

46/28

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
Facultad de Ciencias  
Fecha 10-6-2002  
ENTRADA NUM. 1994

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**  
**Y BIOLOGÍA MOLECULAR**



UNIVERSIDAD DE GRANADA  
**28 MAYO 2002**  
COMISION DE DOCTORADO

**TESIS DOCTORAL**  
**METABOLISMO LIPÍDICO EN**  
**CÉLULAS DE HEPATOMA HUMANO HepG2.**  
**ALTERACIONES INDUCIDAS POR ETANOL**  
**Y HEXADECILFOSFOCOLINA**

**BIBLIOTECA UNIVERSITARIA**  
**GRANADA**  
Nº Documento 61337975  
Nº Copia 1559565

**José Manuel Jiménez López**  
**2002**



**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

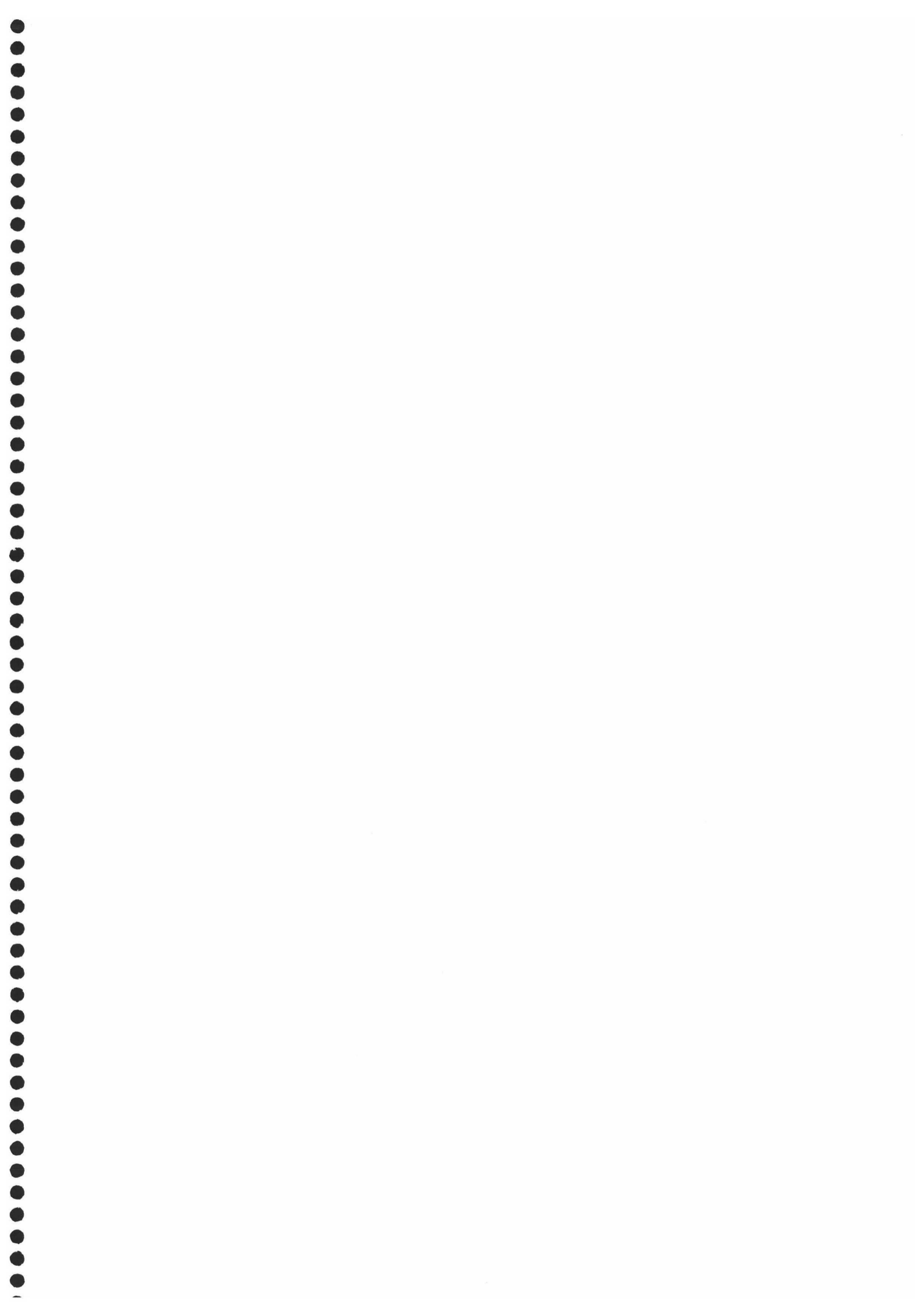
**D. José Antonio Gómez Capilla**, Catedrático y Director del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Granada,

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada “**METABOLISMO LIPÍDICO EN CÉLULAS DE HEPATOMA HUMANO HepG2. ALTERACIONES INDUCIDAS POR ETANOL Y HEXADECILFOSFOCOLINA**” ha sido realizada por D. José Manuel Jiménez López, bajo la dirección y supervisión de las Dras. D<sup>a</sup>. Josefa Liboria Segovia Parra y D<sup>a</sup>. Carmen Marco de la Calle, y que el Departamento ha dado su conformidad para que ésta sea presentada ante la Comisión de Doctorado.

En Granada, a 27 de Mayo de 2002

Fdo.: José Antonio Gómez Capilla



**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

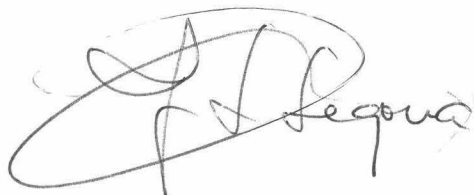
**D<sup>a</sup>. Josefa Liboria Segovia Parra**, Catedrática del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Granada y

**D<sup>a</sup>. Carmen Marco de la Calle**, Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Granada,

CERTIFICAN:

Que el trabajo que se expone en la memoria de Tesis Doctoral titulada “**METABOLISMO LIPÍDICO EN CÉLULAS DE HEPATOMA HUMANO HepG2. ALTERACIONES INDUCIDAS POR ETANOL Y HEXADECILFOSFOCOLINA**” ha sido realizado por D. José Manuel Jiménez López en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Granada, correspondiendo fielmente a los resultados obtenidos. La presente Memoria ha sido revisada por nosotras, encontrándola conforme para su presentación y de este modo aspirar al grado de Doctor en Ciencias Químicas por el Tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones legalmente vigentes, a los efectos oportunos.

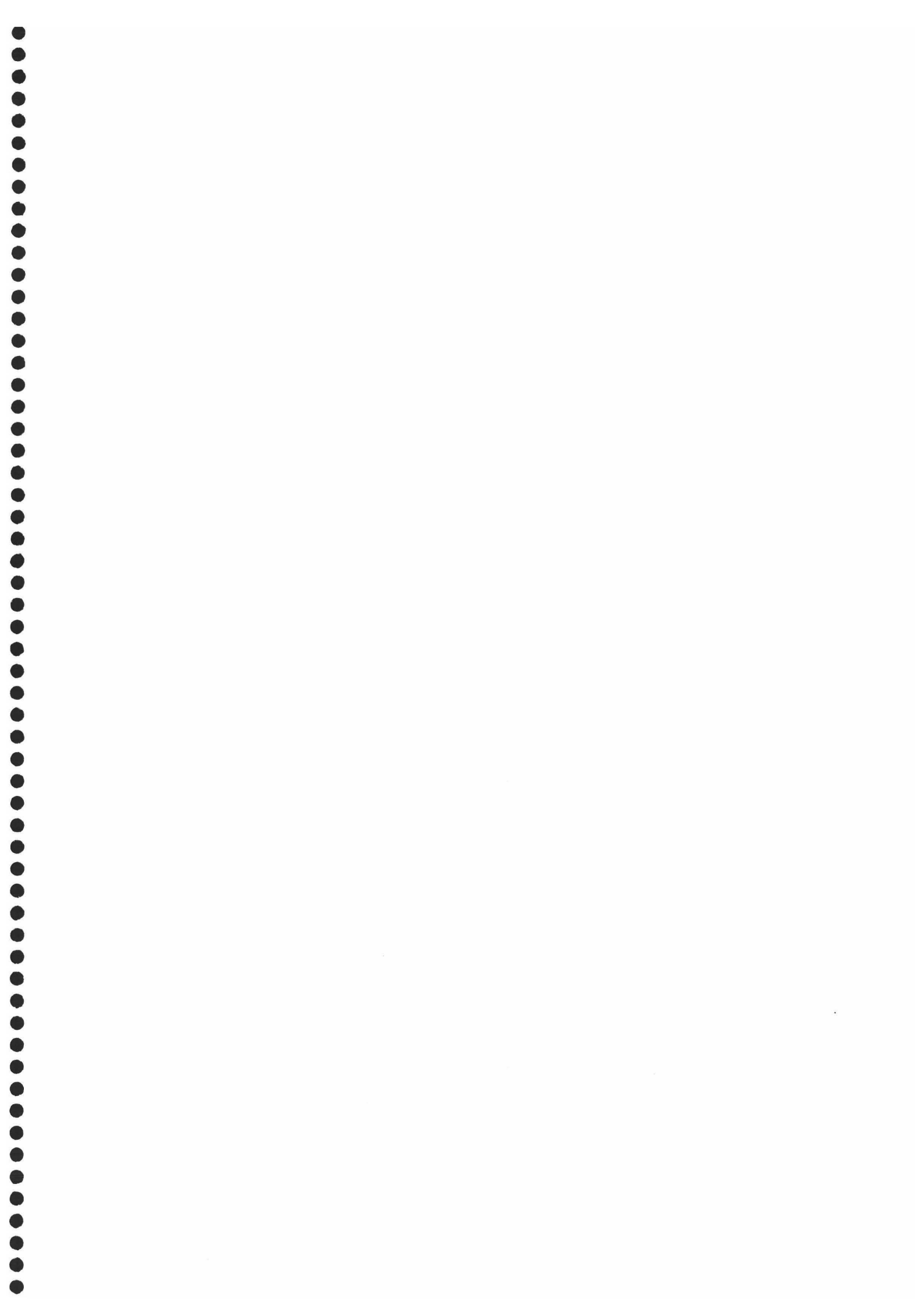


Fdo.: Josefa Liboria Segovia Parra

En Granada, a 27 de Mayo de 2002



Fdo.: Carmen Marco de la Calle



Expreso mi más sincero agradecimiento a las directoras de este trabajo, Dra. Josefa L. Segovia Parra y Dra. Carmen Marco de la Calle, por su constante apoyo y orientación en la realización de los estudios que constituyen la presente Memoria.

Deseo manifestar una enorme gratitud hacia aquellas personas que me aportaron sus conocimientos para completar mi formación científica. En especial, al Dr. Alfredo Berzal Herranz, así como a mis profesores durante los estudios de Licenciatura y Doctorado.

Quisiera otorgar, además, un recuerdo muy grato a quienes me han ofrecido su amistad y ayuda dentro del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias, especialmente a la Dra. M<sup>a</sup> Paz Carrasco Jiménez y al Dr. Andrés S. Soler González, y a los demás compañeros.





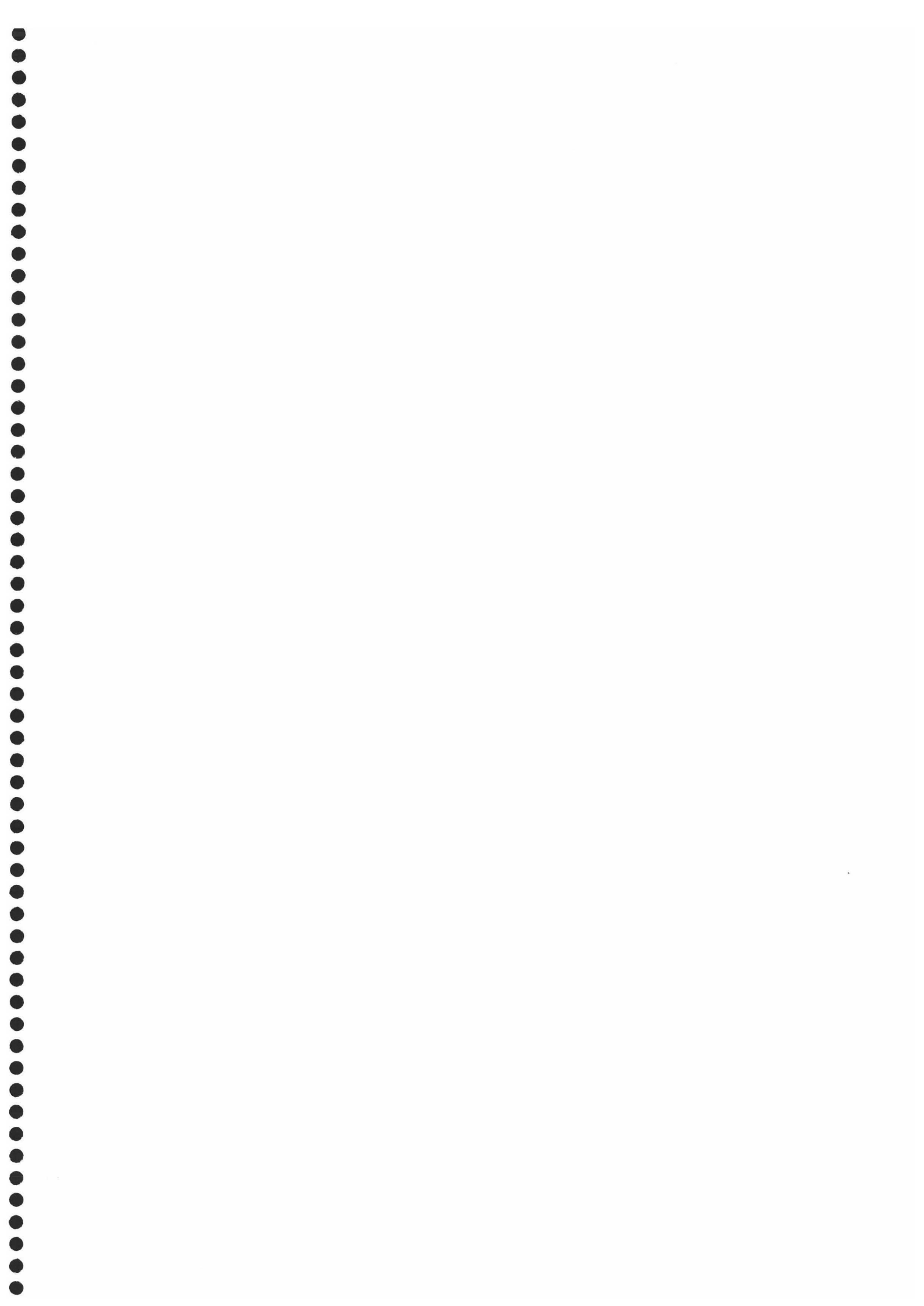


A mis padres, Ana y Máximo

A mi hermano, Alejandro

A mi novia, Tania

A mis amigos



**METABOLISMO LIPÍDICO EN CÉLULAS DE HEPATOMA HUMANO HEPG2.  
ALTERACIONES INDUCIDAS POR ETANOL Y HEXADECILFOSFOCOLINA**

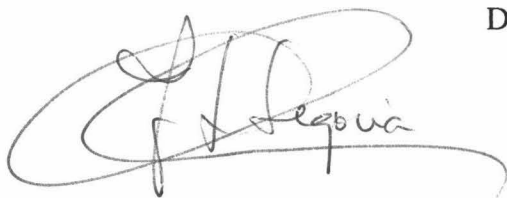
Memoria que presenta el Licenciado en Ciencias Químicas  
**D. José Manuel Jiménez López** para optar al grado de Doctor.



Fdo.: José Manuel Jiménez López

VºBº

DIRECTORES DE TRABAJO



Fdo.: Josefa Liboria Segovia Parra

Dra. en Ciencias Químicas

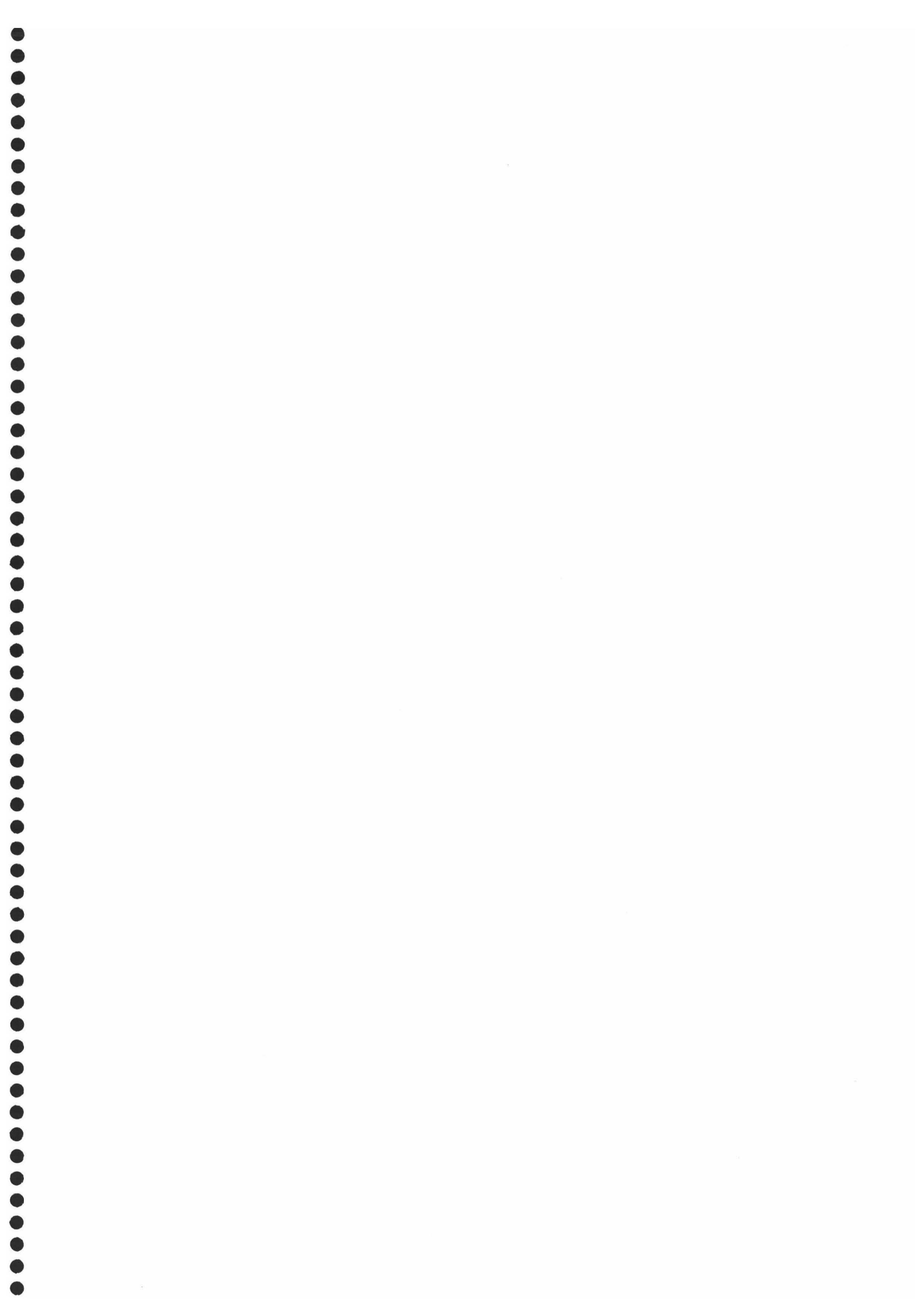
Catedrática del Dpto. de Bioquímica y  
Biología Molecular de la Universidad  
de Granada



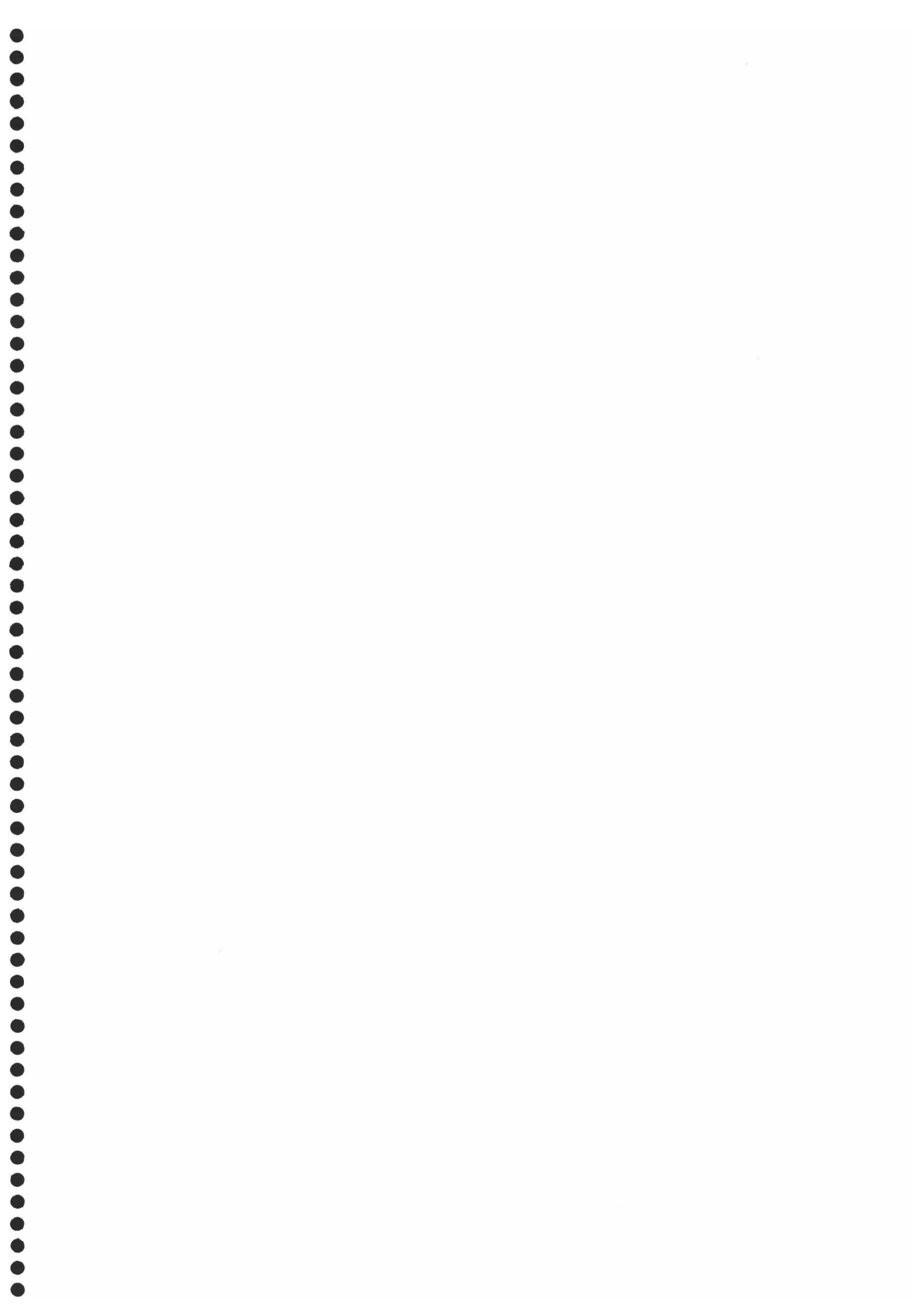
Fdo.: Carmen Marco de la Calle

Dra. en Ciencias Biológicas

Profesora Titular del Dpto. de Bioquímica y  
Biología Molecular 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, siendo financiada con cargo al proyecto PM97-0179 de la DGES.



### **PUBLICACIONES:**

Jimenez-Lopez JM, Carrasco MP, Segovia JL, Marco C (2002)  
Resistance of HepG2 cells against the adverse effects of ethanol related  
to neutral lipid and phospholipid metabolism. *Biochem. Pharmacol.* 63,  
1485-1490.

Jimenez-Lopez JM, Carrasco MP, Segovia JL, Marco C (2002)  
Hexadecylphosphocholine inhibits phosphatidylcholine biosynthesis  
and the proliferation of HepG2 cells. (en prensa)

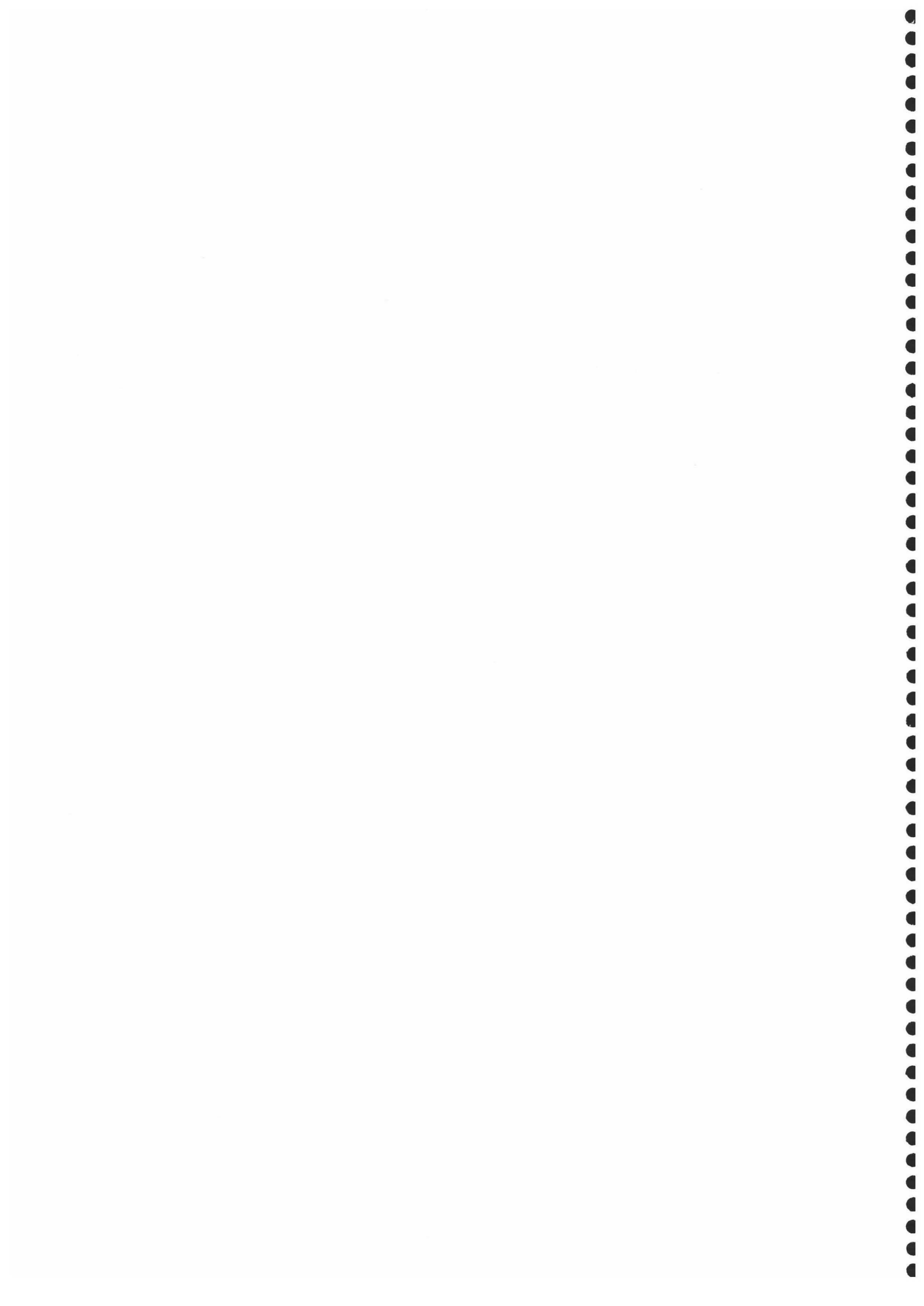
### **COMUNICACIONES A CONGRESOS:**

XXIV Congreso de la SEBBM (Valencia, Septiembre 2001)

27<sup>th</sup> Meeting of the FEBS/PABMB (Lisboa, Julio 2001)

XXIII Congreso de la SEBBM (Granada, Septiembre 2000)

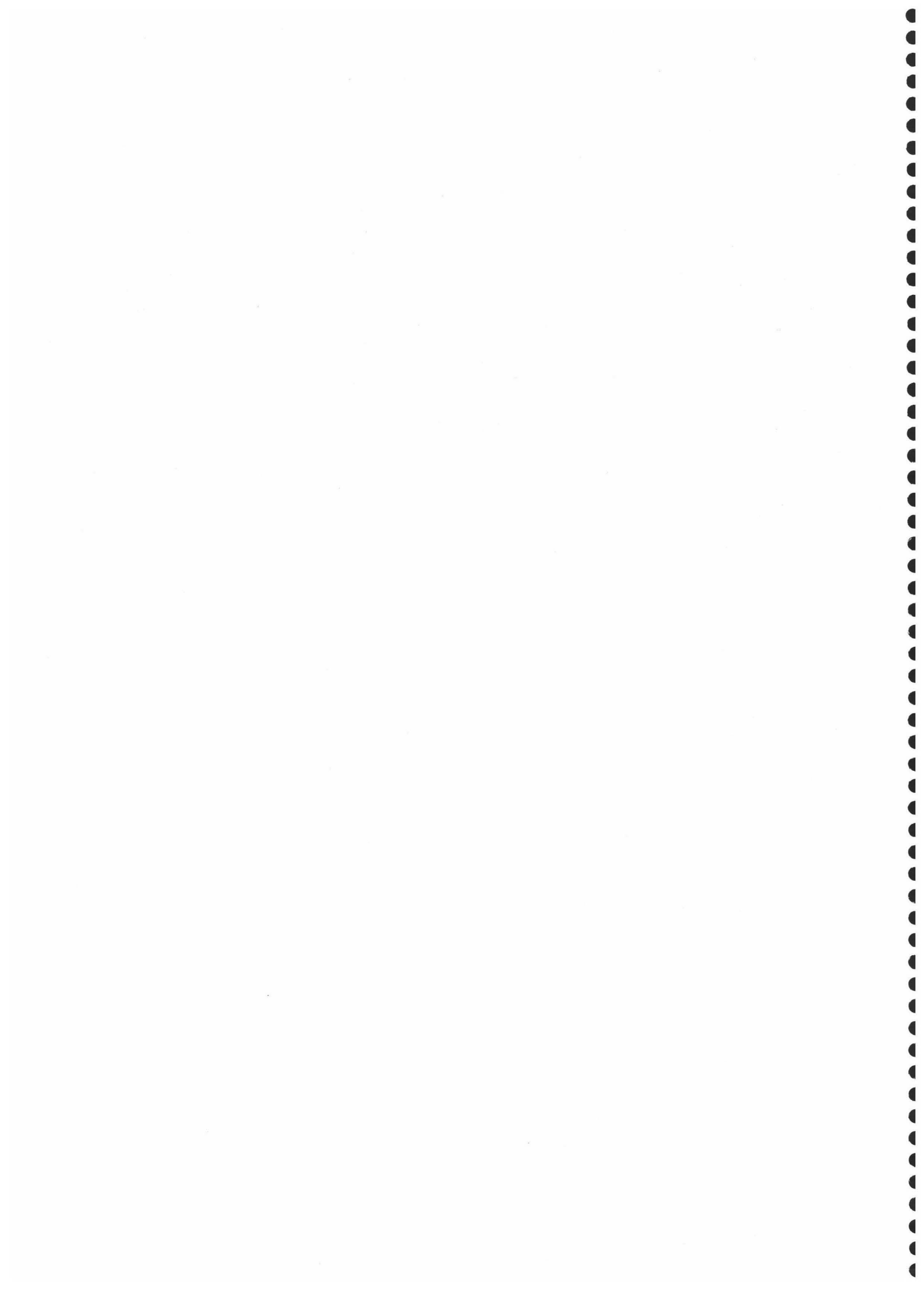
VIII Congreso de la SEBC (Granada, Diciembre 1999)



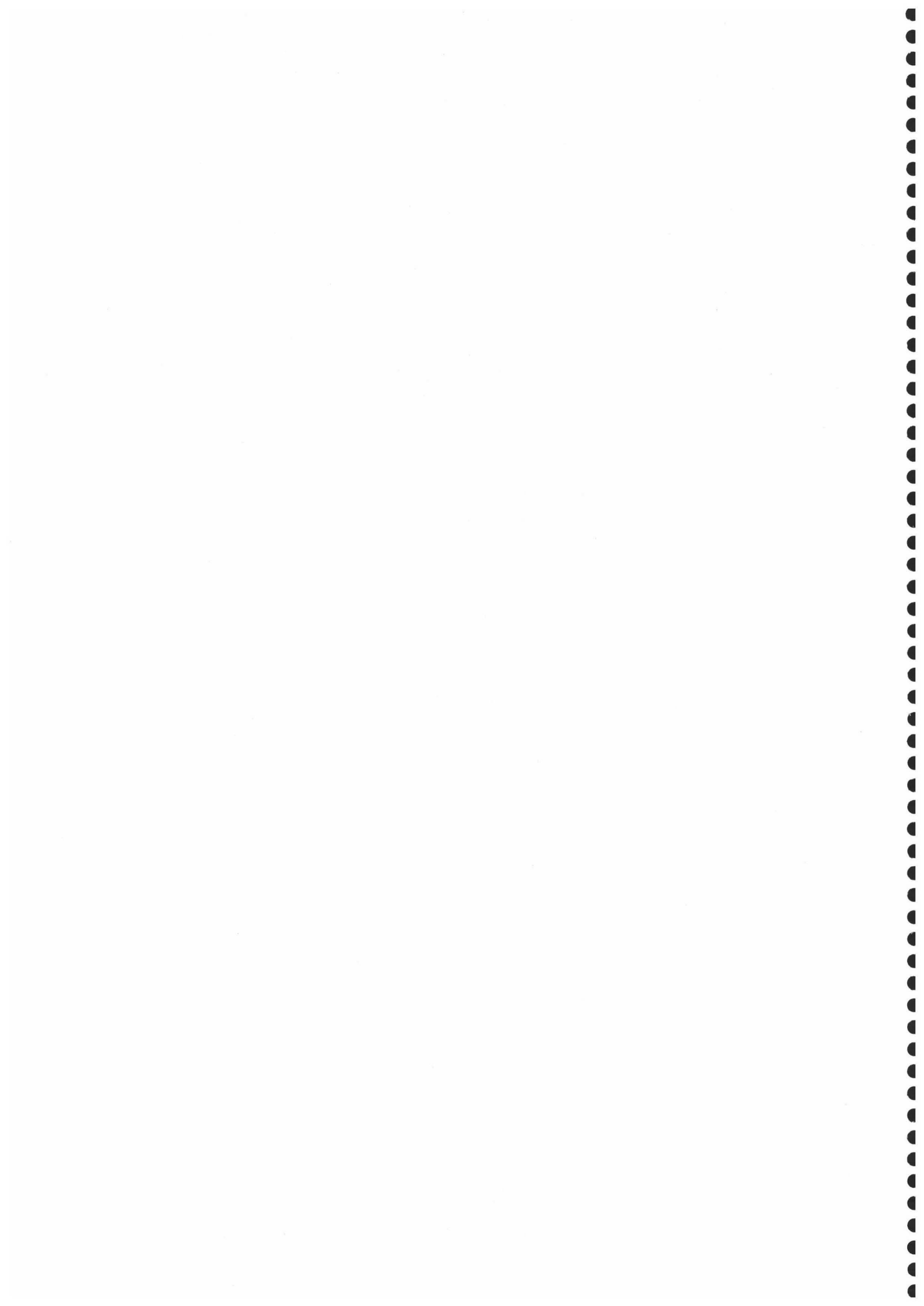


## ABREVIATURAS

ACAT	acil-CoA:colesterol O-aciltransferasa
ADH	alcohol deshidrogenasa
ALDH	aldehído deshidrogenasa
ALP	alquilisofosfolípido
APC	alquilfosfocolina
Apo	apolipoproteína
ATCC	American Type Culture Collection
BHT	2,6-di- <i>tert</i> -butil-4-metilfenol
BSA	albúmina sérica bovina
DG	diacilglicerol
DMSO	dimetilsulfóxido
dpm	desintegraciones por minuto
ECACC	European Collection of Animal Cell Cultures
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EMEM	medio esencial mínimo de Eagle
FCS	suero bovino fetal
HePC	hexadecilfosfocolina
Hepes	ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacil]etanosulfónico
HDL	lipoproteínas de alta densidad
LDH	lactato deshidrogenasa
LDL	lipoproteínas de baja densidad
MEOS	sistema microsomal de oxidación del etanol
MTT	bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
PA	fosfatidato
PBS	solución salina isotónica de fosfatos
PC	fosfatidilcolina
PE	fosfatidiletanolamina
PI	fosfatidilinositol
PKC	proteína quinasa C
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PS	fosfatidilserina
RE	retículo endoplasmático
rpm	revoluciones por minuto
SAM	S-adenosilmetionina
SEM	error estándar de la media
SM	esfingomielina
TLC	cromatografía en capa fina
TBA	ácido 2-tiobarbitúrico
TBARS	sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico
TG	triacilglicerol
VLDL	lipoproteínas de muy baja densidad



## ÍNDICE



<b>INTRODUCCIÓN: METABOLISMO LIPÍDICO</b> .....	1
I. GENERALIDADES .....	2
II. BIOSÍNTESIS DE PRECURSORES LIPÍDICOS .....	3
II.1. FOSFATIDATO COMO PRECURSOR DE GLICEROLÍPIDOS .....	3
II.1.1. $\alpha$ -GLICEROFOSFATO ACILTRANSFERASA .....	3
II.1.2. DIHIDROXIACETONA FOSFATO ACILTRANSFERASA .....	4
II.1.3. 1-ACIL GLICEROL-3-FOSFATO ACILTRANSFERASA .....	4
II.2. CONVERSIÓN DE FOSFATIDATO A DIACILGLICEROL .....	5
II.3. CONVERSIÓN DE FOSFATIDATO A CDP-DIACILGLICEROL .....	6
III. BIOSÍNTESIS DE GLICEROFOSFOLÍPIDOS .....	6
III.1. BIOSÍNTESIS DE FOSFATIDILCOLINA .....	8
III.1.1. BIOSÍNTESIS DE FOSFATIDILCOLINA VÍA CDP-COLINA .....	8
III.1.2. BIOSÍNTESIS DE FOSFATIDILCOLINA POR METILACIÓN DE FOSFATIDILETANOLAMINA .....	13
III.2. BIOSÍNTESIS DE FOSFATIDILETANOLAMINA .....	14
III.2.1. BIOSÍNTESIS DE FOSFATIDILETANOLAMINA VÍA CDP-ETANOLAMINA .....	15
III.2.1. BIOSÍNTESIS DE FOSFATIDILETANOLAMINA POR DESCARBOXILACIÓN DE FOSFATIDILSERINA .....	16
III.3. BIOSÍNTESIS DE FOSFATIDILSERINA: REACCIÓN DE INTERCAMBIO DE BASES .....	17
III.4. BIOSÍNTESIS DE ESFINGOMIELINA .....	19
III.5. BIOSÍNTESIS DE FOSFATIDILINOSITOL, FOSFATIDILGLICEROL Y CARDIOLIPINA .....	20
IV. BIOSÍNTESIS DE TRIACILGLICEROL .....	21
V. RUTAS DE DEGRADACIÓN Y REMODELADO DE FOSFOLÍPIDOS .....	22
V.1. DEGRADACIÓN POR FOSFOLIPASAS .....	22

V.2. DEGRADACIÓN DE ESFINGOMIELINA .....	24
V.3. REMODELADO DE FOSFOLÍPIDOS .....	25
<b>OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO .....</b>	<b>28</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>31</b>
<b>I. MATERIAL .....</b>	<b>32</b>
I.1. MATERIAL DE CULTIVO CELULAR .....	32
I.1.1. ESTERILIZACIÓN DEL MATERIAL Y REACTIVOS .....	32
I.2. MATERIAL RADIATIVO .....	32
I.3. OTROS TIPOS DE MATERIAL Y REACTIVOS .....	33
I.3.1. AGENTES XENOBIÓTICOS: HEXADECILFOSFOCOLINA Y ETANOL .....	33
I.4. MATERIAL BIOLÓGICO: LÍNEA CELULAR HepG2 .....	33
<b>II. MÉTODOS .....</b>	<b>34</b>
II.1. MANTENIMIENTO DEL CULTIVO CELULAR .....	34
II.1.1. SUBCULTIVO CELULAR .....	35
II.1.2. DETECCIÓN DE CONTAMINACIÓN .....	36
II.2. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD .....	36
II.2.1. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD LDH .....	37
II.2.2. TEST DEL MTT .....	37
II.2.3. CITOVIABILIDAD: TEST DE EXCLUSIÓN DEL AZUL DE TRIPÁN .....	38
II.2.4. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA: TEST DEL TBA .....	38
II.3. ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN .....	39
II.4. EXPERIMENTOS DE MARCAJE METABÓLICO .....	40
II.4.1. EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE LÍPIDOS .....	40
II.4.2. INCORPORACIÓN DE PRECURSORES LIPÍDICOS RADIATIVOS .....	41
II.4.2.1. INCORPORACIÓN DE [1,2,3- <sup>3</sup> H]GLICEROL .....	42
II.4.2.2. INCORPORACIÓN DE [1- <sup>14</sup> C]ETANOL .....	43
II.4.2.3. INCORPORACIÓN DE BASES NITROGENADAS .....	45
II.4.2.3.1. INCUBACIÓN CON [1- <sup>14</sup> C]ETANOLAMINA .....	45
II.4.2.3.2. INCUBACIÓN CON L-[3- <sup>3</sup> H]SERINA .....	46



II.4. SECRECIÓN LIPÍDICA .....	68
<b>RESULTADOS</b> .....	71
<b>I. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS CÉLULAS HepG2</b> .....	72
I.1. OBSERVACIÓN DE LAS CÉLULAS HepG2 MEDIANTE MICROSCOPIA ÓPTICA .....	72
I.2. OBSERVACIÓN DE LAS CÉLULAS HepG2 MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA .....	73
<b>II. CARACTERIZACIÓN DEL METABOLISMO LIPÍDICO EN LAS CÉLULAS HepG2</b> .....	75
II.1. COMPOSICIÓN LIPÍDICA .....	75
II.1.1. CÉLULAS HepG2 EN PROLIFERACIÓN .....	76
II.1.2. CÉLULAS HepG2 EN CONFLUENCIA .....	77
II.2. INCORPORACIÓN DE PRECURSORES METABÓLICOS .....	78
II.2.1. INCORPORACIÓN DE [1,2,3- <sup>3</sup> H]GLICEROL A LO LARGO DEL TIEMPO .....	79
II.2.2. INCORPORACIÓN DE L-[3- <sup>3</sup> H]SERINA .....	81
II.2.3. INCORPORACIÓN DE [1,2- <sup>14</sup> C]JETANOLAMINA .....	86
II.2.4. INCORPORACIÓN DE [METIL- <sup>14</sup> C]COLINA .....	87
II.2.5. INCORPORACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS MARCADOS ISOTÓPICAMENTE .....	89
II.2.5.1. INCORPORACIÓN DE [1- <sup>14</sup> C]PALMITATO .....	89
II.2.5.2. INCORPORACIÓN DE [1- <sup>14</sup> C]ARAQUIDONATO .....	92
II.3. SECRECIÓN DE LÍPIDOS SINTETIZADOS <i>DE NOVO</i> A PARTIR DE GLICEROL .....	94
II.4. DEGRADACIÓN Y SECRECIÓN DE LÍPIDOS ENDÓGENOS .....	95
<b>DISCUSIÓN</b> .....	98
<b>I. SÍNTESIS <i>DE NOVO</i> LIPÍDICA EN LAS CÉLULAS HepG2</b> .....	99
<b>II. SECRECIÓN LIPÍDICA</b> .....	105



