando alteraciones en parámetros bioquímicos y actividades enzimáticas asociadas a membrana. Otra vía por la cual el etanol podría modificar el metabolismo lipídico, sería a través de cambios metabólicos producidos en el citoplasma celular como consecuencia de su metabolismo hepático, mediado por la alcohol deshidrogenasa. Así, cuando el etanol es metabolizado se produce un incremento en la relación  $\text{NADH/NAD}^+$  (Dawson, 1983), que a su vez provoca alteraciones en la utilización de diferentes intermediarios metabólicos.

## I. INFLUENCIA DEL ETANOL *IN VITRO* SOBRE EL METABOLISMO LIPIDICO EN HEPATOCITOS DE HIGADO DE RATA

Con objeto de analizar en profundidad los efectos del etanol sobre las diferentes rutas del metabolismo lipídico, se realizaron experimentos en los cuales hepatocitos aislados de hígado de rata se incubaron junto con distintos precursores metabólicos, marcados isotópicamente, en ausencia o presencia de etanol a una concentración 100 mM.

En primer lugar, se ha analizado el efecto del etanol *in vitro* sobre los niveles de colesterol y triacilglicéridos. Nuestros resultados muestran, que bajo esta condición experimental, sólo incrementan los triacilglicéridos. Esto puede ser debido al aumento que se produce en ácidos grasos y glicerol fosfato como consecuencia del metabolismo hepático del etanol (Brindley, 1987), lo que lleva consigo una mayor formación de precursores para la biosíntesis de diacilglicéridos.

Nuestros resultados muestran que el etanol *in vitro* claramente interacciona con determinadas actividades enzimáticas implicadas en el metabolismo de lípidos neutros y fosfolípidos. De este modo, cuando incubamos con glicerol marcado isotópicamente observamos, un incremento en la incorporación de este sustrato lipogénico a los diferentes lípidos neutros y fosfolípidos. Simultáneamente, y puesto que el etanol es metabolizado en el hepatocito por la alcohol deshidrogenasa, se han realizado incubaciones en presencia de 4-metilpirazol, un inhibidor específico de esta enzima. Nuestros resultados indican que en presencia de este inhibidor, el efecto producido por el etanol incrementando la incorporación de glicerol a los distintos lípidos, prácticamente desaparece, con la única excepción de un ligero incremento observado en la incorporación a triacilglicéridos. De

este modo, el 4-metilpirazol, puede prevenir el aumento en la biosíntesis *de novo* de lípidos neutros y fosfolípidos por un descenso de los correspondientes sustratos precursores que serían producidos como consecuencia del metabolismo hepático del etanol. Por otra parte, los cambios que acontecen en el estado redox pueden ser un factor importante responsable de la mayor actividad lipogénica observada en este estudio. De acuerdo con ésto, Wood y Lamb (1979), inhibiendo la alcohol deshidrogenasa se puede parcialmente impedir el aumento en la actividad fosfatidato fosfohidrolasa inducido por el etanol en cultivos de hepatocitos.

Las incubaciones realizadas con oleico tritiado, en presencia o ausencia de etanol, muestran que el alcohol aumenta marcadamente la incorporación de este ácido graso a diacilglicéridos, triacilglicéridos, así como a los distintos fosfolípidos. Sin embargo, cabe destacar el descenso en el marcaje en colesterol esterificado, probablemente debido a una inhibición específica producida a nivel de la acil-CoA:colesterol aciltransferasa por la presencia de etanol. El aumento en el marcaje observado a los diferentes componentes lipídicos podría obedecer a un aumento en las actividades enzimáticas implicadas en la síntesis de estos componentes lipídicos, pero teniendo en cuenta que el metabolismo del etanol produce un incremento en la disponibilidad de sustratos lipogénicos, ácidos grasos y glicerol fosfato, es difícil demostrar dicha activación en nuestra situación experimental.

De hecho, en incubaciones realizadas en presencia de 4-metilpirazol prácticamente desaparece el efecto producido por el etanol *in vitro*, con la única excepción de un ligero incremento observado en la radiactividad asociada a fosfatidiletanolamina. De esto se deduce que la acción ejercida por el etanol, cuando se utiliza este precursor lipogénico, es mediada en general por su transformación vía alcohol deshidrogenasa.

Cuando utilizamos serina marcada como sustrato lipogénico, se observa que el etanol *in vitro* incrementa significativamente la radiactividad asociada a los diferentes lípidos neutros y fosfolípidos, excepto a fosfatidilserina, que presenta un nivel de

incorporación más elevado, pero no significativo en presencia del etanol. De este modo, podemos indicar que por efecto del etanol *in vitro* se produce una activación en la degradación de serina hasta acetyl CoA, que es utilizado para la síntesis de diacilglicéridos y triacilglicéridos. Además, se favorece probablemente la reacción de intercambio de bases de serina con otras bases nitrogenadas de fosfolípidos endógenos, así como la descarboxilación de la fosfatidilserina sintetizada *de novo*, y la metilación posterior de fosfatidiletanolamina para formar fosfatidilcolina.

En presencia de 4-metilpirazol desaparecen los efectos producidos por el etanol *in vitro*, lo que indica que también al utilizar serina como sustrato lipogénico, la acción ejercida por el etanol es dependiente de su metabolismo vía alcohol deshidrogenasa.

Con objeto de clarificar la acción ejercida por el etanol *in vitro* sobre las rutas de Kennedy que sintetizan fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina, vía CDP-etanolamina y CDP-colina respectivamente, se han realizado incubaciones con etanolamina o colina marcadas isotópicamente, y en presencia o ausencia de etanol.

Nuestros resultados muestran que en presencia de etanol se produce una marcada disminución en la incorporación a fosfoetanolamina y CDP-etanolamina, aunque aumenta notablemente la síntesis de fosfatidiletanolamina. De este modo, podemos concluir que el etanol *in vitro* ejerce una inhibición a nivel de la etanolamina quinasa. Los niveles inferiores en CDP-etanolamina, pueden deberse a que existe menos etanolamina fosfato y por tanto se sintetiza menos CDP-etanolamina, o probablemente y debido a que los niveles de fosfoetanolamina aunque disminuidos sean saturantes para la reacción catalizada por la enzima etanolamina-fosfato citidililtransferasa, se produzca una inhibición a nivel de esta enzima. En cualquier caso, lo que está demostrado es la activación que ejerce el etanol sobre la etanolamina fosfotransferasa, lo que demuestra el incremento en la radiactividad asociada a fosfatidiletanolamina.

Por otra parte, en presencia de etanol, se produce una marcada inhibición en la formación de fosfatidilcolina a partir de fosfatidiletanolamina. Ello indica que se produce una inhibición, por efecto del etanol, de las correspondientes fosfatidiletanolamina metiltransferasas, lo cual queda patente por el menor nivel de radiactividad asociado a los diferentes metilderivados.

En presencia de 4-metilpirazol, se sigue manteniendo la inhibición en la síntesis de fosfoetanolamina, y además se observa una disminución en la formación de fosfatidiletanolamina. Los niveles de CDP-etanolamina son similares en presencia o ausencia de etanol, cuando en la incubación se encuentra presente el 4-metilpirazol. Estos resultados nos indican, que el etanol ejerce acciones específicas, independiente de su metabolismo vía alcohol deshidrogenasa, inhibiendo a nivel de la etanolamina quinasa y a nivel de la etanolamina fosfotransferasa.

Por otra parte, en presencia del inhibidor específico de la alcohol deshidrogenasa, se mantiene la inhibición en la síntesis de fosfatidilcolina a partir de fosfatidiletanolamina. De este modo, podemos indicar igualmente que el etanol inhibe específicamente a las metiltransferasas implicadas en esta vía de síntesis de fosfatidilcolina, lo cual se demuestra por la disminución observada en el marcaje de los metilderivados.

La incubación de los hepatocitos con colina marcada, en presencia o ausencia de etanol, nos proporciona información acerca del efecto que ejerce el etanol sobre la ruta de síntesis de fosfatidilcolina, vía CDP-colina. Nuestros resultados muestran que el etanol produce una marcada inhibición en la incorporación a fosfocolina y CDP-colina. Sin embargo, permanecen invariables los niveles de radiactividad asociada a fosfatidilcolina en presencia o ausencia de etanol.