## **CAPÍTULO 2. ALTERACIONES INDUCIDAS POR ETANOL EN CÉLULAS DE HEPATOMA HUMANO HepG2**

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	111
<b>I. ETANOL</b> .....	112
I.1. CONSUMO DE ETANOL Y ALCOHOLISMO .....	112
I.2. METABOLISMO HEPÁTICO DEL ETANOL .....	114
I.2.1. ALCOHOL DESHIDROGENASA .....	114
I.2.2. CATALASA .....	115
I.2.3. SISTEMA MICROSOMAL DE OXIDACIÓN DEL ETANOL .....	115
I.2.4. ALDEHÍDO DESHIDROGENASA .....	118
I.2.5. METABOLISMO NO OXIDATIVO DEL ETANOL .....	119
I.3. ALTERACIONES DEL METABOLISMO LIPÍDICO CAUSADAS POR UNA INGESTA EXCESIVA DE ETANOL .....	120
<b>II. INFLUENCIA DEL ETANOL EN CÉLULAS HepG2</b> .....	121
<b>RESULTADOS</b> .....	123
<b>I. EFECTOS TÓXICOS DEL ETANOL EN LAS CÉLULAS HepG2</b> .....	124
<b>II. METABOLISMO DEL ETANOL EN CÉLULAS HepG2</b> .....	126
II.1. INCORPORACIÓN DE [1- <sup>14</sup> C]ETANOL A LÍPIDOS EN CÉLULAS HepG2 .....	126
II.2. EFECTOS DEL TRATAMIENTO PROLONGADO DE ALCOHOL SOBRE LA INCORPORACIÓN DE [1- <sup>14</sup> C]ETANOL .....	129
<b>III. EFECTO DEL ETANOL SOBRE EL METABOLISMO LIPÍDICO EN CÉLULAS HepG2</b> .....	131
III.1. SÍNTESIS <i>DE NOVO</i> .....	132
III.2. SECRECIÓN DE LÍPIDOS RECIÉN SINTETIZADOS .....	134
III.3. DEGRADACIÓN Y SECRECIÓN DE LÍPIDOS ENDÓGENOS .....	134
<b>IV. INFLUENCIA DE UN TRATAMIENTO PROLONGADO DE</b>	

ETANOL SOBRE EL METABOLISMO LIPÍDICO EN CÉLULAS HepG2 . . .	137
IV.1. SÍNTESIS <i>DE NOVO</i> . . . . .	137
IV.2. SECRECIÓN LIPÍDICA . . . . .	139
<b>DISCUSIÓN</b> . . . . .	141
I. ANÁLISIS DE TOXICIDAD DEL ETANOL EN CÉLULAS HepG2 . . . . .	142
II. METABOLISMO DEL ETANOL EN HepG2 . . . . .	143
III. INFLUENCIA DEL ETANOL SOBRE EL METABOLISMO LIPÍDICO EN CÉLULAS HepG2 . . . . .	145
<b><u>CAPÍTULO 3. ALTERACIONES INDUCIDAS POR HEXADECILFOSFOCOLINA EN CÉLULAS DE HEPATOMA HUMANO HepG2</u></b>	
<b>INTRODUCCIÓN</b> . . . . .	150
I. ANÁLOGOS SINTÉTICOS DE FOSFOLÍPIDOS CON ACTIVIDAD ANTINEOPLÁSICA . . . . .	151
II. APLICACIÓN QUIMIOTERAPÉUTICA DE LAS ALQUILFOSFOCOLINAS . . . . .	153
III. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LAS ALQUILFOSFOCOLINAS . . . . .	155
<b>RESULTADOS</b> . . . . .	161
I. ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y ANTIPROLIFERATIVA DE LA HEXADECILFOSFOCOLINA EN CÉLULAS HepG2 . . . . .	162
II. INFLUENCIA DE LA HEXADECILFOSFOCOLINA SOBRE EL METABOLISMO LIPÍDICO EN CÉLULAS HepG2 . . . . .	165
II.1. INCORPORACIÓN DE PRECURSORES METABÓLICOS A COMPONENTES LIPÍDICOS: SÍNTESIS <i>DE NOVO</i> LIPÍDICA . . . . .	165
II.1.1. INCORPORACIÓN DE [1,2,3- <sup>3</sup> H]GLICEROL . . . . .	165
II.1.2. INCORPORACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS . . . . .	167

II.1.2.1. INCORPORACIÓN DE [1- <sup>14</sup> C]PALMITATO .....	168
II.1.2.2. INCORPORACIÓN DE [1- <sup>14</sup> C]ARAQUIDONATO .....	169
II.1.3. INCORPORACIÓN DE BASES NITROGENADAS .....	172
II.1.3.1. INCORPORACIÓN DE L-[3- <sup>3</sup> H]SERINA. INFLUENCIA DE LA HEXADECILFOSFOCOLINA SOBRE LA ACTIVIDAD FOSFATIDILSERINA SINTASA .....	173
II.1.3.2. INCORPORACIÓN DE [1,2- <sup>14</sup> C]ETANOLAMINA .....	175
II.1.3.3. INCORPORACIÓN DE [METIL- <sup>14</sup> C]COLINA .....	179
II.1.3.3.1. INFLUENCIA DE LA HEXADECILFOSFOCOLINA SOBRE LA TOMA INTRACELULAR DE COLINA EN CÉLULAS HepG2 .....	179
II.2. EFECTOS DE LA HEXADECILFOSFOCOLINA SOBRE LA SECRECIÓN DE LÍPIDOS RECIÉN SINTETIZADOS .....	181
II.3. EFECTOS DE LA HEXADECILFOSFOCOLINA SOBRE LA DEGRADACIÓN Y SECRECIÓN DE LÍPIDOS ENDÓGENOS PREEXISTENTES .....	184
II.4. COMPOSICIÓN LIPÍDICA .....	189
III. EFECTOS DE LA HEXADECILFOSFOCOLINA SOBRE LAS ACTIVIDADES DE LA RUTA CDP-COLINA EN CÉLULAS HepG2 .....	190
IV. REVERSIBILIDAD DE LAS ALTERACIONES PRODUCIDAS POR LA HEXADECILFOSFOCOLINA EN CÉLULAS HepG2 .....	196
IV.1. SUPRESIÓN DEL TRATAMIENTO DE HEXADECILFOSFOCOLINA .....	197
IV.2. ANTAGONISMO DEL OLEATO FRENTE A LA ACCIÓN DE LA HEXADECILFOSFOCOLINA .....	201
V. ALTERACIONES MORFOLÓGICAS E INDUCCIÓN DE APOPTOSIS POR HEXADECILFOSFOCOLINA EN LAS CÉLULAS HepG2 .....	206
V.1. CAMBIOS MORFOLÓGICOS PROVOCADOS POR LA HEXADECILFOSFOCOLINA EN CÉLULAS HepG2 .....	208
V.2. FRAGMENTACIÓN DE DNA PROVOCADA POR LA HEXADECILFOSFOCOLINA EN CÉLULAS HepG2 .....	209

<b>DISCUSIÓN</b> .....	213
I. ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y CITOSTÁTICA DE LA HEXADECILFOSFOCOLINA EN CÉLULAS HepG2 .....	214
II. EFECTOS DE LA HEXADECILFOSFOCOLINA SOBRE EL METABOLISMO LIPÍDICO EN CÉLULAS HepG2 .....	214
II.1. SÍNTESIS <i>DE NOVO</i> DE FOSFATIDILCOLINA .....	215
II.2. SÍNTESIS <i>DE NOVO</i> DE OTROS GLICEROFOSFOLÍPIDOS .....	219
II.3. SÍNTESIS <i>DE NOVO</i> DE ESFINGOMIELINA Y CERAMIDA .....	220
II.4. SÍNTESIS <i>DE NOVO</i> DE DIFERENTES LÍPIDOS NEUTROS .....	221
II.5. DEGRADACIÓN LIPÍDICA .....	222
II.6. COMPOSICIÓN LIPÍDICA .....	223
III. REVERSIBILIDAD DE LAS ALTERACIONES PRODUCIDAS POR HEXADECILFOSFOCOLINA EN CÉLULAS HepG2 .....	224
IV. CAMBIOS MORFOLÓGICOS Y APOPTOSIS INDUCIDOS POR HEXADECILFOSFOCOLINA EN CÉLULAS HepG2 .....	225
<b>CONCLUSIONES</b> .....	228
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	231



**INTRODUCCIÓN:  
METABOLISMO LIPÍDICO**



## I. GENERALIDADES

Los fosfolípidos están implicados en múltiples niveles de la organización y función celular, formando parte, junto con proteínas, de las membranas biológicas y regulando una amplia variedad de procesos celulares. Se trata de pequeñas moléculas anfipáticas que se agregan espontáneamente en bicapas cuando se disponen en medio acuoso. Las membranas biológicas separan el interior de la célula del ambiente externo y delimitan también los orgánulos subcelulares. El colesterol, un miembro de la familia de los esteroides, es otro componente esencial de las membranas celulares animales, y molécula precursora de hormonas esteroideas, vitamina D<sub>3</sub> y sales biliares.

El triacilglicerol (TG), por otra parte, constituye la principal reserva energética del organismo, siendo su función predominantemente metabólica. La biosíntesis de glicerofosfolípidos y TG se lleva a cabo a través de rutas metabólicas que requieren un intermediario común, el fosfatidato (PA). Ciertas situaciones requieren un control coordinado de ambos procesos, por ejemplo la formación de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) por el hígado.

Los fosfolípidos más abundantes en los tejidos de mamíferos son fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE), mientras esfingomielina (SM), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI), fosfatidato (PA), fosfatidilglicerol (PG) y cardiolipina (CL) están presentes en cantidades significativamente menores. No obstante, la importancia de los fosfolípidos no es exclusivamente como componentes de membrana, puesto que los glicerofosfolípidos y los esfingofosfolípidos son importantes precursores de segundos mensajeros lipídicos, tales como diacilglicerol (DG) y ceramida, los cuales participan en rutas de transducción intracelular de señales y, de esta forma, median los efectos de varios agonistas.

Los glicerofosfolípidos están constituidos por un esqueleto carbonado de glicerol, esterificado en las posiciones *sn*-1 y 2 por dos cadenas de ácido graso y en posición *sn*-3 por un

aminoalcohol fosforilado. En los acilgliceroles, mono- di- y triacilglicerol, el glicerol está esterificado en una, dos, o tres posiciones, respectivamente. Los esfingolípidos presentan un esqueleto de esfingosina, aminoalcohol que contiene una larga cadena hidrocarbonada insaturada unida a un ácido graso mediante un enlace amida, mientras que su grupo hidroxilo primario está unido a colina fosfato.

## II. BIOSÍNTESIS DE PRECURSORES LIPÍDICOS

### II.1. FOSFATIDATO COMO PRECURSOR DE GLICEROLÍPIDOS

Fosfatidato es sintetizado vía 1-acil glicerol-3-fosfato (lisofosfatidato) por sucesivas acilaciones del  $\alpha$ -glicerofosfato. El lisofosfatidato es, además, un ligando mitogénico extracelular que provoca diversas respuestas celulares (Santos *et al.*, 2000).

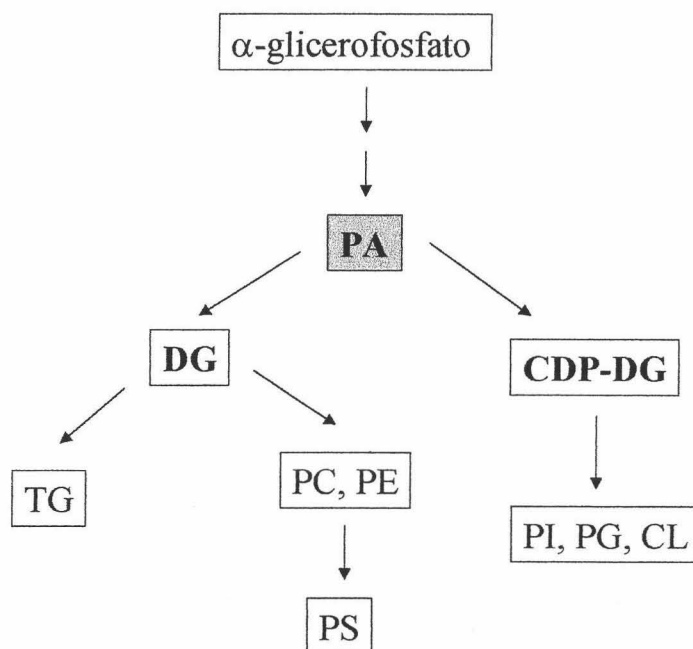
El PA desempeña un papel central en la biosíntesis de fosfolípidos y lípidos neutros, siendo precursor de glicerofosfolípidos y acilgliceroles (Esquema 1). La conversión de fosfatidato a diacilglicerol (DG) es requerida para la biosíntesis de PC y PE (e, indirectamente, de PS sintetizada a partir de éstos), y de los acilgliceroles (Tijburg *et al.*, 1989). Por otra parte, el DG es convertido en CDP-DG para la biosíntesis de PI, PG y CL, y, en levaduras, también de PS.

#### II.1.1. $\alpha$ -GLICEROFOSFATO ACILTRANSFERASA

La  $\alpha$ -glicerofosfato aciltransferasa (EC 2.3.1.15) cataliza la primera etapa en la biosíntesis de los glicerolípidos y, por tanto, su actividad está altamente regulada y modulada por distintas situaciones metabólicas (Igal *et al.*, 2001). En mamíferos se han descrito dos enzimas, una mitocondrial y otra microsomal, las cuales pueden ser distinguidas en base a su distinta sensibilidad frente a N-etilmaleimida (NEM) (Saggerson *et al.*, 1980). La enzima microsomal es inhibida por NEM mientras la enzima mitocondrial *in situ* no es sensible a NEM. La enzima



mitocondrial muestra preferencia por el sustrato acil-CoA saturado frente al insaturado, mientras la enzima microsomal no muestra tal especificidad de sustrato. Esto ha llevado a la especulación de que la enzima mitocondrial es responsable de la preferencia por grupos acilo grasos saturados en la posición 1 de los fosfolípidos sintetizados *in vivo*.



**ESQUEMA 1. FOSFATIDATO COMO PRECURSOR DE GLICEROLÍPIDOS.**

### II.1.2. DIHIDROXIACETONA FOSFATO ACILTRANSFERASA

Tanto la  $\alpha$ -glicerofosfato aciltransferasa mitocondrial como la microsomal catalizan la acilación de dihidroxiacetona fosfato, pero existe además una dihidroxiacetona aciltransferasa peroxisomal que no acila  $\alpha$ -glicerofosfato. La enzima peroxisomal parece ser específica para la síntesis de lípidos éter, mientras las enzimas microsomal y mitocondrial funcionan sólo en la síntesis de glicerolípidos (Kennedy, 1986).

### II.1.3. 1-ACIL GLICEROL-3-FOSFATO ACILTRANSFERASA

La conversión de 1-acil glicerol-3-fosfato a PA es catalizada por la 1-acil glicerol-3-fosfato aciltransferasa. Se han descrito dos actividades enzimáticas que presentan diferente localización intracelular, microsomal y citosólica, siendo reguladas por diferentes efectores (Vancura y Haldar, 1992). La actividad específica de esta enzima en RE de hígado de rata es considerablemente superior a la de la  $\alpha$ -glicerofosfato aciltransferasa, sugiriéndose que la reacción de acilación del  $\alpha$ -glicerofosfato limita la velocidad de síntesis del PA (Brindley, 1984).

## II.2. CONVERSIÓN DE FOSFATIDATO A DIACILGLICEROL

Tras la síntesis de PA, las rutas biosintéticas de glicerolípidos se separan en dos ramas en las cuales el siguiente intermediario es DG o CDP-DG (Esquema 1). Las enzimas que catalizan las reacciones correspondientes, fosfatidato fosfohidrolasa y CDP-diacilglicerol sintetasa, son de gran importancia debido a que controlan el flujo hacia ambos destinos. Además, existe un gran interés en la fosfatidato fosfohidrolasa ya que desempeña un importante papel en rutas de transducción de señales.

La fosfatidato fosfohidrolasa (EC 3.1.3.4) cataliza la hidrólisis de PA para generar DG y fosfato inorgánico. Esta actividad enzimática se encuentra tanto en forma soluble como asociada a RE y membrana plasmática. Además, es posible que las enzimas citosólica y microsomal sean formas interconvertibles de la misma enzima, puesto que los ácidos grasos causan translocación de la forma citosólica a los microsomas en extractos libres de células (Day y Yeaman, 1992) y en células intactas (Aridor-Piterman *et al.*, 1992).

En mamíferos se han identificado isoformas de la enzima implicadas en la síntesis de glicerolípidos y en transducción de señales (Kocsis y Weselake, 1996). Esta enzima es considerada esencial en la regulación de la síntesis hepática de TG, ya que su actividad es influida marcadamente por distintas situaciones metabólicas o agentes externos que afectan a la biosíntesis de TG. Así, se ha comprobado que un incremento en la capacidad del hígado para

sintetizar TG va acompañado generalmente de un aumento en la actividad fosfatidato fosfohidrolasa.

### **II.3. CONVERSIÓN DE FOSFATIDATO A CDP-DIACILGLICEROL**

Las rutas biosintéticas de PI, PG y CL (difosfatidilglicerol) utilizan CDP-DG como precursor metabólico, el cual se sintetiza a partir de CTP y PA por mediación de la CDP-diacilglicerol sintetasa (EC 2.7.7.41), actividad enzimática que se halla presente tanto en bacterias como en eucariotas (Heacock y Agranoff, 1997).

En mamíferos y levaduras, la actividad CDP-diacilglicerol sintetasa se asocia principalmente con el RE, donde funciona en la ruta biosintética de PI (Mok *et al.*, 1993). Aparece en menor proporción en la membrana interna mitocondrial, estando implicada en la biosíntesis de PG y CL (Schlame y Haldar, 1993). La regulación de esta enzima no ha sido estudiada en mamíferos, aunque se ha descrito una acumulación de CDP-DG en respuesta a estimulación hormonal (Stubbs y Agranoff, 1993), sugiriendo que los niveles de este importante intermediario están regulados *in vivo*.

## **III. BIOSÍNTESIS DE GLICEROFOSFOLÍPIDOS**

Fosfatidilcolina es el fosfolípido más abundante en las membranas celulares de organismos superiores y levaduras. Constituye un 40-80% del total de fosfolípidos de membrana, dependiendo del tipo celular, y es por otra parte precursor de PS, PE y SM. La fracción de PC es una población metabólica dinámica que experimenta un rápido recambio. Las células coordinan la biosíntesis y degradación de PC, y es probable que la regulación del metabolismo de este fosfolípido sirva para mantener una composición constante de los otros fosfolípidos (Lykidis y Jackowski, 2001).

El fosfolípido PC está implicado en el control de la proliferación y supervivencia celular, así como en la regulación de la fluidez de la membrana y, por tanto, en el mantenimiento de la integridad de las células. Se ha comprobado que la alteración de la concentración de PC en las membranas celulares produce cambios en las actividades de enzimas asociadas a estas membranas. Por otra parte, la síntesis celular de PC es esencial para el ensamblaje y secreción al plasma de las lipoproteínas hepáticas, ya que PC es su fosfolípido mayoritario. Además, la PC es un componente de la bilis y del surfactante pulmonar (1,2-dipalmitil fosfatidilcolina). Es de destacar, además, que la PC es fuente de moléculas de señalización intracelular. Por tanto, la regulación de la síntesis de este fosfolípido es importante para mantener la homeostasis fosfolipídica tanto dentro como fuera de las células.

Fosfatidiletanolamina es también un fosfolípido mayoritario en las membranas de las células eucarióticas, siendo el principal fosfolípido en las membranas de bacterias. El contenido celular de PE, lo mismo que ocurre con el contenido de PC, se mantiene a un nivel constante para cada tipo celular. La PE interviene de forma decisiva en la conformación de la bicapa lipídica, siendo capaz de inducir estructuras no-bicapa con una configuración en fase hexagonal (Post *et al.*, 1995). Esta propiedad de la PE puede ser responsable de la regulación de numerosas proteínas de membrana, tales como los citocromos P<sub>450</sub> (Ruckpaul *et al.*, 1989), los cuales participan en procesos de detoxificación de moléculas de naturaleza hidrofóbica.

La PS celular está presente en pequeñas cantidades en relación a PC y PE, y está localizada principalmente en la superficie citoplasmática de la membrana plasmática, así como en la superficie interna de membranas subcelulares. La PS puede ser considerada tanto un producto final, componente de las membranas celulares eucarióticas, como un intermediario biosintético, puesto que es precursora de PE y, a partir de ésta, de PC. El papel de la PS en la membrana puede no ser tan importante como su papel biosintético, observándose que células carentes de la síntesis de PS pueden crecer en presencia de etanolamina o PE. El fosfolípido PS, no obstante, está asociado con una amplia variedad de procesos celulares. Así, es activador de la proteína quinasa C (Nishizuka, 1992), está implicado en procesos tales como la agregación

plaquetaria y coagulación, y se transloca a la superficie externa de la membrana plasmática durante las etapas tempranas del programa apoptótico.

Los niveles de PI constituyen una pequeña proporción del total de fosfolípidos en la mayoría de las células. El PI, además de ser un fosfolípido esencial de membrana, está implicado en el anclaje de proteínas a la membrana y es precursor de los segundos mensajeros inositol-1,4,5-trisfosfato y DG. Tras su síntesis, el PI puede ser fosforilado secuencialmente por varias quinasas para producir fosfoinosítidos. Los fosfoinosítidos presentan un prominente papel en la comunicación intracelular, generando diversos segundos mensajeros, y además modulan diferentes procesos celulares, incluyendo exocitosis, reorganización del citoesqueleto, apoptosis y tráfico de membrana (Farooqui *et al.*, 2000). Por otra parte, pueden ser glicosilados originando glicosil fosfoinosítidos, los cuales tienen un papel estructural permitiendo el anclaje covalente de proteínas a la superficie celular (proteínas ancladas a GPI) y están implicados además en transducción de señales (Chatterjee y Mayor, 2001; Jones y Varela-Nieto, 1998).

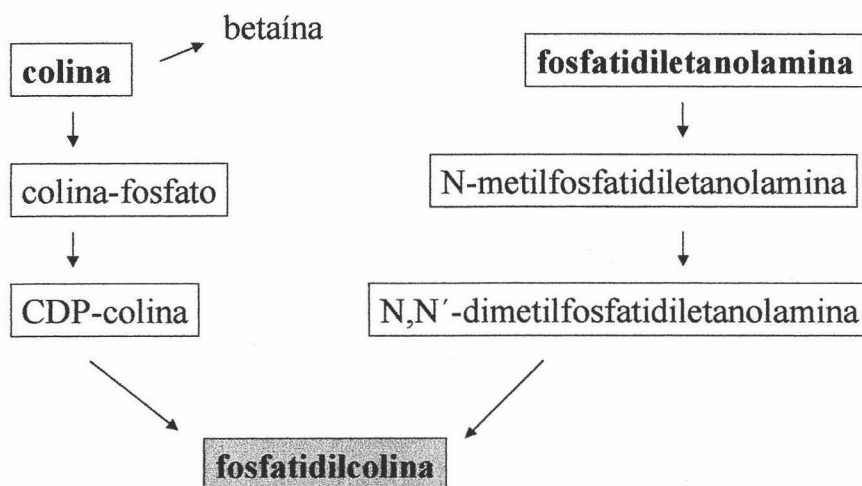
### **III.1. BIOSÍNTESIS DE FOSFATIDILCOLINA**

Existen dos rutas para la biosíntesis de PC: mediante incorporación de colina a través del intermediario CDP-colina (ruta de Kennedy), y por metilación sucesiva de PE en microsomas (Esquema 2). En mamíferos, la vía CDP-colina es la predominante para la síntesis de PC en todos los tejidos, mientras el tejido hepático es el único en el que una cantidad significativa de PC es sintetizada por metilación de PE (Ridgway, 1989). En levaduras, sin embargo, la ruta principal de síntesis de PC es vía metilación de PE, presentando la ruta CDP-colina una función auxiliar.

#### **III.1.1. BIOSÍNTESIS DE FOSFATIDILCOLINA VÍA CDP-COLINA**

La ruta de Kennedy para la biosíntesis de PC, también denominada vía CDP-colina, comprende tres reacciones enzimáticas estrictamente reguladas. En primer lugar, la colina es

fosforilada en el citosol, con gasto de ATP, por la enzima colina quinasa. A continuación, la enzima CTP:colina-fosfato citidililtransferasa cataliza la síntesis de CDP-colina a partir de colina-fosfato y CTP. Finalmente, la CDP-colina:1,2-diacilglicerol colinafosfotransferasa cataliza una reacción reversible que produce PC y CMP a partir de CDP-colina y DG. La regulación de la vía CDP-colina ocurre principalmente a nivel de la etapa catalizada por la citidililtransferasa (Kent, 1990).



**ESQUEMA 2. RUTAS DE BIOSÍNTESIS DE FOSFATIDILCOLINA.**

La colina es un componente esencial de la dieta en la mayoría de los mamíferos. En hepatocitos de rata, la incorporación de colina parece estar mediada por dos mecanismos, uno saturable y el otro no saturable (Pelech *et al.*, 1982). El componente no saturable se atribuye a la difusión pasiva de la colina a través de la membrana plasmática, mientras que el mecanismo saturable está vinculado a la actividad colina oxidasa, responsable de la formación de betaína.

La colina quinasa (EC 2.7.1.32) cataliza la fosforilación de colina por ATP en presencia de  $Mg^{2+}$ , produciendo colina-fosfato y ADP, aunque funciona también *in vitro* como una etanolamina quinasa, originando etanolamina-fosfato. La colina/ etanolamina quinasa es la primera enzima en la biosíntesis de PC y/o PE en las células animales (Aoyama *et al.*, 2000). Se trata de una enzima soluble que ha sido purificada a homogeneidad partiendo de diversas

fuentes. Además, han sido clonadas múltiples isoformas procedentes de distintas especies (Ishidate, 1997).

Aunque esta enzima no presenta una función reguladora importante de la velocidad de la ruta CDP-colina, se ha observado que la activación de la colina quinasa se correlaciona con la transducción de señales mitogénicas (Warden y Friedkin, 1985) y la transformación celular (Kent, 1995), debido a un incremento de los niveles intracelulares de colina-fosfato. Esta enzima constituye, pues, un objetivo para el desarrollo terapéutico de fármacos anticancerígenos (Hernandez-Alcoceba *et al.*, 1999).

La CTP:colina-fosfato citidililtransferasa (CCT) (EC 2.7.7.15), encontrada tanto en forma soluble como asociada a membranas, es la principal enzima reguladora (Sleight y Kent, 1980) de la biosíntesis de PC por la vía CDP-colina. Los ensayos de marcaje metabólico establecen que la reacción que cataliza esta enzima constituye el paso limitante de la ruta (Kent, 1997; Vance *et al.*, 1980). Esta enzima cataliza la transferencia de la porción de citidina donada por CTP a la colina-fosfato, para producir el intermediario citidina-5'-difosfocolina. Se han identificado dos isoformas de la enzima, denominadas CCT $\alpha$  y CCT $\beta$ .

La CCT $\alpha$  se expresa de forma ubicua en todos los tejidos y reside fundamentalmente en el núcleo, aunque también se asocia con el retículo endoplasmático (RE). Las proteínas CCT $\alpha$  presentan cuatro dominios: Una señal de localización nuclear, situada en el extremo amino de la proteína, que dirige la acumulación de la enzima en el núcleo (Wang *et al.*, 1995). Un centro catalítico que presenta el sitio de unión al CTP (Veitch *et al.*, 1998). Una región helicoidal, adyacente al centro catalítico, que consta de tres repeticiones anfipáticas consecutivas en  $\alpha$ -hélice y permite la interacción de la CCT $\alpha$  con la bicapa lipídica (Johnson *et al.*, 1997). La actividad de la CCT $\alpha$  depende absolutamente de su interacción con lípidos, y este dominio media la regulación de la enzima por lípidos. Por último, el extremo carboxilo de la CCT $\alpha$  está enriquecido en residuos de serina que son sitios de fosforilación (MacDonald y Kent, 1994). El estado de fosforilación de la CCT regula su asociación a la membrana y su actividad, de manera

que la forma soluble e inactiva de la enzima está altamente fosforilada, mientras la activación de la enzima está acompañada de desfosforilación y translocación a la membrana (Weinhold *et al.*, 1994).

Se sugiere que el núcleo puede actuar como un reservorio de la enzima CCT $\alpha$  inactiva que, tras su estimulación, saldrá al citoplasma y se asociará con membranas (RE, principalmente) para activarse (Northwood *et al.*, 1999).

Recientemente se ha identificado una segunda isoforma de la CCT, denominada CCT $\beta$  (Lykidis *et al.*, 1998, 1999), la cual está localizada en el RE y presenta una expresión diferencial en distintos tejidos. El extremo amino de la CCT $\beta$  no se asemeja al de la CCT $\alpha$ , y carece de la secuencia de localización nuclear.

La CTP:colina-fosfato citidililtransferasa presenta una estricta dependencia de lípidos para expresar actividad, y por esta razón se deben adicionar lípidos aniónicos en el ensayo *in vitro* de su actividad catalítica máxima (Weinhold *et al.*, 1986). La proteína soluble, analizada en fracciones citosólicas de extractos crudos celulares, retiene lípidos incluso tras ser purificada y presenta, por consiguiente, cierto grado de actividad (Cornell, 1991). No obstante, para determinar *in vitro* la actividad máxima de la enzima soluble es necesario añadir lípidos activadores, mientras que la proteína asociada a membrana es activa en ausencia de lípidos exógenos. Los lípidos que activan a la enzima purificada han sido caracterizados utilizando membranas modelo, y son químicamente diversos. Los activadores lipídicos más potentes son los fosfolípidos aniónicos (fosfatidato, fosfatidilglicerol o fosfatidilinositol) y los ácidos grasos (oleato), y su efectividad se relaciona principalmente con la carga negativa del grupo de cabeza. Otros lípidos activadores menos potentes incluyen DG y otros lípidos neutros con grupos de cabeza polares y pequeños, PE insaturada y PC oxidada (Cornell y Northwood, 2000). La mezcla PC/ lípido aniónico se considera la combinación más potente.



En muchos tipos celulares se ha observado que la activación de la colina-fosfato citidililtransferasa se correlaciona concomitantemente con una translocación de la forma soluble de la enzima a la membrana (Kent, 1990; Tijburg *et al.*, 1989), indicando que existe una distribución reversible de la enzima entre citosol y membranas, activándose en asociación con la bicapa lipídica. La translocación reversible de la enzima también ha sido detectada *in vivo* (Bladergroen *et al.*, 1998). No obstante, la activación de la colina-fosfato citidililtransferasa también ocurre sin una apreciable translocación a membranas (Watkins y Kent, 1990; Weinhold *et al.*, 1991), sugiriendo que múltiples mecanismos pueden regular su actividad.

Existen dos modelos para explicar el mecanismo de activación de la CTP:colina-fosfato citidililtransferasa por lípidos. Kent y sus colaboradores proponen que la región helicoidal interfiere con el dominio catalítico provocando una disminución de actividad, de manera que la ocupación de los residuos de esta región con lípidos evita tal acción (Wang y Kent, 1995). El segundo modelo, establecido por Jackowski y sus colaboradores, propone que la unión del dominio helicoidal a lípidos induce un cambio conformacional que altera la afinidad de la enzima por el sustrato CTP (Yang *et al.*, 1995).

La CDP-colina:1,2-diacilglicerol colinafosfotransferasa (EC 2.7.8.2) cataliza la última reacción en la ruta de síntesis de PC vía CDP-colina. Los estudios de fraccionamiento subcelular indican que la colinafosfotransferasa está localizada principalmente en el RE, aunque parte de su actividad también es detectada en asociación con las membranas del Aparato de Golgi, mitocondriales y del núcleo (McMaster y Bell, 1997a). Esta actividad enzimática determina tanto la ubicación final de la PC sintetizada *de novo* como su constitución de ácidos grasos, que se halla evidentemente determinada por la composición correspondiente a la molécula de DG utilizada. La colinafosfotransferasa presenta un pH óptimo alcalino (8,0-8,5) y es inhibida por  $\text{Ca}^{2+}$ , y la reacción que cataliza es fácilmente reversible, de manera que podría disminuir el contenido de PC para producir DG (McMaster y Bell, 1997a).

El papel de la colinafosfotransferasa en la regulación de la biosíntesis de PC es poco conocido. No obstante, se ha descrito que la reducción de la síntesis de PC vía inhibición de la colinafosfotransferasa por tratamiento de las células con farnesol (Anthony *et al.*, 1999) o ceramidas permeables de corta cadena (Bladergroen *et al.*, 1999) provoca apoptosis, sugiriendo que esta enzima puede ejercer también un papel en el control de la síntesis de PC. Por otra parte, en nuestro laboratorio hemos observado que el etanol inhibe *in vitro* la actividad diacilglicerol colinafosfotransferasa, sugiriendo que el alcohol puede modular la biosíntesis de PC vía CDP-colina sin afectar a la enzima citidililtransferasa (Carrasco *et al.*, 2001b).

La colinafosfotransferasa no ha sido aún purificada a homogeneidad, aunque se ha clonado un cDNA humano correspondiente a una colina/ etanolaminafosfotransferasa ubicua (hCEPT1) y se ha expresado la proteína (Henneberry y McMaster, 1999).

### **III.1.2. BIOSÍNTESIS DE FOSFATIDILCOLINA POR METILACIÓN DE FOSFATIDILETANOLAMINA**

La PC también puede ser sintetizada mediante metilación sucesiva de PE, siendo ésta la principal ruta biosintética de PC en levaduras. Esta ruta alternativa de producción de PC es minoritaria en la mayoría de tejidos animales y en plantas, aunque contribuye significativamente a la síntesis total de PC en el tejido hepático, especialmente en situaciones de ausencia metabólica de colina (Walkey *et al.*, 1998). Aunque la actividad de metilación de PE ha sido descrita también en tejidos no hepáticos, la actividad es extremadamente baja en relación con la actividad de la ruta CDP-colina (Yang *et al.*, 1988; Blusztajn y Wurtman, 1981).

El proceso de metilación, que comprende una serie de tres reacciones, está catalizado por actividades fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa asociadas principalmente al RE, las cuales utilizan S-adenosilmetionina (SAM) como donador de grupos metilo. El gen que codifica para la enzima en humanos origina tres transcritos mediante procesamiento alternativo y se expresa diferencialmente en distintos tejidos (Shields *et al.*, 2001). La primera reacción de metilación

transforma la PE en el intermediario N-monometilfosfatidiletanolamina, el cual es metilado en una segunda etapa para producir el intermediario N,N'-dimetilfosfatidiletanolamina y, finalmente, éste es metilado para rendir PC, el derivado trimetilado de la PE (Esquema 2).

Existen pruebas de que el aporte de sustratos y la presencia de productos finales determinan la magnitud del proceso de biosíntesis de PC vía metilación de PE. El aporte de metionina es uno de los factores implicados, observándose un aumento en la formación de PC a partir de PE cuando se incuban hepatocitos de rata en presencia de concentraciones crecientes de este aminoácido (Yao y Vance, 1988). Por otra parte, Ridgway y colaboradores (1989) obtuvieron pruebas de que la actividad PE metiltransferasa se correlaciona fuertemente con la concentración de PE en hepatocitos de ratas deficientes en colina y metionina.

### **III.2. BIOSÍNTESIS DE FOSFATIDILETANOLAMINA**

En eucariotas, la PE se sintetiza mediante incorporación de etanolamina a PE vía CDP-etanolamina o por descarboxilación de PS. La reacción de intercambio base:etanolamina con fosfolípidos preexistentes puede además contribuir a la síntesis global de este fosfolípido.

La contribución relativa de cada ruta biosintética a la cantidad total de PE se desconoce. La vía de Kennedy a través del intermediario CDP-etanolamina depende de la disponibilidad de etanolamina en el medio. Así, muchas células animales en cultivo no requieren etanolamina para su crecimiento debido a que la PE es sintetizada principalmente por descarboxilación de PS (Kent, 1995). Por otro lado, estudios *in vivo* con sustratos marcados y experimentos realizados con hepatocitos frescos aislados de rata sugieren que la ruta CDP-etanolamina puede ser una ruta importante en la síntesis hepática de PE cuando están presentes concentraciones fisiológicas de etanolamina extracelular (Vermeulen *et al.*, 1997). Los niveles de etanolamina fosfato son incrementados cuando se eleva la concentración de etanolamina, mientras que los niveles de CDP-etanolamina permanecen relativamente constantes, lo cual sugiere que la etanolamina-

fosfato citidililtransferasa cataliza la etapa limitante de la ruta y puede ser considerada un punto de control en la biosíntesis de PE.

### III.2.1. BIOSÍNTESIS DE FOSFATIDILETANOLAMINA VÍA CDP-ETANOLAMINA

Las células *in vivo* están expuestas a un aporte constante de etanolamina presente en el suero, de manera que en estas condiciones puede predominar la síntesis de PE a través de la vía CDP-etanolamina. En este sentido, se ha indicado que la diferencia en la composición de ácidos grasos de PE y PS sintetizadas *de novo* sugiere que la descarboxilación de PS no contribuye de un modo significativo a la síntesis de PE hepática (Schmid *et al.*, 1991).

Las reacciones de la ruta CDP-etanolamina están catalizadas por tres enzimas: etanolamina quinasa, CTP:etanolamina-fosfato citidililtransferasa y CDP-etanolamina:1,2-diacilglicerol etanolaminafosfotransferasa. Esta vía de biosíntesis de PE es análoga a la ruta CDP-colina para la síntesis de PC, aunque ésta última ha sido estudiada más extensamente.

En células de mamíferos se ha propuesto que las actividades etanolamina quinasa (EC 2.7.1.82) y colina quinasa residen en una única proteína colina/ etanolamina quinasa (Aoyama *et al.*, 2000), aunque se han descrito también quinasas con una alta afinidad, o específicas, para la etanolamina en distintas especies. Sin embargo, recientemente se ha aislado un cDNA humano que codifica para una quinasa específica de etanolamina (EK1) (Lykidis *et al.*, 2001).

La CTP:etanolamina-fosfato citidililtransferasa (EC 2.7.7.14) cataliza la conversión de etanolamina-fosfato en CDP-etanolamina, y está expresada ampliamente en los tejidos humanos. El cDNA que codifica para la CTP:etanolamina-fosfato citidililtransferasa humana ha sido clonado (Nakashima, 1997). La etanolamina-fosfato citidililtransferasa exhibe cierta homología de secuencia con la colina-fosfato citidililtransferasa, y presenta dos dominios catalíticos unidos por una región conectora.

A diferencia de la colina-fosfato citidililtransferasa, la etanolamina-fosfato citidililtransferasa no es regulada por lípidos (Vermeulen *et al.*, 1993). Es una proteína hidrofílica que se obtiene como una enzima soluble, y carece de una región hidrofóbica lo suficientemente extensa como para insertarse en membrana. No obstante, la enzima presenta un alto contenido de aminoácido hidrofóbicos, y estudios ultraestructurales indican que la enzima está localizada preferentemente en áreas del citoplasma ricas en RE rugoso (Bladergroen y van Golde, 1997), sugiriendo que la enzima puede tener una débil afinidad por las membranas. En la mayoría de condiciones, esta enzima contribuye significativamente a la regulación de la vía CDP-etanolamina. La distribución reversible de la enzima entre el espacio citosólico y las cisternas del RE puede desempeñar además un papel en la canalización metabólica de la síntesis de PE.

La CDP-etanolamina:1,2-diacilglicerol etanolaminafosfotransferasa (EC 2.7.8.1) cataliza la reacción final en la biosíntesis de PE vía CDP-etanolamina (McMaster y Bell, 1997b). Esta enzima utiliza *in vivo*, casi exclusivamente, CDP-etanolamina. La actividad etanolaminafosfotransferasa de mamíferos se asocia fundamentalmente con la fracción microsomal, aunque su localización precisa aguarda el desarrollo de anticuerpos específicos. En mamíferos no ha sido aún purificada la proteína ni se ha clonado su cDNA. Como se indicó anteriormente, la hCEPT1, proteína codificada por un cDNA de colinafosfotransferasa humana, exhibe también actividad etanolaminafosfotransferasa (Henneberry y McMaster, 1999), aunque se desconoce su implicación en la síntesis de PE en mamíferos.

### **III.2.1. BIOSÍNTESIS DE FOSFATIDILETANOLAMINA POR DESCARBOXILACIÓN DE FOSFATIDILSERINA**

Fosfatidiletanolamina puede también ser sintetizada por descarboxilación de PS mediante la actividad fosfatidilserina descarboxilasa, localizada exclusivamente en mitocondrias (Vance, 1990), y que se halla presente tanto en eucariotas como en procariontes. El gen que codifica la

fosfatidilserina descarboxilasa ha sido clonado en mamíferos (Kuge *et al.*, 1996). La proenzima requiere múltiples etapas de procesamiento post-traducciona para ser funcional.

Voelker (1984) demostró que la descarboxilación de PS podría ser responsable de toda la PE sintetizada *de novo* en células de riñón de hámster cultivadas en ausencia de etanolamina, obteniéndose resultados similares cuando se utilizan distintas líneas celulares cultivadas en ausencia de etanolamina en el medio.

Un aspecto interesante de la biosíntesis de PE por descarboxilación de PS es que las dos enzimas participantes presentan distinta localización subcelular. Así, la fosfatidilserina sintasa está asociada a RE, mientras la fosfatidilserina descarboxilasa está localizada en la membrana interna mitocondrial de las células de mamífero, expuesta al espacio intermembrana (Zborowski *et al.*, 1983). Se han empleado distintos sistemas para estudiar los procesos acoplados de transporte y descarboxilación de PS, incluyendo células intactas (Voelker, 1985), células permeabilizadas (Voelker, 1990) y combinaciones de fracciones subcelulares purificadas (Vance, 1991). La PS recién sintetizada es importada a la mitocondria mediante un proceso de transporte dependiente de energía metabólica (ATP), que no requiere la implicación de ninguna proteína o factor citosólico. Entonces, se produce la conversión de la PS sintetizada a PE, en la reacción catalizada por la actividad descarboxilasa (Voelker, 1997). La PE originada es, a su vez, sustrato para la formación de PC vía metilación sucesiva en el RE.

### **III.3. BIOSÍNTESIS DE FOSFATIDILSERINA: REACCIÓN DE INTERCAMBIO DE BASES**

Fosfatidilserina se sintetiza en levaduras vía CDP-DG y en mamíferos a partir de PC o PE. Este último proceso se lleva a cabo mediante una reacción de intercambio de la serina exógena con la base del fosfolípido preexistente.

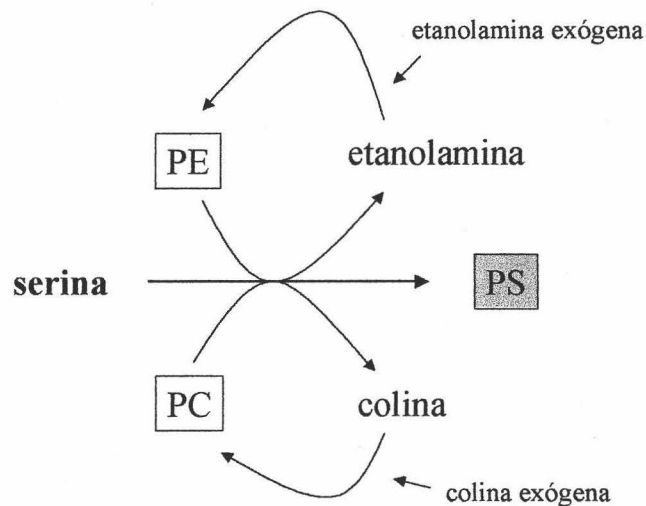
La incorporación de serina, etanolamina o colina a sus correspondientes fosfolípidos mediante reacción de intercambio de bases ocurre en la mayoría de los tejidos de mamíferos y en plantas, pero no en bacterias. Las reacciones correspondientes están catalizadas por actividades base:fosfolípido fosfatidiltransfera, y representan una ruta minoritaria para la síntesis de la mayoría de los fosfolípidos, excepto para PS. Así, en hepatocitos de rata y en presencia de concentraciones fisiológicas de etanolamina se ha observado que menos de un 10% de la etanolamina incorporada a PE puede atribuirse a una reacción de intercambio de bases (Sundler *et al.*, 1974). Por ello, este tipo de reacciones no producen una síntesis neta de los fosfolípidos mayoritarios, sino únicamente un remodelado de la porción aminoalcohol de los fosfolípidos ya existentes.

En mamíferos, la serina es incorporada a PS mediante una reacción de intercambio base:serina interviniendo actividades fosfatidilserina sintasa, localizadas en RE y dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (Gatti *et al.*, 1989; Suzuki y Kanfer, 1985). Esta reacción supone la única ruta metabólica de síntesis de PS en células de mamíferos. La adición de PS exógena al medio extracelular inhibe la síntesis *de novo* de PS (Kuge *et al.*, 1999; Nishijima *et al.*, 1986), indicando que un mecanismo de control por retroalimentación regula su producción.

El papel de las enzimas de intercambio de bases en la biosíntesis de PS *in vivo* ha sido elucidado mediante estudios genéticos utilizando mutantes de células ováricas de hámster chino (CHO) defectivos en actividades de intercambio de bases (Kuge y Nishijima, 1997). La reacción de intercambio de la base serina está catalizada por al menos dos enzimas: la fosfatidilserina sintasa I cataliza la reacción de intercambio de bases entre serina y PC, aunque posiblemente también utiliza PE como sustrato, mientras la fosfatidilserina sintasa II utiliza solamente PE (Esquema 3).

Posteriormente, la PS sintetizada puede ser transportada a la mitocondria, donde es descarboxilada a PE mediante la reacción catalizada por fosfatidilserina descarboxilasa. La PE

resultante puede a su vez ser transformada en PC por sucesivas metilaciones, como se indicó anteriormente.



**ESQUEMA 3. BIOSÍNTESIS DE FOSFATIDILSERINA MEDIANTE REACCIÓN DE INTERCAMBIO DE BASES CATALIZADA POR LA FOSFATIDILSERINA SINTASA.**

### III.4. BIOSÍNTESIS DE ESFINGOMIELINA

La biosíntesis de este esfingofosfolípido está estrechamente relacionada con la síntesis de PC, ya que ésta cede directamente su grupo de cabeza colina-fosfato a la ceramida para producir SM, en una reacción catalizada por la esfingomielina sintasa, también denominada fosfatidilcolina:ceramida colinafosfotransferasa (Luberto y Hannun, 1999). Además de SM, también se genera DG como producto de la reacción (ver Esquema 4, en apartado VI.2.).

Existen distintas isoenzimas de la esfingomielina sintasa, localizándose en aparato de Golgi (Futerman *et al.*, 1990), membrana plasmática (Kallen *et al.*, 1994), así como en membrana nuclear y cromatina (Albi y Magni, 1999), variando considerablemente sus niveles relativos dependiendo del tipo celular.



### III.5. BIOSÍNTESIS DE FOSFATIDILINOSITOL, FOSFATIDILGLICEROL Y CARDIOLIPINA

Estos tres fosfolípidos se sintetizan vía CDP-DG, como se indicó anteriormente. El PA precursor para la biosíntesis de estos fosfolípidos aniónicos es producido vía lisofosfatidato mediante acilación sucesiva del  $\alpha$ -glicerofosfato, o bien mediante fosforilación catalizada por la diacilglicerol quinasa del DG generado en respuestas de señalización celular. Por tanto, la biosíntesis de estos fosfolípidos está bajo el control de aquellos agonistas y señales intracelulares que estimulan la generación de PA o DG.

La diacilglicerol quinasa (EC 2.7.1.107) fosforila al segundo mensajero DG produciendo PA, y se sugiere que la enzima está activada en membrana plasmática, donde se genera el DG (van Blitterswijk y Houssa, 2000). En mamíferos, la familia de enzimas diacilglicerol quinasa incluye nueve isoformas diferentes, las cuales han sido clonadas y caracterizadas. También es detectada en el núcleo, en asociación con otras enzimas reguladoras del ciclo de los fosfoinosítidos, teniendo un efecto sobre la progresión del ciclo celular. Se sugiere que el aporte del precursor PA es limitante y que la diacilglicerol quinasa está implicada en la regulación global de las rutas de biosíntesis de estos fosfolípidos aniónicos (Lykidis *et al.*, 1997).

La última etapa en la ruta biosintética de PI está catalizada por la actividad fosfatidilinositol sintasa (EC 2.7.8.11). Esta enzima está presente en todas las células de mamíferos (Antonsson, 1997) y utiliza mio-inositol y el sustrato hidrofóbico CDP-DG para producir PI y CMP. La fosfatidilinositol sintasa es una enzima unida a membrana, y está localizada principalmente en la cara citoplasmática del RE, aunque también se encuentra en preparaciones de membrana plasmática. Los niveles de expresión de las proteínas CDP-diacilglicerol sintetasa y fosfatidilinositol sintasa no son determinantes críticos del contenido celular en PI, lo que sugiere que no intervienen directamente en la regulación de la biosíntesis de PI (Lykidis *et al.*, 1997).

El PG es producido también vía CDP-DG a través de dos reacciones catalizadas por la fosfatidilglicerol-fosfato sintasa y la fosfatidilglicerol-fosfato fosfatasa. La fosfatidilglicerol-fosfato sintasa cataliza una etapa común en la biosíntesis tanto del PG como de la CL (difosfatidilglicerol) en células de mamíferos, y ha sido purificada recientemente de mitocondrias (Kawasaki *et al.*, 2001). La mutación de esta enzima ocasiona alteraciones en la estructura y función mitocondrial (Ohtsuka *et al.*, 1993).

La CL es encontrada en todos los eucariotas, localizándose exclusivamente en las mitocondrias de los tejidos de mamíferos y en levaduras. En eucariotas, la síntesis mitocondrial de CL utiliza PG y CDP-DG como sustratos y es catalizada por la cardiolipina sintasa, una proteína unida a membrana que presenta requerimiento de fosfolípidos y cationes divalentes (Schlame y Hostetler, 1997).

#### **IV. BIOSÍNTESIS DE TRIACILGLICEROL**

La síntesis de TG utiliza DG como precursor. Cuantitativamente, el TG es el principal lípido de reserva energética en las células eucarióticas, y es almacenado en diversos tejidos corporales, principalmente adiposo y hepático. La utilización del TG requiere su movilización a partir de estos depósitos (Gibbons *et al.*, 2000) y su transferencia al plasma sanguíneo.

La acil-CoA:diacilglicerol aciltransferasa (EC 2.3.1.20) cataliza la reacción de acilación del DG para producir TG, utilizando acil-CoA como sustrato, y se expresa ubicuamente en todos los tejidos. Esta enzima desempeña un papel importante en la síntesis de TG para el ensamblaje y la secreción de lipoproteínas (Buhman *et al.*, 2001). Se trata de una proteína integral de membrana que, al igual que aquellas que utilizan DG para la síntesis de PC y PE, está estrechamente asociada con las membranas del RE. La proteína no ha sido aún purificada a homogeneidad, aunque recientemente se ha identificado un cDNA que codifica para la actividad diacilglicerol aciltransferasa (Cases *et al.*, 1998).

Se ha descrito *in vitro* un posible mecanismo de modulación de la actividad diacilglicerol aciltransferasa por fosforilación/ desfosforilación (Haagsman *et al.*, 1982; Rodriguez *et al.*, 1992). Así, en microsomas de tejido hepático o adiposo de rata la enzima fue inactivada en presencia de ATP,  $Mg^{2+}$  y fracción citosólica, mientras que fue reactivada al incubar sólo con citosol. Por otra parte, la enzima es también inhibida por ácidos grasos. Durocher y colaboradores (1990) observaron que la actividad enzimática decrece al incubar *in vitro* microsomas de tejido adiposo de rata en presencia de concentraciones micromolares de ácido oleico.

La síntesis global de TG parece ser muy sensible a alteraciones de la actividad diacilglicerol aciltransferasa, pudiéndose considerar como la enzima limitante en la síntesis de TG (Mayorek y Bar-Tana, 1987). Sin embargo, otros autores consideran más probable que la biosíntesis de TG sea controlada mediante una regulación coordinada de las actividades fosfatidato fosfohidrolasa y diacilglicerol aciltransferasa, así como por la disponibilidad de sustratos precursores. En este sentido, determinados factores metabólicos y de estrés inducen una activación simultánea de ambas enzimas en hígado (Cascales *et al.*, 1984; Tijburg *et al.*, 1988).

## **V. RUTAS DE DEGRADACIÓN Y REMODELADO DE FOSFOLÍPIDOS**

### **V.1. DEGRADACIÓN POR FOSFOLIPASAS**

La homeostasis de membrana es mantenida a través de la degradación mediada por fosfolipasas de los fosfolípidos en exceso (Lykidis y Jackowski, 2001). Los fosfolípidos son degradados por mediación de fosfolipasas específicas. La enzima fosfolipasa C origina DG y una base fosforilada; la fosfolipasa D genera PA y una base libre; finalmente, la enzima fosfolipasa

A libera los grupos acilo grasos de los fosfolípidos para producir un lisofosfolípido: la fosfolipasa A<sub>2</sub> elimina el ácido graso de la posición *sn*-2, generando un ácido graso insaturado, mientras la fosfolipasa A<sub>1</sub> lo elimina de la posición *sn*-1.

La fosfolipasa A<sub>2</sub> está presente de forma ubicua en los tejidos de mamíferos. Existen distintas isoformas de fosfolipasa A<sub>2</sub>, tanto intracelulares como secretadas (Valentin y Lambeau, 2000). Se trata de una enzima importante en la producción de mediadores lipídicos del proceso inflamatorio, ya que el araquidonato liberado de la posición *sn*-2 de fosfolípidos es precursor de los eicosanoides (Piomelli, 1993). La enzima celular puede ser activada a través de receptores de membrana acoplados a proteínas G o por receptores tirosina quinasa, estando implicada en la producción inicial de mediadores lipídicos. Varias líneas de evidencia sugieren que la enzima secretada está implicada en la producción sostenida de mediadores lipídicos en distintos tipos celulares (Berezziat, 1996). Por otra parte, el lisofosfatidato generado es también un mediador fosfolipídico que ejerce varias actividades biológicas (Gaits *et al.*, 1997), incluyendo quimiotaxis y relajación del músculo liso, y potencia respuestas celulares a largo plazo. además de presentar actividad lítica contra la membrana y ser tóxico para las células.

Se han identificado fosfolipasas C específicas para PI (Crooke y Bennett, 1989) y PC (Kiss, 1999). Existe un enorme interés en las rutas del metabolismo de los fosfoinosítidos, debido a la importancia de estos lípidos en transducción de señales. El PI-4,5-bisfosfato es un sustrato para la fosfolipasa C, la cual es activada en respuesta a una amplia variedad de estímulos hormonales. El DG producido actúa entonces como un segundo mensajero, activando ciertas isoenzimas de la proteína quinasa C (Nishizuka, 1992), la cual ejerce un papel fundamental en un amplio rango de procesos biológicos, incluyendo proliferación y diferenciación celular (Saito *et al.*, 2002). El otro producto generado, inositol-1,4,5-trisfosfato, causa una movilización del Ca<sup>2+</sup> almacenado intracelularmente (Berridge e Irvine, 1989).

La hidrólisis estimulada por agonistas de PC y, en menor medida, posiblemente también de PE, por mediación de la fosfolipasa C o la acción combinada de fosfolipasa D y fosfatidato

fosfohidrolasa, es particularmente importante para producir una elevación sostenida de los niveles de DG. El incremento sostenido en los niveles de DG permite una activación prolongada de la proteína quinasa C en ausencia de una alta concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Tronchere *et al.*, 1994), lo cual puede ser importante en respuestas a largo plazo tales como la proliferación y diferenciación celular.

La fosfolipasa D (EC 3.1.4.4) hidroliza principalmente PC, y en menor extensión PE, y está ampliamente distribuida en los tejidos de mamíferos. Sus acciones celulares están relacionadas con la producción de PA e incluyen alteraciones del crecimiento y morfología celular, así como modulación de procesos de secreción (Exton, 2000). La fosfolipasa D cataliza una reacción de transfosfatidilación, de manera que sustituye la cabeza polar de la PC por una molécula de agua, produciendo PA. Cuando el grupo incorporado es un alcohol primario, en lugar de agua, el producto generado es fosfatidilalcohol, el cual se acumula intracelularmente.

Las reacciones de intercambio de bases, por consiguiente, pueden considerarse que están catalizadas por actividades tipo fosfolipasa D implicadas en el remodelado de las cabezas polares de fosfolípidos.

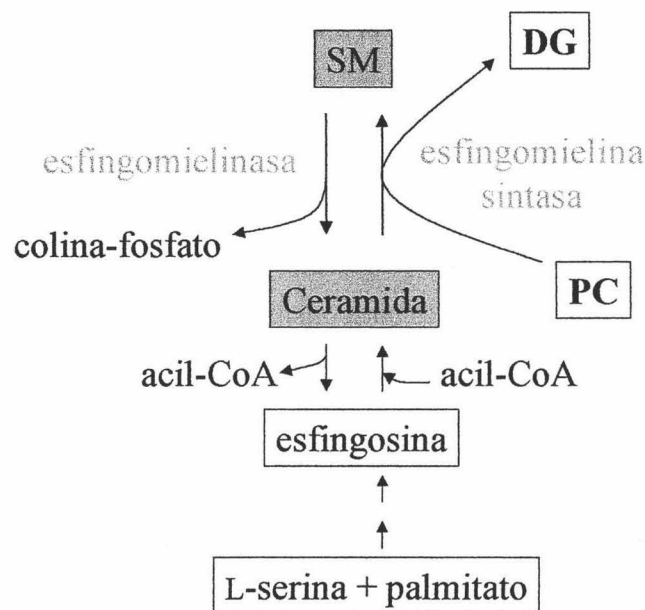
## **V.2. DEGRADACIÓN DE ESFINGOMIELINA**

Las rutas de señalización que implican a los glicerofosfolípidos y la SM están controladas y coordinadas simultáneamente (Hannun *et al.*, 2001). Aunque los esfingolípidos son menos abundantes que los glicerolípidos, también se encuentran ubicuamente en las membranas celulares eucarióticas y en las lipoproteínas, y están implicados en transducción de señales, regulando los procesos de proliferación, diferenciación y muerte celular.

El denominado ciclo de la SM (Alessenko, 2000) es una ruta de transducción de señales caracterizada por la degradación reversible de la SM mediada por actividades esfingomielinasa,

y una generación concomitante de ceramida (Esquema 4), la cual funciona como segundo mensajero intracelular (Mathias *et al.*, 1998).

La ceramida es un componente central en el metabolismo de esfingolípidos y en señalización. Se sintetiza vía esfingosina, y sirve de precursora para la biosíntesis de SM, cerebrósidos, sulfátidos y gangliósidos. La ceramida activa diversas fosfatasas y quinasas intracelulares, actuando como un potente y específico supresor del crecimiento celular y un inductor de apoptosis (Hannun y Obeid, 1995).



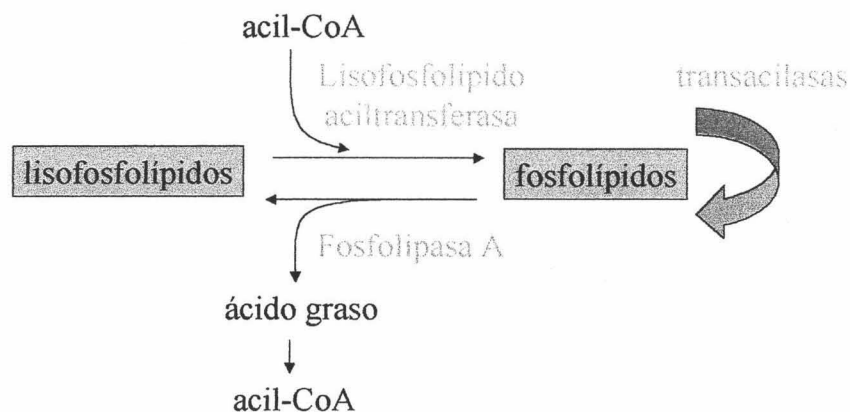
**ESQUEMA 4. CICLO DE LA ESFINGOMIELINA.**

### V.3. REMODELADO DE FOSFOLÍPIDOS

En las células eucarióticas se mantiene un constante remodelado de los grupos acilo de los fosfolípidos, a través de procesos de desacilación por fosfolipasas A y reacilación por aciltransferasas, así como mediante reacciones de transacilación (Esquema 5).

Los procesos de acilación de lisofosfolípidos constituyen una vía de recambio de los grupos acilo de fosfolípidos previamente degradados por la fosfolipasa A. En estos procesos de remodelado fosfolipídico intervienen distintas actividades acil-CoA:lisofosfolípido aciltransferasa, dependientes e independientes de coenzima A (Yamashita *et al.*, 1997). Las actividades lisofosfolípido aciltransferasa se encuentran ampliamente distribuidas en los células de mamíferos, y están estrechamente unidas a la membrana microsomal y plasmática.

Con pocas excepciones, la aciltransferasa específica para la acilación de la posición *sn*-1 del lisofosfolípido transfiere preferentemente ácidos grasos saturados, mientras que una enzima diferente utiliza ácidos grasos insaturados para esterificar los 1-acil 2-lisofosfolípidos. Esta última enzima es la responsable de la inserción gradual de araquidonato en los fosfolípidos hepáticos, reemplazando en esta posición al oleato o al linoleato.



**ESQUEMA 5. INTERCAMBIO METABÓLICO DE LOS GRUPOS ACILO DE FOSFOLÍPIDOS.**

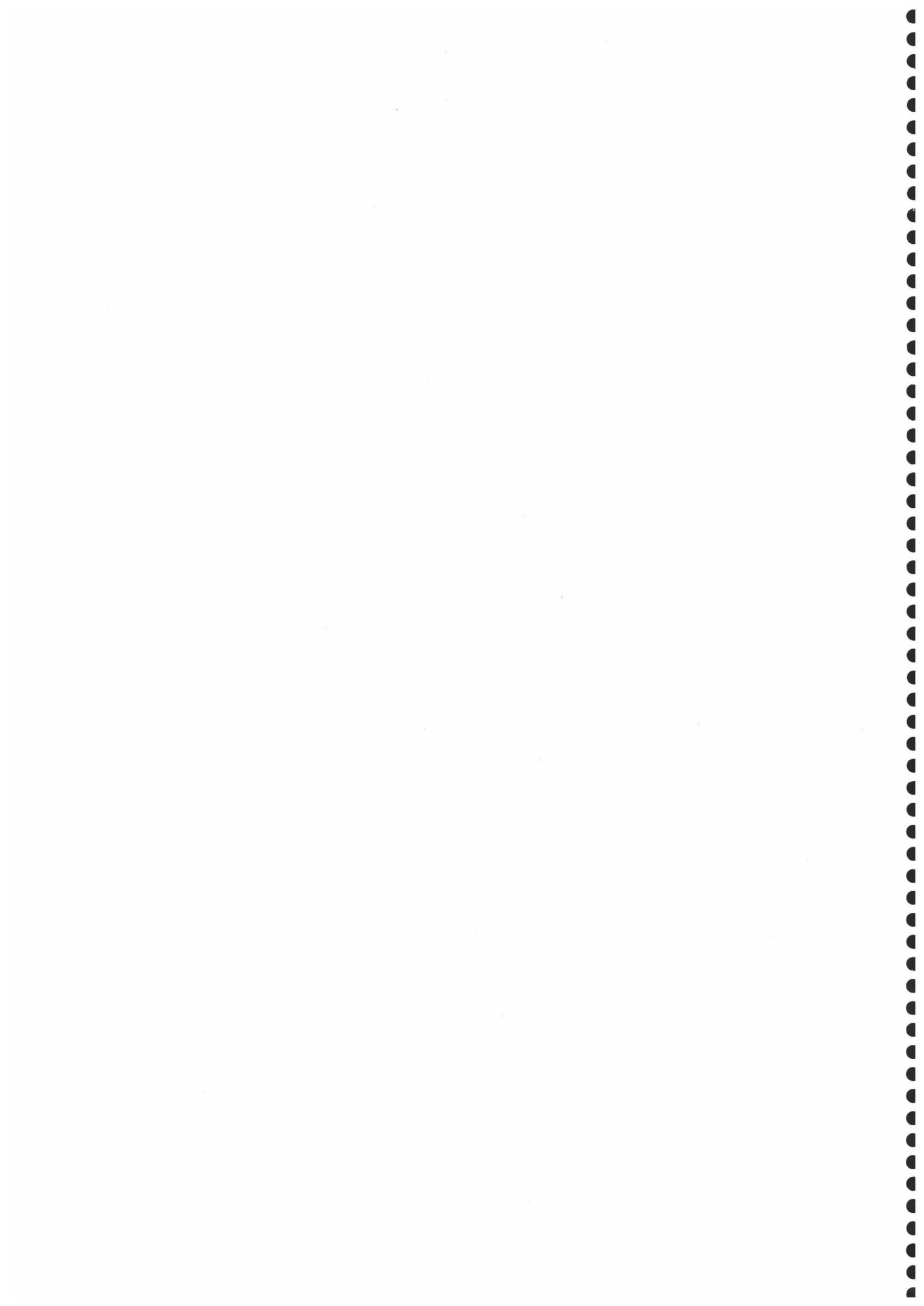
Otros sistemas de remodelado de ácidos grasos de los fosfolípidos consisten en la transferencia directa de un ácido graso desde un fosfolípido a un lisofosfolípido e implican la actuación de transacilasas (McDonald y Sprecher, 1991). Estas actividades enzimáticas también pueden catalizar la transferencia de ácidos grasos insaturados entre fosfolípidos preexistentes, sin que se libere ningún ácido graso libre (Snyder, 1992).

Se han destinado considerables esfuerzos para determinar el papel de estas enzimas de acilación/ transacilación en el modelado de las especies moleculares de los fosfolípidos de membrana. Cambios relativamente pequeños en su composición de grupos acilo pueden provocar alteraciones significativas en la fluidez de la membrana, lo que puede ser importante en la respuesta celular frente a variaciones del entorno.





## **OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO**



La línea celular de hepatoma humano HepG2 es un modelo experimental adecuado para estudios sobre metabolismo lipídico hepático. Nuestra experiencia previa en el trabajo con células hepáticas nos animó a emplear tales células para estudiar la influencia de dos agentes xenobióticos de importancia farmacológica, etanol y hexadecilfosfocolina, a nivel del metabolismo de lípidos. Ambos agentes se intercalan en la bicapa lipídica, pudiendo afectar tanto a la composición como a la funcionalidad de las membranas biológicas.

La mayor dificultad en el análisis de la acción del alcohol es poder simplificar un sistema multiparamétrico complejo. Una de las estrategias por las que se ha llevado a cabo esta simplificación es la utilización de las células ADH-negativas HepG2. Es razonable asumir que los efectos ejercidos por el etanol en estas células no estarán determinados por la estimulación lipogénica que implica su oxidación vía ADH, desencadenando respuestas moleculares que podrán ser analizadas independientemente.

La aplicación sistémica de las alquilfosfocolinas para uso terapéutico es un campo actual de investigación que promete ser efectivo en la lucha contra el cáncer y ciertas enfermedades parasitarias, siendo la hexadecilfosfocolina el principal representante de estos agentes análogos sintéticos de la lisofosfatidilcolina. Está descrito, además, que se produce un acúmulo de estos compuestos en hígado cuando son administrados vía oral o intravenosa. No obstante, no se ha estudiado aún su acción sobre líneas celulares de procedencia hepática.

Teniendo en cuenta los antecedentes bibliográficos nos planteamos los siguientes objetivos:

- a) Caracterización de las principales rutas del metabolismo de fosfolípidos y lípidos neutros en la línea celular de hepatoma HepG2.
- b) Estudio de la actividad citotóxica del etanol y de la capacidad de metabolización del alcohol en estas células.
- c) Análisis de la influencia del etanol sobre el metabolismo lipídico en células HepG2.

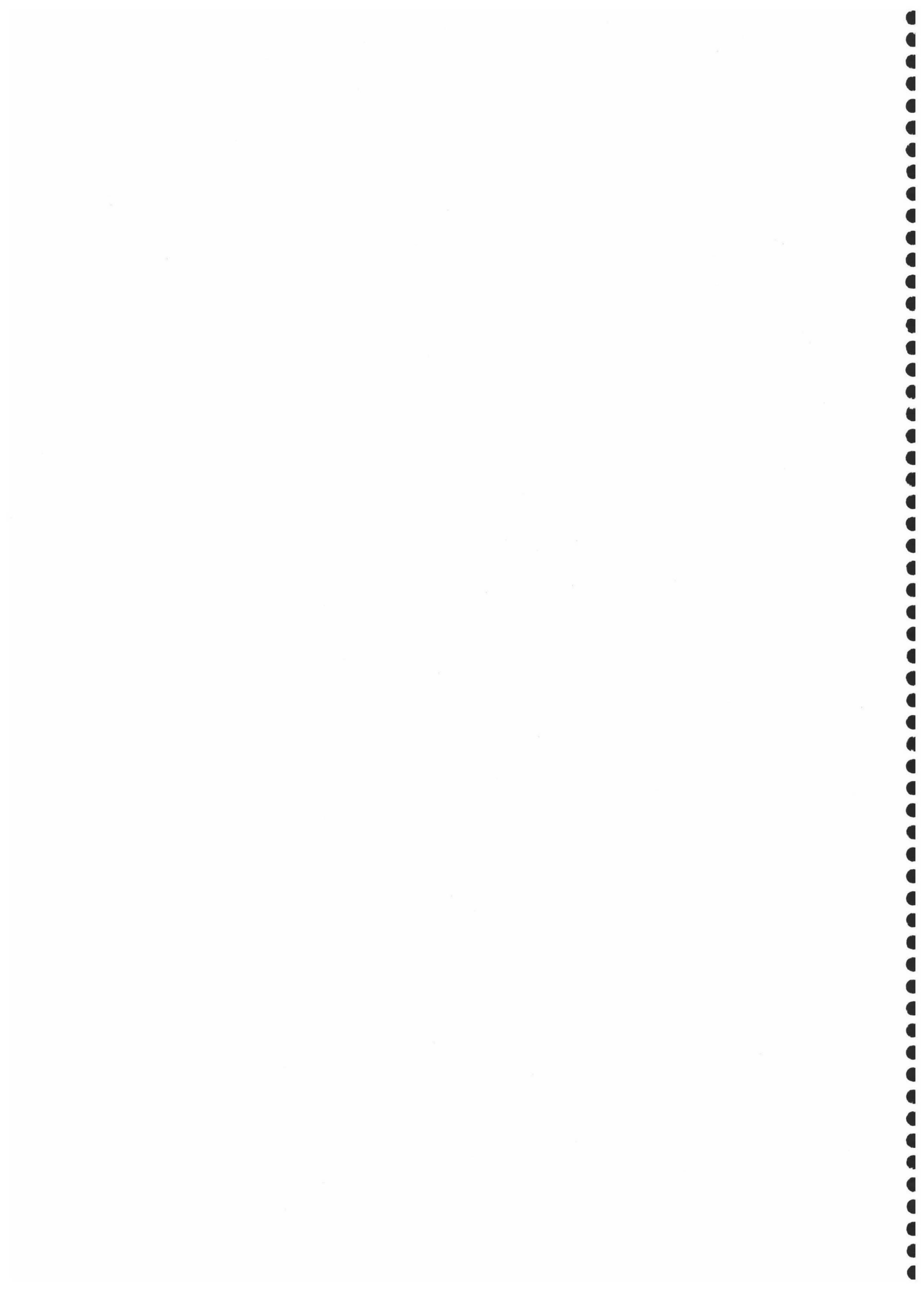
- d) Estudio de la actividad citotóxica y antiproliferativa de la hexadecilfosfocolina en células HepG2.
- e) Análisis de la influencia de esta alquilfosfocolina sobre las principales rutas del metabolismo lipídico en la línea celular HepG2.
- f) Determinación de los posibles mecanismos moleculares de ambos agentes xenobióticos en células HepG2.

Para la consecución de estos objetivos nos proponemos el siguiente Plan de Trabajo:

- 1) Valoración de la citotoxicidad causada en células HepG2 por la exposición a etanol o hexadecilfosfocolina, utilizando diferentes técnicas.
- 2) Realización de experimentos de marcaje isotópico, incorporando distintos precursores metabólicos exógenos. Análisis de la influencia del tratamiento con etanol o hexadecilfosfocolina sobre las principales rutas de biosíntesis *de novo* de fosfolípidos y lípidos neutros.
- 3) Influencia de etanol y hexadecilfosfocolina sobre los procesos de recambio metabólico y secreción lipídica.
- 4) Análisis de composición lipídica de las células HepG2, en cuanto a niveles de fosfolípidos, colesterol y triacilglicerol.
- 5) Determinación de actividades enzimáticas y niveles de intermediarios en aquellas rutas metabólicas afectadas por la acción de estos agentes.



## **MATERIAL Y MÉTODOS**



## I. MATERIAL

### I.1. MATERIAL DE CULTIVO CELULAR

El medio de cultivo EMEM, de composición definida, y las soluciones de tripsina al 2,5%, antibióticos (penicilina 5000 U/mL, estreptomicina 5000 µg/mL) y azul de tripán al 0,4% (w/v) fueron suministrados por Sigma-Aldrich. El suero bovino fetal se obtuvo de Roche Diagnostics. Las placas y frascos para cultivo de células en adherencia se adquirieron de Redox Lab y Afora.

#### I.1.1. ESTERILIZACIÓN DEL MATERIAL Y REACTIVOS

La solución salina isotónica PBS (NaCl 136,9 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,2 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM), ajustada a pH 7,4, así como los frascos de vidrio, y el sistema y la membrana de filtración se esterilizan en el autoclave. El medio de cultivo (pH 7,2-7,4) y el medio de congelación se esterilizan mediante filtración al vacío.

El resto de material empleado se ha adquirido estéril: placas petri y Falcons, pipetas individuales desechables, solución de tripsina y solución de antibióticos.

### I.2. MATERIAL RADIATIVO

[1,2,3-<sup>3</sup>H]glicerol (40 Ci · mmol<sup>-1</sup>), [1-<sup>14</sup>C]etanol (55 Ci · mol<sup>-1</sup>) y clorhidrato de [1,2-<sup>14</sup>C]etanolamina (110 Ci · mol<sup>-1</sup>) fueron suministrados por American Radiolabeled Chemicals. L-[3-<sup>3</sup>H]serina (27 Ci · mmol<sup>-1</sup>), ácido[1-<sup>14</sup>C]araquidónico (54 Ci · mol<sup>-1</sup>), ácido [1-<sup>14</sup>C]palmítico (56 Ci · mol<sup>-1</sup>), cloruro de [metil-<sup>14</sup>C]colina (55 Ci · mol<sup>-1</sup>), [metil-<sup>14</sup>C]colina-fosfato (56 Ci · mol<sup>-1</sup>) y citidina-5'-difosfo[metil-<sup>14</sup>C]colina (54 Ci · mol<sup>-1</sup>) se adquirieron de Amersham Pharmacia Biotech.

### **I.3. OTROS TIPOS DE MATERIAL Y REACTIVOS**

La hexadecilfosfocolina, las placas de cromatografía en capa fina y el Kit para la determinación de triacilglicerol fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. El Kit para la determinación de colesterol total fue suministrado por Dipal. El MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) se adquirió de Molecular Probes. El líquido de centelleo Ecoscint, biodegradable y válido tanto para muestras orgánicas como acuosas, fue adquirido de National Diagnostics. Todos los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico.

#### **I.3.1. AGENTES XENOBIÓTICOS: HEXADECILFOSFOCOLINA Y ETANOL**

El etanol absoluto fue diluido directamente en el medio de cultivo para obtener la concentración adecuada de alcohol durante los experimentos. Para minimizar la evaporación del etanol, las placas fueron selladas con Parafilm. Las placas controles fueron también selladas, incubándose en las mismas condiciones que las placas correspondientes a las células tratadas con etanol.

La suspensión de hexadecilfosfocolina, disuelta en PBS, se preparó poco antes de ser añadida al medio de cultivo, para obtener la concentración final requerida.

### **I.4. MATERIAL BIOLÓGICO: LÍNEA CELULAR HepG2**

La línea celular de hepatoblastoma humano HepG2 (Knowles *et al.*, 1980), designada con la referencia HB-8065 en la ATCC (American Type Culture Collection), ha sido adquirida a través de la ECACC (European Collection of Animal Cell Cultures) (Salisbury, UK).

El cultivo de las células HepG2 fue iniciado en el pase nº 111. Hemos mantenido una reserva de la línea celular en viales de criocongelación sumergidos en la fase gaseosa de



nitrógeno líquido, de la cual hemos descongelado células para cultivarlas hasta completar un máximo de 20 pases más.

Las células HepG2 fueron congeladas de manera gradual, hasta alcanzar una temperatura igual o inferior a  $-80^{\circ}\text{C}$ , en FCS suplementado con un 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). Una vez tripsinizadas y recogidas mediante centrifugación, las células fueron resuspendidas en FCS/DMSO al 10% y transferidas a viales de criocongelación debidamente identificados. Éstos fueron sumergidos en primer lugar en hielo durante 2 h, después se mantuvieron a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante otras 2 h, y se pasaron rápidamente a una cámara a  $-80^{\circ}\text{C}$ . A esta última temperatura hemos mantenido una reserva de células a corto plazo, permaneciendo las células en condiciones óptimas de viabilidad durante varios meses. Finalmente, los viales fueron transferidos a un contenedor de nitrógeno líquido, manteniéndose de este modo una reserva indefinida de la línea celular.

El proceso de descongelación de las células, al contrario de la congelación, debe efectuarse rápidamente. Para ello se dispone el vial a temperatura ambiente durante 1 min, y se coloca seguidamente en un baño de agua a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 1 ó 2 min, sin sumergirlo totalmente, hasta que se descongele. La suspensión celular descongelada se transfiere a una cantidad en exceso del medio de cultivo previamente calentado a  $37^{\circ}\text{C}$ , se centrifuga a 1000 rpm durante 5 min y se resuspenden las células en un volumen adecuado de medio de cultivo fresco.

## **II. MÉTODOS**

### **II.1. MANTENIMIENTO DEL CULTIVO CELULAR**

Las células HepG2 son mantenidas en medio esencial mínimo de Eagle (EMEM) conteniendo L-glutamina 2 mM y un 1% de aminoácidos no esenciales, y suplementado con un 10% (v/v) de suero bovino fetal (FCS) inactivado por calor y antibióticos (penicilina 100 U/mL y

estreptomycin 100 µg/mL). El pH del medio de cultivo se ha regulado mediante los sistemas tampón NaHCO<sub>3</sub> 25 mM y Hepes 10 mM, y ajustado dentro del intervalo 7,2-7,4. Las células han sido sembradas en placas o frascos con su superficie tratada para una adecuada adhesión celular, y se han incubado a 37°C en una estufa termostaticada con una atmósfera humidificada de 95% aire: 5% CO<sub>2</sub>.

El cambio del medio de cultivo se ha realizado en condiciones estériles empleando una cámara de flujo laminar. Tras eliminar el medio, la monocapa celular es lavada con PBS (pH 7,4) a 37°C. El medio de cultivo es reemplazado rutinariamente cada dos días por medio fresco precalentado, manteniéndose de esta forma las células en unas óptimas condiciones de aporte de nutrientes y retirada de los productos de desecho y restos celulares en suspensión, así hasta que requieren un subcultivo o bien son utilizadas en un determinado ensayo.

### II.1.1. SUBCULTIVO CELULAR

El subcultivo de las células se realiza mediante tripsinización, de modo que las células son despegadas de la superficie de la placa de cultivo y sembradas en nuevas placas. Este procedimiento se lleva a cabo cuando las células han crecido hasta alcanzar casi total confluencia.

El medio de cultivo es retirado, y las células son lavadas dos veces con PBS. Se añade entonces una solución estéril de tripsina al 0,25% (w/v) conteniendo EDTA al 0,02% (w/v), preparada en PBS (pH 7,4), dejándose actuar la proteasa a 37°C durante varios minutos. Tras observar que las células comienzan a redondearse y despegarse, se añade un exceso del medio de cultivo (EMEM/ 10% FCS), con lo cual se inhibe la actuación de la tripsina. Se dispersan las células mediante un suave pipeteo que disgregue las aglomeraciones celulares, y se centrifugan a 1000 rpm durante 10 min. Tras eliminar el medio que contiene la tripsina, se resuspende el sedimento celular en medio fresco y se siembran las células en nuevas placas, distribuyéndolas

homogéneamente por toda la superficie de cultivo. Finalmente, las células se disponen en la estufa de CO<sub>2</sub> para su adherencia y crecimiento.

Para conseguir una velocidad de crecimiento adecuada, las células HepG2 requieren ser subcultivadas a una dilución entre 1:3 a 1:6, sembrándolas a una densidad celular inicial de aproximadamente  $2-3 \cdot 10^4$  células/cm<sup>2</sup>. Debido a su procedencia tumoral, estas células no presentan inhibición del crecimiento por contacto, una característica propia de las células no tumorales en cultivo, por lo tanto tienden a crecer más rápidamente y a agruparse cuando se aproximan y entablan contacto entre sí.

Habitualmente, las células fueron utilizadas en los experimentos que constituyen la presente memoria de Tesis Doctoral una vez transcurridos 6-7 días tras el subcultivo, habiéndose formado monocapas celulares densas con una confluencia aproximada del 70% (aproximadamente,  $3 \cdot 10^6$  células en una placa de 60 mm de diámetro).

### **II.1.2. DETECCIÓN DE CONTAMINACIÓN**

Los cultivos fueron rutinariamente inspeccionados con objeto de detectar una posible contaminación por micoplasmas, utilizando para ello la tinción con Hoechst 33258 (bisbenzimidazoles) (50 ng/mL, en PBS), un colorante que tiñe el DNA. Hemos de indicar que en ningún caso detectamos la presencia de micoplasmas. Los cultivos contaminados por hongos o bacterias, apreciados visualmente, fueron inmediatamente desechados.

### **II.2. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD**

Para el estudio de la acción citotóxica ejercida por el etanol o la hexadecilfosfolina en estas células hemos realizado diversos ensayos utilizando las siguientes técnicas: medida del grado de liberación al medio extracelular de la enzima citosólica lactato deshidrogenasa (LDH); valoración del daño mitocondrial y funcionalidad celular por el test del MTT; análisis de la

viabilidad celular mediante el test de exclusión del colorante azul de tripán y medida del grado de peroxidación lipídica mediante el test del ácido 2-tiobarbitúrico (TBA).

### II.2.1. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD LDH

La liberación de LDH desde el citosol al medio extracelular es indicativa de una lisis de la membrana celular y, por consiguiente, de citotoxicidad.

Tras exponer las células HepG2 a distintos tratamientos con los agentes etanol o hexadecilfosfolina, se recogieron muestras del medio de cultivo y se cuantificó la actividad LDH extracelular. Como control de ausencia de toxicidad, determinamos la actividad LDH en muestras de medio procedentes de células no tratadas e incubadas en idénticas condiciones, por tanto la acción citotóxica ejercida por ambos compuestos xenobióticos se expresa como actividad LDH liberada relativa al control.

Para la determinación de la actividad LDH, se centrifuga el medio a 3000 rpm durante 10 min para eliminar posibles restos celulares en suspensión. El ensayo se realiza a 25°C utilizando piruvato 0,6 mM y NADH 0,18 mM, en tampón fosfato potásico 50 mM (pH 7,5), determinándose la  $\Delta A_{340}/\Delta t$  producida por la oxidación del NADH ( $\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) al reducirse el piruvato a L-lactato. Se añade una cantidad de medio tal que la  $\Delta A_{340}/\text{min}$  sea aproximadamente de 0,05-0,1. Los resultados pueden expresarse como  $U/\text{mL}_{\text{medio}}$ , siendo U la actividad enzimática ( $\mu\text{mol}$  de sustrato transformado o producto producido por min).

### II.2.2. TEST DEL MTT

La sal de tetrazolio MTT, soluble en agua y de color amarillo, sufre ruptura del anillo de tetrazolio por acción de las deshidrogenasas mitocondriales (Carmichael *et al.*, 1987), transformándose en un derivado de formazán, insoluble en agua y de color violeta. La solubilización del formazán producido permite determinar su concentración midiendo

espectrofotométricamente la absorbancia a 570 nm, con sustracción del fondo a 630 nm. Las deshidrogenasas mitocondriales activas de las células viables transformarán el MTT, de manera que valoramos el porcentaje de citoviabilidad midiendo la  $A_{570}-A_{630}$  del derivado de formazán solubilizado y hallando la relación del valor obtenido para las células tratadas con respecto al valor en las células controles.

Este ensayo es un índice de la funcionalidad de la membrana interna mitocondrial. La disminución en la producción de formazán está correlacionada con una disminución en el número de mitocondrias funcionales presentes, lo que indica pérdida de viabilidad celular.

Tras lavar la monocapa celular con PBS, añadimos una solución de MTT 2 mg/mL (en PBS) al medio de cultivo, en proporción 1:10, e incubamos durante 3 h a 37°C y en oscuridad. Retiramos entonces el medio de incubación, lavamos con PBS y disolvemos el derivado de formazán en una solución de isopropanol ácido (HCl 0,05 N en isopropanol absoluto) agitando durante 10 min. Centrifugamos a 2500 rpm durante 5 min, esperamos 20 min a temperatura ambiente y medimos en un espectrofotómetro  $A_{570}-A_{630}$  frente a un blanco de isopropanol ácido.