Con objeto de elucidar el mecanismo por el cual el etanol produce una inhibición en la incorporación asociada a estas dos fracciones, fosfocolina y CDP-colina,

se realizaron las correspondientes incubaciones en presencia del sustrato marcado y 4-metilpirazol. Nuestros resultados muestran, que bajo estas condiciones experimentales desaparece la inhibición en la síntesis de fosfocolina y CDP-colina, y sin embargo disminuye la formación de fosfatidilcolina y aumenta el marcaje de betaína. Por ello, el etanol específicamente, por un mecanismo independiente de su metabolismo, inhibe la síntesis de fosfatidilcolina, ejerciendo una clara inhibición a nivel de la colina fosfotransferasa. Podemos indicar también que el etanol aumenta la degradación de colina, lo que se demuestra por el incremento observado en el marcaje de betaína.

## II. INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO PROLONGADO CON ETANOL SOBRE EL METABOLISMO LIPIDICO EN HEPATOCITOS DE HIGADO DE RATA

Nuestros resultados muestran que el tratamiento prolongado con etanol produce alteraciones en los niveles de ciertos parámetros bioquímicos celulares. De este modo, se ha observado que en ratas tratadas crónicamente con alcohol se produce una disminución en el contenido de colesterol total, debido fundamentalmente a un menor contenido en colesterol libre. También se han elevado significativamente los niveles en triacilglicéridos.

Los niveles incrementados en triacilglicéridos, han sugerido que determinadas enzimas implicadas en la biosíntesis de estos lípidos neutros puedan estar activadas. De este modo, se ha observado en hámster (Lamb et al., 1979) y en monos (Savolainen et al., 1984) que la administración crónica de etanol incrementa la actividad fosfatidato fosfohidrolasa. En estos últimos animales, se ha detectado además que el etanol induce una activación de la diacilglicérido aciltransferasa. Así, pues los aumentos observados en las actividades de estas dos enzimas incrementarían el potencial del hígado para sintetizar triacilglicéridos, aunque en cualquier caso la expresión de este potencial depende del aporte de sustratos al hígado (Brindley, 1984). Se considera que la fosfatidato fosfohidrolasa citosólica es metabólicamente inactiva, y que su translocación al retículo endoplasmático (Brindley, 1984) provoca que la enzima exprese su actividad. Dicha translocación es generalmente llevada a cabo por la presencia de ácidos grasos libres y de sus esteres de CoA.

El etanol incrementa la disponibilidad de precursores (ácidos grasos y glicerol) para la síntesis hepática de triacilglicéridos (Brindley, 1987). Los niveles de ácidos

grasos disponibles para la síntesis de triacilglicéridos, se pueden ver aumentados por el efecto que ejerce el etanol disminuyendo su catabolismo o incrementado la lipólisis en el tejido adiposo (Brick and Pohorecky, 1985). Además, en el metabolismo del etanol se produce acetato, que puede ser considerado como un precursor para la síntesis de ácidos grasos, hecho que ha sido comprobado por Cascales et al. (1983). Sin embargo, este proceso no es considerado cuantitativamente significativo en el acúmulo de lípidos que se produce en casos de esteatosis (Konrad and Reed, 1977).

El otro precursor para la síntesis de triacilglicéridos es el glicerol fosfato. La concentración de este compuesto se halla incrementada por el etanol como resultado de la oxidación del etanol y los cambios producidos en el estado redox (Lieber, 1974). Sin embargo, existen dudas acerca de la influencia de este sustrato en el aumento hepático de triacilglicéridos. De este modo, Dich et al. (1983) han indicado que las fluctuaciones en la concentración de glicerol fosfato no median en el efecto del etanol sobre la biosíntesis de glicerolípidos. Posteriormente, Castro et al., (1987); realizaron estudios *in vitro*, utilizando hepatocitos aislados de ratas ayunadas o alimentadas, con el objeto de analizar si el efecto activador del etanol sobre la síntesis de triacilglicéridos es dependiente de los niveles de glicerol 3-fosfato. Observaron que sólo en hepatocitos aislados de ratas que ayunaron, el aumento inducido por el etanol en la concentración de glicerol 3-fosfato es determinante para la estimulación en la síntesis de triacilglicéridos en presencia de etanol. En estas condiciones de privación de comida es importante considerar el hecho de que la actividad glicerol fosfato aciltransferasa mitocondrial hepática se encuentra disminuida (Declercq et al., 1982; Bates and Saggerson, 1979).

De todo lo indicado, podemos deducir que el incremento observado en los niveles de triacilglicéridos se debe fundamentalmente a la activación de las enzimas implicadas en su síntesis, aunque no hay que descartar la mayor disponibilidad de precursores hepáticos para la síntesis de estos compuestos lipídicos.

En el presente trabajo se han realizado estudios para analizar los efectos producidos por el tratamiento prolongado con etanol sobre las principales rutas del metabolismo lipídico. Para ello, se han incubado hepatocitos aislados de ratas controles y tratadas crónicamente con etanol con diferentes precursores lipogénicos, marcados radiactivamente, y se ha cuantificado la radiactividad asociada a las distintas fracciones de lípidos neutros y fosfolípidos.

Respecto a la incubación con glicerol, marcado isotópicamente, nuestros resultados muestran que la administración de etanol durante 31 días, produce un aumento en la incorporación de este precursor a las fracciones de lípidos neutros y fosfolípidos de hepatocitos. El incremento observado en la incorporación a diacilglicéridos y triacilglicéridos, se considera que puede ser debido a cambios en diferentes actividades enzimáticas por efecto del tratamiento prolongado con etanol. En todo caso, es importante indicar que el aporte de los sustratos necesarios para las reacciones catalizadas por estas enzimas se encuentra favorecido en esta condición experimental.

Los diacilglicéridos son además precursores para la síntesis de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina. El incremento observado en la incorporación de glicerol a fosfatidilcolina, puede ser debido a la alta concentración de diacilglicéridos observada tras el tratamiento prolongado con etanol, lo cual favorecería la ruta de síntesis de este fosfolípido, o bien puede deberse a la activación específica de determinadas enzimas implicadas en la biosíntesis de fosfatidilcolina vía CDP-colina. Será necesario diseñar experimentos posteriores para confirmar esta última hipótesis. Por otra parte, se conoce que la biosíntesis de fosfatidilinositol se lleva a cabo por una ruta diferente que no utiliza diacilglicéridos como precursores. En nuestros resultados, tras el tratamiento prolongado con etanol, observamos un incremento significativo en la incorporación de glicerol a este fosfolípido. Esto significa que el etanol puede además activar a ciertas enzimas implicadas en la biosíntesis de ácido fosfatídico, tales como glicerol fosfato aciltransferasas (lo que proporcionaría mayor concentración de precursor inicial para la

síntesis de fosfatidilinositol), o bien el etanol podría actuar sobre la actividad fosfatidato citidililtransferasa, incrementando la formación de CDP-diacilglicérido, el cual actuaría como precursor para la biosíntesis de fosfolípidos aniónicos.

Se ha observado que tras el tratamiento prolongado con etanol, se produce un incremento en la incorporación de oleato radiactivo a diacilglicéridos, triacilglicéridos y colesterol esterificado, así como a fosfatidilcolina, fosfatidilinositol y fosfatidiletanolamina. En lípidos neutros el mayor nivel de incorporación se encuentra asociado a la fracción de triacilglicéridos, mientras que en la fracción de fosfolípidos es la fosfatidilcolina la que se encuentra significativamente más marcada.

En estos experimentos, hemos de considerar el efecto producido por la mayor concentración de oleato junto a la acción que ejerce el etanol sobre la actividad de enzimas específicas implicadas en la síntesis de los diferentes lípidos neutros y fosfolípidos. De este modo, se conoce que los ácidos grasos tales como el oleato estimulan rápidamente la biosíntesis y secreción de los triacilglicéridos hepáticos. Por otra parte, el otro componente cuantitativamente más marcado tras la incubación de los hepatocitos con oleato, es la fosfatidilcolina. Feldman et al. (1980) indicaron que la forma soluble de la colina-fosfato citidililtransferasa, implicada en la biosíntesis de fosfatidilcolina, requiere de lípidos para expresar su máxima actividad. Recientemente, se han realizado estudios sobre la regulación de la biosíntesis hepática de triacilglicéridos y fosfatidilcolina, y se ha sugerido que la concentración de CDP-colina puede ser un importante regulador en el punto de ramificación en el que están situados metabólicamente los diacilglicéridos (Lamb et al., 1993). De este modo, indican que el diacilglicérido se incorpora preferentemente a fosfatidilcolina o triacilglicéridos dependiendo de la disponibilidad de CDP-colina. En nuestros ensayos, los niveles de oleato (adicionado exógenamente) son probablemente muy superiores a los de CDP-colina, ello explica la mayor incorporación observada en la fracción de triacilglicéridos respecto a la encontrada en fosfatidilcolina, así como la mayor incorporación observada en estas dos fracciones respecto a los restantes lípidos neutros y

fosfolípidos.

Además, se produce un aumento en la incorporación a diacilglicéridos, probablemente debida a la activación producida a nivel de la fosfatidato fosfohidrolasa. La mayor concentración observada en triacilglicéridos obedece también a la activación de la diacilglicérido aciltransferasa. El etanol podría ejercer una activación de la acil CoA:colesterol aciltransferasa, lo que explicaría el incremento detectado en la incorporación a colesterol esterificado (Sánchez-Amate et al., 1991).

Respecto a los fosfolípidos, en todos ellos se observa que el tratamiento prolongado con etanol aumenta la incorporación de oleato a los distintos fosfolípidos. Estos resultados indican una activación específica del remodelado de estos fosfolípidos. Puesto que el tratamiento no modifica la incorporación de ácido oleico a fosfatidilserina, se deduce que el etanol no modifica sustancialmente la correspondiente actividad aciltransferasa.

Las reacciones de intercambio de bases representan la principal ruta de biosíntesis de fosfatidilserina. Nuestros resultados demuestran como el máximo nivel de incorporación aparece en la fracción de fosfatidilserina. No obstante, el hecho de detectar radiactividad asociada a los fosfolípidos, fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina, indica que en hepatocitos de rata, en nuestras condiciones experimentales, los niveles de descarboxilación mitocondrial de fosfatidilserina, así como la metilación posterior de fosfatidiletanolamina en retículo endoplasmático, se lleva a cabo de modo eficiente. En cuanto al fosfatidilinositol, fosfolípido que se sintetiza por una ruta diferente, no aparece marcado radiactivamente.

Nuestros resultados muestran que por efecto del tratamiento prolongado con etanol incrementa la incorporación de serina marcada a los distintos fosfolípidos mencionados. Esto probablemente significa que el etanol favorece la reacción de

intercambio de bases de serina con la cabeza polar del fosfolípido fosfatidiletanolamina, y además activa la descarboxilación de fosfatidilserina (fosfatidilserina descarboxilasa) en la mitocondria y la metilación posterior de fosfatidiletanolamina por mediación de la fosfatidiletanolamina metiltransferasas microsomales.

Los lípidos neutros también aparecen marcados en incubaciones con serina radiactiva. Esto es debido a la degradación de la serina vía desaminación deshidratante que produce piruvato, el cual es transformado en acetyl-CoA, sustrato utilizado para la síntesis de ácidos grasos y colesterol. La mayor producción de ácidos grasos tras el metabolismo de la serina, junto con el aumento observado en el contenido en glicerol fosfato producido por el etanol (Brindley, 1987), originan los sustratos adecuados para la síntesis de diacilglicéridos. Por ello, se origina una mayor síntesis de lípidos neutros. De nuevo, se confirma que en hepatocitos de animales crónicamente tratados con etanol se halla favorecida la síntesis de esteres de colesterol.

Con objeto de comprobar si los efectos producidos por el etanol tras 31 días de tratamiento sobre la incorporación de serina a distintos lípidos neutros y fosfolípidos, se mantienen o por el contrario desaparecen después de 3 días de la supresión del etanol de la dieta, se realizaron las correspondientes incubaciones con serina marcada. Los resultados obtenidos, en estas condiciones, muestran que se sigue observando el incremento en la biosíntesis de diacilglicéridos y triacilglicéridos. Respecto a los fosfolípidos, se sigue apreciando también un incremento en el marcaje de fosfatidilcolina, aunque, sin embargo, se inhibe la biosíntesis de fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina.

Las incubaciones de hepatocitos con etanolamina marcada radiactivamente proporcionan el sistema más adecuado para el estudio de la ruta de Kennedy que sintetiza fosfatidiletanolamina vía CDP-etanolamina y de la vía que origina fosfatidilcolina por metilación de fosfatidiletanolamina. En nuestros experimentos se observa que el tratamiento prolongado con etanol disminuye marcadamente la incorporación de

etanolamina marcada a fosfoetanolamina y CDP-etanolamina. Sin embargo, se incrementa la síntesis de fosfatidiletanolamina y la metilación de ésta para formar fosfatidilcolina. Nuestros resultados indican que el descenso de estos intermediarios metabólicos sería atribuible a un descenso en la carga energética producido como consecuencia del tratamiento prolongado con etanol. Sin embargo, es factible que también contribuye la mayor síntesis de fosfatidiletanolamina provocada por la mayor disponibilidad de diacilglicéridos. Esto podría explicar el aumento observado en la fracción de fosfatidiletanolamina, a pesar de la menor incorporación a los dos intermediarios metabólicos de la ruta CDP-etanolamina. Por otra parte, las metiltransferasas, responsables de la formación de fosfatidilcolina a partir de fosfatidiletanolamina, se encuentran activadas debido al tratamiento prolongado con etanol. Este último resultado confirma los obtenidos por Uthus et al. (1976), quienes observaron que la administración de etanol estimulaba significativamente la actividad específica de las metiltransferasas de la ruta de biosíntesis de fosfatidilcolina en microsomas de hígado de rata.

Con objeto de comprobar si los efectos producidos por el tratamiento prolongado con etanol durante 31 días se visualizan a los 7 días de tratamiento, hemos realizado las incubaciones correspondientes con etanolamina marcada tras 7 días de tratamiento con etanol. Nuestros resultados muestran que tras este período de tiempo, aumenta significativamente la síntesis de fosfoetanolamina. Además, en este tratamiento se observa ya un marcado aumento en la síntesis de fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina. De este modo, podemos decir que los 7 días de tratamiento con etanol son suficientes para observar la activación a nivel de la etanolamina fosfotransferasa y a nivel de las metiltransferasas. Sin embargo, se requiere un tratamiento más prolongado para observar la inhibición a nivel de la etanolamina quinasa y etanolamina-fosfato citidililtransferasa. Podemos señalar que la etanolamina quinasa presenta un comportamiento diferencial, ya que a los 7 días de tratamiento se encuentra activada y a los 31 días inhibida. Probablemente, ello sea debido a que 7 días de tratamiento no son suficientes para producir un significativo descenso de la carga energética o de los niveles de ATP.

Además, se han realizado experimentos con etanolamina marcada tras la supresión del etanol en la dieta durante 3 días, después de un tratamiento prolongado durante 31 días. Nuestros resultados indican que tras la retirada del etanol, se sigue observando una ligera disminución en la incorporación a fosfoetanolamina, lo que se traduce que tras este tiempo de retirada se sigue manteniendo la inhibición de la etanolamina quinasa, aunque desaparece la inhibición ejercida a nivel de la etanolamina-fosfato citidililtransferasa, ya que se restauran los niveles de CDP-etanolamina respecto a los controles. Por otra parte, tras la supresión de etanol seguimos observando una activación, aunque de menor magnitud, a nivel de la etanolamina fosfotransferasa y de las metiltransferasas.

Las incubaciones de hepatocitos con colina marcada radiactivamente proporcionan el sistema más adecuado para el estudio de la ruta de Kennedy que sintetiza fosfatidilcolina vía CDP-colina. Nuestros resultados muestran que el tratamiento prolongado con etanol no altera los niveles de incorporación de colina a fosfocolina o CDP-colina. Sin embargo, sí disminuye significativamente la formación de betaína y la biosíntesis de fosfatidilcolina. Esto demuestra que la oxidación de colina se encuentra inhibida por el etanol. Además, es probable que el alcohol no modifique la actividad colina-fosfato citidililtransferasa, ya que no disminuyen los niveles de CDP-colina, y sin embargo, si inhiba específicamente la colina fosfotransferasa, lo que explicaría la menor formación de fosfatidilcolina.

Los resultados obtenidos sobre la incorporación de este sustrato a los diferentes intermediarios de la ruta CDP-colina, tras 7 días de tratamiento con etanol, nos indican que tras este período de tiempo, aumenta la incorporación de colina a fosfocolina, CDP-colina, y fosfatidilcolina. Es decir, nuestros resultados muestran que las enzimas implicadas en la biosíntesis de fosfatidilcolina, a través de la ruta de Kennedy, muestran un comportamiento diferencial a distintos tiempos de tratamiento. De este modo, a los 7 días podemos indicar que el alcohol ejerce activaciones a nivel de la colina quinasa, a

nivel de la colina-fosfato citidililtransferasa, y a nivel de la colina fosfotransferasa. La inhibición en la oxidación de colina es similar a los 7 y 31 días de tratamiento.