### **II.2.3. CITOVIABILIDAD: TEST DE EXCLUSIÓN DEL AZUL DE TRIPÁN**

Las células no viables presentan alterada la permeabilidad de la membrana, por tanto el colorante de DNA azul de tripán tiñe sus núcleos. Utilizando un hemocitómetro y el colorante (concentración final 0,2% (w/v)), hemos determinado el número total de células y, simultáneamente, el número de células no viables. La citoviabilidad se determina, pues, como el porcentaje de células que excluyen el azul de tripán.

Recogemos las células mediante tripsinización, y las resuspendemos en PBS frío. La suspensión celular es diluida 1:2 con una solución de azul de tripán al 0,4%. Dejamos teñir

durante 5-10 min, y contamos el número de células teñidas de azul con el reactivo y las no teñidas, empleando una cámara de recuento de Malassez como hemocitómetro.

#### II.2.4. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA: TEST DEL TBA

Este ensayo está basado en la determinación de sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS), entre ellas el malondialdehído, producto de la rotura de endoperóxidos lipídicos procedentes de la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados (Buege y Aust, 1978). Las TBARS reaccionan con el TBA produciendo un complejo que absorbe a 535 nm ( $\epsilon = 156 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). Los resultados son expresados como equivalentes de TBARS formados por mg de proteína.

Empleamos una solución compuesta de TBA al 0,5% (w/v) y ácido tricloroacético al 15% (w/v) en HCl 0,25 N, preparada extemporáneamente. Esta mezcla es añadida en proporción 2:1 sobre la suspensión celular en PBS, agitamos vigorosamente y centrifugamos a 3000 rpm durante 10 min. Recogemos el sobrenadante, se incuba a 100°C durante 20 min y posteriormente se enfría en hielo durante 10 minutos. En un espectrofotómetro, medimos  $A_{535}$  frente a un blanco preparado solamente con PBS en lugar de la suspensión celular.

### II.3. ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN

La proliferación celular se ha determinado mediante el conteo de las células en una cámara de recuento de Malassez, empleando la siguiente fórmula de recuento:

$$\text{células/mL} = C_t / (S \cdot P \cdot D),$$

representando  $C_t$ : número de células; S: superficie de recuento ( $\text{cm}^2$ ); P: profundidad de la cámara (cm); D: dilución. Así, una vez conocido el volumen original de suspensión celular, en mL, determinamos el número total de células presentes en la muestra.

## II.4. EXPERIMENTOS DE MARCAJE METABÓLICO

Las células HepG2 fueron incubadas a 37°C en medio de cultivo suplementado con diversos sustratos lipídicos marcados isotópicamente. Seguidamente, las células y el medio de incubación se recogieron, y los lípidos fueron extraídos y separados mediante cromatografía en capa fina (TLC). Determinamos entonces la incorporación de radiactividad procedente de cada precursor metabólico radiactivo a las distintas fracciones lipídicas.

### II.4.1. EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE LÍPIDOS

Tras finalizar el periodo de incubación con el precursor radiactivo, el medio de incubación fue recogido y se centrifugó a 2500 rpm durante 10 min para eliminar restos celulares en suspensión. La monocapa celular se lavó dos veces con PBS frío y se recogieron las células en PBS usando un raspador. Seguidamente, se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 min, decantándose el sobrenadante, y el sedimento de células fue resuspendido en PBS frío. La suspensión celular fue sonicada y tomamos una alícuota para la determinación de la cantidad de proteína.

Los lípidos fueron extraídos de la suspensión celular y del medio de incubación siguiendo el método de Bligh y Dyer (1959). A un volumen de la suspensión de células se le añade 3,75 volúmenes de una mezcla cloroformo/ metanol (1:2). Los tubos se agitan vigorosamente y a continuación se añade 1,25 volúmenes de cloroformo. Tras agitar, se adiciona 1,25 volúmenes de HCl 0,01 N. Los tubos se agitan de nuevo y se centrifugan a 2500 rpm durante 10 min. Tras la centrifugación aparecen dos fases claramente diferenciadas, separadas por una interfase proteica. La fase superior, correspondiente a la fase acuosa, se recoge con una pipeta Pasteur. La fase inferior clorofórmica se transfiere a un tubo nuevo y se lava con 2,5 volúmenes de una mezcla metanol/ agua/ cloroformo (48:47:1).

Ambas fases, orgánica y acuosa, se evaporan a sequedad bajo corriente de nitrógeno y se resuspenden en un volumen apropiado de cloroformo o agua, respectivamente. A los extractos lipídicos se les añade el antioxidante 2,6-di-*tert*-butil-4-metilfenol (BHT) al 0,05%, con objeto de prevenir la peroxidación de los lípidos. Las muestras son gaseadas bajo corriente de nitrógeno y guardadas a -20°C hasta su utilización.

La separación de los distintos componentes presentes en las fases recogidas se realizó mediante TLC, empleando patrones adecuados para su localización y portadores para mejorar la resolución cromatográfica.

Se llevaron a cabo cromatografías para la separación de fosfolípidos y lípidos neutros, contenidos en la fase orgánica, y para separar los intermediarios metabólicos solubles en agua, presentes en la fase acuosa, utilizando placas de silicagel sobre cristal de 20 x 20 cm del tipo 60 G. Se realizó una cromatografía ascendente convencional, en cubetas de vidrio previamente saturadas con el líquido de desarrollo, dejando que el solvente alcance el extremo superior de la placa.

#### **II.4.2. INCORPORACIÓN DE PRECURSORES LIPÍDICOS RADIATIVOS**

Hemos utilizado diversos sustratos metabólicos exógenos, marcados radiactivamente, con objeto de caracterizar distintas rutas del metabolismo lipídico en las células HepG2, un modelo experimental hepático. En todos los casos, los ensayos fueron realizados estando el cultivo celular en la fase logarítmica de crecimiento rápido y exponencial, con una confluencia aproximada del 70%. El medio de cultivo se suplementó con etanol o hexadecilfosfocolina, mientras las células no tratadas se usaron como control. De este modo, se ha llevado a cabo el estudio de la influencia de ambos agentes xenobióticos sobre el metabolismo lipídico en estas células.



Para conseguir la concentración y radiactividad específica del sustrato deseada en el medio de incubación, el precursor radiactivo se mezcló con el correspondiente sustrato no marcado. Los valores de concentración y radiactividad específica para cada precursor metabólico aparecen indicados en los apartados correspondientes dentro de la sección de Resultados.

A continuación, indicamos la metodología utilizada para cada análisis en particular, dependiendo de la ruta metabólica seguida por el sustrato empleado.

#### II.4.2.1. INCORPORACIÓN DE [1,2,3-<sup>3</sup>H]GLICEROL

En este apartado, con la finalidad de caracterizar las diferentes rutas de síntesis de lípidos en células HepG2, hemos examinado la incorporación de radiactividad procedente del glicerol marcado isotópicamente, a lo largo del tiempo, a las diversas fracciones lipídicas celulares y exportadas al medio. Puesto que el glicerol es incorporado tanto a fosfolípidos como a lípidos neutros, incubando las células en presencia de este sustrato lipogénico hemos estimado la actividad biosintética de lípidos en células HepG2.

Por otra parte, para el análisis de degradación lipídica las células fueron incubadas en presencia del sustrato marcado durante 24 h, transcurridas las cuales el medio radiactivo fue reemplazado por medio fresco no marcado. A distintos periodos, recogimos tanto las células como el medio de incubación, y se cuantificó la radiactividad asociada a las diferentes fracciones lipídicas.

El medio de incubación conteniendo glicerol fue además suplementado con colina 60  $\mu\text{M}$  y etanolamina 25  $\mu\text{M}$ , de modo que no hubiese limitación de ambas bases nitrogenadas para la síntesis *de novo* de los fosfolípidos mayoritarios, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina.

#### SEPARACIÓN DE FOSFOLÍPIDOS

La separación de los diferentes fosfolípidos se realizó según la técnica de Higgins (1987), utilizando un sistema solvente constituido por la mezcla cloroformo/ metanol/ ácido acético glacial/ agua desionizada (60:50:1:4, v/v). En todos los casos se añadió un extracto lipídico de hígado como portador, preparado en el laboratorio. Mediante este sistema de cromatografía se consigue una apropiada separación de los fosfolípidos mayoritarios. Así, los valores de Rf obtenidos son los siguientes:

Lípidos neutros	0,85
Fosfatidiletanolamina	0,60
Fosfatidilinositol	0,44
Fosfatidilserina	0,28
Fosfatidilcolina	0,17
Esfingomielina	0,11

#### SEPARACIÓN DE LÍPIDOS NEUTROS

Se realizó según una modificación de la técnica de Lichtenstein y Brecher (1980), utilizando como líquido de desarrollo la mezcla solvente n-hexano/ éter etílico/ ácido acético glacial (80:20:2, v/v) y añadiendo lípidos portadores para mejorar la separación cromatográfica. Los valores de Rf obtenidos son:

Ésteres de colesterol	0,84
Ésteres etílicos de ácidos grasos	0,67
Triacilglicerol	0,55
Ácidos grasos	0,32
1,3-diacilglicerol + colesterol	0,14
1,2-diacilglicerol	0,10
Fosfolípidos	0,00

#### II.4.2.2. INCORPORACIÓN DE [1-<sup>14</sup>C]ETANOL

El destino metabólico del etanol ha sido analizado incubando las células HepG2 con etanol marcado, en presencia o ausencia de metirapona 10 mM, un inhibidor potente del citocromo P<sub>450</sub> (Gadeholt, 1984). De esta manera, se ha examinado la capacidad de las células HepG2 para metabolizar el etanol, determinándose la incorporación del etanol vía acetil-CoA a las distintas fracciones lipídicas.

Tras recoger las células, los extractos lipídicos celulares obtenidos se evaporaron bajo corriente de nitrógeno y se resuspendieron en cloroformo varias veces, para eliminar por evaporación el etanol radiactivo de la fase orgánica.

Los diferentes fosfolípidos y lípidos neutros fueron separados mediante los procedimientos descritos en el apartado anterior.

#### SEPARACIÓN DE DIACILGLICEROL Y COLESTEROL

El colesterol y el diacilglicerol solapan en el sistema de desarrollo descrito anteriormente para la separación de los distintos lípidos neutros. Por tanto, se requirió una segunda cromatografía para la adecuada resolución de ambos lípidos, utilizando una mezcla benceno/ isopropanol/ agua (100:10:0,25, v/v), mediante la cual se obtienen los siguientes valores de R<sub>f</sub>:

Ésteres de colesterol	0,75
Triacilglicerol	0,67
1,3-diacilglicerol	0,60
1,2-diacilglicerol	0,54
colesterol	0,44

#### SEPARACIÓN DE FOSFATIDILETANOL Y FOSFATIDATO

El sistema cromatográfico que resuelve los fosfolípidos mayoritarios no permite una separación adecuada de fosfatidato y fosfatidiletanol, por ello en los experimentos en que se necesitó separar estos fosfolípidos se realizó una segunda cromatografía que emplea como

líquido de desarrollo cloroformo/ metanol/ ácido acético glacial/ agua desionizada (80:13:8:0,3, v/v). Los valores de Rf obtenidos en este sistema son los siguientes:

Fosfatidiletanol	0,70
Fosfatidato	0,46
Fosfatidiletanolamina	0,19

#### II.4.2.3. INCORPORACIÓN DE BASES NITROGENADAS

Las distintas bases nitrogenadas, marcadas isotópicamente, nos han permitido examinar diversas rutas de síntesis de fosfolípidos en estas células. En todos los casos, el medio de incubación fue suplementado con glicerol 25  $\mu\text{M}$ , colina 60  $\mu\text{M}$  y etanolamina 50  $\mu\text{M}$ , de modo que no hubiese limitación en el aporte de sustratos para la síntesis de lípidos neutros y de los principales fosfolípidos, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina.

##### II.4.2.3.1. INCUBACIÓN CON [1-<sup>14</sup>C]ETANOLAMINA

Este sustrato es incorporado a los intermediarios metabólicos solubles de la vía CDP-etanolamina y al producto final de la ruta, la fosfatidiletanolamina. Los intermediarios solubles de la ruta CDP-etanolamina se separaron utilizando un sistema solvente constituido por la mezcla etanol al 96%/  $\text{NH}_3$  acuoso al 3% (1:2, v/v). Exponemos los valores de Rf obtenidos:

CDP-etanolamina	0,76
Etanolamina-fosfato	0,51
Etanolamina	0,25

Puesto que la fosfatidiletanolamina sintetizada puede ser metilada en RE produciendo fosfatidilcolina, se analizó simultáneamente la actividad de síntesis de fosfatidilcolina en estas células vía metilación de fosfatidiletanolamina, mediante la separación y cuantificación de la radiactividad asociada a la fosfatidiletanolamina y a los distintos derivados metilados. La fosfatidiletanolamina y los intermediarios de su metilación fueron separados utilizando el

sistema solvente n-propanol/ ácido propiónico/ cloroformo/ agua (3:2:2:1, v/v). Los valores de Rf obtenidos se exponen a continuación:

Fosfatidiletanolamina	0,61
N-monometilfosfatidiletanolamina	0,49
N,N'-dimetilfosfatidiletanolamina	0,43
Fosfatidilcolina	0,32
Esfingomielina	0,27

#### II.4.2.3.2. INCUBACIÓN CON L-[3-<sup>3</sup>H]SERINA

La serina es rápidamente metabolizada en las células hepáticas a acetyl-CoA, el cual puede ser entonces utilizado para la síntesis de ácidos grasos. Por otra parte, la serina puede ser incorporada mediante reacciones de intercambio de bases a la fracción polar de fosfatidilserina, y, a partir de ella, la radiactividad aparecerá también asociada a la cabeza polar de fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina.

##### II.4.2.3.2.1. *Determinación de la actividad fosfatidilserina sintasa*

La medida de actividad fosfatidilserina sintasa se ha llevado a cabo en un homogeneizado de células HepG2, utilizando serina exógena marcada radiactivamente y los propios fosfolípidos endógenos de membrana como sustratos de la reacción, según el método descrito por Hu *et al.* (1992) ligeramente modificado.

En primer lugar, las células fueron recogidas en PBS frío y se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 min. Tras eliminar el sobrenadante, el sedimento celular se resuspendió en tampón Hepes 40 mM (pH 7,4), y se sonicó en frío a 50 W durante 2 seg. El medio de reacción contiene el homogeneizado celular sonicado (0,5 mg de proteína), CaCl<sub>2</sub> 1 mM, L-[3-<sup>3</sup>H]serina (concentración final 50 μM, 19 Ci · mol<sup>-1</sup>) y tampón Hepes 40 mM (pH 7,4) hasta completar un volumen final de 0,5 mL.

Tras preincubar a 37°C durante 10 min, la reacción se inicia por adición de 20 µL de serina marcada. Después de incubar durante 20 min a la misma temperatura, se detiene la reacción por adición de 6 mL de cloroformo/ metanol (2:1). Agitamos vigorosamente y añadimos 2 mL de HCl 0,1 N, realizándose una extracción de lípidos según el método de Folch *et al.* (1957). Seguidamente, los fosfolípidos presentes en la fase clorofórmica se separaron cromatográficamente, para determinación de la radiactividad asociada a fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina sintetizados vía reacción de intercambio de bases.

Para analizar el efecto de la hexadecilfosfocolina *in vitro* sobre la reacción de intercambio de bases, el ensayo se efectuó de manera idéntica aunque añadiendo una cantidad adecuada de este agente al medio de preincubación para conseguir la concentración final deseada.

#### II.4.2.3.3. INCUBACIÓN CON [METIL-<sup>14</sup>C]COLINA

Hemos examinado la síntesis de fosfatidilcolina vía CDP-colina usando colina marcada isotópicamente como precursor exógeno. Este sustrato se incorpora a fosfatidilcolina y a los intermediarios solubles de la ruta de Kennedy. Además, puede hallarse radiactividad asociada a esfingomielina, puesto que ésta es producida a partir de la fosfatidilcolina recién sintetizada utilizando como sustrato la ceramida endógena.

En el sistema cromatográfico indicado en el apartado II.4.2.1. la fosfatidilcolina y la esfingomielina, aunque están bien resueltas, quedan bastante próximas, por lo que la separación de esfingomielina de la fosfatidilcolina fue mejorada empleando la mezcla cloroformo/ metanol/ ácido acético glacial/ agua (60:30:8:5, v/v). A continuación se indican los valores obtenidos de R<sub>f</sub> para ambos fosfolípidos:

Fosfatidilcolina	0,55
Esfingomielina (2 bandas)	0,32 y 0,37

Los metabolitos solubles de colina fueron separados mediante un líquido de desarrollo constituido por la mezcla metanol/ NaCl al 0.6%/ NH<sub>3</sub> acuoso al 25% (10:10:1, v/v). Los valores de R<sub>f</sub> obtenidos son los siguientes:

CDP-colina	0,75
Betaína	0,62
Colina-fosfato	0,50
Colina	0,14

Para mejorar la resolución de la CDP-colina y la betaína se llevó a cabo la cromatografía utilizando etanol al 96%, en lugar de metanol, en la misma mezcla anterior.

#### II.4.2.3.3.1. *Influencia de la hexadecilfosfocolina sobre la toma intracelular de colina*

Las células HepG2 fueron preincubadas a 37°C durante 5 min, 1,5 h ó 6 h en medio de cultivo completo en presencia o ausencia de hexadecilfosfocolina 50 µM. El medio fue entonces retirado y las células fueron expuestas inmediatamente, durante 3 min a 37°C, a un medio suplementado con colina marcada isotópicamente. La incorporación de colina se detuvo mediante la aspiración del medio radiactivo seguido de dos lavados con colina 580 µM en PBS frío.

Los lípidos fueron extraídos directamente de las células adheridas por el método de Bligh y Dyer (1959) ligeramente modificado. En primer lugar, se añadió metanol durante 2 min, en agitación, para deshidratar la superficie celular y fijar las células, y esta fase fue recogida. Seguidamente, se añadió una mezcla de cloroformo/ metanol (1:2, v/v), en agitación durante 6 min, y se recogió también esta fase. Ambas fases fueron reunidas, y se llevó a cabo la extracción lipídica tras la adición de una cantidad adecuada de agua. Entonces, la proteína de la monocapa celular fue solubilizada mediante agitación, durante 10 min, en una disolución acuosa de NaOH 0,2 N.

Tras la extracción de lípidos, las fases acuosa y orgánica fueron separadas y se determinó la radiactividad en cada fase, observándose marcaje radiactivo sólo en la fase acuosa, que contiene los metabolitos solubles de colina. La toma de colina marcada exógena se determinó midiendo la cantidad total de radiactividad incorporada por las células.

#### **II.4.2.4. INCORPORACIÓN DE [1-<sup>14</sup>C]PALMITATO Y [1-<sup>14</sup>C]ARAQUIDONATO**

Usando dos ácidos grasos, uno saturado y el otro insaturado, hemos examinado distintos procesos de esterificación lipídica en estas células, puesto que ambos son incorporados como grupos acilo grasos a los distintos fosfolípidos y lípidos neutros. En todos los casos, el medio de incubación fue suplementado, además, con glicerol 25  $\mu\text{M}$ , colina 60  $\mu\text{M}$  y etanolamina 50  $\mu\text{M}$ .

Para incubar las células en presencia del ácido graso éste debe hallarse en forma de sal, de modo que hemos de considerar en primer lugar la preparación de la solución de palmitato marcado a partir del ácido [1-<sup>14</sup>C]palmítico. El procedimiento es idéntico para el caso del araquidonato, aunque partiendo de ácido [1-<sup>14</sup>C]araquidónico.

El ácido palmítico marcado se evaporó bajo corriente de nitrógeno y el sedimento se resuspendió mediante agitación vigorosa en NaOH 0,2 M, para obtener una relación molar 1:56. La suspensión de palmitato fue sonicada brevemente, observándose una dispersión homogénea. Seguidamente, se neutralizó la solución de palmitato cuidadosamente añadiendo pequeñas cantidades de HCl 1 N, utilizando un microelectrodo para ajustar el pH próximo a la neutralidad. Se añadió, entonces, la cantidad necesaria de EMEM/ 10% FCS, agitando y dejando incubar 10 min a 37°C. Finalmente, el medio de incubación conteniendo palmitato marcado fue filtrado bajo condiciones de esterilidad.

#### **SEPARACIÓN DE CERAMIDA**

Puesto que el ácido graso puede ser incorporado a la ceramida, ha sido necesario llevar a cabo la separación de este esfingolípido. Así, para la resolución cromatográfica de la ceramida



hemos utilizado como sistema de desarrollo la mezcla cloroformo/ metanol (9:1, v/v). Los valores de Rf obtenidos son los siguientes:

Triacilglicerol	0,74
Ceramida	0,62
Fosfolípidos	0,00

#### II.4.3. CUANTIFICACIÓN DE RADIATIVIDAD INCORPORADA

En todos los casos, tras la separación cromatográfica las placas se dejaron secar al aire y entonces se revelaron mediante exposición a yodo sublimado y, en caso necesario, a luz ultravioleta. Los lípidos y componentes solubles correspondientes a las distintas bandas fueron identificados mediante patrones desarrollados paralelamente con las muestras.

Las bandas se rasparon, transfiriéndose a viales de centelleo, donde se les añadió 3 mL de líquido de centelleo. Los viales se agitaron vigorosamente y se dispusieron en un contador de centelleo líquido (Beckman 6000-TA), determinándose el contenido en  $^3\text{H}$  ó  $^{14}\text{C}$  de cada una de las muestras. La cuantificación de la incorporación de radiactividad procedente de los distintos precursores marcados se ha efectuado utilizando la siguiente expresión:

$$Ae = \text{dpm} / (\text{Re} \cdot \text{C} \cdot \text{V} \cdot \text{F} \cdot \text{t}),$$

representando Ae: actividad específica expresada como mol de sustrato incorporados por h y mg de proteína; dpm: desintegraciones por min de la muestra problema; Re: radiactividad específica del sustrato en el medio de incubación, expresada como dpm/mol; C: concentración de proteínas de la muestra de partida para la extracción de lípidos; V: volumen de muestra de partida; F: fracción del extracto lipídico utilizada en la cromatografía; t: tiempo de incubación con el sustrato marcado, expresado en h.

## II.5. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DE LA RUTA CDP-COLINA

Las células fueron raspadas en PBS frío, se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 min y se resuspendieron en 4 volúmenes del tampón de homogeneización NaCl 0,145 M, Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, KF 10 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0,2 mM, a pH 7,4 y en frío. La suspensión celular se sonicó a 50 W durante 2 seg, en un baño de hielo, utilizando una microsonda de titanio. El homogeneizado celular se centrifugó inmediatamente a 105.000 g durante 30 min a 4°C, obteniéndose una fracción particulada y el sobrenadante citosólico. El sedimento de membranas fue resuspendido en un tampón sacarosa 0,25 M, Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, PMSF 0,2 mM, a pH 7,4. La concentración de proteínas fue determinada en cada fracción celular obtenida.

Este procedimiento de sonicación y posterior centrifugación produce menos de un 8% de contaminación de microsomas y mitocondrias en la fracción citosólica, como indicó la determinación de las enzimas marcadoras NADPH:citocromo C reductasa y citocromo C oxidasa, respectivamente.

### II.5.1. ENSAYO DE ACTIVIDAD COLINA QUINASA

La actividad colina quinasa ha sido ensayada en la fracción citosólica midiendo la velocidad de incorporación de [metil-<sup>14</sup>C]colina a colina fosfato, de acuerdo con el método descrito por Pelech *et al.* (1983).

El medio de reacción contuvo 50 µg aproximadamente de proteína citosólica, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, ATP 10 mM, [metil-<sup>14</sup>C]colina (concentración final 1 mM, 3,2 Ci · mol<sup>-1</sup>) y tampón Tris-HCl 100 mM (pH 8,5) hasta completar un volumen final de 60 µL.

Tras preincubar a 37°C durante 5 min, la reacción se inició mediante la adición de 10 µL de colina marcada. Incubamos entonces durante 20 min a la misma temperatura, y se detuvo la reacción por inmersión de los tubos en un baño de agua a 100°C durante 2 min. El precipitado proteico se eliminó mediante centrifugación a 8.000 g durante 10 min. Seguidamente la colina, sustrato de la reacción, fue separada cromatográficamente de la colina-fosfato sintetizada, y se determinó la radiactividad incorporada a ésta última.

Cuando estudiamos el efecto de la hexadecilfosfocolina sobre la actividad colina quinasa, el ensayo se efectuó de la forma indicada anteriormente pero añadiendo una cantidad adecuada del agente al medio de preincubación para conseguir la concentración final deseada.

## **II.5.2. ENSAYO DE ACTIVIDAD CTP:COLINA-FOSFATO CITIDILILTRANSFERASA**

La actividad CTP:colina-fosfato citidililtransferasa se ensayó tanto en el citosol como en la fracción particulada, en el intervalo de tiempo de 1 h tras finalizar la ultracentrifugación, determinándose la formación de CDP-colina radiactiva a partir de [metil-<sup>14</sup>C]colina-fosfato siguiendo el método descrito por Weinhold y Feldman (1992). La actividad enzimática en la fracción citosólica fue medida habitualmente en presencia de liposomas de fosfatidilcolina/oleato en la mezcla final de reacción, mientras la actividad en membranas se ensayó sin liposomas.

Para la determinación de la actividad colina-fosfato citidililtransferasa en membranas, el medio de reacción contuvo 25 µg aproximadamente de proteína, CTP 3 mM, ADP 6 mM, Mg(AcO)<sub>2</sub> 15 mM, [metil-<sup>14</sup>C]colina-fosfato (concentración final 1,6 mM, 0,6 Ci · mol<sup>-1</sup>) y tampón imidazol 50 mM, KCl 150 mM, EDTA 2 mM (pH 7,0) hasta completar un volumen final de 100 µL. La medida de la actividad colina-fosfato citidililtransferasa citosólica se realizó en un medio de reacción conteniendo 25 µg aproximadamente de proteína, CTP 3 mM, Mg(AcO)<sub>2</sub> 12 mM, [metil-<sup>14</sup>C]colina-fosfato (concentración final 1,6 mM, 0,6 Ci · mol<sup>-1</sup>), liposomas de

fosfatidilcolina/ oleato (500  $\mu$ M:500  $\mu$ M) y tampón imidazol 50 mM, KCl 150 mM, EDTA 2 mM (pH 7,0) hasta completar un volumen final de 100  $\mu$ L.

A continuación, indicamos el procedimiento para la preparación de los liposomas de fosfatidilcolina/ oleato. En un tubo cónico de cristal se evaporaron a sequedad, bajo corriente de nitrógeno, 2 mg de fosfatidilcolina de yema de huevo (tipo XVI-E, en cloroformo). Entonces, se adicionó 0,76 mg de una solución acuosa extemporánea de oleato sódico, agitando la mezcla vigorosamente y se añadió tampón de ensayo hasta completar un volumen final de 1 mL. Por último, se sonicó la suspensión a 50 W durante 12 min, en un baño de agua a temperatura ambiente, obteniéndose una solución blanquecina, aunque translúcida, de liposomas de fosfatidilcolina/ oleato (2,5 mM:2,5 mM) que se mantiene a temperatura ambiente.

Tras preincubar a 37°C durante 5 min, la reacción se inició mediante la adición de 10  $\mu$ L de colina-fosfato marcada. Incubamos entonces durante 15 min a la misma temperatura, y se detuvo la reacción mediante la adición de 100  $\mu$ L de una mezcla de ácido tricloroacético al 10%/ colina fosfato 150 mM.

La CDP-colina fue aislada de la reacción mediante adsorción a carbón activo, midiéndose la radiactividad asociada a esta fracción soluble. Para ello, se añadió a cada muestra 1 mL de carbón activo (6 g/ 100 mL agua, preparado extemporáneamente y mantenido en agitación) para adsorber la CDP-colina formada en la reacción. Los tubos se agitaron vigorosamente y se mantuvieron durante 30 min a temperatura ambiente. Se añadió 5 mL de agua y se agitaron de nuevo vigorosamente. El carbón activo conteniendo la CDP-colina adsorbida se sedimentó mediante centrifugación a 2000 rpm durante 10 min. El sobrenadante, conteniendo la colina-fosfato radiactiva, se desechó y el sedimento de carbón activo fue resuspendido en 5 mL de agua y transferido a los pocillos de un sistema de filtración de múltiples vías, utilizando filtros de acetato de celulosa con un tamaño de poro de 0,45  $\mu$ m. Los sedimentos se lavaron cuatro veces con 5 mL agua, con objeto de eliminar la colina-fosfato radiactiva. Tras desechar el agua de lavado, la CDP-colina fue eluida añadiendo 0,5 mL de un solvente agua/ etanol/ NH<sub>3</sub> acuoso al

24% (11,6:18,8:1,1, v/v), dejándolo actuar durante 5 min. El proceso de elución fue repetido y la CDP-colina radiactiva fue recogida en viales de centelleo a los que se añadió 10 mL de líquido de centelleo, determinándose la radiactividad correspondiente a la CDP-colina sintetizada en el ensayo.

Para examinar el efecto de la hexadecilfosfocolina sobre la actividad CT, en citosol o membranas, el ensayo se efectuó de la forma indicada anteriormente aunque añadiendo una cantidad adecuada de la alquilfosfocolina al medio de preincubación para conseguir la concentración final deseada.

### **II.5.3. ENSAYO DE ACTIVIDAD CDP-COLINA:DIACILGLICEROL COLINAFOSFOTRANSFERASA**

La actividad diacilglicerol colinafosfotransferasa ha sido ensayada midiendo la velocidad de incorporación de  $^{14}\text{C}$  procedente de CDP-[metil- $^{14}\text{C}$ ]colina a fosfatidilcolina, según el método descrito por Cornell (1992).

El medio de reacción contuvo 50  $\mu\text{g}$  aproximadamente de proteína de membrana,  $\text{MgCl}_2$  10 mM, EGTA 0,5 mM, 1,2-*sn*-dioleína 2,4 mM, CDP-[metil- $^{14}\text{C}$ ]colina (concentración final 0,4 mM, 1,2 Ci  $\cdot$  mol $^{-1}$ ) y tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8,5) hasta completar un volumen final de 100  $\mu\text{L}$ .

A continuación, indicamos el procedimiento para la preparación de la emulsión de 1,2-*sn*-dioleína. En un tubo cónico de cristal se evaporaron a sequedad, bajo corriente de nitrógeno, 8 mg (aproximadamente 12,8  $\mu\text{mol}$ ) de dioleína (en cloroformo). Entonces, se adicionó 0,4 mg de una solución acuosa de Tween 20 preparada a una concentración 25 mg/mL, agitando la mezcla vigorosamente. Se preparó, por separado, una solución acuosa de asolectina (fosfatidilcolina de soja) 50 mg/mL, agitada vigorosamente durante 30 min. Se añadió 0,8 mL de asolectina sobre la suspensión de dioleína/ Tween 20. Por último, se sonicó la mezcla a 50 W

durante 5 min, en un baño de agua a 4°C, obteniéndose una emulsión homogénea de 1,2-*sn*-dioleína 16 mM que se mantiene a 4°C.

Tras preincubar a 37°C durante 5 min, la reacción se inició mediante la adición de 10 µL de CDP-colina marcada. Incubamos entonces durante 15 min a la misma temperatura, y la reacción se detuvo por adición de un volumen adecuado de mezcla cloroformo/ metanol (1:2, v/v). Seguidamente, la fosfatidilcolina fue extraída de la reacción siguiendo el procedimiento de Bligh y Dyer (1959), y se midió la radiactividad incorporada a esta fracción lipídica.

Para estudiar el efecto de la hexadecilfosfocolina sobre la actividad diacilglicerol colinafosfotransferasa, el ensayo se efectuó de la forma indicada anteriormente pero añadiendo una cantidad adecuada del agente al medio de preincubación para conseguir la concentración final deseada.

## II.6. AISLAMIENTO Y DETECCIÓN DE DNA FRAGMENTADO

El procedimiento de extracción y detección de DNA fragmentado ha sido realizado según el siguiente protocolo:

Recogemos el medio de incubación conjuntamente con las células de la placa raspadas en PBS frío, y centrifugamos a 1500 rpm durante 10 min. El sedimento celular se disuelve en 400 µL del tampón de lisis: Tritón X-100 al 0,4%, EDTA 2 mM, Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), y se incuba en hielo durante 15 min. El lisado celular se centrifuga a 13000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente. Se recoge 350 µL del sobrenadante, se suplementa con NaCl 150 mM, EDTA 40 mM, SDS al 1%, proteinasa K 200 µg/mL y Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), y se deja incubar toda la noche a temperatura ambiente.

El DNA se extrae añadiendo un volumen de una mezcla fenol/ cloroformo/ alcohol isoamílico (25:24:1, v/v). Agitamos en el agitador mecánico durante 10 seg y centrifugamos la

mezcla a 13000 rpm durante 10 segundos a 4°C. Recogemos la fase acuosa superior, conteniendo el DNA, y le añadimos NaCl para una concentración final 150 mM y 2 volúmenes de etanol absoluto enfriado a -20°C. Mezclamos varias veces por inversión y dejamos precipitando toda la noche a -20°C.

Se recoge el DNA mediante centrifugación a 13000 rpm durante 10 min a 4°C, eliminamos el sobrenadante con cuidado mediante decantación y lavamos con 1 volumen de etanol al 70% enfriado a -20°C. Centrifugamos nuevamente durante 5 min, decantamos el sobrenadante y dejamos secar al aire. Resuspendemos el DNA en 15 µL de tampón Tris 10 mM (pH 7,6)/ EDTA 1 mM (TE), y lo dejamos media hora a temperatura ambiente. Incubando posteriormente el DNA durante 1 h a 37°C con 50 µg/mL de ribonucleasa A (libre de desoxirribonucleasas).

Finalmente, separamos electroforéticamente el DNA en un gel de agarosa al 1,5% conteniendo bromuro de etidio, a 40 V durante varias horas, utilizando tampón TAE (Tris 40 mM, acetato sódico 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). El DNA es visualizado mediante exposición a luz ultravioleta.

## **II.7. ANÁLISIS CUANTITATIVOS**

En este apartado, indicamos cómo se han cuantificado las cantidades celulares de proteína, los distintos fosfolípidos, triacilglicerol y colesterol total.

### **II.7.1. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA**

En general, los resultados experimentales están referidos a la cantidad de proteína celular. La cuantificación de proteínas se ha realizado mediante el método de Bradford (1976), empleando albúmina de suero bovino (BSA) 0,5 mg/mL como estándar. Los valores de concentración de proteína se expresan en mg/mL.

### II.7.2. DETERMINACIÓN DE FÓSFORO LIPÍDICO

Las cantidades de los diferentes fosfolípidos han sido determinadas a partir de la medida del contenido en fósforo inorgánico presente en las bandas raspadas de las placas de TLC, siguiendo el método de Fiske y Subbarrow, modificado por Bartlett (1959).

Este método se basa en la reacción del fósforo, solubilizado por hidrólisis a 180°C en ácido perclórico al 70%, con el ácido molíbdico, formándose ácido fosfomolíbdico. Éste es reducido selectivamente por adición de ácido 1-amino-2-naftol-3-sulfónico, originándose un compuesto de color azul oscuro cuya intensidad es determinada espectrofotométricamente mediante medida de absorbancia a 830 nm y es proporcional a la cantidad de fósforo presente en la muestra. Antes de realizar las medidas, los tubos fueron centrifugados a 2500 rpm durante 10 min con objeto de sedimentar el silicagel de las bandas fosfolipídicas.

Se estableció además una recta de calibrado usando una disolución de fosfato dipotásico 321,5 mM, en agua destilada, la cual equivale a 10 µg de fósforo/mL.

### II.7.3. DETERMINACIÓN DE TRIACILGLICEROL

Para la determinación cuantitativa enzimática de triacilglicerol se ha utilizado un test comercial de la firma Sigma Diagnostics. Esta técnica se basa en la hidrólisis enzimática del triacilglicerol y el subsiguiente análisis del glicerol formado mediante una reacción colorimétrica.

Una lipasa hidroliza el triacilglicerol produciendo glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol es entonces transformado mediante una serie de reacciones enzimáticas acopladas, catalizadas por glicerol quinasa,  $\alpha$ -glicerofosfato deshidrogenasa y diaforasa. El glicerol reacciona con ATP por acción de la quinasa, transformándose en  $\alpha$ -glicerofosfato, el cual en



presencia de la deshidrogenasa y  $\text{NAD}^+$  formará dihidroxiacetona fosfato. El NADH formado en la reacción anterior, en presencia de diaforasa y una sal de tetrazolio como agente oxidante, es oxidado con la simultánea reducción de la sal a un derivado de formazán. El formazán resultante es un compuesto coloreado que se cuantifica espectrofotométricamente a 500 nm, siendo la absorbancia proporcional a la concentración de triacilglicerol presente en la muestra.

Para el análisis se tomaron alícuotas del extracto lipídico, se evaporaron bajo corriente de nitrógeno y se resuspendieron en 50  $\mu\text{L}$  de isopropanol. Simultáneamente, se estableció una recta de calibrado a partir de tubos estándar conteniendo desde 0 (blanco) hasta 50  $\mu\text{g}$  de tripalmitina, que fueron procesados de forma idéntica a los problemas. A continuación, se añadió 1 mL del reactivo a cada tubo y se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos, midiéndose la absorbancia del compuesto coloreado a 500 nm en un espectrofotómetro.

#### **II.7.4. DETERMINACIÓN DE COLESTEROL TOTAL**

Para el análisis cuantitativo enzimático de colesterol total se ha utilizado un test comercial de la firma Dipal. El ensayo se realiza en presencia de la enzima colesterol esterasa, que hidroliza los ésteres de colesterol a colesterol y ácidos grasos. La técnica se basa en el análisis enzimático del colesterol mediante reacción colorimétrica. Para ello se utiliza la colesterol oxidasa, que oxida el colesterol generando  $\Delta^4$ -colesteno-3-ona y peróxido de hidrógeno. Este último, en presencia de 4-aminofenazona y fenol, y por acción de la peroxidasa, da lugar a un compuesto coloreado que se determina espectrofotométricamente a 505 nm, siendo la absorbancia proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra.

Para el análisis se tomaron alícuotas del extracto lipídico, se evaporaron bajo corriente de nitrógeno y se resuspendieron en 50  $\mu\text{L}$  de isopropanol. Simultáneamente, se prepararon tubos estándar conteniendo desde 0 (blanco) hasta 50  $\mu\text{g}$  de colesterol, siendo procesados de forma idéntica a las muestras problema. A continuación, se añadió 2 mL del reactivo a cada tubo y se

incubaron a temperatura ambiente durante 15 min, midiéndose espectrofotométricamente la absorbancia del compuesto coloreado a 505 nm.

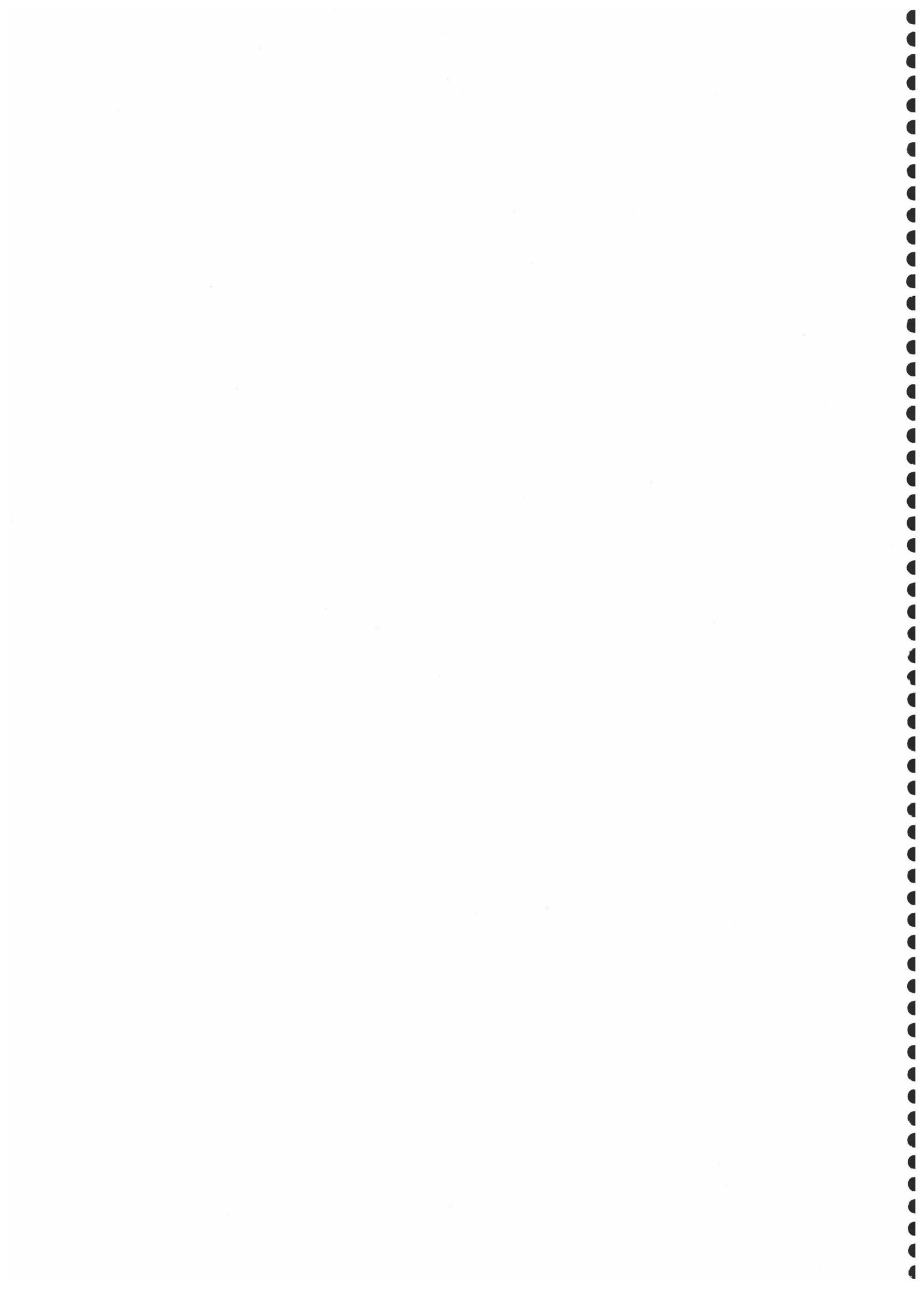
## **II.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados se expresan como valor medio  $\pm$  error estándar de la media (SEM), tal y como se indica en las leyendas de tablas y figuras.

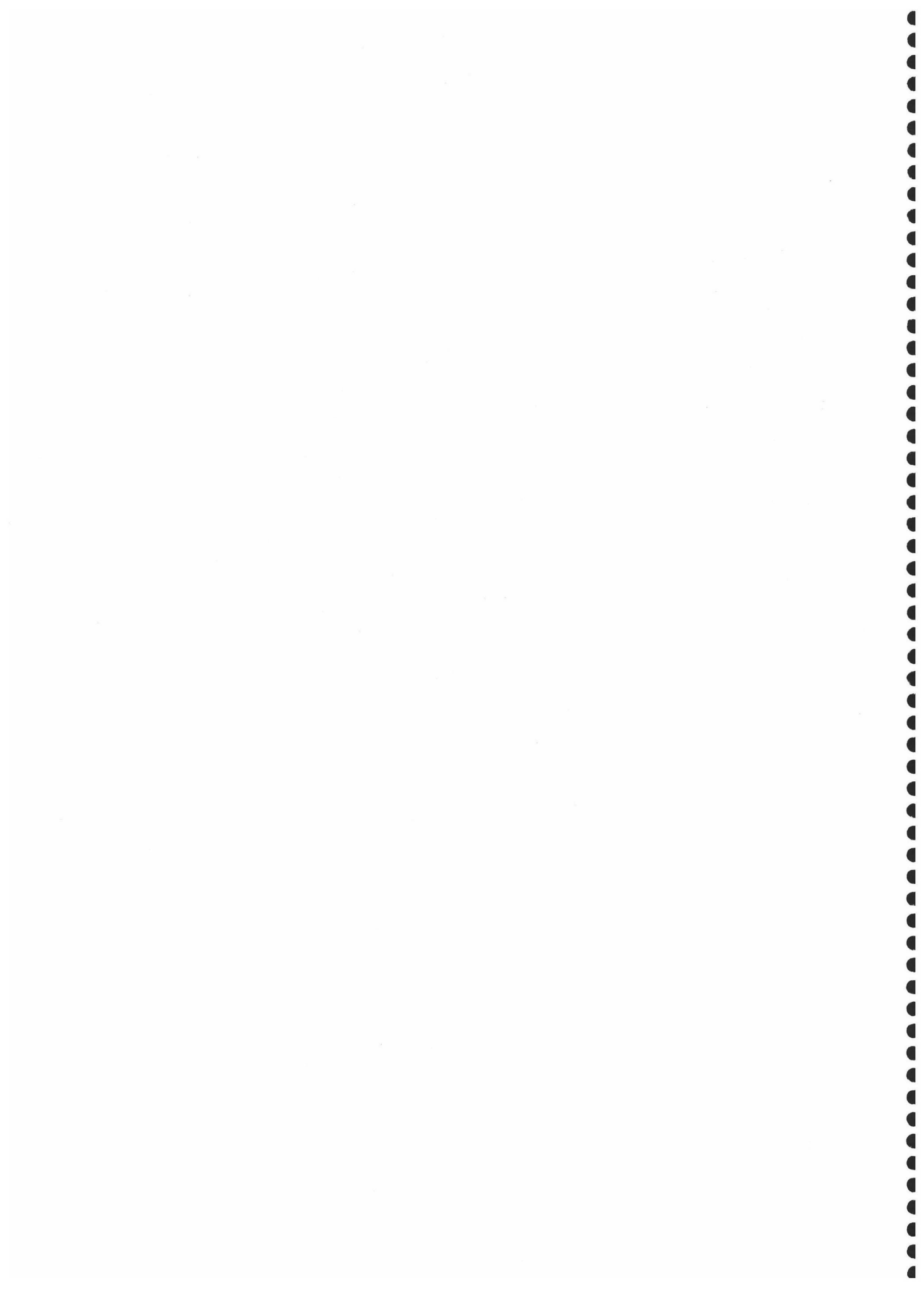
El análisis estadístico se ha realizado con la aplicación SPSS 9.0. Las diferencias con respecto a los controles han sido valoradas mediante el test de la *t* de Student para muestras relacionadas, y se consideraron estadísticamente significativas para valores de  $P < 0,05$ , es decir, para un nivel  $\alpha$  de significación superior al 95%. En los ensayos de incorporación de sustratos radiactivos a lo largo del tiempo, las comparaciones estadísticas fueron realizadas usando un test ANOVA multivariante.

**CAPÍTULO 1**

**CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS  
DE HEPATOMA HUMANO HepG2**



## **Introducción**



## I. LÍNEA CELULAR HepG2: UN MODELO CELULAR HEPÁTICO

La línea celular de hepatoblastoma humano HepG2 (ATCC N°: 85011430) ha sido utilizada extensamente como modelo experimental *in vitro* para el estudio de la regulación del metabolismo lipídico y lipoproteico hepático (Javitt, 1990; Wang *et al.*, 1988), debido fundamentalmente a que retiene un elevado grado de funciones hepáticas diferenciadas. Se trata de una línea celular epitelial madura, derivada de células tumorales procedentes del parénquima hepático, y que está altamente diferenciada. Desde su introducción, hace dos décadas (Aden *et al.*, 1979; Knowles *et al.*, 1980), estas células han resultado ser un modelo muy útil de la célula hepática humana.

Estas células se utilizan, además, como sistema experimental para estudiar los mecanismos de acción de xenobióticos a nivel hepático, analizando las rutas bioquímicas de citotoxicidad por las cuales éstos afectan los procesos hepatocelulares. El hígado ha sido el órgano más extensamente estudiado para evaluar el efecto de distintos compuestos sobre el metabolismo lipídico, debido a que desempeña un papel central en la síntesis y secreción de lípidos en el organismo.

Debido a su procedencia tumoral, las células HepG2 pueden presentar diferencias con respecto a los hepatocitos humanos normales *in vivo*. En este sentido, se ha descrito que la línea HepG2 presenta ciertos rasgos fetales y algunas anormalidades cromosómicas respecto a los hepatocitos normales (Wang *et al.*, 1988). No obstante, los procesos metabólicos investigados hasta ahora parecen simular el comportamiento de los hepatocitos normales y, por tanto, animan a una más amplia utilización de esta línea celular como un modelo fiable para estudiar los problemas biológicos relacionados específicamente con el hígado.

Las líneas celulares de hepatocitos derivadas de tumores representan un sistema alternativo para estudios del metabolismo lipídico hepático en humanos. La procedencia tumoral

de estas células permite un cultivo indefinido, por lo que su utilización evita las dificultades encontradas para aislar hepatocitos bajo condiciones fisiológicas y permite, además, la realización de estudios a largo plazo.

## II. CARACTERÍSTICAS DE LAS CÉLULAS HepG2

### II.1. MORFOLOGÍA CELULAR EN CULTIVO

La apariencia al microscopio electrónico de la monocapa celular indica que HepG2 es una línea celular madura. Interesantemente, estas células presentan una membrana plasmática polarizada y bien diferenciada, que forma en ocasiones estructuras similares a los canalículos biliares, con numerosas microvellosidades, a las cuales son dirigidas proteínas apicales específicas (Thrift *et al.*, 1986; Zegers y Hoekstra, 1998). Además, la composición de la membrana plasmática se asemeja a aquella de los hepatocitos normales polarizados (Koumanov *et al.*, 1990). Estas características morfológicas y funcionales de la superficie celular indican, por tanto, una capacidad de las células HepG2 para llevar a cabo procesos secretores activos (Thrift *et al.*, 1986).

Una función fisiológica importante de las células hepáticas es su implicación en el transporte intracelular y secreción de los lípidos constituyentes de la bilis. Así, utilizando esta línea celular se han revelado importantes detalles concernientes a las rutas de transporte lipídico en las células hepáticas (Zegers y Hoekstra, 1998).

Referente a la constitución subcelular de HepG2, el citoplasma contiene numeroso RE rugoso, mientras que escasea el RE liso, presenta grandes complejos de Golgi, lisosomas, cuerpos multivesiculares y gránulos de acúmulo lipídico no rodeados de membrana (Thrift *et al.*, 1986).



## II.2. COMPOSICIÓN LIPÍDICA

Las células HepG2 presentan una composición lipídica semejante, aunque ligeramente diferente, a los hepatocitos normales humanos. Wang y colaboradores (1988) describieron que el contenido lipídico total de las células HepG2, crecidas hasta confluencia en medio suplementado con suero, es notablemente superior al del hígado humano, presentando unos niveles más elevados de triacilglicerol y fosfolípidos y, en menor medida, de colesterol libre y esterificado con respecto al hígado normal humano.

Estos mismos investigadores observaron también diferencias con respecto a la composición en fosfolípidos. Así, los porcentajes de fosfatidiletanolamina y fosfatidilglicerol son más bajos en la línea celular, mientras aquellos de fosfatidilcolina y esfingomiélin son significativamente más altos. Además, la razón PC/SM, un índice de la fluidez de la membrana (Kapitulnik *et al.*, 1987), es mucho más baja en HepG2 que en el hígado normal (aproximadamente, 4 vs 7), sugiriendo una menor fluidez de membrana en estas células.

Estas diferencias en el contenido lipídico de las células HepG2, con respecto al tejido hepático normal humano, son debidas principalmente a una acumulación de triacilglicerol en el citoplasma y al incremento en los niveles fosfolipídicos de las células. El grupo de Wang (1988) sugiere que las diferencias en la composición lipídica pueden ser debidas a una maduración incompleta de la línea celular, al hecho de que presente una rápida proliferación, o bien a alteraciones específicas del metabolismo lipídico de estas células como consecuencia de su procedencia tumoral. Por otra parte, la composición del medio de cultivo puede influir potencialmente en el metabolismo celular y determinar, de este modo, la composición lipídica de la membrana.

## II.3. ACTIVIDAD BIOSINTÉTICA DE LÍPIDOS

Las células HepG2 preservan las características hepáticas morfológicas y funcionales, expresando las principales enzimas reguladoras del metabolismo lipídico hepático (Javitt, 1990). Así, utilizando esta línea celular se ha evaluado la biosíntesis, a partir de diferentes precursores metabólicos exógenos, de diversas clases lipídicas: ácidos grasos, triacilglicerol, colesterol, fosfolípidos, lipoproteínas, ácidos biliares primarios, etcétera. Los procesos de síntesis de fosfolípidos y lípidos neutros ocurren por vías análogas a las descritas en hepatocitos (Erickson y Fielding, 1986; Lin *et al.*, 1995; Pakula *et al.*, 1997), aunque la regulación de tales procesos prácticamente no ha sido investigada en estas células.

Gibbons y colaboradores (1994) describieron que la línea celular HepG2 sintetiza ácidos grasos *de novo* a una velocidad similar a la observada en hepatocitos de rata aislados y en cultivos primarios. Esta síntesis se inhibe por la adición de oleato extracelular y, en menor extensión, por glucagón, mientras que la insulina sólo tiene un leve efecto estimulador en HepG2. Así, comparada con los hepatocitos normales de rata, la síntesis de ácidos grasos en las células HepG2 es menos sensible a la manipulación del medio de cultivo *in vitro*. Estos mismos autores observaron también que la velocidad de síntesis del triacilglicerol producido a partir de ácidos grasos sintetizados *de novo* fue muy baja en HepG2 comparada con la observada en cultivos primarios de hepatocitos de rata. Además, solamente un 4% del total de ácidos grasos sintetizados *de novo* por las células HepG2 fue secretado en forma de partículas lipoproteicas, lo que contrasta con el 68% secretado en cultivos primarios de hepatocitos de rata. Observaron, por tanto, que las células HepG2 presentan una capacidad más alta de síntesis de triacilglicerol y fosfolípidos a partir de ácidos grasos exógenos que a partir de ácidos grasos sintetizados endógenamente.

Por otra parte, la composición en ácidos grasos del suero afecta notablemente a la composición en ácidos grasos de estas células (Pakula *et al.*, 1997). En este sentido, Homan y colaboradores (1991) observaron que, tras la incubación en presencia de determinados ácidos grasos exógenos, los lípidos secretados por las células fueron enriquecidos significativamente en la especie particular de ácido graso incluida en el medio. De manera interesante, las células

HepG2 no dependen metabólicamente de los ácidos grasos exógenos para su crecimiento. Así, Furth y colaboradores (1992) derivaron una línea HepG2 estable deficiente en ácidos grasos esenciales (HepG2-EFD) y capaz de crecer en medio deslipidado durante varios meses.

No obstante, la disponibilidad de ácidos grasos libres, como el oleato, incrementa la síntesis *de novo* intracelular y la secreción de lípidos neutros, principalmente triacilglicerol, en las células HepG2 (Homan *et al.*, 1991; Lin *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1988). Además, los niveles de apolipoproteínas aumentan ligeramente en respuesta a ácidos grasos exógenos, y se estimula la secreción de lipoproteínas (Dashti y Wolfbauer, 1987). Hemos de indicar que los efectos observados sobre el metabolismo lipoproteico dependen, por otra parte, del tipo individual de ácido graso suministrado, de manera que solamente los ácidos grasos *cis*-insaturados ocasionan una disminución en la concentración de partículas LDL liberadas al medio (Dashti *et al.*, 2000). Por tanto, la disponibilidad de ácidos grasos exógenos determina, al menos en parte, las cantidades relativas y la composición de las diferentes lipoproteínas secretadas.

Cuando estas células son incubadas en presencia de ácidos grasos exógenos, marcados isotópicamente, éstos son rápidamente acilados, detectándose muy bajos niveles (inferiores al 5%) de ácido graso no esterificado dentro de las células (Homan *et al.*, 1991). Pakula y colaboradores (1997) analizaron la incorporación de distintos ácidos grasos saturados de diferente longitud de cadena, y marcados isotópicamente con  $^{14}\text{C}$ , a lípidos en células HepG2. Los ácidos grasos se incorporan principalmente a triacilglicerol y fosfolípidos, dependiendo la distribución de radiactividad del tipo de ácido graso incorporado. Estos autores encontraron sólo cantidades traza de radiactividad en colesterol, ésteres de colesterol, diacilglicerol y ácidos grasos. Por otra parte, las cantidades de lípidos marcados sintetizados por las células y liberados al medio no excedieron de un 1-2%.

Con respecto a la incorporación de ácidos grasos insaturados, Gibbons y colaboradores (1994) describieron que estas células incorporan fácilmente oleato (*cis*-18:1) extracelular marcado a lípidos celulares, aproximadamente un 85% a triacilglicerol y un 15% a fosfolípidos.

Observaron, además, que solamente un 1% del total de triacilglicerol sintetizado a partir del oleato exógeno fue secretado al medio, contrastando con la alta proporción (48%) secretada por los cultivos primarios de hepatocitos de rata, durante el mismo periodo de tiempo.

Las células HepG2 se utilizan también como modelo para el estudio del metabolismo del colesterol y de los ácidos biliares en hepatocitos (Erickson y Fielding, 1986; Javitt, 1990). HepG2 expresa las principales enzimas del metabolismo intra- y extracelular del colesterol, incluyendo lecitina:colesterol aciltransferasa, acil-CoA:colesterol aciltransferasa, 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa y colesterol-7 $\alpha$ -hidroxilasa. Las células HepG2 también sintetizan y secretan ácidos biliares, como colato y quenodesoxicolato. Erickson y Fielding (1986) indican que, aunque puede haber diferencias cuantitativas en la expresión de estas funciones, el sistema modelo HepG2 puede suministrar útiles indicios sobre los mecanismos potenciales de regulación del metabolismo hepático humano del colesterol, lipoproteico y biliar.

Gibbons y colaboradores (1994) analizaron, además, la síntesis y secreción de fosfolípidos en células HepG2. Incubando con oleato marcado radiactivamente y en ausencia de hormonas, los fosfolípidos representaron aproximadamente un 15% del total de glicerolípidos celulares recién sintetizados. La cantidad fosfolipídica secretada, tras su síntesis *de novo*, representó aproximadamente un 5% del total de fosfolípidos sintetizados. No obstante, ésta cantidad constituyó aproximadamente la mitad del total de glicerolípidos secretados en lipoproteínas, mientras que en cultivos primarios de hepatocitos de rata sólo un 2% de los glicerolípidos recién sintetizados y secretados, asociados a las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), fueron fosfolípidos.

La regulación del metabolismo de fosfolípidos no ha sido investigada suficientemente en estas células. Weinhold y colaboradores (1994) analizaron el efecto de la eliminación de colina sobre la biosíntesis de fosfatidilcolina y la distribución y fosforilación de la colina-fosfato citidililtransferasa. Estos autores observaron que la síntesis *de novo* de fosfatidilcolina es reducida, mientras que la ruta de metilación de fosfatidiletanolamina es estimulada, cuando el

medio de incubación carece del aporte de colina. La carencia de colina resultó, a su vez, en un aumento de la actividad colina-fosfato citidililtransferasa en membranas, disminuyendo la actividad citidililtransferasa presente en forma soluble. La suplementación posterior de colina en el medio provocó efectos de signo opuesto.

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren un modelo de translocación como mecanismo regulador de la colina-fosfato citidililtransferasa, por el cual la enzima soluble inactiva se transloca a membranas (RE, membrana nuclear) cuando es desfosforilada, donde es activa. Además, los datos aportan evidencia de que, ambos, el estado de fosforilación de la enzima y el contenido de fosfatidilcolina en la membrana son importantes en la regulación de la cantidad de proteína unida a membrana. No obstante, estos mismos autores propusieron un mecanismo alternativo de activación de la enzima mediante un incremento en su afinidad de unión a las membranas, estando toda la enzima intracelular, activa e inactiva, ligada a membrana (Weinhold y Barrett, 1998).

Por otra parte, la incubación de las células HepG2 con ácidos grasos exógenos (oleato) incrementa la síntesis de fosfatidilcolina a partir de colina, y este incremento se correlaciona con un aumento de la actividad citidililtransferasa tanto en microsomas como en citosol (Weinhold y Barrett, 1998; Weinhold *et al.*, 1991). El grupo de Weinhold sugiere la posibilidad de que la actividad colina-fosfato citidililtransferasa sea regulada por diferentes mecanismos dependiendo de los requerimientos celulares.

## **II.4. SECRECIÓN LIPÍDICA**

La mayor parte de los estudios realizados utilizando el modelo celular HepG2 están relacionados con diversos aspectos del metabolismo de lipoproteínas, incluyendo el análisis de la internalización y el catabolismo de las lipoproteínas normalmente encontradas en el plasma, y su secreción al medio. Ha sido examinada, además, la composición de las diferentes partículas lipoproteicas secretadas, referente a las apolipoproteínas presentes en asociación con distintos

componentes lipídicos, así como la regulación de su síntesis y secreción (Javitt, 1990). Por otra parte, las células HepG2 también sintetizan y exportan ácidos biliares. El contenido celular de apolipoproteínas y ácidos biliares es mínimo, de manera que estos productos se acumulan en el medio extracelular.

Gibbons y colaboradores (1994) indicaron que, aunque la síntesis de lípidos es muy activa en HepG2, existe un defecto en la movilización lipídica. Las células HepG2 presentan muy baja lipólisis intracelular y la secreción de triacilglicerol sintetizado *de novo* está reducida, resultando en la acumulación intracelular de triacilglicerol. La mayoría de la pequeña cantidad de triacilglicerol secretado está asociada con partículas similares a las LDL del plasma (Thrift *et al.*, 1986), y no parece haber ninguna alteración en la secreción de apolipoproteína B (Dixon y Ginsberg, 1993). El grupo de Gibbons (1994) observó, además, que las células HepG2 no presentan diferencias, con respecto a los hepatocitos normales, en la incorporación de fosfolípidos a lipoproteínas.

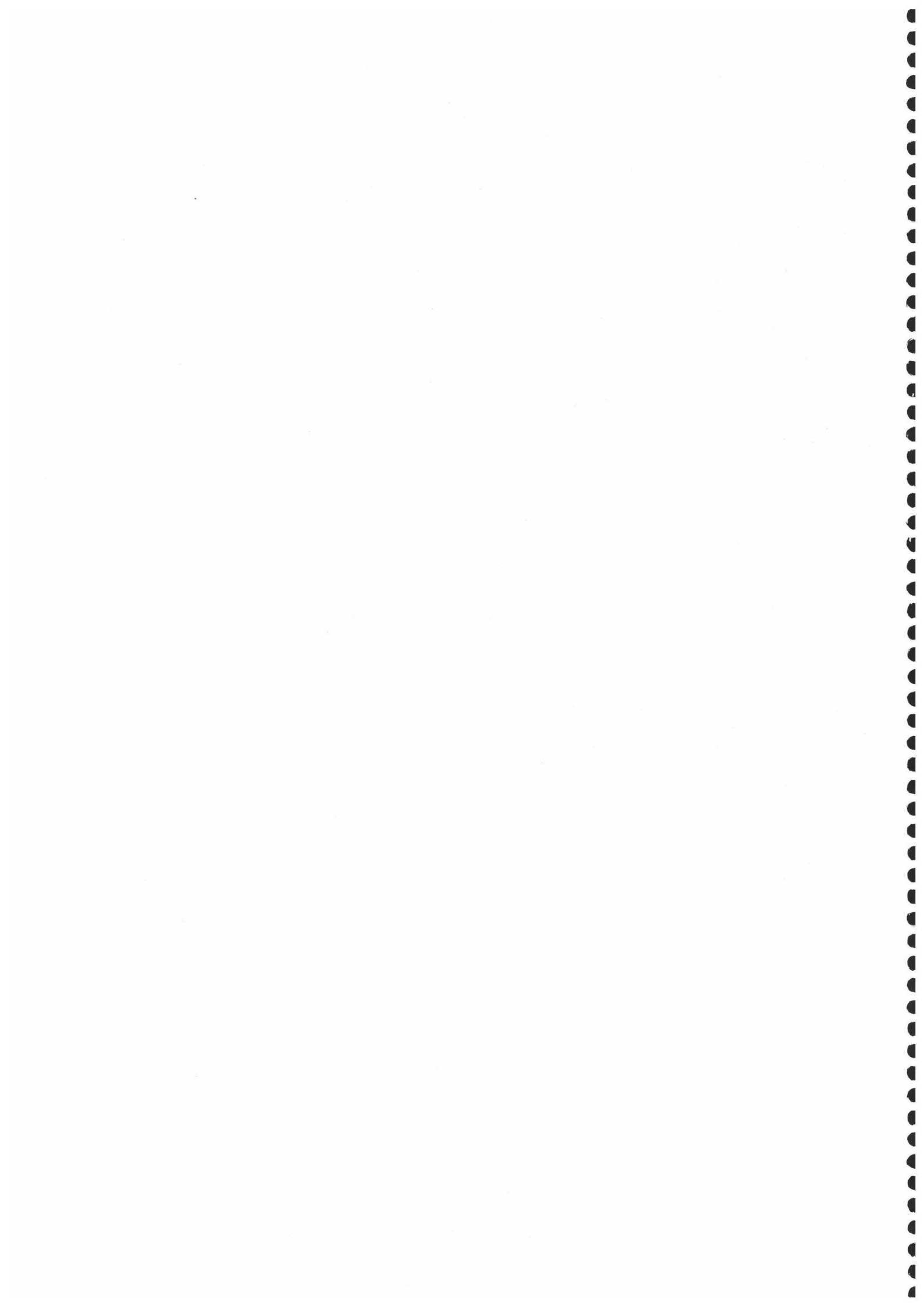
Estas células son ampliamente empleadas para el estudio de la regulación del ensamblaje y secreción de lipoproteínas por parte del hígado (Thrift *et al.*, 1986; Wang *et al.*, 1988). Interesantemente, las monocapas confluentes de HepG2 expresan los receptores normales de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), lipoproteínas de alta densidad (HDL), insulina, transferrina, estrógenos, y asialoglicoproteínas. Así, estas células internalizan y metabolizan quilomicrones, VLDL, LDL y HDL. Las células HepG2 sintetizan y secretan apolipoproteínas y la mayoría de las proteínas plasmáticas, como la albúmina (Knowles *et al.*, 1980; Rash *et al.*, 1981; Wang *et al.*, 1988).

Thrift y colaboradores (1986) demostraron que las células HepG2, crecidas en medio carente de suero, sintetizan y secretan LDL y HDL, y muy pocas VLDL. La composición lipídica de estas lipoproteínas, sin embargo, difiere respecto a las lipoproteínas normales del plasma humano. Así, al caracterizar, por ultracentrifugación diferencial, las lipoproteínas producidas por HepG2, se observan diferentes fracciones lipoproteicas de distinto rango de densidad (Thrift *et*

*al.*, 1986). La fracción de densidad inferior a 1,063 g/mL es similar en tamaño a las LDL plasmáticas. Presentan principalmente apoB<sub>100</sub>, y tienen una composición lipídica diferente a las LDL plasmáticas humanas, presentando un contenido elevado de triacilglicerol y colesterol y un bajo contenido de colesterol esterificado. Se observan, además, muy pocas VLDL (aprox. 1%), correspondientes al rango de densidad inferior a 1,006 g/mL. La fracción de densidad comprendida entre 1,063-1,20 g/mL es heterogénea en composición, tamaño y morfología. Su composición difiere significativamente respecto a las HDL del plasma, presentando un elevado contenido de colesterol y fosfolípidos y una cantidad muy baja de colesterol esterificado. Abunda la apolipoproteína apoA-I, seguida de apoE, estando también presentes apoA-II y apoC en pequeñas cantidades.

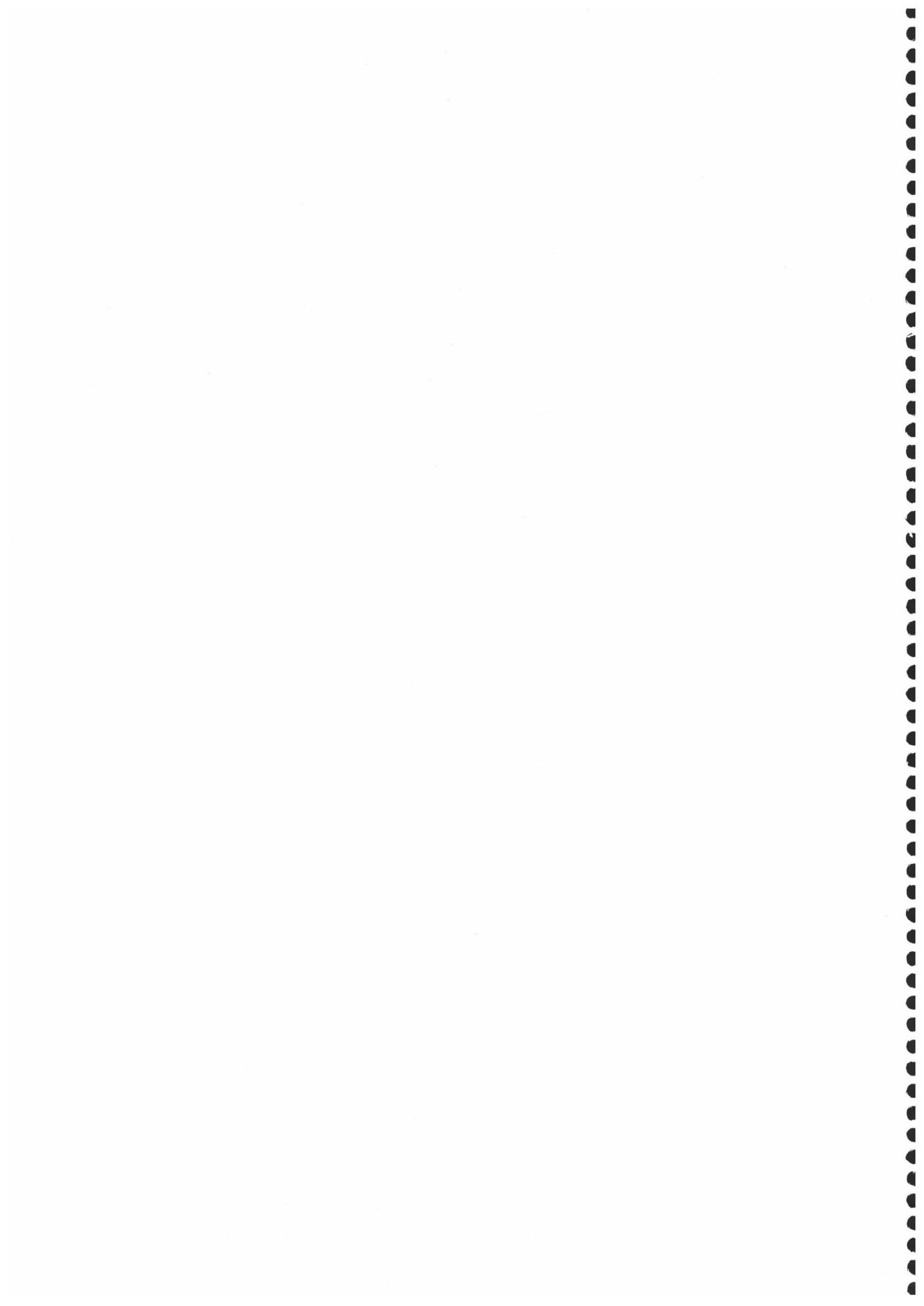
Se sugiere que la población accesible de lípidos neutros (triacilglicerol y/o ésteres de colesterol) regula la secreción de partículas lipoproteicas conteniendo apoB<sub>100</sub> en células HepG2 (Avramoglu *et al.*, 1995; Dixon y Ginsberg, 1993), evitando la degradación intracelular de la apoB<sub>100</sub> recién sintetizada (Yao *et al.*, 1997). La secreción de apoB<sub>100</sub> en partículas relativamente pequeñas y densas, del tipo LDL, parece ser debida principalmente a las bajas tasas de secreción de triacilglicerol por parte de estas células. En este sentido, cuando existe una fuente de ácidos grasos, como el oleato, las partículas secretadas por las células HepG2 aumentan de tamaño, debido al acúmulo de triacilglicerol, y adquieren apoE, asemejándose más a las VLDL plasmáticas (Benoist y Grand-Perret, 1995; Dixon y Ginsberg, 1993).

A diferencia de los hepatocitos, las células HepG2 no necesitan insulina para facilitar su adhesión al sustrato y mantener su viabilidad (Podskalny *et al.*, 1985). En estas células, la insulina afecta a la secreción de lipoproteínas VLDL y LDL, ricas en triacilglicerol. Diversos autores han descrito que la insulina inhibe la secreción de lípidos neutros, apolipoproteínas y otras proteínas, particularmente triacilglicerol y apoB<sub>100</sub>, incrementando de este modo sus concentraciones intracelulares (Dashti y Wolfbauer, 1987; Wang *et al.*, 1988). Así, al igual que ocurre en hepatocitos de rata, la insulina no modifica la síntesis neta de triacilglicerol en células HepG2, sino que sólo altera su secreción (Gibbons *et al.*, 1994).





## **Resultados**

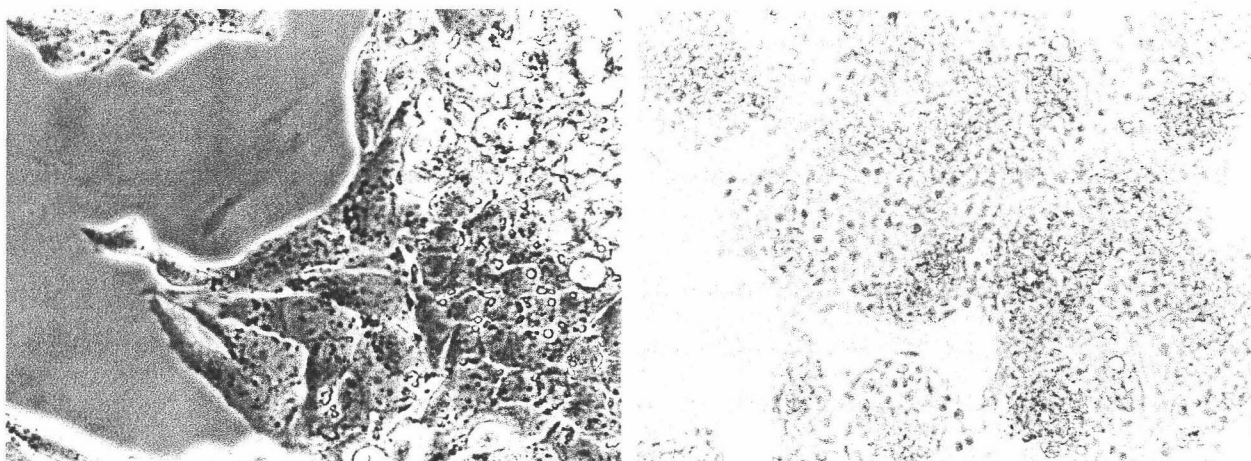


## **I. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS CÉLULAS HepG2**

La línea celular HepG2 fue establecida a partir de una biopsia de un tumor hepático humano (hepatoblastoma). En adherencia, estas células presentan unas características morfológicas y forma celular epitelial compatibles con las células del parénquima hepático (Aden *et al.*, 1979). Se trata de una línea celular madura y altamente diferenciada, aunque presenta ciertos rasgos fetales y algunas anormalidades cromosómicas respecto a los hepatocitos humanos normales. Las células HepG2 retienen un elevado grado de funciones hepáticas diferenciadas, de manera que preservan las características hepáticas morfológicas y expresan la mayoría de las actividades enzimáticas propias del hígado, lo cual ha determinado que se empleen extensamente como modelo experimental en estudios sobre metabolismo lipídico hepático (Javitt, 1990).

### **I.1. OBSERVACIÓN DE LAS CÉLULAS HepG2 MEDIANTE MICROSCOPIA ÓPTICA**

Con objeto de examinar la morfología externa de las células HepG2, hemos realizado micrografías ópticas de las células a distintos aumentos. Como puede observarse en la Figura 1, las células no presentan la característica de inhibición del crecimiento por contacto, como era de esperar por su procedencia tumoral. Al contrario, las células tienden a crecer más rápido y formar agrupaciones tras entablar contacto entre sí. Cuando las células están adheridas su morfología es epitelial, con forma alargada y aspecto fusiforme. Tras dividirse, observamos las células hijas con forma redondeada, que al unirse a la superficie de cultivo adquieren una forma alargada. Por otra parte, el citosol presenta un volumen reducido, y contiene numerosos gránulos de acúmulo lipídico.

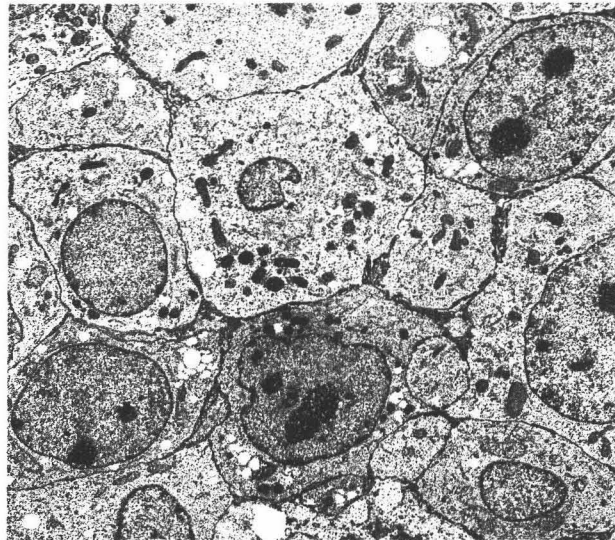


**Figura 1. Aspecto de las células HepG2 bajo microscopía óptica.** Las células HepG2 fueron incubadas en EMEM/ 10% FCS, creciendo en adherencia.

## **I.2. OBSERVACIÓN DE LAS CÉLULAS HepG2 MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA**

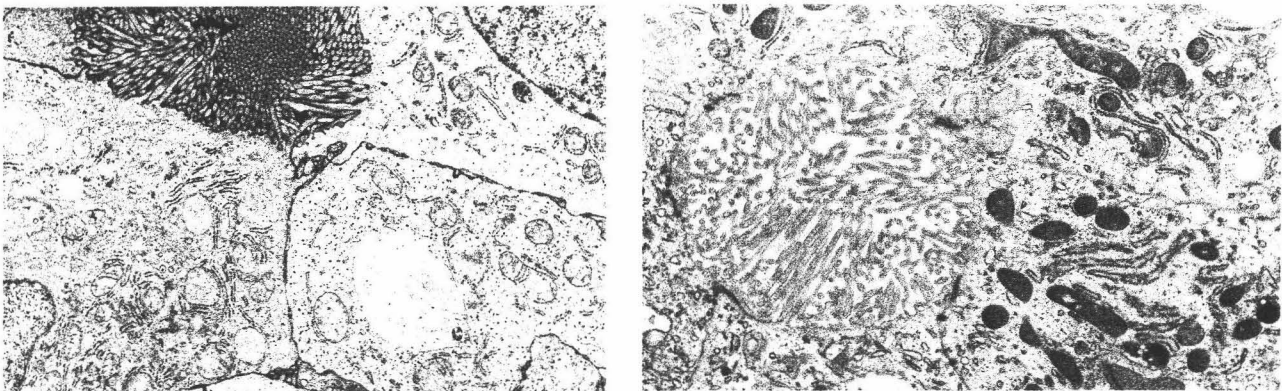
Las células han sido además examinadas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), con el fin de estudiar su morfología a nivel ultraestructural. En la Figura 2 podemos apreciar que las células son mononucleadas, ocupando el núcleo un gran volumen celular. Es de destacar la presencia de elementos característicos de polaridad celular, mostrados en la Figura 3. Las células HepG2 presentan una membrana plasmática diferenciada que ocasionalmente forma estructuras similares a los canalículos biliares, con numerosas microvellosidades, a las cuales son dirigidas proteínas apicales específicas (Zegers y Hoekstra, 1998).

En la Figura 4 se observan distintos componentes citosólicos de las células HepG2. Estas células contienen numeroso retículo endoplasmático rugoso mientras que escasea el retículo endoplasmático liso. Presentan grandes complejos de Golgi, lisosomas, cuerpos multivesiculares y gránulos de acúmulo lipídico no rodeados de membrana.

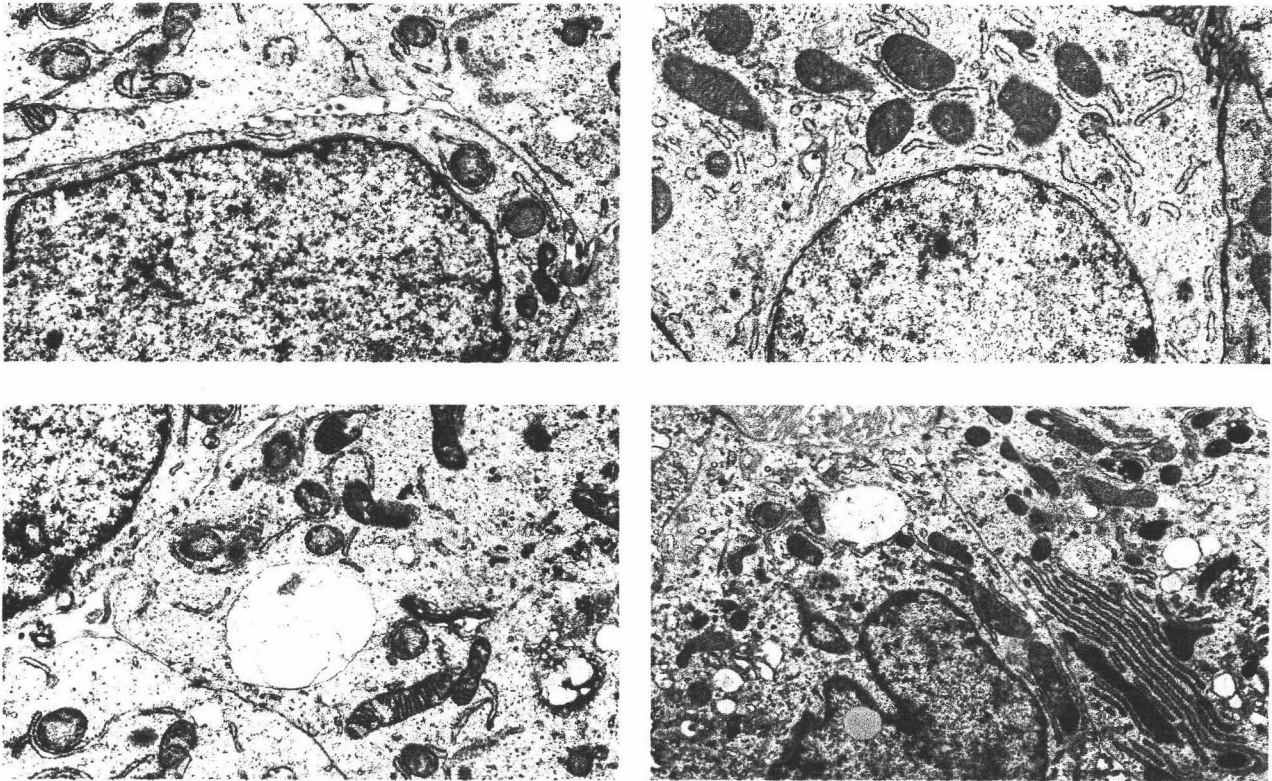


**Figura 2. Micrografías electrónicas de células HepG2.** Las células HepG2 fueron incubadas en EMEM/ 10% FCS, creciendo en adherencia.

Estas características morfológicas y funcionales explican que esta línea celular haya sido utilizada para revelar importantes detalles concernientes a las rutas de transporte lipídico en las células hepáticas (Zegers y Hoekstra, 1998).



**Figura 3. La membrana plasmática diferenciada de las células HepG2 forma estructuras similares a los canalículos biliares.** Las células HepG2 fueron incubadas en EMEM/ 10% FCS, creciendo en adherencia.



**Figura 4. Diferentes componentes citosólicos en células HepG2.** Las células HepG2 fueron incubadas en EMEM/ 10% FCS, creciendo en adherencia.

## **II. CARACTERIZACIÓN DEL METABOLISMO LIPÍDICO EN LAS CÉLULAS HepG2**

### **II.1. COMPOSICIÓN LIPÍDICA**

En primer lugar, hemos analizado la composición lipídica de las células HepG2. Concretamente, se han determinado los niveles de los distintos fosfolípidos celulares, así como los niveles de triacilglicerol y colesterol total. Puesto que la composición lipídica puede variar dependiendo de la fase del ciclo celular, decidimos examinar los niveles lipídicos tanto en células estando en la fase exponencial de crecimiento rápido como en células totalmente confluentes mantenidas en la fase de crecimiento retardado.

los niveles de triacilglicerol y colesterol total. Puesto que la composición lipídica puede variar dependiendo de la fase del ciclo celular, decidimos examinar los niveles lipídicos tanto en células estando en la fase exponencial de crecimiento rápido como en células totalmente confluentes mantenidas en la fase de crecimiento retardado.

Las células se mantuvieron en EMEM/ 10% FCS hasta que alcanzaron la fase logarítmica de crecimiento o bien presentaron total confluencia. Entonces, recogimos las células y los lípidos celulares fueron extraídos y separados mediante TLC.

### II.1.1. CÉLULAS HepG2 EN PROLIFERACIÓN

En la Tabla I se indican los valores obtenidos tras la determinación de fósforo lipídico en los distintos fosfolípidos constituyentes de las células HepG2 subconfluentes, expresados como  $\mu\text{g}$  de fósforo por  $\text{mg}$  de proteína. Como era de esperar, la fosfatidilcolina es el fosfolípido mayoritario en estas células, representando más de la mitad de los fosfolípidos totales. Fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol representan aproximadamente un 18%, 13% y 11%, respectivamente, mientras que solamente un 4% corresponde a esfingomielina.

**TABLA I. Niveles de fosfolípidos en células HepG2 en proliferación.** Las células fueron sembradas en placas petri de 60 mm de diámetro y mantenidas en EMEM/ 10% FCS. Cuando alcanzaron la fase de crecimiento exponencial se recogieron y los lípidos fueron extraídos de las células y separados mediante TLC.