Tras la supresión del etanol de la dieta, se observa una disminución significativa en la incorporación a fosfocolina, y un aumento en la incorporación a fosfatidilcolina, de modo que la retirada de etanol se traduce en una restauración o incluso en un cambio de signo contrario en el proceso de biosíntesis de fosfatidilcolina.

### III. ESTUDIO DE ADAPTACION DE HEPATOCITOS AL ETANOL

El fenómeno de adaptación a la ingesta crónica del alcohol, o tolerancia, comprende un amplio rango de eventos fisiológicos. A nivel de las membranas celulares, la tolerancia se manifiesta como la resistencia a los desórdenes moleculares de los fosfolípidos de membrana producidos por el etanol *in vitro*. La tolerancia de membrana inducida por el etanol, así como las alteraciones lipídicas han sido ampliamente estudiadas (Taraschi and Rubin, 1985; Goldstein, 1986). La tolerancia de membrana fue descrita en sinaptosomas de cerebro (Chin and Goldstein, 1977), y posteriormente se ha definido para una gran variedad de tejidos, tales como membrana plasmática, microsomas y mitocondrias de hígado (Waring et al., 1982; Taraschi et al., 1986), y membranas de eritrocitos (Taraschi et al., 1985).

Se ha demostrado en eritrocitos, sinaptosomas y membranas celulares de hígado (Rottenberg, et al., 1981, Kelly-Murphy et al., 1984; Nie et al., 1987), que la tolerancia de membrana se acompaña por una reducción en el coeficiente de reparto del etanol y de otros compuestos lipofílicos en las membranas.

Aunque es bien conocido que, bajo ciertas condiciones experimentales se produce el fenómeno de tolerancia, los mecanismos que conducen al mismo no están bien definidos. No obstante, se ha mostrado que en microsomas de hígado, el fosfatidilinositol, y en menor grado la fosfatidilserina, pueden conferir resistencia al desorden producido por el etanol *in vitro* (Taraschi et al., 1986).

Como ya hemos comentado, tanto el tratamiento prolongado con etanol durante 31 días como el etanol *in vitro*, a concentración 100 mM, modifican específicamente determinados aspectos del metabolismo lipídico. Por lo tanto, nos ha

parecido interesante realizar un estudio comparativo de los efectos producidos por el etanol *in vitro* sobre la incorporación de diferentes sustratos metabólicos, marcados radiactivamente, a distintas fracciones lipídicas, en células de animales controles y tratados crónicamente con etanol. Con estos experimentos se pretende analizar la existencia de cambios adaptativos en el hepatocito que permitan resistir la presencia del etanol *in vitro*, de modo que puedan ser capaces de funcionar normalmente en presencia de este agente.

Las incubaciones realizadas en presencia de glicerol como sustrato lipogénico, muestran que el etanol *in vitro* produce, tanto en hepatocitos aislados de animales controles como tratados, un patente aumento en la radiactividad asociada a diacilglicéridos, triacilglicéridos, y fosfolípidos, aunque es significativamente menor en células procedentes de animales tratados crónicamente con alcohol. Estos resultados demuestran el comportamiento diferencial exhibido por ambos tipos de hepatocitos.

De lo expuesto, podemos concluir que se produce un cambio adaptativo en las células procedentes de animales tratados crónicamente con alcohol, ya que si bien estas células funcionan normalmente, la misma concentración de etanol *in vitro* produce cambios de menor magnitud a los encontrados en células aisladas de animales controles e incubadas en presencia de la misma concentración de etanol. Es probable, que se requiera una mayor concentración de etanol en el medio de incubación para conseguir los mismos efectos sobre la biosíntesis de los diferentes componentes lipídicos en células aisladas de animales tratados, que los que se observan en hepatocitos procedentes de animales controles.

Las incubaciones realizadas con ácido oleico marcado, muestran que el etanol *in vitro* produce un aumento más marcado sobre la incorporación de oleico a triacilglicéridos en células aisladas de animales tratados crónicamente con etanol. Por tanto, no se puede considerar en este caso la existencia de un cambio adaptativo, sino que por el contrario, se favorece aún más la incorporación de este ácido graso a triacilglicéridos. Hemos de indicar que en esta situación experimental los niveles de triacilglicéridos

hepáticos son cuantitativamente superiores en hepatocitos de animales tratados, y por tanto no es extraño que la magnitud de la incorporación de oleico sea igualmente superior.

Por otra parte, el etanol *in vitro* produce una inhibición, de gran magnitud, sobre la incorporación de oleico a colesterol esterificado en ambos tipos de células. De este modo, la acil-CoA:colesterol aciltransferasa que se encontraba activada tras un tratamiento prolongado con etanol, se inhibe cuando estos hepatocitos son incubados en presencia de etanol, mostrando el mismo efecto que en células aisladas de animales controles incubadas con etanol *in vitro*.

Respecto a los efectos producidos por el etanol *in vitro* sobre la incorporación de oleico a los diferentes fosfolípidos, en células aisladas de animales controles o crónicamente tratados con etanol, son similares para los diferentes fosfolípidos en ambos tipos de células. La única excepción, reside en el aumento de incorporación a fosfatidiletanolamina, significativamente más marcado por efecto del etanol *in vitro* en células aisladas de animales tratados con etanol. De este modo, podemos indicar que es el remodelado de fosfolípidos, específicamente el de la fosfatidiletanolamina, el que se activa bajo esta condición experimental.

Cuando se realizan incubaciones en presencia de serina marcada isotópicamente, se observa que el etanol *in vitro* produce un aumento significativo en la radiactividad asociada a triacilglicéridos y colesterol esterificado. Por otra parte, los incrementos producidos por el etanol *in vitro* sobre la incorporación a diacilglicéridos y triacilglicéridos, son claramente superiores en células aisladas de animales tratados crónicamente con alcohol, mientras que las magnitudes de los incrementos observados en colesterol esterificado son similares en ambos hepatocitos. Podemos indicar, que al utilizar serina como sustrato lipogénico, el etanol *in vitro* produce aumentos de mayor magnitud en la incorporación a diacilglicéridos y triacilglicéridos, en células aisladas de animales crónicamente tratados con alcohol. Estos resultados contrastan claramente con los

obtenidos cuando las incubaciones se realizan con glicerol marcado. De este modo, podemos señalar que tales discrepancias se producen por el origen de los precursores utilizados para la síntesis de diacilglicéridos y triacilglicéridos, en ambos casos. En el caso de las incubaciones realizadas con serina, probablemente se favorezca en mayor grado la degradación de este aminoácido en células aisladas de animales tratados e incubados con etanol, lo que explicaría el mayor aporte de sustratos para la biosíntesis de lípidos neutros.

Respecto a los fosfolípidos, se observa que el etanol *in vitro* ejerce un efecto diferencial sobre la incorporación a los diferentes fosfolípidos, en células aisladas de animales controles y tratados. De este modo, mientras que en células aisladas de animales tratados incrementa la incorporación a fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, pero no a fosfatidilserina, en hepatocitos aislados de animales controles el etanol *in vitro* aumenta significativamente la incorporación de radiactividad a fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina. De lo expuesto se observa la acción diferencial que el etanol *in vitro* ejerce sobre la biosíntesis de estos tres fosfolípidos en células aisladas de animales controles o tratados. El tratamiento crónico con etanol incrementa la incorporación de serina a los tres fosfolípidos mencionados, indicando una activación a nivel de las enzimas implicadas en su biosíntesis. Por otra parte, en células controles, el etanol *in vitro* aumenta la incorporación a fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina, no presentando efecto alguno sobre las actividades metiltransferasas. Sin embargo, en células aisladas de animales tratados crónicamente con etanol, la presencia de etanol no incrementa la biosíntesis de fosfatidilserina, sin embargo si se produce una activación de la fosfatidilserina descarboxilasa y metiltransferasas.

El etanol *in vitro* produce un marcado aumento en la incorporación de etanolamina a fosfatidiletanolamina y un descenso en la radiactividad asociada a fosfatidilcolina. Estas variaciones son cuantitativamente superiores en hepatocitos aislados de animales controles, lo que se traduce en un cambio adaptativo de las enzimas implicadas en la biosíntesis de estos fosfolípidos.