	$\mu\text{g P} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$	Porcentaje (%)
Fosfatidilcolina	$5,96 \pm 0,10$	54%
Fosfatidiletanolamina	$2,04 \pm 0,08$	18%
Fosfatidilserina	$1,41 \pm 0,03$	13%
Fosfatidilinositol	$1,26 \pm 0,03$	11%
Esfingomielina	$0,45 \pm 0,02$	4%

Los resultados son media de seis determinaciones  $\pm$  SEM, expresados como  $\mu\text{g}$  de fósforo por mg de proteína. Se indica, además, la distribución porcentual respecto al total de fosfolípidos analizados.

Los niveles de triacilglicerol y colesterol total, expresados como  $\mu\text{g}$  del correspondiente componente lipídico por mg de proteína, se muestran en la Tabla II. Como puede observarse, la fracción de lípidos neutros representa la mayor parte del contenido lipídico global de estas células. A partir de estos datos, y teniendo en cuenta que el peso molecular promedio de los fosfolípidos tiene un valor de aproximadamente 750 g/mol, la fracción de fosfolípidos y de triacilglicerol representan aproximadamente un 60% y 30% en peso de los lípidos analizados, respectivamente, mientras la fracción de colesterol total sólo constituye aproximadamente un 10% en peso del total de lípidos analizados (Tabla I).

**TABLA II. Niveles de triacilglicerol y colesterol total en células HepG2 en proliferación.**

Las células fueron sembradas en placas petri de 60 mm de diámetro y mantenidas en EMEM/10% FCS. Cuando alcanzaron la fase logarítmica de crecimiento se recogieron y los lípidos fueron extraídos de las células y separados mediante TLC.

	$\mu\text{g} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$
Triacilglicerol	$135,74 \pm 8,91$
Colesterol total	$42,30 \pm 0,14$

Los resultados son media de seis determinaciones  $\pm$  SEM, expresados como  $\mu\text{g}$  de triacilglicerol o colesterol por mg de proteína.

**II.1.2. CÉLULAS HepG2 EN CONFLUENCIA**



Exponemos a continuación los valores obtenidos acerca de los niveles de los distintos fosfolípidos y triacilglicerol en células HepG2 crecidas hasta alcanzar total confluencia. Comparando los valores obtenidos en las Tablas I y III, observamos que la cantidad de fosfatidilcolina se mantiene constante, mientras los niveles celulares del resto de fosfolípidos analizados son ligeramente superiores cuando las células alcanzan la confluencia. El nivel de triacilglicerol, sin embargo, no presenta diferencias significativas para las células en proliferación o totalmente confluentes.

**TABLA III. Niveles de fosfolípidos y triacilglicerol en células HepG2 confluentes.** Las células fueron sembradas en placas petri de 60 mm de diámetro y mantenidas en EMEM/ 10% FCS. Cuando alcanzaron total confluencia se recogieron y los lípidos fueron extraídos de las células y separados mediante TLC.

	$\mu\text{g} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$	Porcentaje (%)
Fosfatidilcolina	$5,93 \pm 0,22$	45%
Fosfatidiletanolamina	$2,68 \pm 0,08$	20%
Fosfatidilserina	$1,76 \pm 0,17$	13%
Fosfatidilinositol	$2,02 \pm 0,18$	15%
Esfingomielina	$0,88 \pm 0,06$	7%
Triacilglicerol	$147,12 \pm 3,22$	

Los resultados son media de cuatro determinaciones  $\pm$  SEM, expresados como  $\mu\text{g}$  de fósforo o triacilglicerol por mg de proteína. Para la fracción fosfolipídica, se indica además la distribución porcentual respecto al total de fosfolípidos analizados.

## II.2. INCORPORACIÓN DE PRECURSORES METABÓLICOS

Hemos empleado distintos sustratos lipogénicos para analizar las principales rutas metabólicas de fosfolípidos y lípidos neutros. En primer lugar, las células HepG2 se incubaron

en presencia de glicerol marcado isotópicamente, el cual ha permitido determinar la velocidad global de síntesis de los diferentes componentes lipídicos.

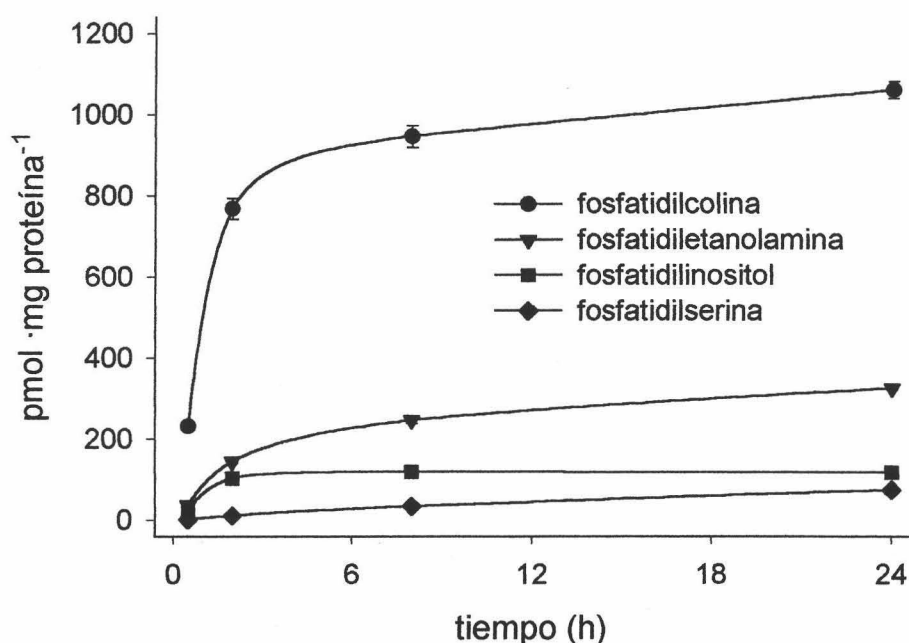
En otra serie de experimentos, las células fueron incubadas con bases nitrogenadas específicas al objeto de estudiar las principales rutas de biosíntesis de fosfolípidos. Mediante la incubación con colina o etanolamina marcada isotópicamente hemos analizado la ruta de Kennedy que sintetiza *de novo* fosfatidilcolina o fosfatidiletanolamina, respectivamente, a través del intermediario CDP-aminobase correspondiente. La utilización de etanolamina marcada nos dará además información acerca de la ruta de síntesis de fosfatidilcolina por metilación sucesiva de fosfatidiletanolamina. Finalmente, la incubación de las células con serina marcada nos ha permitido examinar la síntesis de fosfatidilserina mediante la reacción de intercambio de bases con fosfolípidos preexistentes, así como los procesos de síntesis de fosfatidiletanolamina, por descarboxilación de la fosfatidilserina en mitocondrias, y de fosfatidilcolina, a través de la metilación de la fosfatidiletanolamina en microsomas. La radiactividad procedente de la serina también fue incorporada a los distintos lípidos neutros.

Por último, analizamos la capacidad de estas células de hepatoma para esterificar ácidos grasos exógenos, determinándose la incorporación a lípidos de palmitato y araquidonato marcados radiactivamente.

### **II.2.1. INCORPORACIÓN DE [1,2,3-<sup>3</sup>H]GLICEROL A LO LARGO DEL TIEMPO**

Con objeto de examinar las distintas rutas de síntesis *de novo* de lípidos en células HepG2, se seleccionó en primer lugar el glicerol marcado isotópicamente como precursor metabólico. El glicerol se fosforila a  $\alpha$ -glicerol fosfato, el cual es entonces acilado para producir fosfatidato, por mediación de actividades aciltransferasa que usan acil-CoA. La actividad fosfatidato fosfohidrolasa libera el grupo fosfato, originando diacilglicerol, el cual esterifica con otro grupo acilo formando triacilglicerol o bien deriva hacia la síntesis de fosfatidilcolina y

fosfatidiletanolamina por la ruta de Kennedy. El fosfatidato puede también transformarse en CDP-diacilglicerol e incorporarse así a fosfatidilinositol. La incorporación a fosfatidilserina ocurrirá por reacciones de intercambio base:serina con fosfolípidos preexistentes marcados radiactivamente en el esqueleto carbonado del glicerol.



**Figura 5. Incorporación a lo largo del tiempo de [1,2,3-<sup>3</sup>H]glicerol a distintos fosfolípidos celulares.** Las células HepG2 fueron incubadas con glicerol marcado radiactivamente (25  $\mu$ M, 200 Ci  $\cdot$ mol<sup>-1</sup>). A los tiempos seleccionados, se analizó la incorporación de glicerol a los diferentes fosfolípidos en estas células. Los datos son media de cinco determinaciones  $\pm$  SEM, expresados como pmol de glicerol incorporados por mg de proteína. El experimento fue repetido obteniéndose similares resultados.

Hemos llevado a cabo un análisis a lo largo del tiempo de la incorporación de glicerol a los distintos fosfolípidos y lípidos neutros. Las células HepG2 fueron incubadas en EMEM

suplementado con [1,2,3-<sup>3</sup>H]glicerol, recogidas a diferentes tiempos y, tras la extracción de los lípidos y su separación cromatográfica, determinamos la radiactividad asociada a las distintas fracciones lipídicas.

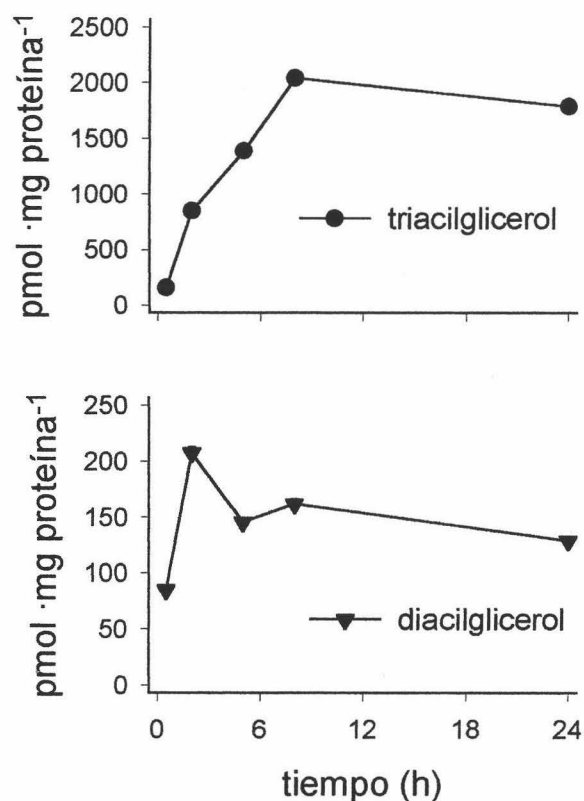
La Figura 5 muestra cómo el glicerol es sustancialmente incorporado a los fosfolípidos mayoritarios, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, aunque fosfatidilinositol y fosfatidilserina también muestran un significativo marcaje radiactivo. Notablemente, el perfil de incorporación de radiactividad es similar para los distintos fosfolípidos. Se observa un incremento de incorporación a lo largo del periodo analizado, alcanzando un máximo aproximadamente a las 8 h de incubación con glicerol.

En la Figura 6 se muestran las cinéticas de incorporación de glicerol marcado radiactivamente a distintos lípidos neutros. Se observa cómo el glicerol es acentuadamente incorporado a la fracción de triacilglicerol, mientras la radiactividad asociada a la fracción de diacilglicerol es claramente inferior. Esto indica que el diacilglicerol sintetizado *de novo* es acilado activamente por la acil-CoA:diacilglicerol O-aciltransferasa para producir triacilglicerol, además de ser utilizado también por las correspondientes aminobase-fosfotransferasas para la biosíntesis de fosfolípidos.

Según se aprecia, la incorporación de radiactividad a triacilglicerol ascendió regularmente hasta las 8 h de incubación, manteniéndose después este valor, mientras la incorporación a diacilglicerol incrementó abruptamente hasta las 2 h de incubación y después se estabilizó. Los niveles de incorporación a monoglicéridos, ácidos grasos, ésteres metílicos de ácidos grasos, colesterol y ésteres de colesterol fueron excesivamente bajos para su detección y análisis. Estos resultados indican que el glicerol se incorpora directamente al esqueleto carbonado de diacilglicerol, triacilglicerol y fosfolípidos, y se transforma en muy baja extensión en acetyl-CoA.

## II.2.2. INCORPORACIÓN DE L-[3-<sup>3</sup>H]SERINA

En los tejidos animales, la fosfatidilserina se sintetiza mediante una reacción de intercambio de serina con la cabeza polar de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina. Las reacciones de intercambio de bases, no obstante, representan una ruta minoritaria para la síntesis del resto de fosfolípidos. La fosfatidilserina puede ser posteriormente descarboxilada por mediación de la actividad fosfatidilserina descarboxilasa mitocondrial y generar así fosfatidiletanolamina, la cual producirá además fosfatidilcolina en microsomas mediante sucesivas etapas de metilación catalizadas por actividades metiltransferasa.



**Figura 6. Incorporación a lo largo del tiempo de [1,2,3-<sup>3</sup>H]glicerol a triacilglicerol y diacilglicerol celulares. Las células HepG2 fueron incubadas con glicerol marcado**

isotópicamente ( $25 \mu\text{M}$ ,  $200 \text{ Ci} \cdot \text{mol}^{-1}$ ). A diferentes tiempos, se analizó la incorporación de glicerol a los diferentes lípidos neutros en estas células. Los datos son media de cinco determinaciones  $\pm$  SEM, expresados como pmol de glicerol incorporados por mg de proteína. El experimento fue repetido obteniéndose similares resultados.

**TABLA IV. Incorporación de L-[3-<sup>3</sup>H]serina a fosfolípidos y lípidos neutros en células HepG2.** Las células en proliferación fueron incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 6 h en EMEM/ 10% FCS suplementado con L-[3-<sup>3</sup>H]serina ( $100 \mu\text{M}$ ,  $15 \text{ Ci} \cdot \text{mol}^{-1}$ ). Tras recoger las células, los lípidos celulares fueron extraídos y separados mediante TLC.

	$\text{pmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$
<i>Fosfolípidos</i>	
Fosfatidilserina	$86,17 \pm 3,83$
Fosfatidiletanolamina	$38,33 \pm 1,67$
Fosfatidilcolina	$18,17 \pm 0,50$
Esfingomielina	$11,50 \pm 0,17$
Fosfatidilinositol	$1,50 \pm 0,17$
<i>Lípidos neutros</i>	
Ceramida	$23,67 \pm 0,67$
Triacilglicerol	$22,00 \pm 0,83$

Los resultados son media de tres determinaciones  $\pm$  SEM, expresados como pmol de serina incorporados por h y mg de proteína. El experimento fue repetido obteniéndose similares resultados.

Por tanto, al incubar las células con serina marcada isotópicamente hemos determinado, por una parte, la radiactividad asociada a estos tres fosfolípidos, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina. La ceramida y la esfingomielina se sintetizan *de novo* a partir de la serina, en un proceso cuya primera reacción está catalizada por la L-serina:palmitil-

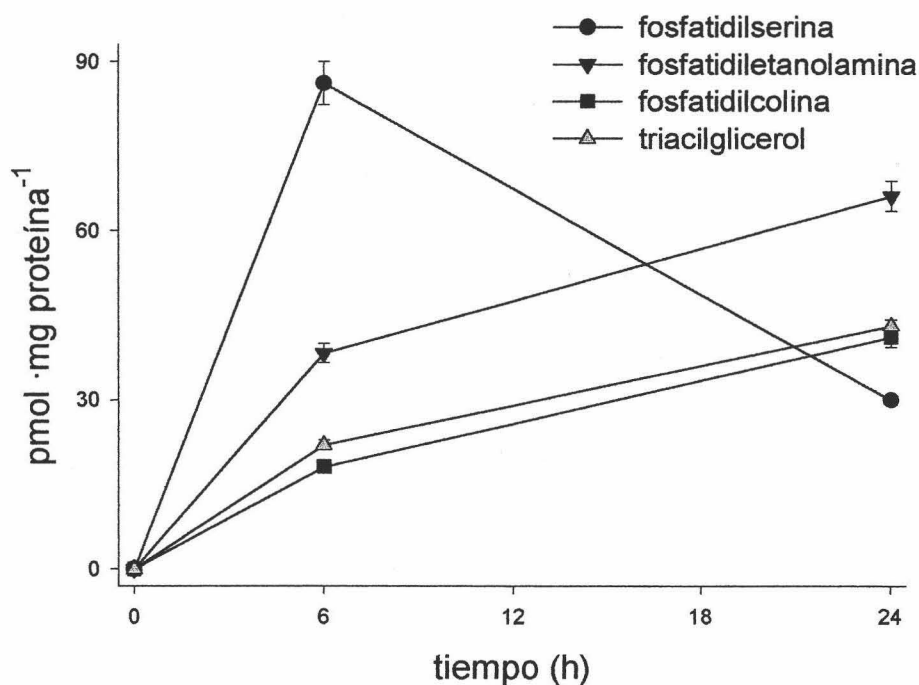
CoA palmitiltransferasa. Por otra parte, la serina es transformada intracelularmente en acetil-CoA, sustrato utilizado para la síntesis de ácidos grasos, de aquí que se observe también incorporación de radiactividad a los distintos lípidos neutros.

En la Tabla IV están indicados los valores de incorporación de serina marcada isotópicamente a los diferentes fosfolípidos y lípidos neutros en células HepG2. Las células fueron incubadas durante 6 h en EMEM/ 10% FCS suplementado con L-[3-<sup>3</sup>H]serina. Tras recoger las células, los lípidos fueron extraídos y separados por TLC. Como puede observarse, el nivel máximo de incorporación aparece en la fracción de fosfatidilserina, la cual presenta aproximadamente el 55% de la radiactividad incorporada a fosfolípidos. La significativa detección de radiactividad asociada a fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina indica que tanto el proceso de descarboxilación mitocondrial de fosfatidilserina, para producir fosfatidiletanolamina, como la metilación posterior de la fosfatidiletanolamina en microsomas para generar fosfatidilserina se llevan a cabo de manera eficiente en estas células.

Es de destacar, además, la elevada proporción de esfingomielina producida a partir de la serina, que representa aproximadamente un 63% de la radiactividad asociada a la fracción de fosfatidilcolina, indicando que estas células utilizan la L-serina eficientemente para la síntesis *de novo* de esfingomielina, a través de ceramida como intermediario metabólico. A este respecto, los niveles intracelulares de ceramida presentaron también un significativo marcaje radiactivo. Por otra parte, la proporción de síntesis de esfingomielina respecto a fosfatidilcolina es comparativamente muy superior a la observada cuando el marcaje radiactivo de esfingomielina procede únicamente del grupo de cabeza de la fosfatidilcolina (ver apartado II.2.2.3), lo cual implica que al incubar con serina marcada la mayor parte de la radiactividad asociada a la fracción de esfingomielina procede del marcaje en el esqueleto carbonado de la ceramida.

En la misma Tabla puede observarse cómo la serina se incorpora comparativamente en una baja proporción a la fracción de triacilglicerol respecto a fosfolípidos, lo cual parece indicar que una pequeña fracción de la serina se desvía hacia la formación de ácidos grasos que son

utilizados para la síntesis de triacilglicerol. Esto es confirmado por el bajo nivel de incorporación de radiactividad a fosfatidilinositol, el cual se debe exclusivamente al marcaje radiactivo de sus ácidos grasos constituyentes.



**Figura 7. Incorporación a lo largo del tiempo de L-[3-<sup>3</sup>H]serina a fosfolípidos y triacilglicerol celulares.** Las células HepG2 fueron incubadas con serina marcada radiactivamente ( $100 \mu\text{M}$ ,  $15 \text{ Ci} \cdot \text{mol}^{-1}$ ). Transcurridas 6 ó 24 h, se analizó la radiactividad incorporada a diferentes fosfolípidos y triacilglicerol en estas células. Los datos son media de tres determinaciones  $\pm$  SEM, expresados como pmol de serina incorporados por mg de proteína.

En un ensayo posterior, las células HepG2 fueron incubadas con serina marcada en las mismas condiciones experimentales pero durante un periodo de 24 h. En la Figura 7 se muestra una situación de equilibrio metabólico, transcurridas 24 h de incorporación de serina, en la cual



la fosfatidilserina marcada deriva en una mayor proporción hacia la síntesis de fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina.

### II.2.3. INCORPORACIÓN DE [1,2-<sup>14</sup>C]ETANOLAMINA

La fosfatidiletanolamina se sintetiza por dos vías diferentes: la ruta de Kennedy, a través del intermediario CDP-etanolamina, y por descarboxilación mitocondrial de fosfatilserina. La incubación de las células con etanolamina marcada isotópicamente nos ha permitido examinar, por una parte, la ruta de síntesis de fosfatidiletanolamina vía CDP-etanolamina y, a su vez, hemos analizado el proceso de síntesis microsomal de fosfatidilcolina mediante sucesivas etapas de metilación de fosfatidiletanolamina.

En la Tabla V se recogen los datos obtenidos acerca de la incorporación de etanolamina marcada isotópicamente a los distintos intermediarios metabólicos y al producto final de la vía CDP-etanolamina, la fosfatidiletanolamina, tras la incubación de las células HepG2 durante 6 h en EMEM/ 10% FCS conteniendo el sustrato radiactivo. Se observa que la formación de CDP-etanolamina es inferior a la de etanolamina-fosfato, debido nuevamente al carácter limitante de la velocidad de la reacción catalizada por la etanolamina-fosfato citidililtransferasa. Es de destacar que se produce una activa síntesis *de novo* de fosfatidiletanolamina en estas células a partir de etanolamina, como se deduce del alto nivel de radiactividad presentado por este fosfolípido en nuestras condiciones experimentales.

Por otra parte, la incubación con etanolamina marcada nos ha permitido analizar simultáneamente la síntesis de fosfatidilcolina a partir de fosfatidiletanolamina en estas células de procedencia hepática. Los resultados obtenidos se presentan también en la Tabla V, donde se han determinado los niveles radiactivos de los intermediarios de dicha ruta biosintética, N-metilfosfatidiletanolamina y N,N'-dimetilfosfatidiletanolamina, así como los niveles del producto final fosfatidilcolina y de la esfingomiélin sintetizada a partir de ella. Según se observa, la producción de metilderivados es muy reducida, de manera que la síntesis de

fosfatidilcolina a través de la metilación de fosfatidiletanolamina no supera el 3% bajo nuestras condiciones experimentales. Esto indica que la actividad de metilación de la fosfatidiletanolamina para producir fosfatidilcolina es muy baja en las células HepG2. La producción de esfingomielina, también muy reducida, representa aproximadamente un 2% de los niveles radiactivos asociados a la fosfatidilcolina sintetizada por esta ruta.

**TABLA V. Incorporación de [1,2-<sup>14</sup>C]etanolamina a lípidos e intermediarios de la vía CDP-etanolamina en células HepG2.** Las células en proliferación fueron incubadas a 37°C durante 6 h en EMEM/ 10% FCS suplementado con [1,2-<sup>14</sup>C]etanolamina (45 μM, 100 Ci · mol<sup>-1</sup>). Tras recoger las células, los lípidos celulares e intermediarios metabólicos de etanolamina fueron extraídos y separados mediante TLC.

	<i>pmol · h<sup>-1</sup> · mg proteína<sup>-1</sup></i>
<i>Lípidos</i>	
Fosfatidiletanolamina	2327,2 ± 58,5
N-monometilfosfatidiletanolamina	5,2 ± 0,2
N,N'-dimetilfosfatidiletanolamina	6,1 ± 0,4
Fosfatidilcolina	52,0 ± 3,0
Esfingomielina	1,0 ± 0,1
<i>Intermediarios solubles</i>	
Etanolamina	9,7 ± 0,2
Etanolamina-fosfato	865,2 ± 68,6
CDP-etanolamina	24,0 ± 2,0

Los resultados son media de cuatro determinaciones ± SEM, expresados como pmol de etanolamina incorporados por h y mg de proteína. El experimento fue repetido obteniéndose similares resultados.

#### II.2.4. INCORPORACIÓN DE [METIL-<sup>14</sup>C]COLINA

La vía de Kennedy constituye la principal ruta de síntesis *de novo* de fosfatidilcolina, y transcurre a través de la síntesis del intermediario CDP-colina. Con objeto de estudiar esta ruta biosintética, hemos incubado las células HepG2 durante 6 h en EMEM/ 10% FCS conteniendo [metil-<sup>14</sup>C]colina. Tras la extracción lipídica, determinamos la incorporación de radiactividad a los distintos intermediarios metabólicos y al producto final de la ruta de biosíntesis, la fosfatidilcolina, así como a esfingomiéline. La reacción de síntesis de esfingomiéline a partir de fosfatidilcolina es catalizada por la enzima fosfatidilcolina:ceramida colinafosfotransferasa, que transfiere el grupo colina fosfato de la fosfatidilcolina a la ceramida, produciéndose esfingomiéline y diacilglicerol.

**TABLA VI. Incorporación de [metil-<sup>14</sup>C]colina a lípidos e intermediarios de la vía CDP-colina en células HepG2.** Las células en proliferación fueron incubadas a 37°C durante 6 h en EMEM/ 10% FCS suplementado con [metil-<sup>14</sup>C]colina (60 μM, 50 Ci · mol<sup>-1</sup>). Tras recoger las células, los lípidos celulares e intermediarios metabólicos de colina fueron extraídos y separados mediante TLC.

	<i>pmol · h<sup>-1</sup> · mg proteína<sup>-1</sup></i>
<i>Lípidos</i>	
Fosfatidilcolina	691,0 ± 18,3
Esfingomiéline	8,3 ± 0,4
<i>Intermediarios solubles</i>	
Colina	56,5 ± 5,0
Colina-fosfato	3508,3 ± 88,6
CDP-colina	19,5 ± 0,7
Betaína	144,5 ± 7,5

Los resultados son media de cuatro determinaciones ± SEM, expresados como pmol de colina incorporados por h y mg de proteína. El experimento fue repetido tres veces obteniéndose similares resultados.

Como se observa en la Tabla VI, la colina marcada isotópicamente se incorpora fundamentalmente a fosfatidilcolina, mientras que la radiactividad asociada a la fracción de esfingomielina representa menos de un 1,5% de la radiactividad en fosfatidilcolina. Cuando la incubación con colina marcada fue prolongada hasta un periodo de 24 h, el porcentaje de síntesis de esfingomielina a partir de la fosfatidilcolina recién sintetizada nunca superó el 4%.

Los valores de incorporación de radiactividad a los intermediarios de la ruta de biosíntesis de fosfatidilcolina están también indicados en la Tabla VI. Podemos observar cómo los niveles de colina-fosfato marcada representan más del 90% de la radiactividad soluble intracelular, mientras los niveles de CDP-colina son netamente inferiores a los de colina-fosfato y fosfatidilcolina. Estos valores reflejan la baja velocidad de la reacción catalizada por la colina-fosfato citidiltransferasa, paso limitante de la ruta. Por otra parte, la colina quinasa transforma rápidamente la colina en colina-fosfato, por lo que los niveles intracelulares de colina marcada son comparativamente muy bajos. La radiactividad asociada a betaína, producto de oxidación de colina, representa menos del 5% del total de radiactividad soluble.

## **II.2.5. INCORPORACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS MARCADOS ISOTÓPICAMENTE**

### **II.2.5.1. INCORPORACIÓN DE [1-<sup>14</sup>C]PALMITATO**

En la Tabla VII se muestran los resultados obtenidos acerca de la incorporación de palmitato marcado isotópicamente a los diferentes fosfolípidos y lípidos neutros en células HepG2. Las células fueron incubadas durante 6 h en EMEM/ 10% FCS suplementado con palmitato marcado isotópicamente. Entonces, recogimos las células y los lípidos fueron extraídos y separados por TLC.

Como puede apreciarse, el palmitato marcado se incorpora a todos los fosfolípidos analizados, preferentemente a los dos fosfolípidos mayoritarios, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, los cuales representan aproximadamente el 64% y 30% de la radiactividad

incorporada a la fracción total de fosfolípidos. El palmitato marcado se incorpora también a los distintos lípidos neutros, mayoritariamente a triacilglicerol, los cuales presentan un 90% de la radiactividad asociada a la fracción total de lípidos neutros.

**TABLA VII. Incorporación de [1-<sup>14</sup>C]palmitato a fosfolípidos y lípidos neutros en células HepG2.** Las células en proliferación fueron incubadas a 37°C durante 6 h en EMEM/ 10% FCS suplementado con [1-<sup>14</sup>C]palmitato (100 μM, 17 Ci · mol<sup>-1</sup>). Tras recoger las células, los lípidos celulares fueron extraídos y separados mediante TLC.

	<i>pmol · h<sup>-1</sup> · mg proteína<sup>-1</sup></i>
<i>Fosfolípidos</i>	
Fosfatidilcolina	6688,3 ± 121,7
Fosfatidiletanolamina	3116,7 ± 118,3
Fosfatidilinositol	530,0 ± 26,7
Fosfatidilserina	335,1 ± 13,3
Esfingomielina	111,4 ± 2,3
<i>Lípidos neutros</i>	
Triacilglicerol	6643,3 ± 318,6
Diacilglicerol	408,3 ± 41,7
Ésteres de colesterol	153,8 ± 8,8
Ceramida	123,1 ± 5,5
Ácidos grasos	56,7 ± 1,4

Los resultados son media de tres determinaciones ± SEM, expresados como pmol de palmitato incorporados por h y mg de proteína. El experimento fue repetido obteniéndose similares resultados.

Es de destacar una notable incorporación de radiactividad a la fracción de ceramidas, las cuales pueden incorporar palmitato marcado por dos vías: a través de la reacción de síntesis de la

base esfingosina, que utiliza palmitil-CoA, y/o por esterificación de la esfingosina con este ácido graso para generar ceramida. Al incubar con palmitato marcado, los niveles radiactivos asociados a la fracción de esfingomielina proceden, igualmente, de su esqueleto de ceramida. Por tanto, ambas fracciones lipídicas marcadas, esfingomielina y ceramida, contienen en conjunto aproximadamente un 1,3% de la radiactividad total incorporada a los lípidos celulares.

**TABLA VIII. Relaciones entre lípidos marcados tras la incubación de las células HepG2 con [1-<sup>14</sup>C]palmitato durante 6 y 24 h.** Las células en proliferación fueron incubadas a 37°C durante 6 ó 24 h en EMEM/ 10% FCS suplementado con [1-<sup>14</sup>C]palmitato (100 μM, 17 Ci · mol<sup>-1</sup>). Tras recoger las células, los lípidos celulares fueron extraídos y separados mediante TLC.

<i>Relación lipídica:</i>	<i>Tiempo de incubación</i>	
	<i>6 h</i>	<i>24 h</i>
PC/PE	2,15	2,63
TG/PL	0,64	0,57
TG/DG <sub>total</sub>	0,37	0,33
PL/DG <sub>total</sub>	0,60	0,66

En un siguiente ensayo, las células fueron incubadas con palmitato marcado durante un periodo de 24 h. No mostramos los resultados ya que no aportan nueva información, aunque sí indicamos en la Tabla VIII diversas relaciones obtenidas a partir de los valores de incorporación de radiactividad procedente del palmitato marcado a las distintas fracciones lipídicas para ambos periodos de incubación, 6 y 24 h. En primer lugar, el valor calculado para la relación PC/PE coincide aproximadamente con la relación entre los niveles intracelulares de estos fosfolípidos (Tabla I y III), lo cual sugiere que el palmitato es incorporado por igual a ambos fosfolípidos. La relación TG/PL, indicativa del flujo relativo de los diacilglicerol hacia triacilglicerol o fosfolípidos, es inferior a 1, lo que sugiere una mayor actividad de síntesis intracelular de fosfolípidos en estas células, en relación a la biosíntesis de triacilglicerol. Por último, la elevada

relación TG/DG<sub>total</sub> refleja la gran actividad de síntesis de triacilglicerol en estas células a partir del ácido graso marcado.

#### II.2.5.2. INCORPORACIÓN DE [1-<sup>14</sup>C]ARAQUIDONATO

De una forma similar a la descrita para la incubación con palmitato marcado, las células HepG2 fueron incubadas durante 24 h en EMEM/ 10% FCS suplementado con araquidonato marcado radiactivamente. Entonces, las células se recogieron y los lípidos fueron extraídos y separados por TLC.

En la Tabla IX se muestran los resultados obtenidos acerca de la incorporación de araquidonato marcado isotópicamente a los diferentes fosfolípidos y lípidos neutros en estas células. Al igual que el palmitato, el araquidonato marcado se incorpora también a todos los fosfolípidos analizados. La fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina incorporan un 40%, cada uno, de la radiactividad total asociada a fosfolípidos. Es de destacar que el araquidonato, en comparación con el palmitato, es incorporado más eficientemente a fosfatidilinositol: los porcentajes de incorporación de ambos ácidos grasos a fosfatidilinositol son aproximadamente un 13% y 5%, respectivamente, del total incorporado a fosfolípidos.

El araquidonato se incorpora también a los diferentes lípidos neutros, aunque lo hace principalmente a triacilglicerol. El porcentaje de incorporación de este ácido graso a la suma de esfingomielina y ceramida representa únicamente un 0,7% de la radiactividad total incorporada. Este valor es inferior al obtenido cuando incubamos con palmitato y, por otra parte, sólo se debe al proceso de esterificación de la esfingosina para generar ambos compuestos.

A continuación, y como mostramos anteriormente al incubar con palmitato, en la Tabla X presentamos las relaciones obtenidas a partir de los valores de incorporación de radiactividad procedente del araquidonato marcado a las distintas fracciones lipídicas. El valor calculado para la relación PC/PE es próximo a 1 y por tanto, siguiendo el razonamiento anteriormente expuesto, indica que el araquidonato se incorpora preferentemente a fosfatidiletanolamina con respecto a

fosfatidilcolina. La relación TG/PL es aún inferior a la que calculamos después de incubar con palmitato, por lo que deducimos que el araquidonato es utilizado aún más acentuadamente para la biosíntesis de fosfolípidos, en lugar de derivar hacia la producción de triacilglicerol. Finalmente, si comparamos la relación TG/DG<sub>total</sub> calculada para ambas incubaciones, con araquidonato y palmitato, se deduce que la actividad acil-CoA:diacilglicerol O-aciltransferasa en estas células utiliza araquidonato de forma menos eficiente que palmitato para generar triacilglicerol.

**TABLA IX. Incorporación de [1-<sup>14</sup>C]araquidonato a fosfolípidos y lípidos neutros en células HepG2.** Las células en proliferación fueron incubadas a 37°C durante 24 h en EMEM/ 10% FCS suplementado con [1-<sup>14</sup>C]araquidonato (100 µM, 58 Ci · mol<sup>-1</sup>). Tras recoger las células, los lípidos celulares fueron extraídos y separados mediante TLC.

	<i>pmol · h<sup>-1</sup> · mg proteína<sup>-1</sup></i>
<i>Fosfolípidos</i>	
Fosfatidilcolina	2048,3 ± 33,2
Fosfatidiletanolamina	1943,6 ± 58,3
Fosfatidilinositol	685,0 ± 33,3
Fosfatidilserina	390,1 ± 11,7
Esfingomielina	34,3 ± 1,2
<i>Lípidos neutros</i>	
Triacilglicerol	1741,7 ± 66,8
Diacilglicerol	43,2 ± 0,7
Ésteres de colesterol	78,0 ± 6,1
Ceramida	12,7 ± 0,8
Ácidos grasos	14,0 ± 0,3

Los resultados son media de tres determinaciones ± SEM, expresados como pmol de araquidonato incorporados por h y mg de proteína.



### II.3. SECRECIÓN DE LÍPIDOS SINTETIZADOS *DE NOVO* A PARTIR DE GLICEROL

Para examinar la secreción de los lípidos sintetizados *de novo*, las células HepG2 fueron incubadas durante 24 h en EMEM suplementado con glicerol marcado radiactivamente y recogimos el medio de incubación a diferentes tiempos. Los lípidos fueron entonces extraídos del medio de cultivo y separados mediante TLC. En la Figura 8 se ha representado la liberación al medio, en función del tiempo, de triacilglicerol y fosfatidilcolina recién sintetizados. Éstas fueron las dos únicas fracciones lipídicas que presentaron una proporción significativa de radiactividad en el medio de cultivo a partir del glicerol marcado.

**TABLA X. Relaciones entre lípidos marcados tras la incubación de las células HepG2 con [1-<sup>14</sup>C]araquidonato durante 24 h.** Las células en proliferación fueron incubadas a 37°C durante 24 h en EMEM/ 10% FCS suplementado con [1-<sup>14</sup>C]araquidonato (100 µM, 58 Ci · mol<sup>-1</sup>). Tras recoger las células, los lípidos celulares fueron extraídos y separados mediante TLC.

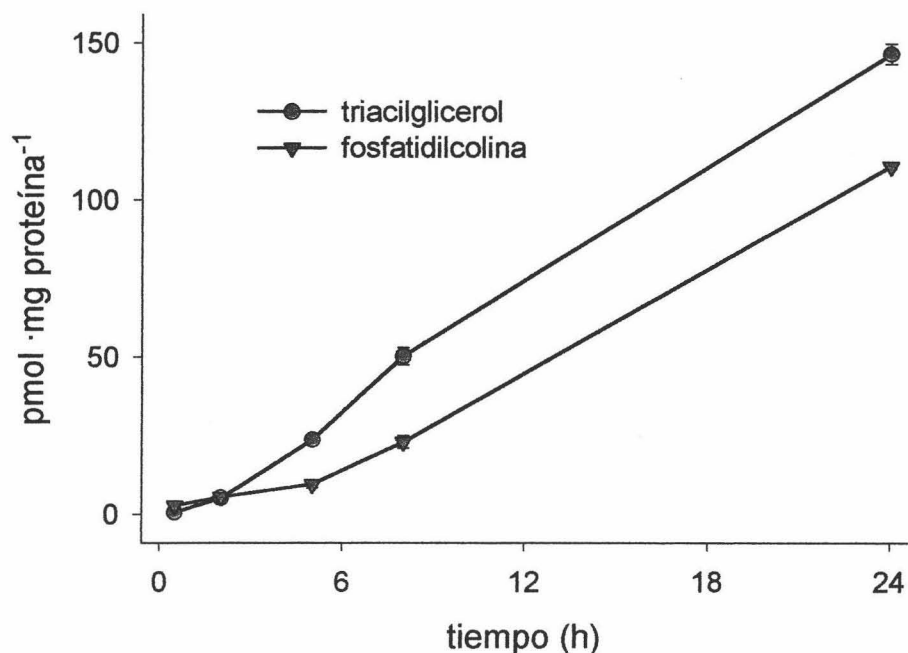
*Relación lipídica:*

PC/PE	1,05
TG/PL	0,34
TG/DG <sub>total</sub>	0,25
PL/DG <sub>total</sub>	0,74

Como puede observarse en esta Figura, los perfiles de exportación al medio de triacilglicerol y fosfatidilcolina fueron diferentes a los correspondientes a las cinéticas de su síntesis celular *de novo* a partir de glicerol –ver las Figuras 5 y 6–. Así, la liberación al medio de los lípidos marcados aumentó de manera sostenida durante el periodo de 24 h analizado. Notablemente, sólo un porcentaje mínimo, inferior al 10%, del total de triacilglicerol y fosfatidilcolina recién sintetizados por las células fue secretado al medio.

## II.4. DEGRADACIÓN Y SECRECIÓN DE LÍPIDOS ENDÓGENOS

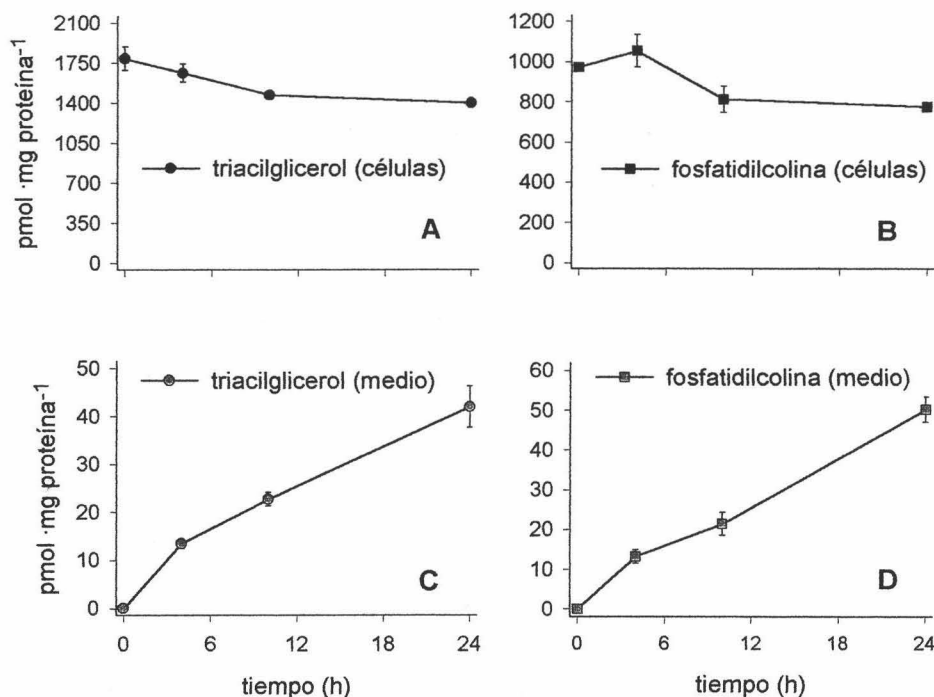
Después de analizar la síntesis y secreción de los lípidos sintetizados *de novo* a partir de glicerol, decidimos examinar la degradación endógena de fosfolípidos y lípidos neutros en células HepG2, así como su secreción al medio extracelular. Para llevar a cabo este estudio, los lípidos celulares fueron, en primer lugar, marcados mediante incubación de las células durante 24 h en EMEM conteniendo glicerol marcado isotópicamente. El medio fue seguidamente retirado y sustituido por medio fresco no radiactivo. A diferentes tiempos, la radiactividad asociada a las distintas fracciones lipídicas fue determinada tanto en las células como en el medio de cultivo.



**Figura 8. Secreción de triacilglicerol y fosfatidilcolina recién sintetizados.** Las células HepG2 fueron incubadas con [1,2,3-<sup>3</sup>H]glicerol (25  $\mu$ M, 200 Ci  $\cdot$  mol<sup>-1</sup>). A diferentes tiempos, se determinó la radiactividad incorporada a triacilglicerol y

fosfatidilcolina liberados al medio de cultivo. Los datos son media de cinco determinaciones  $\pm$  SEM, expresados como pmol de glicerol incorporados por mg de proteína. El experimento fue repetido obteniéndose similares resultados.

Este análisis nos ha permitido estimar la vida media de los diferentes fosfolípidos y lípidos neutros en células HepG2. La velocidad de degradación de los distintos fosfolípidos es relativamente baja. Así, los porcentajes de degradación, transcurridas 24 horas, para fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol y fosfatidilserina son aproximadamente 22, 10, 32 y 35%, respectivamente. Se analizó también la velocidad de degradación para triacilglicerol y diacilglicerol, observándose de nuevo un bajo porcentaje de degradación endógena de ambos lípidos neutros, aproximadamente un 20% transcurridas 24 h después de ser sintetizados.