De los efectos producidos por el etanol *in vitro* sobre la incorporación de colina marcada isotópicamente a fosfatidilcolina, en células aisladas de animales controles y tratados crónicamente con alcohol, nuestros resultados indican que el etanol *in vitro* produce un aumento en la incorporación de colina a fosfatidilcolina, que es similar en células aisladas de animales controles y tratados crónicamente con etanol. La enzima cuantitativamente más importante en la biosíntesis de fosfatidilcolina, la colina fosfotransferasa, se encuentra inhibida tras un tratamiento prolongado con etanol, y se activa tras la incubación de estas células con etanol *in vitro*, lo que explica un comportamiento diferencial de la misma.

## **CONCLUSIONES**

1.- La incubación, en presencia de etanol, de hepatocitos aislados de rata con diferentes precursores lipogénicos, pone de manifiesto que el alcohol produce un marcado incremento en la biosíntesis *de novo* de lípidos neutros y fosfolípidos. Este efecto es dependiente del metabolismo hepático del etanol vía alcohol deshidrogenasa, puesto que en presencia de un inhibidor específico de esta enzima se restaura la actividad lipogénica.

2.- Se comprueba una acción específica del etanol sobre la síntesis *de novo* de fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina a través de la ruta de Kennedy. Concretamente el etanol inhibe marcadamente la incorporación de etanolamina y colina a los correspondientes fosfolípidos, lo que indica un efecto específico a nivel de la colina y etanolamina fosfotransferasas. Este hecho es solamente detectado cuando se inhibe el metabolismo hepático del etanol.

3.- Igualmente se demuestra que el tratamiento prolongado de etanol produce una inhibición en la incorporación de colina a fosfatidilcolina, a nivel de la colina fosfotransferasa indicando una alteración de la ruta biosintética de Kennedy.

4.- Las alteraciones metabólicas producidas como consecuencia de la suplementación prolongada de etanol favorecen marcadamente la utilización de diferentes sustratos lipogénicos. Especialmente interesante es la mayor utilización de serina para la biosíntesis de ácidos grasos que son acumulados en forma de triacilglicéridos y fosfolípidos.

5.- Como consecuencia de la suplementación prolongada de etanol, los hepatocitos adquieren una mayor capacidad para metabolizar distintos sustratos lipogénicos que la exhibida por los hepatocitos no tratados.



## **BIBLIOGRAFIA**

**BIBLIOGRAFIA**

- Akesson, B. (1978) *FEBS Lett.* **92**:177-180.
- Alemanly, S., Varela, I., and Mato, J. M. (1981) *FEBS Lett.* **135**:111-114.
- Andriamampandry, C., Massarelli, R, Freysz, L., and Kanfer, J.N. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **171**:758-763.
- Arthur, G., and Page. L. (1991) *Biochem. J.* **273**:121-125.
- Audubert, K., and Vance, D. E. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**:10695-10701.
- Baraona, E., and Lieber, C.S. (1979) *J. Lipid Res.* **20**:289-315.
- Bartlett, G.R. (1959) *J. Biol. Chem.* **234**:466-469.
- Belfrage, P., Fredrikson, G., Olsson, H., and Belfrage, P. (1983) in *Cell Function and Differentiation*, Part C(eds. G. Akoyunoglou, A.R. Evangelopoulos, J. Georgatsos, G. Pelaiologos, A. Trakatellis, and C.P. Tsiganos), Alan R. Liss, New York, p.213.
- Bates, E.J., and Saggerson, E.D. (1979) *Biochem. J.* **182**:751-762.
- Bell, R.M., and Coleman, R.A. (1980) *Annu. Rev. Biochem.* **49**:459-487.
- Billah, M.M., and Anthes, J.C. (1990) *Biochem. J.* **269**:281-291.
- Björkhem, I., and Ostlung, H. (1979) *Life Sci.* **23**:783-790.
- Bremer, J., and Greenberg, D. M. (1961) *Biochim. Biophys. Acta.* **46**:205-216.
- Brick, J., and Pohorecky, L.A. (1985) *Alcohol* **2**:261-265.

- Brindley, D. N. (1984) *Prog. Lipid Res.* **23**:115-133.
- Brindley, D.N. (1987) *TIBS* **16**:251-253.
- Brindley, D. N., and Sturton, R. G. (1982) in *Phospholipids* (Hawthorne, J. M., and Ansell, G. B., eds), pp 179-213. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.
- Butler, M., and Morell, P. (1983) *J. Neurochem.* **41**:1445-1454.
- Butterwith, S. C., Hopewell, R., and Brindley, D. N. (1984) *Biochem. J.* **220**:825-833.
- Cabot, M.C., Welsh, C.J., Zhang, Z., Cao, H., Chabbott, H., and Leibowitz, M. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* **959**:46-57.
- Camargo, C.A., Williams, P.T., Vranizan, K.M., Albers, J.J., and Wood, P.D. (1985) *JAMA* **253**:2854.
- Carlini, E., Corazzi, L., Camici, O., and Arienti, G. (1993) *Biochemistry and Molecular Biology International* **29**:821-829.
- Cascales, C., Benito, M., Cascales, M., Caldes, T., and Santon-Ruiz. (1983) *Br. J. Nutr.* **50**:549-553.
- Cascales, C., Mangiapane, E. H., and Brindley, D. N. (1984) *Biochem. J.* **219**:911-916.
- Castro, J., Maquedano, A., and Guzmán, M. (1987) *Biochemistry International* **14**:475-482.
- <sup>a</sup>Castro, J., Maquedano, A., and Guzmán, M. (1987) *Int. J. Biochem.* **19**:595-599.
- Cederbaum, A.I., Lieber, C.S., Beattie, D.S., and Rubin, E. (1975) *J. Biol. Chem.* **250**:5122-5129.
- Coleman, R.A., and Haines, E.B. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**:450-456.
- Corazzi, L., Pistolesi, R., Carlini, E., and Arienti, G. (1993) *J. Neurochem.* **60**:50-56.
- Cornell, N. W., Crow, K. E., Leadbetter, M. G., and Veech, R. L. (1979) *Alcohol and Nutrition* pp.315-330.
- Crews, F.T., Hirata, F., and Axelrod, J. (1980) *J. Neurochem.* **34**:1491-1498.
- Crow, K. (1983) *TIBS*
- Chin, J.H., and Goldstein, D.B. (1977) *Science* **196**:684-685.

- Dawson, A. G. (1983) *TIBS* **8**:195-197.
- DeCarli, L.M., and Lieber, C.S. (1967) *J. Nutr.* **91**:331-336.
- Declercq, P.E., Debeer, L.J., and Mannaerts, G.P. (1982) *Biochem. J.* **204**:247-256.
- Declercq, P.E., Haagsman, H.P., Van Veldhoven, P., Debeer, L.J., Van Golde, L.M.G., and Mannaerts, G.P. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**:9064-9075.
- Dich, J., Bro, B., Grunnet, N., Jensen, F., and Kondrup, J. (1983) *Biochem. J.* **212**:617-623.
- Donohue, T. M., Tuma, D. J., and Sorrell, M. F. (1983) *Arch. Biochem. Biophys.* **220**:239-246.
- Duhamel, G., Nalpas, B., Goldstein, S., Laplaud, P.M., Berthelot, P., and Chapman, M.J. (1984) *Hepatology* **4**:577-585.
- Estler, C.J. (1975) *Biochem. Pharmacol.* **24**:1871-1873.
- Exton, J.H. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**:1-4.
- Feierman, D. E., and Cederbaum, A. I. (1985) *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **9**:421-428.
- Feldman, D. A., Dietrich, J. W., and Weinhold, P. A. (1980) *Biochim. Biophys. Acta.* **620**:603-611.
- Feldman, D. A., Rounsifer, M. E., and Weinhold, P. A. (1985) *Biochim. Biophys. Acta.* **833**:429-437.
- Fiske, G.H., and Subbarow, Y.L. (1925) *J. Biol. Chem.* **65**:375-400.
- Folch, J., Lees, B., Sloane-Stanley, G.Y. (1957) *J. Biol. Chem.* **226**:497.
- Goldberg, D. M., Roomi, M. W., Yu, A., and Roncari, D. A. K. (1981) *Biochem. J.* **196**:337-346.
- Goldstein, D.B: (1986) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **492**:103-111.
- González, R.A., and Crews, F.T. (1991) *Alcohol* **8**:131-136.
- Grillone, L.R., Clark, M.A., Godfrey, R.W., Stassen, F., and Crooke, S.T. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**:2658-2663.

- Grunnet, N., and Kondrup, J. (1983) *Pharmacol. Biochem. Behav.* (Suppl.1):245-250.
- Grunnet, N., and Kondrup, J. (1986) *Alcohol Clin. Exp. Res.* **10**:64S-68S.
- Guzmán, M., Castro, J., and Maquedano, A. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **149**:443-448.
- Guzmán, M., and Geelen, M.J.H. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **154**:682-687.
- Gwynne, J.T. (1989) *Am. J. Cardiol.* **64**:10G-17G.
- Haagsman, H.P., Van den Heuvel, J. M., Van Golde, L. M. G., and Geelen, M. J. H. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**:11273-11278.
- Haagsman, H.P., and Van Golde, L.M.G. (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* **208**:395-402.
- Hajra, A.K., and Bishop, J.E. (1982) *Ann. NY Acad. Sci.* **386**:170-182.
- Harwood, J.L. (1985) in *Encyclopedia of Plant Physiology* (eds. D.Day and R. Douce), Springer-Verlag, Berlin, **9**:37.
- Hatch, G. M., Lam, T. S., Tsukitani, Y., and Vance, D. E. (1990) *Biochim. Biophys. Acta.* **1042**:374-379.
- Hatch, G. M., Tsukitani, Y., and Vance, D. E. (1991) *Biochim. Biophys. Acta.* **1081**:25-32.
- Higgins, J. A. (1987) in *Biological Membranes. A Practical Approach* (ed. W.H. Evan) Findlay J.B.C. **1**:103-137.
- Higgins, J. A., and Fieldsend, J. K. (1984) *J. Lipid. Res.* **28**:268-278.
- Hjelmstad, R.H., and Bell, R.M. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**:3909-3917.
- Hoberman, H.D. (1980) *Adv. Exp. Med. Biol.* **132**:265-273.
- Hoek, J.B., Rubin, R., and Thomas, A.P. (1988) *Biochem. J.* **251**:865-871.
- Hoek, J.B., Thomas, A.P., Rubin, R., and Rubin, R. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**:682-691.
- Hoerner, M., Behrens, U. J., Worner, T., and Lieber, C. S. (1986) *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **54**:3-12.
- Hoffman, D.R., and Cornatzer, W.E. (1981) *Lipids* **16**:533-540.

- Holtzman, J.L., and Gillete, J.R. (1968) *J. Biol. Chem.* **243**:3020.
- Hopowell, R., Martín-Sanz, P., Martín, A., Saxton, J., and Brindley, D. N. (1985) *Biochem. J.* **232**:485-491.
- Hosaka, K., and Yamashita, S. (1987) *Eur. J. Biochem.* **162**:7-13.
- Houweling, M., Tijburg, L.B.M., Vaartjes, W.J., and Van Golde, L.M.G. (1992) *Biochem. J.* **283**:55-61.
- Hu, Z., Sun, G. Y., Rhodes, P. G. (1992) *Alcohol Clin. Exp. Res.* **16**: 432-435.
- Hsu, L. C., Tani, K., Fujiyoshi, K., Kurachi, K., and Yoshida, A. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**:3771-3775.
- Ide, A., and Nakazawa, Y. (1987) *Biochem. Pharmacol.* **36**:2443-2448.
- Infante J. P. (1977) *Biochem. J.* **167**:847-849.
- Infante J. P., and Huszagh, V. A. (1987) *Trends Biochem. Sci.* **12**,131-133.
- Iseri, O. A., Gottlieb, L. S., and Lieber, C. S. (1964) *Fed Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **23**:579.
- Iseri, O.A., Lieber, C.S., and Gottlieb, L.S. (1966) *Am. J. Pathol.* **48**:535.
- Ishidate, K., Furusawa, K., and Nakazawa, Y. (1985) *Biochim. Biophys. Acta.* **836**:s119-124.
- Ishidate, K., Nakagomi, K., and Nakazawa, Y. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**:14706-14710.
- Israel, Y., Hurwitz, E., Niemela, O., and Amon, R. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**:7923-7927.
- Jensen, R.G. (1971) *Prog. Chem. Fats Other Lipids* **11**:347.
- Jones, C.L., and Hajra, A.K. (1983) *Arch. Biochem. Biophys.* **226**:155-165.
- Joseph, S.K., Thomas, A.P., Williams, R.J., Irvine, R.F., and Williamson, J.R. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**:3077-3081.
- Juliá, P., Farrés, J., and Parés, X. (1987) *Eur. J. Biochem.* **162**:179-189.
- Kanfer, J.N. (1972) *J. Lipid Res.* **13**:468-476.

- Kanfer, J.N. (1980) *Can. J. Biochem.* **58**:1370-1380.
- Kanoh, H., and Ohno, K. (1976) *Eur. J. Biochem.* **66**:201-210.
- Kato, S., Alderman, J., and Lieber, C. S. (1987) *Alcohol and Alcoholism* **1**:231-234.
- Kelly-Murphy, S., Waring, A., Rottenberg, H., and Rubin, E. (1984) *Lab. Invest.* **50**:174-183.
- Kennedy, E.P. (1986) in *Lipids and Membranes: Past, Present and Future* (Op den Kamp, J.A.F., Roelofsen, B., and Wirtz, K.W.A., eds.) pp.171-206. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Kennedy, E. P. and Weis, S. B. (1956) *J. Biol. Chem.* **222**,193-214.
- Kinnard, F. W., Nelson, G. H., and Hay, M. G. (1956) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **92**:772-773.
- Kirk, C.J., Creba, J.A., Downes, C.P., and Michell, R.H. (1981) *Biochem. Soc. Trans.* **9**:377-379.
- Kiss, Z., and Anderson, W.B. (1989) *FEBS Lett.* **257**:45-48.
- Konrad, K.D., and Reed, C.B: (1977) *Exp. Mol. Pathol.* **26**:425-433.
- Koop, D. R., Crump, B. L., Nordblom, G. D., and Coon, M. J. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**:4065-4069.
- Koop, D. R., Morgan, E. T., Tarr, G. E., and Coon, M. J. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**:8472-8480.
- Kubota, S., Lasker, J. M., and Lieber, C. S. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **150**:304-310.
- Kuge, O., Nishijima, M., and Akamatsu, Y. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:1926-1933.
- Kuge, O., Nishijima, M., and Akamatsu, Y. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**:5790-5794.
- Lamb, R.G., Wood, C.K., and Fallon, H.J. (1979) *J. Clin. Invest.* **63**:14-20.
- Lamb, R.G., Koch, J.C., and Bush, S.R: (1993) *Biochem. Biophys. Acta* **1165**:299-305.
- Lane, B. P., and Lieber, C. S. (1966) *Am. J. Pathol.* **49**:593-603.

- Lefevre, A.F., DeCarli, L.M., and Lieber, C.S. (1972) *J. Lipid Res.* **13**:48-55.
- Li, T. K., and Theorell, H. (1969) *Acta Chem. Scand.* **23**:892-902.
- Lichtenstein, A.H., and Brecher, P. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**:9098-9104.
- Lieber, C.S. (1974) *Lipids* **9**:103-116.
- Lieber, C. S. (1982) in *Medical Disorders of Alcoholism* Lieber, C. S. (ed) pp.1-65.
- Lieber, C. S., and DeCarli, L. M. (1968) *Science* **162**:917-918.
- Lieber, C. S., and DeCarli, L. M. (1970) *J. Biol. Chem.* **245**:2505-2512.
- <sup>a</sup>Lieber, C.S., and DeCarli, L.M. (1970) *Am. J. Clin. Nutr.* **23**:474-478.
- Lieber, C.S.; Lefevre, A.F., Spritz, N., Feinman, L., and De Carli, L.M. (1967) *J. Clin. Invest.* **46**:1451-1460.
- Lieber, C.S., and Savolainen, M. (1984) *Alcohol Clin. Exp. Res.* **8**:409-423.
- Lieber, C.S., Spritz, N., and De Carli, L.M.. (1966) *J. Clin. Invest.* **45**:51-62.
- Lim, P., Cornell, R., and Vance, D. E. (1986) *Biochem. Cell Biol.* **64**:692-698.
- Liscovitch, M. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**:1450-1456.
- Lynch, C.J., Blackmore, P.F., Charest, R.C., and Exton, J.H. (1985) *Mol. Pharmacol.* **28**:93-99.
- Magruder, J.D., Waid-Jones, M., and Reitz, R.C. (1984) *Mol. Pharmacol.* **27**:256-262.
- Mangiapane, E.H., and Brindley, D.N. (1986) *Biochem. J.* **233**:151-160.
- Marino, A., Salgado, E., Trueba, M., and Macarulla, J.M. (1986) *Comp. Biochem. Physiol.* **85B**:795-803.
- Martin, A., Hales, P., and Brindley, D.N. (1987) *Biochem. J.* **245**:347-355.
- Martin, A., Hopewell, R., Martin-Sanz, P., Morgan, J.E., and Brindley, D.N. (1986) *Biochim. Biophys. Acta.* **876**:581-591.
- Martin, T.W., and Michaelis, K. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**:8847-8856.