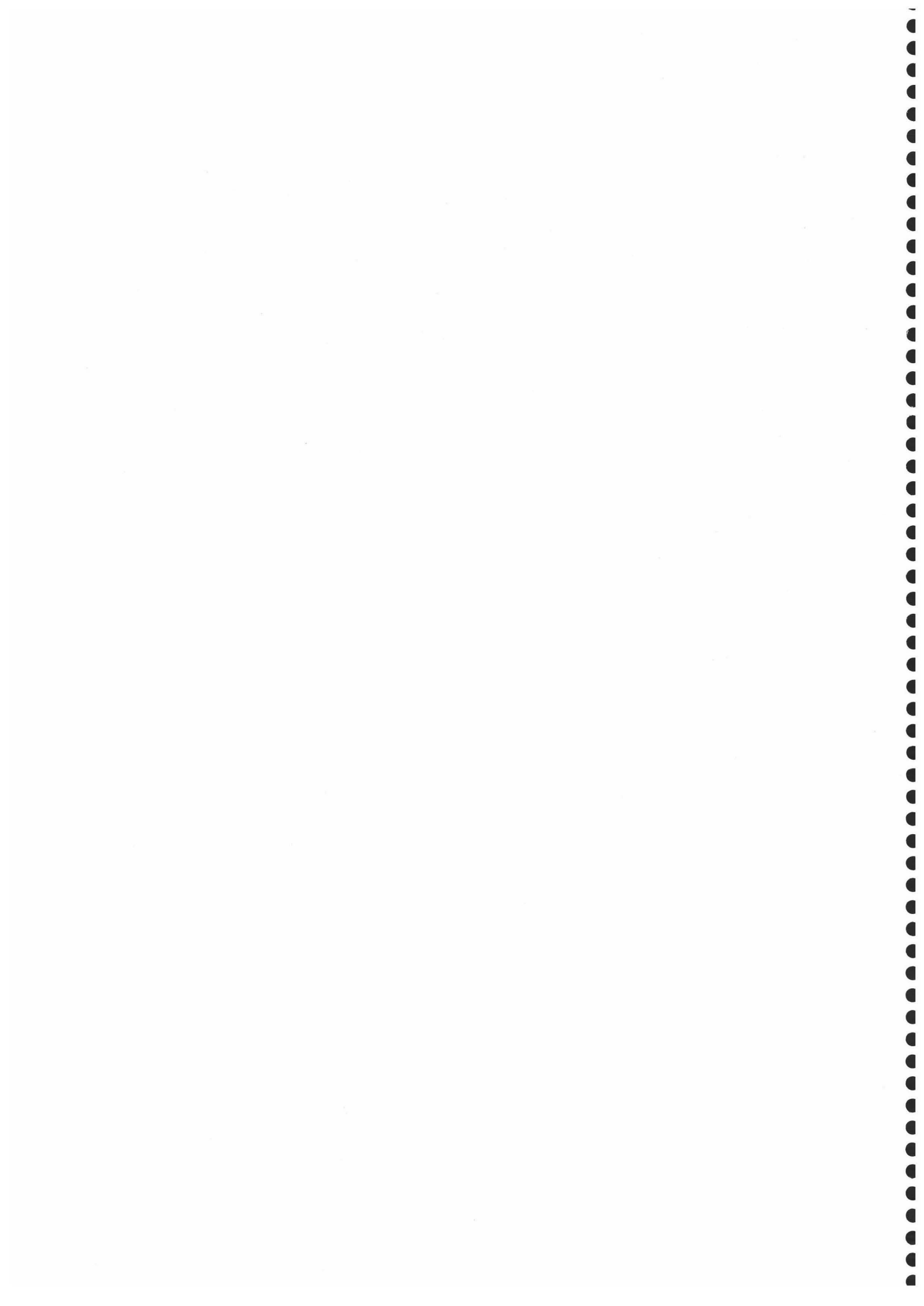


**Figura 9. Degradación intracelular y liberación al medio de triacilglicerol y fosfatidilcolina endógenos.** Las células HepG2 fueron incubadas con [1,2,3-<sup>3</sup>H]glicerol (25  $\mu$ M, 200 Ci  $\cdot$ mol<sup>-1</sup>) durante 24 h. El medio radiactivo fue entonces eliminado y reemplazado por medio fresco no radiactivo. A los tiempos seleccionados, se examinó la desaparición de radiactividad en triacilglicerol y fosfatidilcolina celulares (A, B) y su secreción al medio (C, D). Los datos son media de al menos dos determinaciones  $\pm$  SEM, expresados como pmol de glicerol incorporados por mg de proteína.

Tras el pulso de marcaje durante 24 horas con glicerol marcado radiactivamente, se determinó además la radiactividad asociada a los diferentes componentes lipídicos liberados al medio extracelular. Como se muestra en la Figura 9, la exportación al medio de las poblaciones endógenas de triacilglicerol y fosfatidilcolina aumentó regularmente durante el periodo de 24 h analizado, siendo secretado solamente un porcentaje mínimo del total de triacilglicerol y fosfatidilcolina endógenos premarcados.

En la Figura 9 hemos representado los perfiles de degradación y liberación al medio correspondientes a las poblaciones endógenas de triacilglicerol y fosfatidilcolina en estas células.

## **Discusión**



## I. SÍNTESIS *DE NOVO* LIPÍDICA EN LAS CÉLULAS HepG2

HepG2 y los hepatocitos primarios de rata son los sistemas modelo *in vitro* más comúnmente utilizados para investigar el metabolismo lipídico hepático. Dadas sus características, la línea celular HepG2, derivada de un hepatoma humano, ha sido extensamente empleada para estudiar numerosos aspectos metabólicos relacionados con el hígado (Javitt, 1990). Los estudios realizados hasta ahora se han referido fundamentalmente al análisis del metabolismo de lípidos neutros y lipoproteínas, siendo escasos los trabajos destinados a elucidar las rutas biosintéticas que conducen a fosfolípidos.

En el presente capítulo hemos examinado la capacidad global de síntesis y secreción de lípidos en células HepG2. Se analizaron las principales rutas del metabolismo de fosfolípidos y acilgliceroles en estas células, utilizando para ello diferentes precursores metabólicos. Puesto que es evidente que la expresión de una mayor actividad lipogénica depende de la disponibilidad de sustratos, el medio de incubación se suplementó con glicerol 25  $\mu\text{M}$ , colina 60  $\mu\text{M}$  y etanolamina 50  $\mu\text{M}$ . De este modo se evita una limitación en el aporte de dichos sustratos para la biosíntesis *de novo* de acilgliceroles y de los fosfolípidos mayoritarios, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina.

La utilización de glicerol y ácidos grasos, marcados isotópicamente, como precursores lipogénicos nos ha permitido determinar la actividad biosintética *de novo* de glicerolípidos y esfingolípidos. La radiactividad procedente de estos sustratos aparece asociada a la fracción apolar de los diferentes componentes lipídicos. En otra serie de experimentos utilizamos distintas bases nitrogenadas marcadas radiactivamente, analizándose diversas rutas biosintéticas de fosfolípidos en estas células.

La incorporación de glicerol marcado radiactivamente ha sido utilizada para examinar la síntesis *de novo* de glicerolípidos en estas células. De los resultados obtenidos, se deduce que el glicerol es utilizado eficientemente por las células HepG2 para la biosíntesis *de novo* de

glicerofosfolípidos y acilgliceroles, indicando que el diacilglicerol recién sintetizado deriva rápidamente hacia la producción de otros glicerolípidos. Como es de esperar, los componentes lipídicos mayoritarios presentan mayor marcaje radiactivo, principalmente triacilglicerol y fosfatidilcolina, demostrando que la síntesis de ambos glicerolípidos es especialmente activa en este tipo celular, como describieron otros autores (Dashti *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 1995; Pakula *et al.*, 1997). Destacamos, por tanto, que este sistema experimental permite disponer de un modelo apropiado para el análisis de las distintas vías biosintéticas de lípidos a nivel hepático. Por otra parte, se detectan muy bajos niveles de incorporación a las fracciones lipídicas sintetizadas vía acetil-CoA, sugiriendo que el glicerol se incorpora directamente al esqueleto carbonado de glicerolípidos.

La utilización de palmitato o araquidonato como sustrato lipogénico debe, en principio, aportar información similar a la obtenida empleando glicerol exógeno. Comparando los resultados con los obtenidos en presencia de glicerol, se observa una mayor actividad lipogénica hacia fosfolípidos. Así, el valor de la relación TG/PL, indicativa del flujo relativo de diacilglicerol hacia la síntesis de triacilglicerol o fosfolípidos, es inferior a 1, mientras que a partir de glicerol esta misma relación presenta un valor próximo a 2.

La utilización de palmitato y araquidonato como sustratos lipogénicos nos ha permitido ampliar el conocimiento de la capacidad de estas células para la biosíntesis de los diferentes componentes lipídicos celulares. Es interesante comprobar que el grado de incorporación de estos ácidos grasos es netamente superior al observado a partir de glicerol como sustrato exógeno. Esta característica ha sido previamente puesta de manifiesto en nuestro laboratorio utilizando hepatocitos aislados de rata, y puede ser debida a una marcada estimulación lipogénica producida por activación de la fosfatidato fosfohidrolasa en presencia de ácidos grasos exógenos (Carrasco *et al.*, 1998).

De especial interés resulta el hecho de que estas células presenten una mayor capacidad, con respecto a los hepatocitos normales, para desviar el diacilglicerol hacia la biosíntesis de



fosfolípidos, en lugar de hacia triacilglicerol, cuando se exponen a la presencia de ácidos grasos exógenos. Por otra parte, el palmitato es incorporado a los distintos componentes lipídicos en mayor proporción que el araquidonato, aunque el perfil de distribución entre los diferentes fosfolípidos y lípidos neutros fue, en general, similar para ambos ácidos grasos. Solamente es de destacar que la fosfatidiletanolamina y el fosfatidilinositol incorporan preferencialmente el ácido graso poliinsaturado. De modo similar, en nuestro laboratorio hemos comprobado, utilizando microsomas aislados de hígado de rata, que los ácidos grasos poliinsaturados se incorporan preferentemente a estos dos fosfolípidos por acción de aciltransferasas específicas. Esta mayor especificidad para estos ácidos grasos es probablemente responsable del elevado contenido en ácidos grasos poliinsaturados que presentan aquellos fosfolípidos *in vivo*.

Cuando el sustrato lipogénico es serina, la mayor parte del marcaje radiactivo aparece asociado a la fracción de fosfolípidos, siendo menor la desviación de este metabolito hacia acilgliceroles, como se puede observar del nivel radiactivo asociado a triacilglicerol. La utilización del esqueleto carbonado de la serina para la síntesis de acilgliceroles ocurre mediante su transformación previa en acetil-CoA, el cual deriva entonces hacia la vía lipogénica. Así, nuestros resultados indican que, en células HepG2, aproximadamente un 10% de la serina total incorporada a lípidos se detecta en triacilglicerol.

Como cabría esperar, la serina exógena es utilizada activamente para la síntesis de fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina, de manera semejante a lo que ocurre en hepatocitos aislados de rata incubados en condiciones similares (Carrasco *et al.*, 1996b). Puesto que la radiactividad asociada a fosfatidilinositol es comparativamente muy baja, y este fosfolípido sólo puede presentar marcaje procedente de serina en la fracción apolar, se deduce que el marcaje radiactivo de fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina se localiza preferentemente en la cabeza polar del fosfolípido. En este sentido, Weinhold y colaboradores (1994) detectaron que la serina es incorporada casi exclusivamente (96%) a la porción polar de los fosfolípidos en células HepG2, de modo que tras hidrolizarlos con fosfolipasa C casi la

totalidad de la radiactividad total en el extracto lipídico fue convertida en productos solubles en agua.

La mayor proporción de radiactividad se observa lógicamente en fosfatidilserina, sintetizada a través de la reacción de intercambio de bases. Además, una proporción considerable de la radiactividad aparece en fosfatidiletanolamina, generada en la reacción catalizada por la fosfatidilserina descarboxilasa mitocondrial. Por tanto, existe una activa transferencia de la fosfatidilserina recién sintetizada en RE hacia las mitocondrias, donde es descarboxilada.

El grado en que la fosfatidilserina sintetizada *de novo* es descarboxilada puede determinarse mediante la relación existente entre la radiactividad asociada a los productos de descarboxilación de la fosfatidilserina (PE+PC) con respecto a la fosfatidilserina total sintetizada ( $PS_{total}=PS+PE+PC$ ). A partir de los resultados obtenidos en nuestro estudio, calculamos un valor aproximado de 0,40, indicando que un 40% de la fosfatidilserina recién sintetizada es a continuación descarboxilada en mitocondrias. Este valor, en hepatocitos normales de rata, fue de 0,31 (Carrasco *et al.*, 1996b), indicando que la descarboxilación mitocondrial de fosfatidilserina se lleva a cabo de forma eficiente en células HepG2.

Por otra parte, la fosfatidilcolina que aparece marcada radiactivamente procede de la fosfatidiletanolamina sintetizada *de novo* en mitocondrias, por lo que el transporte de ésta al RE, para ser metilada, ocurre también eficientemente en estas células. El valor de la relación de radiactividad en fosfatidilcolina respecto a la radiactividad asociada a la fosfatidiletanolamina total recién sintetizada ( $PE_{total}=PE+PC$ ), indicativa de la capacidad de las células para metilar fosfatidiletanolamina, muestra que un 32% de la fosfatidiletanolamina producida en mitocondrias es posteriormente metilada en microsomas. No obstante, es interesante indicar que el valor de esta relación en hepatocitos aislados de rata muestra que éstos presentan una capacidad muy superior de metilación de la fosfatidiletanolamina sintetizada por esta ruta (Carrasco *et al.*, 1996b).

Finalmente, hemos de indicar que la serina es también un precursor proteico. En cualquier caso, en nuestro estudio solamente hemos efectuado un seguimiento de la radiactividad incorporada a las distintas fracciones de naturaleza lipídica.

Una vía alternativa de síntesis de fosfatidiletanolamina es la denominada ruta de Kennedy, que utiliza etanolamina como precursor. Puesto que se trata de una ruta microsomal, la fosfatidiletanolamina sintetizada puede ser directamente metilada sin necesidad de transporte previo.

El análisis de los intermediarios metabólicos de la vía CDP-etanolamina resalta el hecho de que la reacción catalizada por la etanolamina-fosfato citidililtransferasa constituye la etapa limitante de la síntesis de fosfatidiletanolamina, como se ha descrito en distintos tipos celulares. En estas células, además, se observa que la fosfatidiletanolamina generada a partir de etanolamina como sustrato exógeno es metilada, puesto que aparece radiactividad asociada a fosfatidilcolina. De forma similar a como indicamos anteriormente tras incubar con serina, hemos calculado la relación de la radiactividad incorporada a fosfatidilcolina con respecto a la radiactividad total asociada a la fosfatidiletanolamina sintetizada por la vía de Kennedy y posteriormente metilada ( $PE_{total}=PE+MPE+DPE+PC$ ), indicando la capacidad de metilación de la fosfatidiletanolamina sintetizada *de novo*, donde MPE y DPE representan los intermediarios mono- y dimetilado, respectivamente. El valor obtenido,  $PC/PE_{total}$ , es aproximadamente 0,022, indicando que menos de un 3% de la fosfatidiletanolamina recién sintetizada vía CDP-etanolamina es metilada en microsomas para producir fosfatidilcolina. De manera interesante, un valor muy similar para esta relación fue obtenido a partir de los resultados de incorporación de etanolamina marcada en hepatocitos aislados de rata (0,027) (Carrasco *et al.*, 1996b), indicando que el proceso de metilación microsomal de fosfatidiletanolamina es similar en ambos tipos de células de procedencia hepática.

Todos estos datos demuestran claramente que la capacidad de metilación microsomal de fosfatidiletanolamina es diferente dependiendo de la procedencia de la fosfatidiletanolamina utilizada como sustrato de la reacción catalizada por la metiltransferasa, sugiriendo una localización distinta de las poblaciones específicas de fosfatidiletanolamina sintetizada. Así, la fosfatidiletanolamina recién transportada desde mitocondrias, procedente de la descarboxilación de fosfatidilserina, parece ser utilizada más eficientemente que la sintetizada *in situ* en microsomas a través de la vía CDP-etanolamina. Una posible explicación para la metilación diferencial observada es que ambas poblaciones intracelulares del fosfolípido presenten distinta accesibilidad a la actividad metiltransferasa.

La colina es incorporada a la vía CDP-colina de síntesis *de novo* de fosfatidilcolina. Nuevamente, como en el caso de la incubación con etanolamina, la distribución de radiactividad en los intermediarios metabólicos de la ruta indica el carácter limitante de la reacción catalizada por la colina-fosfato citidililtransferasa, observándose unos elevados niveles radiactivos del sustrato de la reacción, colina-fosfato, mientras que la radiactividad asociada al producto de la misma, CDP-colina, es comparativamente muy baja. De acuerdo con nuestros resultados, otros autores han demostrado, utilizando diversos tipos celulares, que la reacción catalizada por la colina-fosfato citidililtransferasa constituye la etapa limitante de la ruta de biosíntesis del fosfolípido mayoritario, fosfatidilcolina (Kent, 1997; Vance *et al.*, 1980).

Relacionado también con el metabolismo de la colina, se ha de considerar que este metabolito es susceptible no sólo de ser utilizado para la síntesis de fosfatidilcolina, sino que puede además ser oxidado a betaína en una reacción catalizada por la colina oxidasa. La betaína, a su vez, es utilizada en determinadas situaciones metabólicas para la síntesis de metionina, la cual mediante la reacción catalizada por la metionina S-adenosiltransferasa se transforma en S-adenosilmetionina. Nuestros datos indican que el nivel de producción de betaína a partir de colina es de aproximadamente un 5% en las células HepG2, de modo que la mayor proporción de colina incorporada deriva hacia la síntesis de fosfatidilcolina.

Mención aparte merece el análisis de la ruta de síntesis de esfingomielina, fosfolípido minoritario que se sintetiza vía ceramida a partir de palmitato y L-serina. Los datos bibliográficos existentes hasta el momento sobre esta ruta biosintética son realmente escasos, y las enzimas que participan en ella no han sido investigadas en profundidad. El grupo de cabeza colina-fosfato de la esfingomielina es donado por la fosfatidilcolina, en la reacción catalizada por la fosfatidilcolina:ceramida colinafosfotransferasa (esfingomielina sintasa).

Utilizando colina, el valor obtenido para la relación SM/PC es inferior a 0,04, indicando que un porcentaje muy bajo de la fosfatidilcolina sintetizada vía CDP-colina es utilizada para la síntesis de este esfingofosfolípido. De manera similar, un 2% de la fosfatidilcolina producida vía metilación de fosfatidiletanolamina es utilizada para la síntesis de esfingomielina. Estos datos son consistentes con los distintos niveles intracelulares de estos fosfolípidos. Así, la fosfatidilcolina es sintetizada muy activamente y sólo una pequeña proporción de ella se utiliza para la formación de esfingomielina. Por el contrario, los resultados obtenidos a partir de serina o palmitato indican una activa producción de ceramida y, por tanto, de esfingomielina. De hecho, aproximadamente un 40% de la ceramida total sintetizada se transforma en esfingomielina, indicando que la actividad esfingomielina sintasa es relativamente elevada en estas células. Por otra parte, el ácido graso poliinsaturado se incorpora en gran medida, mediante esterificación del esqueleto de esfingosina, para generar ceramida, que a la vez es eficientemente transformada en esfingomielina.

## II. SECRECIÓN LIPÍDICA

Tal y como hemos indicado, la síntesis de lípidos es muy activa en estas células, aunque según demostramos en este estudio la exportación al medio de los lípidos recién sintetizados es comparativamente muy baja. De hecho, sólo un máximo del 10% del triacilglicerol y fosfatidilcolina sintetizados *de novo* son exportados al medio extracelular. En este sentido, Gibbons y colaboradores (1994), analizando la secreción de lipoproteínas en células HepG2, demuestran que esta línea celular presenta muy baja secreción de triacilglicerol, asociado

principalmente con lipoproteínas similares a las LDL del plasma, probablemente como consecuencia de una reducida actividad de lipólisis y reesterificación intracelular del triacilglicerol, lo que conduce a una alteración en el ensamblaje de lipoproteínas para su secreción.

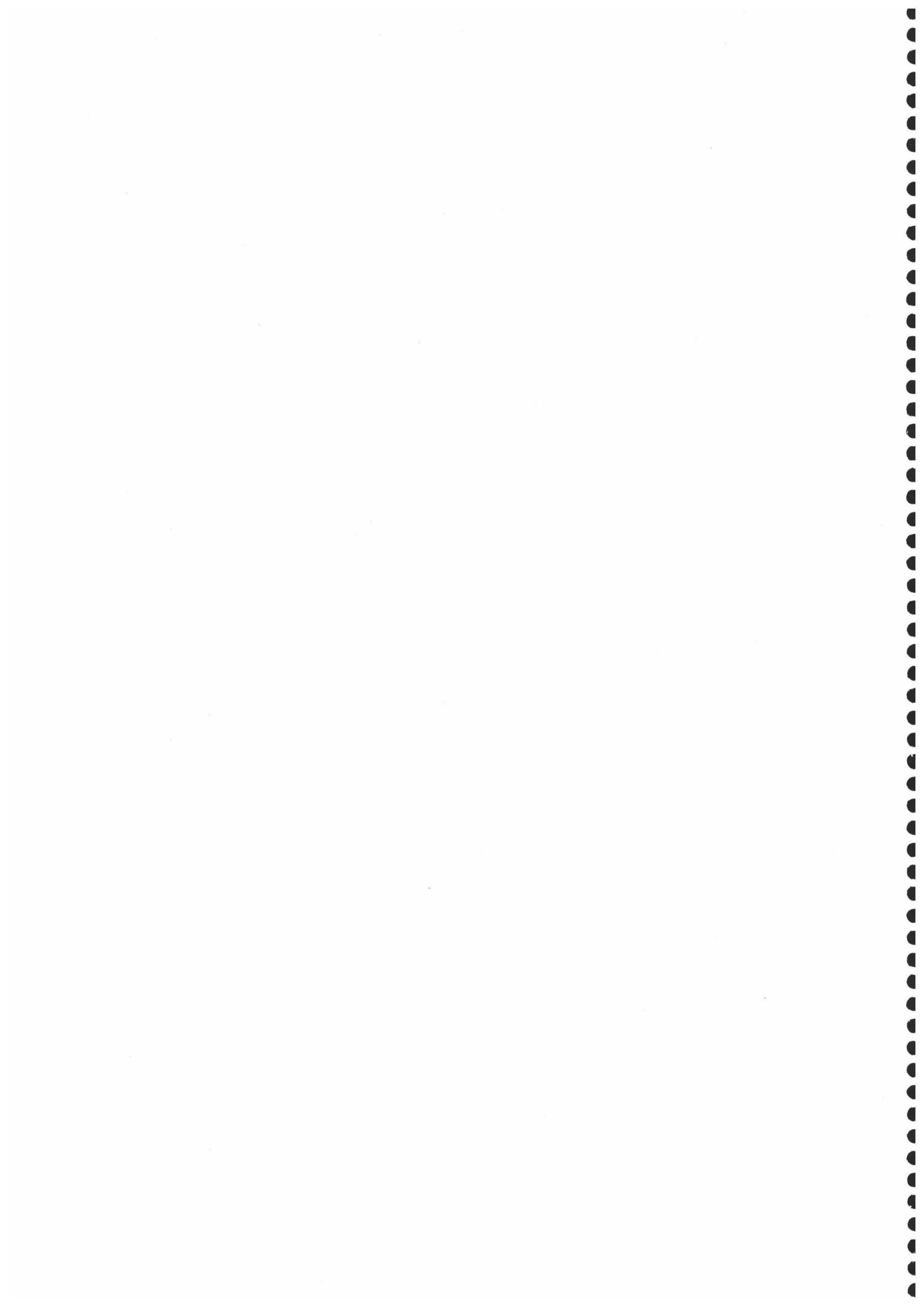
No obstante, y como es de esperar, se observa una correlación entre la producción intracelular lipídica y su liberación al medio extracelular, aunque los perfiles cinéticos para los procesos de síntesis y secreción difieren de modo notable. Así, las cinéticas de incorporación del glicerol a los correspondientes lípidos celulares se estabilizan tras alcanzar 8 h de incubación en presencia del sustrato marcado, mientras que la secreción de triacilglicerol y fosfatidilcolina al medio continúa incrementando de forma gradual durante 24 h.

Por último, es interesante mencionar que la exportación al medio de los lípidos endógenos, previamente marcados mediante incubación con glicerol radiactivo, muestra una cinética bastante similar a la correspondiente a la secreción de los lípidos sintetizados *de novo* a partir de glicerol. Así, se puede apreciar que la liberación de triacilglicerol y fosfatidilcolina aumenta de manera gradual durante el periodo de 24 h examinado. Nuevamente, las células presentan una baja tasa de secreción de los lípidos endógenos celulares aunque, si comparamos los resultados obtenidos, se observa cómo las células exportan de un modo más eficiente los lípidos sintetizados *de novo*, sugiriendo que éstos son los utilizados principalmente para la síntesis de las lipoproteínas secretadas por las células.



**CAPÍTULO 2**

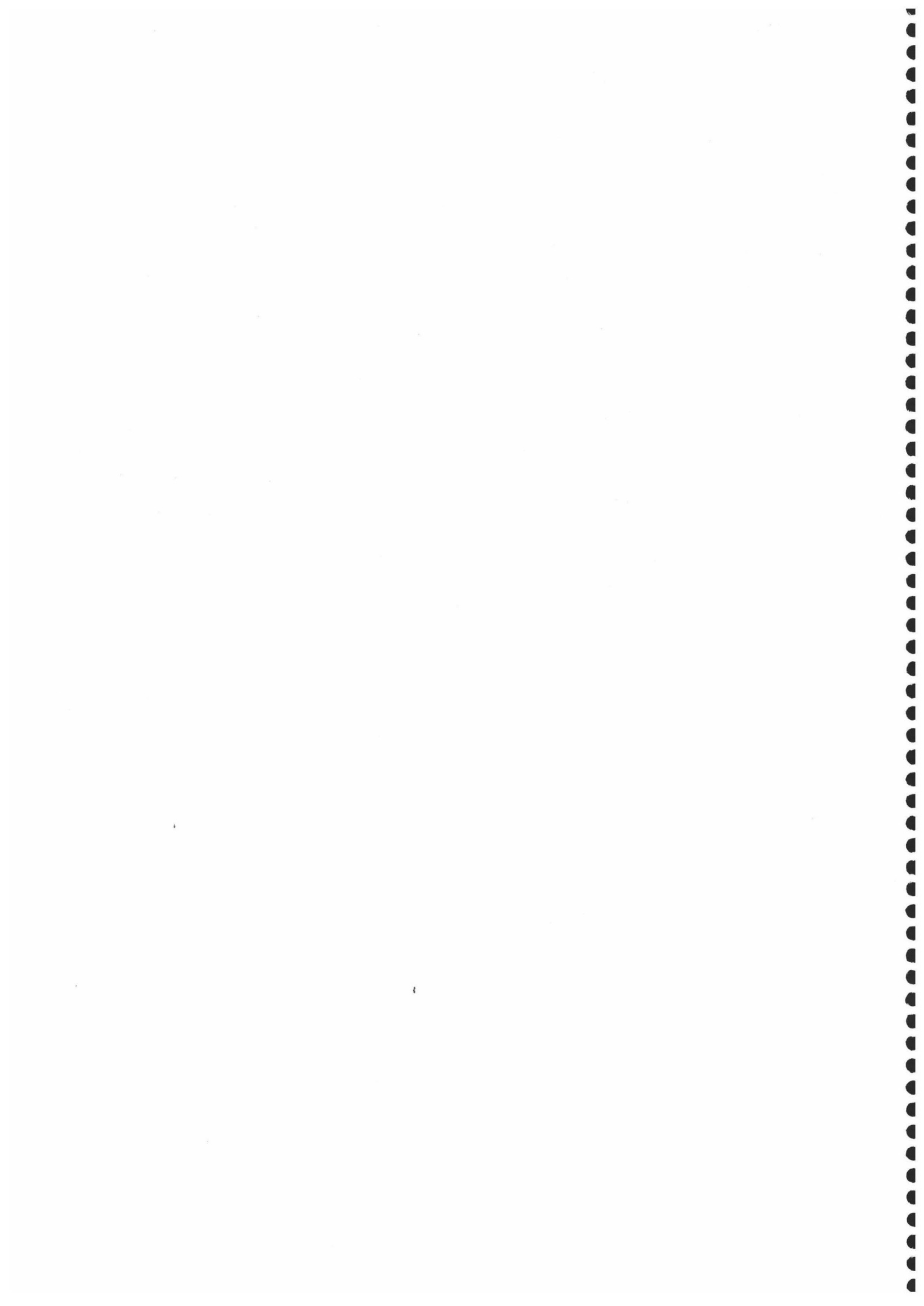
**ALTERACIONES INDUCIDAS POR ETANOL  
EN CÉLULAS DE HEPATOMA HUMANO HepG2**







## **Introducción**



## I. ETANOL

### I.1. CONSUMO DE ETANOL Y ALCOHOLISMO

El alcoholismo constituye un problema social y de salud pública, y está considerado como una de las más graves enfermedades adictivas que prevalecen en nuestra sociedad. El etanol es la segunda sustancia psicoactiva mundialmente más consumida, después de la cafeína (Samson y Harris, 1992), y es claramente tóxico cuando se ingiere en exceso.

Las alteraciones bioquímicas, físicas y psicológicas observadas en los individuos tras una ingesta aguda o crónica de alcohol son complejas, y pueden verse influidas por factores biológicos y sociales. El impacto fisiopatológico del etanol incluye tanto los efectos producidos por una intoxicación aguda como los cambios funcionales y de composición originados en el organismo tras su consumo crónico (Lieber, 1997a; Lieber, 1994a).

El consumo prolongado de etanol afecta desfavorablemente a diversos tejidos, hepáticos y extrahepáticos, llevando al desarrollo de hígado graso así como a otras alteraciones lipídicas en diversos órganos del cuerpo (Baraona y Lieber, 1998; Pessayre *et al.*, 1999). La ingesta continuada de alcohol está asociada con numerosos procesos degenerativos e inflamatorios en distintos órganos, siendo especialmente el sistema nervioso central y el hígado los más afectados. Los efectos del consumo crónico de etanol sobre diversos órganos pueden estar en parte relacionados con su metabolismo. La mayor parte del alcohol ingerido es metabolizado en el hígado (80-95%). No obstante, otros tejidos (riñón, músculo, pulmón, intestino, cerebro) pueden también metabolizarlo, aunque en menor extensión (von Wartburg y Buhler, 1984). El alcohol se elimina también directamente en orina, sin transformar.

Para tratar de prevenir los problemas relacionados con el alcohol, es esencial la investigación básica acerca de los mecanismos por los cuales éste ejerce su actividad. La

búsqueda de acciones moleculares del etanol se ha basado principalmente en analizar los mecanismos de intoxicación y desarrollo de tolerancia y dependencia.

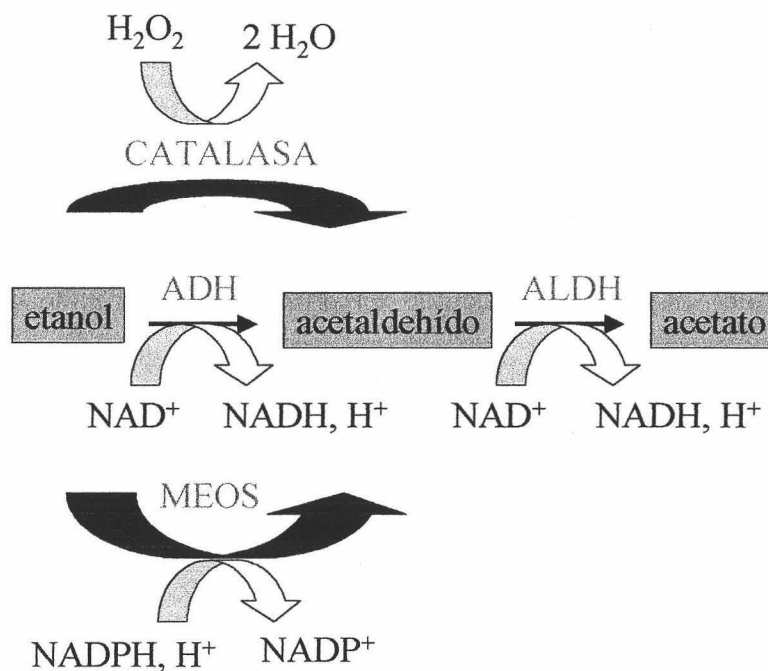
Surge, sin embargo, una considerable controversia cuando se analizan e intentan explicar los distintos mecanismos bioquímicos implicados en los múltiples desórdenes asociados con las acciones del etanol sobre diferentes tejidos. Estos mecanismos, posiblemente relacionados entre sí, reflejan las múltiples respuestas del organismo a las diversas acciones directas e indirectas del alcohol. Algunos de los efectos del etanol son debidos a las consecuencias metabólicas de su oxidación, no obstante se ha observado que el alcohol interacciona también de un modo directo con diferentes componentes lipídicos o proteicos de las membranas biológicas, alterando su organización estructural y funcional, siendo éstas probablemente el centro principal de su acción toxicológica (Segovia *et al.*, 1998). Así, los mecanismos moleculares de la interacción del etanol con las membranas y los consecuentes cambios bioquímicos por los cuales altera la estructura y función celular no están aún completamente esclarecidos.

El efecto del alcohol sobre las membranas se asocia con cambios en diferentes actividades enzimáticas ligadas a ella y con alteraciones en el funcionamiento de receptores, flujo de iones, liberación de neurotransmisores y generación de segundos mensajeros. Estos cambios pueden ser explicados como consecuencia de los efectos del etanol sobre la organización estructural y funcional de lípidos y proteínas de membrana, alterando las interacciones lípido-proteína y la fluidez de la bicapa lipídica.

Está descrito que la exposición a etanol ocasiona alteraciones ultraestructurales en los hepatocitos, apreciables mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), principalmente la acumulación de gránulos citoplasmáticos densos a los electrones, presencia de vacuolas, gotas lipídicas, abundantes haces de microfilamentos, aspecto relajado de la cromatina, alteraciones mitocondriales (aumenta su tamaño longitudinal, la matriz muestra vacuolización, se producen daños estructurales) y proliferación del RE (Neuman *et al.*, 1993).

## I.2. METABOLISMO HEPÁTICO DEL ETANOL

El etanol es metabolizado casi exclusivamente por el hígado, mediante tres rutas metabólicas localizadas en diferentes compartimentos subcelulares de las células hepáticas (Esquema 1): la alcohol deshidrogenasa (ADH), en citosol; el sistema microsomal de oxidación del etanol (MEOS), en RE, con actuación del sistema citocromo P<sub>450</sub>; y la catalasa, en peroxisomas. Por cualquiera de estas tres vías el etanol se transforma en acetaldehído, el cual se oxida rápidamente a acetato por acción de la actividad aldehído deshidrogenasa (ALDH), en citosol y mitocondrias.



**ESQUEMA 1. METABOLISMO HEPÁTICO DEL ALCOHOL.**

### I.2.1. ALCOHOL DESHIDROGENASA

La principal ruta de oxidación hepática del etanol implica la enzima citosólica ADH (EC 1.1.1.1), la cual cataliza la reacción de transformación de etanol en acetaldehído, que es a su vez convertido en acetato a través de la actividad ALDH. Ambas reacciones enzimáticas generan un

exceso de poder reductor en el hígado, principalmente en forma de NADH (French, 2000). De esta manera, el cambio en el estado redox intracelular después del consumo prolongado de etanol estimula la síntesis de ácidos grasos e incrementa la concentración de  $\alpha$ -glicerofosfato (Castro *et al.*, 1987), el cual favorece la acumulación de lípidos hepáticos mediante la captura de ácidos grasos. El aumento de la relación NADH/NAD<sup>+</sup> en citoplasma y el acúmulo lipídico originan, pues, numerosas alteraciones a nivel del metabolismo lipídico y glucídico en el hígado.

Cuando el etanol se administra en bajas concentraciones la ADH supone la vía más importante implicada en su catabolismo, contribuyendo en un 90% o más a su oxidación a acetaldehído. Las distintas isoenzimas de ADH, en humanos, se han agrupado en cinco clases (I-V) de acuerdo con sus propiedades funcionales y fisicoquímicas (Lieber, 2001).

### **I.2.2. CATALASA**

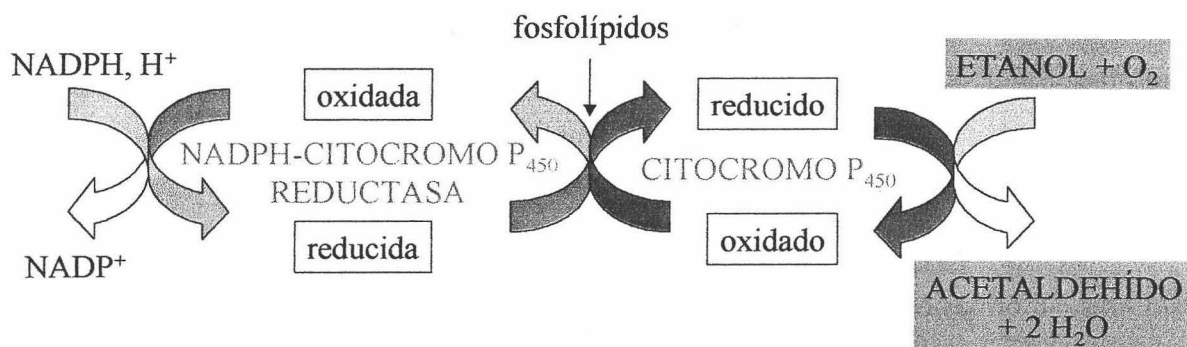
El etanol puede también ser metabolizado mediante la enzima peroxisomal catalasa, que cataliza la oxidación del etanol a acetaldehído en presencia de peróxido de hidrógeno. Se considera que este sistema de oxidación del etanol ejerce en el hígado una acción minoritaria *in vivo* (Kato *et al.*, 1987; Lieber, 1994b), debido principalmente a que la concentración y generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in vivo* es insignificante y, de hecho, el tratamiento con aminotriazol, un inhibidor de catalasa, no afecta a la retirada *in vivo* del etanol (Takagi *et al.*, 1986). La catalasa, pues, parece desempeñar sólo un papel minoritario en las rutas no-ADH de oxidación del etanol bajo condiciones fisiológicas, contribuyendo el MEOS de manera más importante.

### **I.2.3. SISTEMA MICROSOMAL DE OXIDACIÓN DEL ETANOL**

En la década de los 70 se describió que el consumo prolongado de etanol estaba asociado con una proliferación de las membranas del RE en hígado (Lane y Lieber, 1966). Esto sugirió que los microsomas hepáticos podrían contribuir a la oxidación del etanol mediante un sistema distinto y de carácter adaptativo, inducible por el alcohol, el cual se identificó *in vitro* y se

denominó sistema microsomal de oxidación del etanol, MEOS (Lieber y DeCarli, 1970), siendo además observado *in vivo* en mamíferos.

En el MEOS está implicado el sistema monooxigenasa asociado al citocromo P<sub>450</sub>. La reacción química básica catalizada por este sistema es una oxigenación de función mixta, con gasto de NADPH y O<sub>2</sub>, y producción de NADP<sup>+</sup> y H<sub>2</sub>O. El sistema microsomal que lleva a cabo tal reacción contiene los siguientes componentes genéricos: NADPH-citocromo P<sub>450</sub> reductasa, citocromo P<sub>450</sub> y lípidos activadores. Este sistema oxida el etanol utilizando NADPH como cofactor y en presencia de oxígeno, generando acetaldehído (Esquema 2).



**ESQUEMA 2. COMPONENTES DEL MEOS.**

La superfamilia citocromo P<sub>450</sub> comprende diversas monooxigenasas que contienen un grupo hemo y que, debido a sus diferentes especificidades de sustrato, catalizan el metabolismo oxidativo de una amplia variedad de compuestos lipofílicos (Venkatakrisnan *et al.*, 2001). Constituyen, pues, un sistema de defensa biológico para la detoxificación de compuestos xenobióticos no proteicos de pequeño tamaño molecular, entre ellos el alcohol.

El consumo crónico de etanol está asociado con la inducción (hasta 4-10 veces) de una isoforma del citocromo P<sub>450</sub>, denominada P<sub>450</sub>2E1, de mayor afinidad por el alcohol (Lieber, 1997b; Lieber, 1988; Wu y Cederbaum, 1996). El citocromo P<sub>450</sub>2E1 no sólo está asociado con un incremento en la generación de acetaldehído por oxidación del etanol, sino que además activa

otros muchos xenobióticos en forma de metabolitos reactivos que a menudo son hepatotóxicos, incluyendo drogas, fármacos, carcinógenos, toxinas y solventes industriales (Lieber, 2001). Además, esta isoforma P<sub>450</sub>2E1 muestra una alta actividad NADPH oxidasa, siendo muy activa en la producción de especies reactivas del oxígeno (anión superóxido, radical hidroxilo, peróxido de hidrógeno), radicales lipídicos y el radical 1-hidroxietilo, metabolito del etanol (Stoyanovsky *et al.*, 1998), que promueven la peroxidación de lípidos, proteínas y DNA (Brooks, 1997; Cederbaum, 2001; Lieber, 1997a).

La capacidad del etanol para promover estrés oxidativo y el papel de los radicales libres en el daño tisular producido por el alcohol es un área de investigación principal en el campo del alcohol. Así, el citocromo P<sub>450</sub>2E1 puede constituir una fuente importante del estrés oxidativo generado por este agente (Cederbaum, 2001). Por otra parte, el consumo de oxígeno producido en su destoxicación hepática vía MEOS induce hipoxia y, consecuentemente, una disminución de los niveles intracelulares de ATP.

Otras isoformas del citocromo P<sub>450</sub>, además de P<sub>450</sub>2E1, son capaces de oxidar el alcohol *in vitro* y pueden contribuir a su oxidación *in vivo*. Así, el término MEOS debe referirse a la capacidad global de los microsomas para oxidar el etanol.

El MEOS presenta una constante de Michaelis (Km) aparente relativamente alta para el etanol (8-10 mM), comparado con la ADH (0,2-2 mM), la cual exhibe por tanto más afinidad por el alcohol (Lieber, 1997a). Aunque la ADH es la vía principal de oxidación del etanol, se sugiere que el MEOS es activo *in vivo* a altas concentraciones de alcohol, cuando sus niveles en sangre son elevados. Por otra parte, la contribución del MEOS a la oxidación del etanol puede ser claramente superior tras un consumo prolongado de alcohol, fundamentalmente debido a su inducibilidad (Lieber, 1988).

La oxidación del etanol a través del MEOS, a diferencia de la ADH, no ocasiona una producción neta de poder reductor intracelular. Por tanto, el incremento de actividad del MEOS



tras el consumo crónico de etanol supone un mecanismo adaptativo que contribuye a la tolerancia metabólica al alcohol en presencia de ADH. La administración crónica de alcohol causa una marcada inducción de la actividad monooxigenasa global en microsomas, con un incremento en la cantidad de proteínas enzimáticas activas presentes en estas membranas. En animales, se produce un aumento asociado en los niveles del citocromo P<sub>450</sub>, incluida la isoforma específica P<sub>450</sub>2E1. Un mecanismo principal por el cual el alcohol induce P<sub>450</sub>2E1 es mediante su estabilización frente a la degradación por la vía proteolítica que implica la actuación del sistema proteosoma (Yang y Cederbaum, 1997).