- Martin-Sanz, P., Hopewell, R., and Brindley, D.N. (1985) *FEBS Lett.* **179**:262-266.
- Maruyama, S., Muruwaki, Y., and Hirayama, C. (1986) *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **53**:3-21.
- Matsuzaki, S., and Lieber, C. S. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **75**:1059-1065.
- Mauch, T. K., Donohue, T. M., Zetterman, R. JK., Sorrell, M. F., and Tuma, D. J. (1986) *Hepatology* **6**:263-269.
- Mayorek, N., and Bar-Tana, J. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**:6528-6532.
- Mayorek, N., and Bar-Tana, J. (1987) in *Abstracts of the 28th International Conference on the Biochemistry of Lipids* (Nottingham), B5.
- Meier-Tackmann, D., Korenke, G. C., Agarwal, D. P., and Goedde, H. W. (1988) *Alcohol* **5**:73-80.
- Mendenhall, C.L. (1972) *J. Lipid Res.* **13**:177-183.
- Merida, I., and Mato, J. M. (1987) *Biochim. Biophys. Acta.* **928**:92-97.
- Mezey, E. (1981) *Pharmacol. Ther.* **14**:411-430.
- Mezey, E., Potter, J. J., and Maddrey, W. C. (1973) *Gastroenterology* **65**:560.
- Miller, M.A., and Kent, C. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**:9753-9761.
- Miller, S.S., Goldman, M.E., Erickson, C.K., and Shorey, R.L. (1980) *Psychopharmacology* **68**:55-59.
- Miwa, G. T., Levin, W., Thomas, P. E., and Lu, A. Y. H. (1978) *Arch. Biochem. Biophys.* **187**:464-475.
- Morash, S.C., Cook, H.W., and Spence, M.W. (1988) *Biochim. Biophys. Acta.* **961**:129-138.
- Morash, S.C., Cook, H.W., and Spence, M.W. (1989) *Biochim. Biophys. Acta.* **1004**:221-229.
- Mori, H., Morikawa, S., Taniguchi, S., Fujii, K., Fujiwara, M., and Hosaka, K. (1989) *Biochim. Biophys. Acta.* **1003**:98-107.
- Mulligan, J.J., Cluette-Brown, J.E., Noring, R., Igoe, F.D., Chong, J., and Hojnacki, J.L.

- (1985) *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **47**:181-202.
- Nelson, G. H., Kinnard, F. W., Aull, J. C., and Hay, M. G. (1957) *Q. J. Stud. Alc.* **18**:343-348.
- Nhamburo, P.T., John, G.R., and Littleton, J. (1982) *Biochem. Pharmacol.* **31**:3936-3938.
- Nie, Y., Stubbs, C.D., and Rubin E. (1987) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **492**:210-211.
- Nimmo, H.G. (1979) *Biochem. J.* **177**:283-288.
- Nishijima, M., Kuge, O., Maeda, M., Nakano, A., and Akamatsu, Y. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**:7101-7108.
- Nishizuka, Y. (1986) *Science* **233**:305-312.
- Nomura, F., and Lieber, C. S. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **100**:131-137.
- O'Doherty, P.J.A. (1978) in *Fatty Acids and Glycerides* (ed. A. Kuksis), Plenum Press, New York, p.289.
- Ohnishi, K., and Lieber, C. S. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**:7124-7131.
- Ontko, J.A. (1973) *J. Lipid Res.* **14**:78-86.
- Oshino, N., Chance, B., Sies, H., and Bücher, T. (1973) *Arch. Biochem. Biophys.* **154**:117-131.
- Pelech, S. L., Pritchard, P. H., Sommerman, E.F., Percival-Smith, A., and Vance, D.E: (1984) *Can. J. Biochem. Cell Biol.* **62**:196-202.
- Pelech, S. L., Pritchard, P. H., and Vance, D. E. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**:8283-8286.
- Pelech, S. L., Pritchard, P. H., and Vance, D. E. (1982) *Biochim. Biophys. Acta.* **713**:260-269.
- Pelech, S. L., and Vance, D. E. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**,14198-14202.
- Pelech, S. L., and Vance, D. E. (1984) *Biochim. Biophys. Acta.* **779**:217-251.
- Pittner, R.A., and Fain, J.N. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1133**:316-320..
- Pittner, R.A., Fears, R., and Brindley, D.N. (1985) *Biochem. J.* **225**:455-462.

- Pohorecky, L.A. (1984) *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **8**:500-504.
- Polokoff, M.A., Simon, T.J., Harris, R.A., and Simon, F.R. (1985) *Biochemistry* **24**:3114-31200.
- Polokoff, M. A., Wing, D. C., and Raetz, C. R. H. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**:7687-7690.
- Pollard, A.D., and Brindley, D.N. (1984) *Biochem. J.* **217**:461-469.
- Ponnappa, B.C., Waring, A.J., Hoek, J.B., Rottenberg, H., and Rubin, E. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**:10141-10146.
- Porter, T. J., and Kent, C. (1988) *J. Cell. Biol.* **107**,426A.
- Pritchard, P. H., Pelech, S. L., and Vance, D. E. (1981) *Biochim. Biophys. Acta.* **666**:301-306.
- Reynier, M. (1969) *Acta Chem. Scand.* **23**:1119-1129.
- Ridgway, N. D., Yao, Z., and Vance, D.E. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**:1203-1207.
- Rottenberg, H., Waring, A., and Rubin, E. (1981) *Science* **213**:583-585.
- Rubin, E., Thomas, A.P., and Hoek, J.B. (1988) *Arch. Biochem. Biophys.* **256**:29-38.
- Rüstow, B., and Künze, D: (1987) *Biochim. Biophys. Acta.* **921**:552-558.
- Sabesin, S.M. (1981) *Circulation* **64**, Suppl.3:72-84.
- Saggerson, E.D. (1986) *Biochem. Soc. Trans.* 679-681.
- Salaspuro, M., and Lindros, K. O. (1985) in *Alcohol related diseases in gastroenterology*, Seitz, H. K. and Kommerell, B.(eds.) pp:106-123
- Salerno, D.M., and Beeler, D.A. (1973) *Biochim. Biophys. Acta.* **326**:814-822.
- Sánchez-Amate, M.C., Zurera, J.M., Carrasco, M.P., Segovia, J.L., and Marco, C. (1991) *FEBS Letters* **293**:215-218.
- Sane, T., Nikkilä, E.A., Taskinen, M.R., Välimäki, M., and Ylikahri, R. (1984) *Atherosclerosis* **53**:185.
- Sanghera, J. S., and Vance, D. E. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**:1215-1223.

- Savolainen, M.J. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **75**:511-518..
- Savolainen, M.J., Baraona, E., Pikkarainen, P., and Lieber, C.S. (1984) *J. Lipid Res.* **25**:813-820.
- Savolainen, M.J., and Hassinen, T.E. (1978) *Biochem. J.* **176**:885-892.
- Savolainen, M.J., and Hassinen, T.E. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.* **201**:640-645.
- Seglen, P.O. (1976) *Methods Cell Biol.* **13**:29-83.
- Schneider, W. J., and Vance, D. E. (1978) *Eur. J. Biochem.* **85**:181-187.
- Shigeta, Y., Nomura, F., Iida, S., Leo, M. A., and Felder, M. R. (1984). *Biochem. Pharmacol.* **33**:807-814.
- Siddiqui, R.A., and Exton, J.H. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**:5755-5761.
- Sleight, R., and Kent, C. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**:10644-10650.
- Smith, T.L., Vichers, A.E., Brendel, K., and Yamamura, H.I. (1983) *Biochem. Pharmacol.* **32**:3059-3063.
- Stevens, V. J., Fantl, W. J., and DNewman, C. B. (1981) *J. Clin. Invest.* **67**:361-369.
- Stremmel, W., and Berk, P.D. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:3086-3090.
- Strum-odin, R., Adkins-Findke, B., Blake, W. L., Phinney, S. D., and Clarke, S. D. (1987) *Biochim. Biophys. Acta.* **921**:378-391.
- Sundler, R., and Akesson, B. (1975) *J. Biol. Chem.* **250**:3359-3367.
- Sundler, R., and Akesson, B., and Nilsson, A. (1974) *J. Biol. Chem.* **249**:5102-5107.
- \*Sundler, R., and Akesson, B., and Nilsson, A. (1974) *FEBS Lett.* **43**:303-307.
- Tadokoro, K., Ishidate, K., and Nakazawa, Y. (1985) *Biochim. Biophys. Acta.* **835**:501-513.
- Tagaki, T., Alderman, J., Gellert, J. and Lieber, C. S. (1986) *Biochem. Pharmac.* **35**:3601-3606.
- Tagaki, T., Alderman, J., and Lieber, C. S. (1985) *Alcohol* **2**:9-12

- Taraschi, T.F., Ellingson, J.S., Wu, A., Zimmerman, R.F., and Rubin, E. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:9398-9402.
- Taraschi, T.F., and Rubin, E. (1985) *Lab. Invest.* **52**:120-131.
- Taraschi, T.F., Wu, A., and Rubin, E. (1985) *Biochemistry* **24**:7096-7101.
- Taskinen, M.R., Välimäki, M., Nikkilä, E.A., Kuusi, T., Ehnholm, C., Ylikahri, R. (1982) *Metabolism* **31**:1168.
- Taskinen, M.R., Välimäki, M., Nikkilä, E.A., Kuusi, T., Ylikahri, R. (1985) *Metabolism* **34**:112.
- Teschke, R., Hasumura, Y., Joly, J-G., Ishii, H., and Lieber, C. S. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **49**:1187-1193.
- Teschke, R., Hasumura, Y., and Lieber, C. S. (1974) *Arch. Biochem. Biophys.* **163**:404-415.
- Theorell, H., and Yonetani, T. (1969) *Acta Chem. Scand.* **23**:255-260.
- Thomas, P. E., Bandiera, S., Maines, S. L., Ryan, D. E., and Levin, W. (1987) *Biochemistry* **26**:2280-2289.
- Thomas, A.P., Hoek, J.B., Rubin, R., and Rubin, E. (1989) in *Cell Calcium Metabolism* (ed. G. Fiskum) Plenum, New York, pp.169-177.
- Thomas, A.P., Marks, J.S., Coll, K.E., and Williamson, J.R.: (1983) *J. Biol. Chem.* **258**:5716-5725.
- Thompson, G.A. Jr., and Martin, C.E. (1984) in *Physiology of Membrane Fluidity* (ed. Meir Shinitzky) CRC Press. Boca Raton, Florida. Vol I, pp.99-109.
- Thurman, R. G., and Handler, J. A. (1989) *Drug Metabolism Reviews* **20**:679-688.
- \*Tijburg, L.B.M., Houweling, M., Geelen, M.J.H., and Van Golde, L.M.G. (1987) *Biochim. Biophys. Acta.* **922**:184-190.
- \*Tijburg, L.B.M., Houweling, M., Geelen, M.J.H., and Van Golde, L.M.G. (1988) *Biochim. Biophys. Acta.* **959**:1-8.
- Tijburg, L.B.M., Houweling, M., Geelen, M.J.H., and Van Golde, L.M.G. (1989) *Biochem. J.* **257**:645-650.

- Tijburg, L. B. M., Maquedano, A., Guzmán, and Geelen, M. J. H. (1988) *Arch. Biochem. Biophys.* **267**:568-579.
- Tijburg, L. B. M., Nishimaki-Mogami, T., and Vance, D.E. (1991) *Biochim. Biophys. Acta.* **1085**:167-177.
- Tijburg, L. B. M., and Vance, D.E. (1991) *Biochim. Biophys. Acta.* **1085**:178-183.
- Tijburg, L. B. M., Schuurmans, E. A. J. M., Geelen, M. J. H., and Van Golde, L. M. G. (1987) *Biochim. Biophys. Acta.* **919**:49-57.
- Titov, V.N., and Pitsin, D.G. (1978) *Biokhimiya* **43**:476-487.
- Tuma, D. J., Jennett, R. B., and Sorrell, M. F. (1987) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **492**:277-286.
- Uhing, R.J., Prpic, V., Jiang, J., and Exton, J.H. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**:2140-2146.
- Uthus, E.O., Skurdal, D.N., and Cornatzer, W.E. (1976) *Lipids* **11**:641-644.
- Vallee, B. L., and Bazzone, T. J. (1983) *Isozymes; Curr. Top. Biol. Med. Res.* **8**:219-244.
- Van den Bosch, H., Aarsman, A.J., Slotboom, A.J., and Van Deenen, L.L.M. (1968) *Biochim. Biophys. Acta.* **164**:215.
- Van Golde, L. M. G., Fleischer, B., and Fleischer S. (1971) *Biochim. Biophys. Acta.* **249**:318-330.
- Van Veldhoven, P., and Mannaerts, G.P. (1985) *Biochem. J.* **227**:737-741.
- Vance, J.E. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**:89-97.
- Vance, D.E., and Kruijft, B. (1980) *Nature* **288**:277-278.
- Vance, D. E., and Pelech, S. L. (1984) *Trends Biochem. Sci.* **9**:17-20.
- Vance, D. E., Pelech, S. D., and Choy, P.C. (1981) in *Methods in Enzymology* (ed. J.M. Lowenstein) Academic Press Inc. **71**:576-581.
- Vance, J. E., and Vance, D. E. (1986) *FEBS Lett.* **204**:243-246.
- Vance, J. E., and Vance, D. E. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**:5898-5909.
- Vecchini, A., Roberti, R., Freysz, L., and Binaglia, L. (1987) *Biochim. Biophys. Acta.*

- 918:40-47.
- Veech, R. L., Guynn, R., and Veloso, D. (1972) *Biochem. J.* **127**:387-397.
- Veldhuizen, R.A.W., Thompson, W., and Possmayer, F. (1991) *Biochim. Biophys. Acta.* **1083**:211-216.
- Voelker, D.R. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 2669-2673.
- Voelker, D.R. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**:14671-114676.
- Voelker, D.R. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**:8019-8025.
- <sup>a</sup>Voelker, D.R. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**:9921-9925.
- Voelker, D.R., and Frazier, J.L. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**:1002-1008.
- Von Wartburg, J. P., and Bühler, R. (1984) *Laboratory Investigation* **50**/1:5-15.
- Waite, M. (1987) in *The Phospholipases* pp.1-332. Plenum Press, New York.
- Wang, X., and Moore, T.S.Jr. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**:19981-19987.
- Warden, C. H., and Friedkin, M. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**:6006-6011.
- Waring, A.J., Rottenberg, H., Ohnishi, T., and Rubin, E. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:2582-2586.
- Weidman, S.W., Ragland, J.B., and Sabesin, S.M. (1982) *J. Lipid Res.* **23**:556-569.
- Weiner, H., and Flynn, T.G., (eds.) (1989) in *Nomenclature of mamalian aldehyde deshidrogenase*. pp:xix-xxi.
- Weinhold, P. A., Charles, L. G., and Feldman, D. A. (1991) *Biochim. Biophys. Acta.* **1086**:57-62.
- Whitlon, D. S., Anderson, K. E., Mueller, G. C. (1985) *Biochim. Biophys. Acta.* **835**:367-377.
- Wilson, J. E. (1978) *Trends Biochem. Sci.* **3**:124-125.
- Williamson, D. H., Lund, P., and Krebs, H. A. (1967) *Biochem. J.* **103**:514-526.
- Wood, C.K., and Lamb, R.G. (1979) *Biochim. Biophys. Acta.* **572**:121-131.

Wrighton, S. A., Thomas, P. E., Molowa, D. T., Haniu, M., Shively, J. E., Maines, S. L., Watkins, P. B., Parker, G., Méndez-Picón, G., Levin, W., and Guzelian, P. S. (1986) *Biochemistry* **25**:6731-6735.

Yamada, K., and Okuyama, H. (1978) *Arch. Biochem. Biophys.* **190**:409-420.

Yao, Z., and Vance, D.E. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**:2998-3004.

Yorek, M. A., Dunlap, J. A., Spector, A.A., and Ginsberg, B. H. (1986) *J. Lipids. Res.* **27**:1205-1213.

Yorek, M. A., Rosario, R. T., Dudley, d. T., and Spector, A. A. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**:2930-2936.

Zeisel, S. H., Story, D. L., Wurtman, R. J. and Brunengraber, H. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**:4417-4419.

Zelinski, T. A., and Choy, P. C. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**:13201-13204.

Zimmerman, J., Gati, I., Eisenberg, S., and Rachmilewitz, D. (1986) *J. Lab. Clin. Med.* **107**:498-501.

Zysset, T., Polokoff, T.A., and Simon, F.R. (1985) *Hepatology* **5**:531-537.