La inducción del MEOS por acción del etanol, y como consecuencia la inducción cruzada de otras enzimas microsomales, incrementa el potencial para el daño hepático por aceleración del metabolismo de xenobióticos, generándose hepatotoxinas y diversos radicales libres. Por tanto, el tratamiento crónico de alcohol aumenta la susceptibilidad a diversos agentes hepatotóxicos (Lieber, 1988).

#### **1.2.4. ALDEHÍDO DESHIDROGENASA**

La conversión de acetaldehído a acetato en el hígado, en presencia de NAD<sup>+</sup>, es catalizada principalmente por una ALDH (EC 1.2.1.3) mitocondrial de baja Km siendo ésta la ruta principal de retirada del acetaldehído. Esta actividad es reducida significativamente por el consumo crónico de alcohol (Lieber, 1997a). La magnitud del proceso de oxidación del acetaldehído es importante desde un punto de vista fisiológico, debido a que el acetaldehído es un producto reactivo muy tóxico capaz de alterar las funciones hepáticas. Así, muchos de los efectos tóxicos del etanol y algunas de las alteraciones fisiológicas relacionadas con éste han sido atribuidas al acetaldehído más que al propio alcohol.

Las acciones del acetaldehído son muy diversas (Lieber, 1997a). Presenta capacidad para unirse covalentemente a una gran variedad de proteínas, formando aductos acetaldehído-proteína. Impide la acción antioxidante del glutatión, directamente o por unión covalente con el

grupo sulfhidrilo del glutation, favoreciendo por tanto la peroxidación lipídica. Altera las funciones mitocondriales, particularmente después del consumo crónico de alcohol, el cual sensibiliza a la mitocondria a los efectos adversos del acetaldehído. Los daños mitocondriales contribuyen a alterar el potencial redox intracelular, lo que tiene profundas consecuencias metabólicas, como una capacidad disminuida para oxidar ácidos grasos, ocasionando deposición grasa en el hígado, y una reducción en los niveles intracelulares de ATP. Otra consecuencia adversa debida al acetaldehído se produce cuando los aductos acetaldehído-proteína estimulan la producción de anticuerpos, una respuesta autoinmune que puede contribuir a agravar o perpetuar el daño hepático inducido por el alcohol.

#### **I.2.5. METABOLISMO NO OXIDATIVO DEL ETANOL**

El etanol puede también ser metabolizado mediante una ruta no oxidativa que implica su esterificación con un ácido graso para formar el éster etílico correspondiente (FAEE), en una reacción catalizada por la éster etílico sintasa. Esta ruta de metabolización del alcohol puede ser especialmente importante en aquellos tejidos que tienen capacidad limitada para oxidar el etanol vía ADH. Además, se observa que los órganos más comúnmente dañados por el alcohol, principalmente el hígado y el páncreas, presentan los niveles más elevados de FAEE y su sintasa (Dan y Laposata, 1997).

Así, los ésteres etílicos de ácidos grasos, metabolitos no oxidativos del etanol, pueden estar implicados como mediadores del daño tisular inducido por el alcohol (Laposata *et al.*, 1995). No obstante, la síntesis de FAEE *in vivo* puede tener además una importancia fisiológica en ausencia de ingestión de alcohol, evitando en parte la acumulación de metabolitos resultantes de la oxidación de las pequeñas cantidades de etanol generado en procesos fisiológicos. Estos metabolitos oxidativos, en bajas concentraciones, resultan más tóxicos para la célula que los propios FAEE (Szczepiorkowski *et al.*, 1995).

Otra ruta de retirada no oxidativa del etanol implica la reacción de transfosfatidilación catalizada por la fosfolipasa D, sintetizándose fosfatidiletanol (Liscovitch *et al.*, 2000). En condiciones normales los niveles basales de fosfatidilalcohol encontrados en las membranas biológicas son muy bajos. No obstante, su producción puede incrementar notablemente cuando se ingieren cantidades excesivas de alcohol, debido además a la estimulación ejercida por el etanol sobre la actividad fosfolipasa D.

### **I.3. ALTERACIONES DEL METABOLISMO LIPÍDICO CAUSADAS POR UNA INGESTA EXCESIVA DE ETANOL**

Los efectos tóxicos del alcohol están bien documentados, sin embargo aún no han sido confirmados de manera inequívoca los mecanismos por los cuales el alcohol los provoca, ocasionando daño tisular. Las acciones del etanol sobre el metabolismo lipídico son múltiples, dependiendo además del tipo de sistema analizado (órgano, célula o membrana), así como del modo de exposición al alcohol (dosis, duración, ruta de administración) y de los métodos empleados para analizar sus efectos. El hígado ha sido el órgano más extensamente estudiado para evaluar las alteraciones ocasionadas por el etanol sobre el metabolismo lipídico (Forman, 1988; French, 1989), debido a que desempeña un papel central en la síntesis y secreción de lípidos en el organismo.

El alcohol afecta también a los tejidos no hepáticos, desencadenando miopatía alcohólica (Preedy *et al.*, 2002), daños en el sistema nervioso (Goodlett y Horn, 2001; Sun y Sun, 2001), etcétera. Los tejidos extrahepáticos, como el tejido adiposo, han sido además estudiados por el papel complementario que desempeñan en el desarrollo de las alteraciones producidas por el etanol.

Los principales efectos del alcohol sobre el metabolismo lipídico son muy diversos. El incremento en los niveles intracelulares de poder reductor y las alteraciones mitocondriales producidas inhiben la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos y el ciclo del ácido cítrico, y este aumento de

poder reductor estimula además la lipogénesis (French, 1989). Se produce, por tanto, una acumulación de triacilglicerol, favoreciendo la formación de hígado graso (esteatosis), y disminuye la síntesis de lipoproteínas y ácidos biliares (Forman, 1988). La proliferación de las membranas del RE y la inducción de enzimas microsomales implicadas en la síntesis de lípidos y lipoproteínas, como consecuencia de la administración crónica de alcohol, pueden también contribuir a la mayor capacidad del hígado para sintetizar lípidos.

Por otra parte, como consecuencia de la ingesta de alcohol incrementan los niveles de triacilglicerol y colesterol circulantes en plasma, principalmente en forma de VLDL, ocasionando un acúmulo de lípidos en diferentes tejidos (hiperlipemia). Se produce una movilización de lípidos del tejido adiposo e incrementa el flujo de sangre hepático, provocando un incremento en la captación de ácidos grasos plasmáticos por el hígado. El aumento en la cantidad de ácidos grasos junto con la mayor disponibilidad de  $\alpha$ -glicerofosfato contribuyen a la acumulación hepática de triacilglicerol.

## II. INFLUENCIA DEL ETANOL EN CÉLULAS HepG2

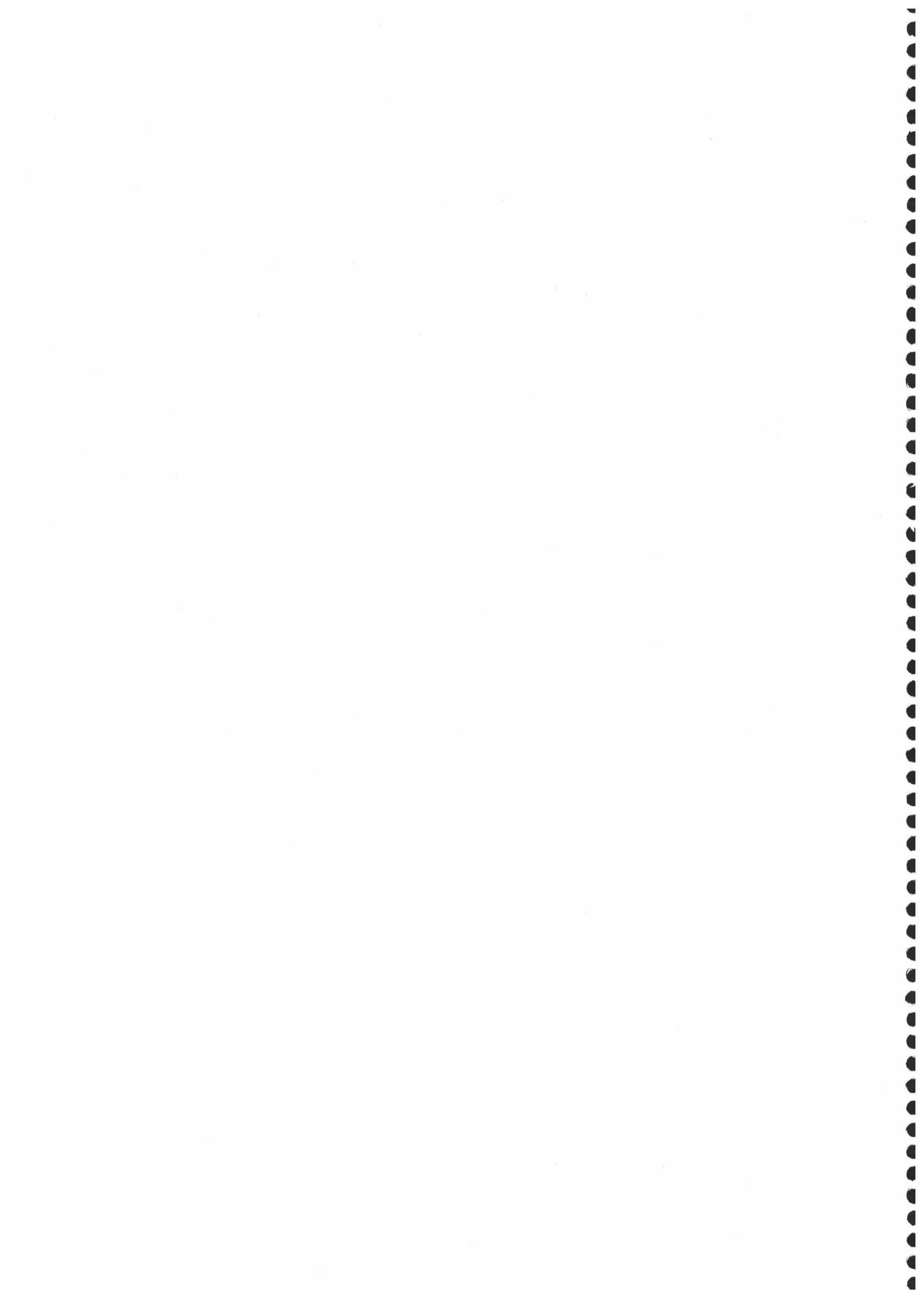
La línea celular de hepatoblastoma humano HepG2 presenta deficiencias en el metabolismo del etanol. Tam (1992) indicó que las células HepG2 no expresan prácticamente ADH, determinada mediante la utilización de sondas humanas de cDNA de  $\beta$ - y  $\gamma$ -ADH. En este sentido, Wolfla y colaboradores (1988) describieron que la actividad ADH en las células HepG2 es prácticamente indetectable en comparación con la actividad en hígado normal de rata, de manera que estas células se consideran ADH-negativas. Otros autores han confirmado también que las células HepG2 exhiben aproximadamente un 0,5% de la actividad ADH contenida en los hepatocitos recién aislados de rata (Clemens *et al.*, 1995).

La relevancia del modelo celular HepG2 para analizar *in vitro* los efectos que ocasiona el etanol *in vivo* se debe, particularmente, a la importante proporción del metabolismo del etanol

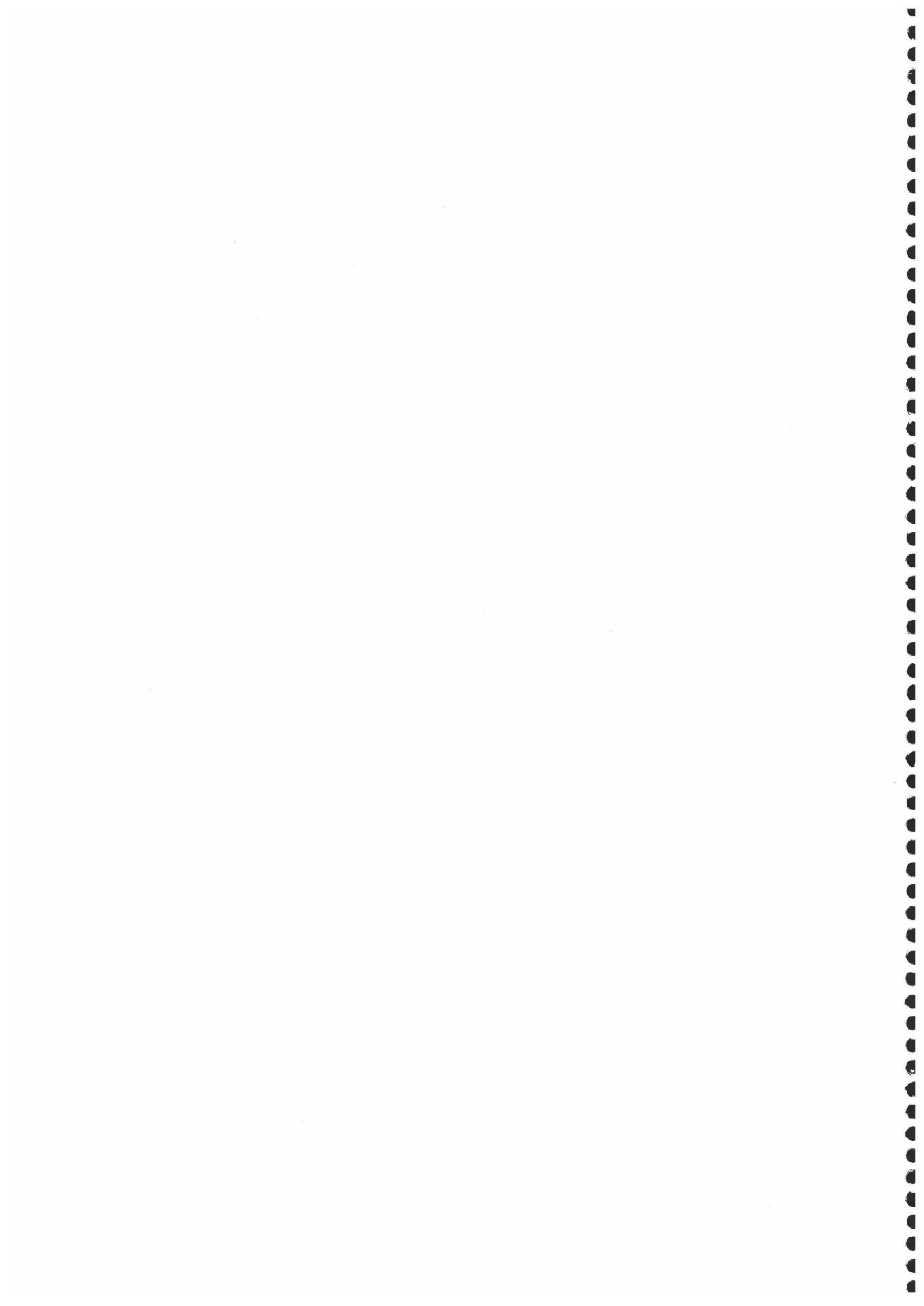
que sucede en el hígado normal a través del sistema MEOS cuando las concentraciones de alcohol son elevadas (dosis agudas) o tras un tratamiento crónico. Como ya indicamos, el MEOS puede desempeñar un papel altamente significativo en la oxidación del etanol bajo estas circunstancias, en parte debido a su inducibilidad, de manera que las rutas no-ADH pueden ser de gran importancia *in vivo*. Por tanto, las células de hepatoma humano HepG2 suministran un excelente sistema experimental para estudiar el papel del MEOS en el metabolismo no-ADH del etanol y examinar los mecanismos moleculares por los cuales el etanol afecta a la síntesis y secreción de lípidos y lipoproteínas hepáticas.

Existen algunos datos bibliográficos que sugieren que el etanol puede alterar las rutas del metabolismo lipídico en estas células. Así, está descrito que la incubación de las células con etanol provoca un aumento en el contenido celular, y una acumulación en el medio extracelular, de triacilglicerol, colesterol, ésteres de colesterol y apolipoproteínas (apoB<sub>100</sub>, apoA-I), y reduce la formación global de fosfolípidos (Dashti *et al.*, 1996; Tam, 1992; Visioli *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1994).

El tratamiento a corto plazo con bajas concentraciones de etanol incrementa la concentración intracelular y secreción de apoB<sub>100</sub> (Dashti *et al.*, 1996; Tam, 1992; Wang *et al.*, 1994). Sin embargo, la exposición prolongada con bajas concentraciones de alcohol ocasiona un aumento en la concentración intracelular y secreción de apoA-I y una capacidad incrementada para unir HDL, sin afectar significativamente a la secreción de apoB<sub>100</sub> (Dashti *et al.*, 1996; Goldberg *et al.*, 1989). Así, los resultados obtenidos por distintos autores indican que el efecto del etanol sobre la producción de lipoproteínas que contengan apoA-I o apoB<sub>100</sub> es dependiente de la dosis y de la duración del tratamiento de alcohol, y es diferente para estas dos apolipoproteínas. Además, los datos obtenidos son consistentes con el incremento observado *in vivo* de la concentración plasmática de lipoproteínas antiaterogénicas (HDL) tras el consumo continuado y moderado de alcohol. Por el contrario, los cambios metabólicos producidos tras la ingesta en exceso de etanol pueden explicar, al menos parcialmente, los incrementados niveles de lipoproteínas aterogénicas (LDL) y triacilglicerol observados en individuos alcohólicos.



## **Resultados**





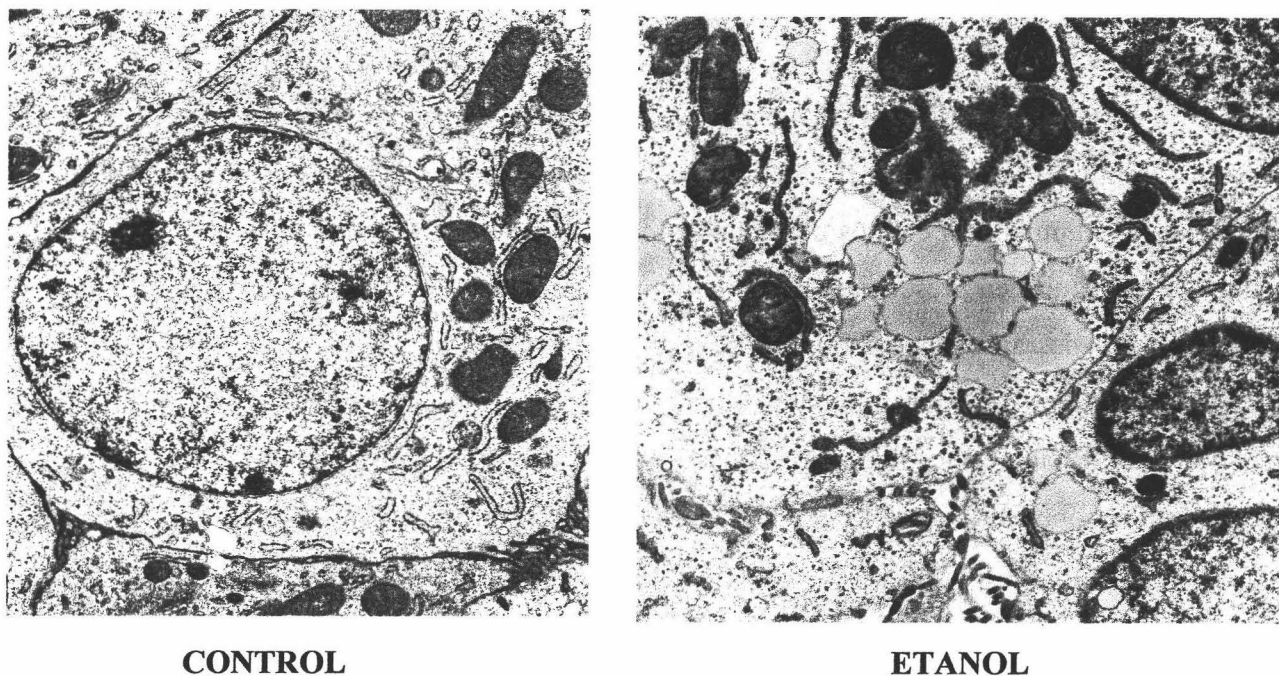
## I. EFECTOS TÓXICOS DEL ETANOL EN LAS CÉLULAS HepG2

El estudio bioquímico sobre la influencia del etanol en las células HepG2 se ha realizado en unas condiciones extrapolables a las fisiológicas tras el consumo moderado de alcohol. En primer lugar, hemos determinado unas condiciones de tratamiento con etanol que no ocasionen pérdida de viabilidad celular ni alteraciones morfológicas evidentes al microscopio óptico, tales como la pérdida de adhesión celular, la inhibición de la capacidad proliferativa, etcétera. Por tanto, los experimentos iniciales evaluaron los posibles efectos citotóxicos del etanol en las células HepG2. Empleamos para ello diversas técnicas: liberación de LDH desde el citosol de las células dañadas al medio extracelular, tinción con el colorante vital azul de tripán o la determinación de la producción de formazán a partir del MTT.

Teniendo en cuenta los estudios previos realizados en nuestro laboratorio en hepatocitos aislados de hígado de rata, se seleccionó una concentración 100 mM de etanol en el medio de cultivo para examinar los efectos ocasionados por el alcohol en las células HepG2. Así, hemos incubado las células en presencia de etanol 100 mM durante 24 h ó 7 días, con objeto de estudiar la influencia de ambos periodos de exposición al alcohol, a corto y a largo plazo, respectivamente. Esta concentración de alcohol es ligeramente superior a la existente en sangre tras una intoxicación etílica aguda, y equivale a 4,6 g de etanol por litro de plasma. No obstante, puesto que la concentración de etanol en la circulación portal, tras la ingestión de alcohol, puede ser muy superior a la encontrada en la circulación periférica, es posible que los hepatocitos estén expuestos a concentraciones de etanol similares a la que hemos usado en nuestros experimentos, tras la ingestión de cantidades menos tóxicas de alcohol (Wang *et al.*, 1994).

Nuestros resultados demuestran que los tratamientos de etanol 100 mM, a largo plazo (7 días) o a corto plazo (24 h), no producen efectos aparentes de toxicidad, como fue determinado por distintos métodos de valoración de citotoxicidad. Decidimos también prolongar el tratamiento hasta un total de 30 días en presencia de una concentración de alcohol 50 mM. Como

controles hemos utilizado las células incubadas en las mismas condiciones pero sin añadir etanol al medio de cultivo. En todos los casos, el recuento de las células HepG2 expuestas al etanol indica que éste, además de no ocasionar pérdida de viabilidad, tampoco afecta a la adhesión o proliferación celular bajo nuestras condiciones experimentales. Por otra parte, no se detecta actividad LDH liberada al medio extracelular durante los distintos tratamientos de etanol, ni el ensayo del MTT indica una pérdida de funcionalidad celular. La exposición de las células al etanol no produce además peroxidación lipídica, determinada como el contenido de sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico, TBARS, después de la incubación a corto o largo plazo de las células HepG2 con etanol. Todos estos resultados indican, por tanto, que las células HepG2 mantienen una alta viabilidad tras ser sometidas a la exposición al alcohol durante distintos periodos de tiempo.



**Figura 10. Micrografías electrónicas de transmisión de células HepG2 expuestas crónicamente al etanol.** Las células fueron tratadas con etanol 50 mM durante 30 días, mientras que las controles se incubaron en ausencia de alcohol en el medio.

En otra serie de estudios, las células HepG2 fueron observadas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) después de ser incubadas crónicamente en presencia de etanol. El análisis de las micrografías electrónicas no detectó diferencias apreciables a nivel ultraestructural entre las células tratadas y las controles, con la excepción de un ligero acúmulo lipídico en las células expuestas crónicamente al alcohol (Figura 10).

## II. METABOLISMO DEL ETANOL EN CÉLULAS HepG2

Existe cierta conflictividad en cuanto a la capacidad de las células HepG2 para metabolizar el etanol por las diferentes vías metabólicas anteriormente descritas. Con objeto de aportar datos que clarificasen este aspecto, utilizamos etanol marcado isotópicamente y se analizó el destino metabólico del mismo determinando su incorporación vía acetyl-CoA a las distintas fracciones lipídicas. Las células oxidan el etanol a acetaldehído, el cual se oxida a acetato, y éste se esterifica con coenzima A produciendo acetyl-CoA, que se incorpora a lípidos celulares o se oxida completamente a CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O tras su entrada en el ciclo del ácido cítrico.

### II.1. INCORPORACIÓN DE [1-<sup>14</sup>C]ETANOL A LÍPIDOS EN CÉLULAS HepG2

Las células HepG2 fueron incubadas durante 2,5 h en medio EMEM carente de suero suplementado con etanol marcado isotópicamente. Tras recoger las células, los lípidos fueron separados cromatográficamente y determinamos la radiactividad incorporada a los diferentes fosfolípidos y lípidos neutros celulares.

Como se indica en la Tabla XI, la fracción de fosfolípidos incorpora radiactividad procedente del etanol marcado mayoritariamente a fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, mientras los otros fosfolípidos presentan niveles de incorporación de radiactividad sensiblemente inferiores. En estas condiciones experimentales encontramos, además, una

mínima radiactividad asociada a fosfatidiletanol (PEt), indicativa de una baja actividad de transfosfatidilación en estas células catalizada por la fosfolipasa D.

**TABLA XI. Incorporación de [1-<sup>14</sup>C]etanol a fosfolípidos en células HepG2.** Las células fueron sembradas en placas petri de 60 mm de diámetro. Cuando alcanzaron la fase logarítmica de crecimiento fueron incubadas durante 2,5 h en EMEM suplementado con [1-<sup>14</sup>C]etanol (10 mM, 0,5 Ci · mol<sup>-1</sup>). Los lípidos fueron extraídos de las células y separados mediante TLC.

	<i>nmol · mg proteína<sup>-1</sup></i>	<i>Porcentaje (%)</i>
Fosfatidilcolina	125,9 ± 4,5	74,8%
Fosfatidiletanolamina	26,5 ± 0,7	15,7%
Fosfatidilserina	5,5 ± 0,4	3,3%
Fosfatidilinositol	4,5 ± 0,3	2,7%
Esfingomielina	3,8 ± 0,2	2,3%
Fosfatidato	1,3 ± 0,4	0,8%
Fosfatidiletanol	0,7 ± 0,2	0,4%

Los resultados son media de cuatro determinaciones ± SEM, expresados como nmol de etanol incorporados por mg de proteína. Se indica, además, la distribución porcentual respecto al total de fosfolípidos sintetizados *de novo*.

En la Tabla XII se muestran los resultados obtenidos acerca de la incorporación de radiactividad procedente del etanol marcado a los diferentes lípidos neutros en estas células. Se observa una sustancial incorporación de radiactividad a triacilglicerol, consistente con una mayor actividad biosintética de este lípido, mientras el diacilglicerol incorpora etanol en mucho menor grado. Es de destacar la elevada aparición de radiactividad en la fracción de colesterol, lo que indica una importante actividad colesterogénica en estas células, mientras que sólo fue detectado un bajo nivel de incorporación de radiactividad a ésteres etílicos de ácidos grasos.

Resumiendo, estos datos indican que el etanol se incorpora rápida y eficientemente a los grupos acilo de fosfolípidos y lípidos neutros, vía acetil-CoA, demostrando que las células HepG2 metabolizan activamente el alcohol.

**TABLA XII. Incorporación de [1-<sup>14</sup>C]etanol a lípidos neutros en células HepG2.** Las células fueron sembradas en placas petri de 60 mm de diámetro. Cuando alcanzaron la fase logarítmica de crecimiento fueron incubadas durante 2,5 h en EMEM suplementado con [1-<sup>14</sup>C]etanol (10 mM, 0,5 Ci · mol<sup>-1</sup>). Los lípidos fueron extraídos de las células y separados mediante TLC.

	<i>nmol · mg proteína<sup>-1</sup></i>	<i>Porcentaje (%)</i>
Triacilglicerol	160,7 ± 5,0	70,4%
Colesterol	31,2 ± 0,7	13,7%
Diacilglicerol	19,6 ± 0,9	8,6%
Ácidos grasos	10,8 ± 1,1	4,7%
Ésteres de colesterol	4,7 ± 0,1	2,1%
Ésteres etílicos de ácidos grasos	1,1 ± 0,2	0,5%

Los resultados son media de cuatro determinaciones ± SEM, expresados como nmol de etanol incorporados por mg de proteína. Se indica, además, el porcentaje del total de lípidos neutros sintetizados *de novo*.

Con objeto de analizar con mayor profundidad la ruta por la cual las células HepG2 catabolizan el etanol y cuantificar la contribución del MEOS al metabolismo del etanol en estas células, analizamos la incorporación de etanol marcado isotópicamente a lípidos en presencia de metirapona, un potente inhibidor del citocromo P<sub>450</sub> (Gadeholt, 1984). Como se aprecia en la Tabla XIII, la incubación de las células durante 1 h con metirapona 10 mM disminuyó la incorporación de etanol a lípidos en un 95%, con respecto al valor obtenido en las células no tratadas con metirapona.

Este efecto no fue debido a una acción citotóxica de este agente, puesto que la incubación de las células en presencia de metirapona no produjo liberación de LDH al medio extracelular.

**TABLA XIII. Incorporación de [1-<sup>14</sup>C]etanol a lípidos en presencia de metirapona 10 mM.** Las células HepG2 en fase logarítmica de crecimiento fueron incubadas durante 1 h en EMEM suplementado con [1-<sup>14</sup>C]etanol (10 mM, 0,5 Ci · mol<sup>-1</sup>) y conteniendo metirapona 10 mM. Los lípidos fueron extraídos de las células y se determinó la radiactividad total incorporada.

	<i>Sin metirapona</i>	<i>Metirapona 10 mM</i>
Lípidos totales	265,1 ± 10,5	11,2 ± 1,0

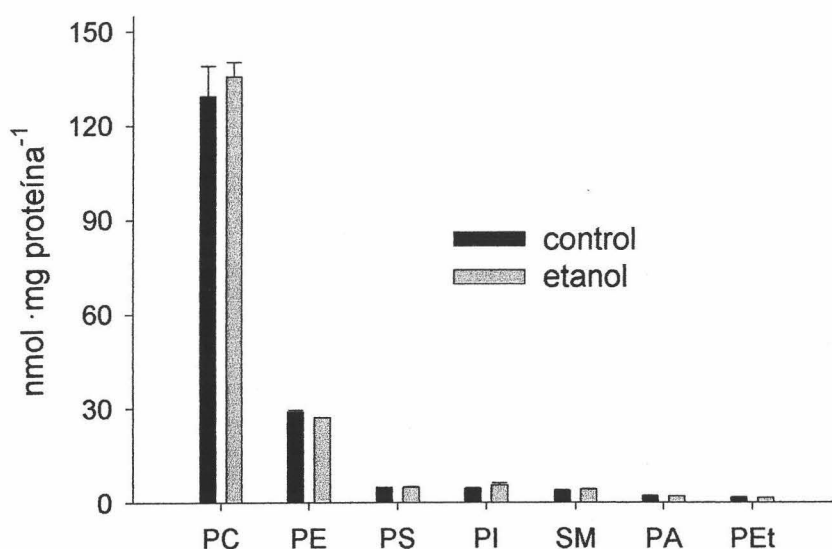
Los resultados son media de tres determinaciones ± SEM, expresados como nmol de etanol incorporados por h y por mg de proteína.

## II.2. EFECTOS DEL TRATAMIENTO PROLONGADO DE ALCOHOL SOBRE LA INCORPORACIÓN DE [1-<sup>14</sup>C]ETANOL

A continuación, con objeto de estudiar una posible inducción del sistema P<sub>450</sub> en estas células por efecto del etanol, decidimos examinar la posible alteración en la capacidad de las células HepG2 para metabolizar el etanol marcado isotópicamente tras exponerlas al tratamiento de etanol 100 mM durante 7 días.

Para llevar a cabo este estudio tras una exposición crónica al etanol, las células en fase logarítmica de crecimiento fueron incubadas durante 2,5 h en EMEM suplementado con etanol marcado isotópicamente, determinándose la incorporación de radiactividad a las diferentes fracciones lipídicas celulares, tanto en células tratadas como en controles.

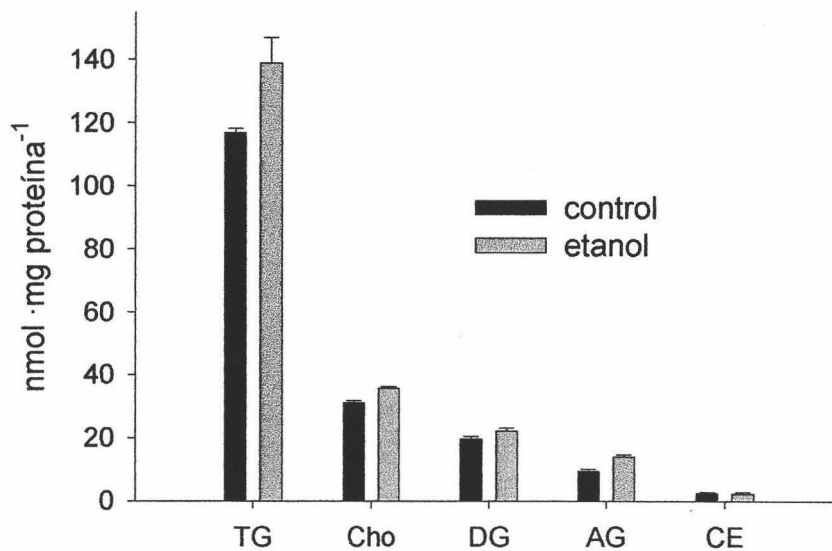
Los resultados obtenidos están mostrados en las Figuras 11 y 12, donde se representan los distintos fosfolípidos y lípidos neutros analizados, respectivamente. Como puede apreciarse, las células expuestas crónicamente al alcohol no incorporan etanol marcado a lípidos de forma significativamente diferente a como lo hacen las células controles, descartándose, por tanto, una inducción del sistema P<sub>450</sub> tras el tratamiento crónico con etanol.



**Figura 11. Incorporación de [1-<sup>14</sup>C]etanol a distintos fosfolípidos en células HepG2 controles y tratadas durante un periodo prolongado con etanol.** Las células fueron expuestas a etanol 100 mM durante 7 días y posteriormente incubadas en EMEM conteniendo [1-<sup>14</sup>C]etanol (10 mM, 0,5 Ci · mol<sup>-1</sup>) durante 2,5 h. Las células controles se mantuvieron sin tratamiento de alcohol. Los datos son media de dos determinaciones ± SEM, expresados como nmol de etanol incorporados por mg de proteína.

Un estudio similar fue realizado tras exposición de las células HepG2 a etanol durante 24 h. Como cabría esperar, tampoco se observaron diferencias en cuanto a los niveles de

incorporación del etanol marcado a los diferentes lípidos en las células tratadas a corto plazo con alcohol o en las controles (resultados no mostrados).



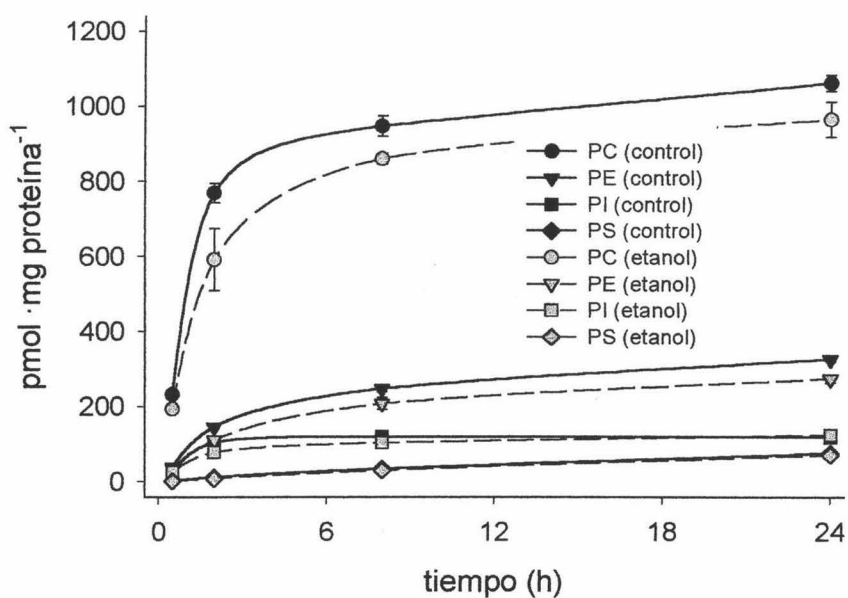
**Figura 12.** Incorporación de  $[1-^{14}\text{C}]$ etanol a distintos lípidos neutros en células HepG2 controles y tratadas durante un periodo prolongado con etanol. Las células fueron expuestas a etanol 100 mM durante 7 días y posteriormente incubadas en EMEM conteniendo  $[1-^{14}\text{C}]$ etanol (10 mM,  $0,5 \text{ Ci} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) durante 2,5 h. Las células controles se mantuvieron en idénticas condiciones pero en ausencia de alcohol. Los datos son media de dos determinaciones  $\pm$  SEM, expresados como nmol de etanol incorporados por mg de proteína.

### III. EFECTO DEL ETANOL SOBRE EL METABOLISMO LIPÍDICO EN CÉLULAS HepG2



### III.1. SÍNTESIS *DE NOVO*

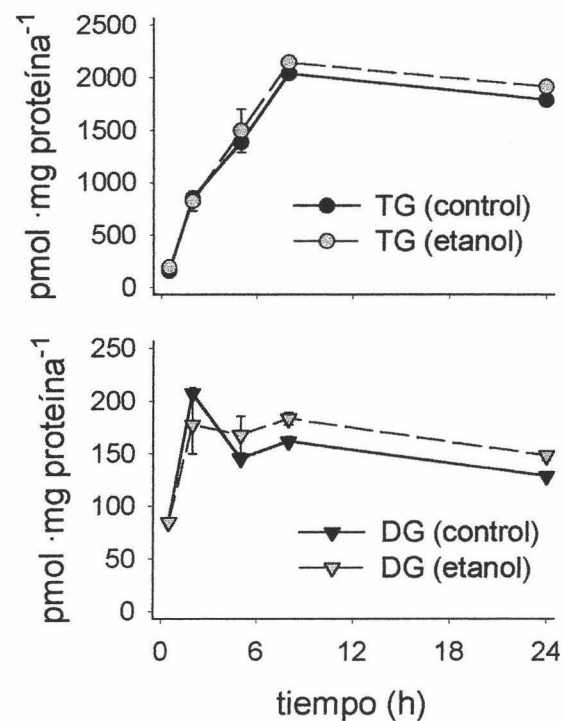
Hemos llevado a cabo el estudio de los efectos de un tratamiento de 24 h con etanol 100 mM (exposición a corto plazo) sobre la incorporación de glicerol marcado isotópicamente a diferentes componentes lipídicos, a lo largo del tiempo, en células HepG2. La incubación con el sustrato marcado se realizó manteniendo el tratamiento de alcohol, mientras las células controles no recibieron tratamiento.



**Figura 13.** Incorporación de [1,2,3-<sup>3</sup>H]glicerol a distintos fosfolípidos celulares en células controles y tratadas durante 24 h con etanol 100 mM. Las células HepG2 fueron incubadas en EMEM conteniendo [1,2,3-<sup>3</sup>H]glicerol (25  $\mu$ M, 200 Ci  $\cdot$  mol<sup>-1</sup>). A los tiempos seleccionados, se determinó la incorporación de glicerol a fosfolípidos individuales sintetizados *de novo* en las células tratadas con etanol (----) y en las controles (—). Los datos son media de cinco determinaciones  $\pm$  SEM, expresados como

pmol de glicerol incorporados por mg de proteína. El experimento fue repetido obteniéndose similares resultados.

En la Figura 13 se puede comprobar cómo el etanol no modifica significativamente la cinética de incorporación del glicerol a los diferentes fosfolípidos. Sin embargo, puede apreciarse una ligera disminución, observable ya a las 2 h de tratamiento, en los niveles de incorporación de radiactividad a las diversas clases de fosfolípidos en las células expuestas al etanol 100 mM, con respecto a las células controles.



**Figura 14.** Incorporación de [1,2,3-<sup>3</sup>H]glicerol a triacilglicerol y diacilglicerol en células controles y tratadas durante 24 h con etanol 100 mM. Las células HepG2 fueron incubadas en EMEM conteniendo [1,2,3-<sup>3</sup>H]glicerol (25  $\mu$ M, 200 Ci  $\cdot$  mol<sup>-1</sup>). A los tiempos seleccionados, se determinó la incorporación de glicerol a triacilglicerol y

diacilglicerol sintetizados *de novo* en las células tratadas con etanol (----) y en las controles (—). Los datos son media de cinco determinaciones  $\pm$  SEM, expresados como pmol de glicerol incorporados por mg de proteína. El experimento fue repetido obteniéndose similares resultados.

En la Figura 14 se muestran las cinéticas de incorporación del glicerol a triacilglicerol y diacilglicerol, las únicas fracciones de lípidos neutros que exhibieron sustanciales niveles de radiactividad al incubar con glicerol marcado. Como se observa, la presencia de etanol no altera significativamente los perfiles de incorporación, aunque se aprecia un ligero aumento de incorporación de radiactividad a ambos lípidos neutros tras exposición al alcohol.

### III.2. SECRECIÓN DE LÍPIDOS RECIÉN SINTETIZADOS

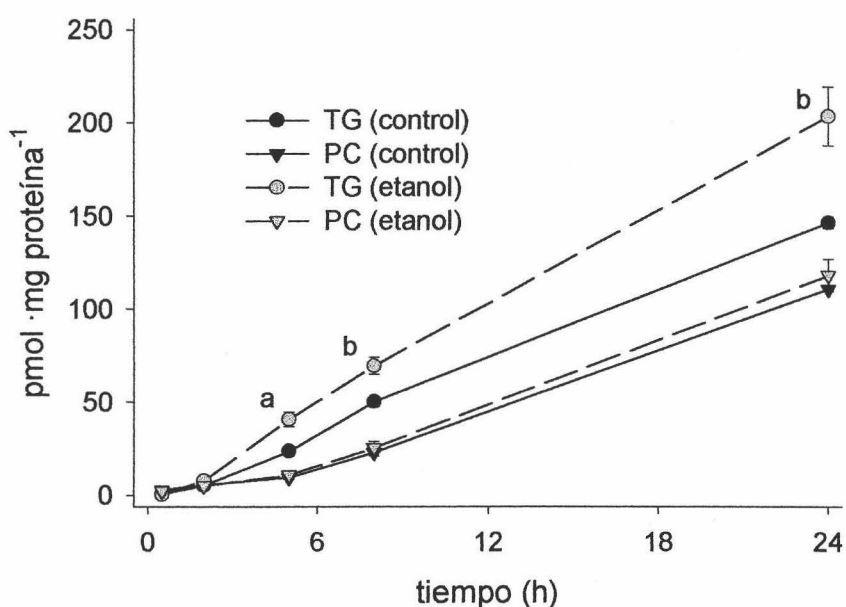
El medio de incubación fue además recogido en los ensayos de incorporación de glicerol marcado, al objeto de determinar la radiactividad asociada a las diferentes fracciones lipídicas secretadas tras su síntesis intracelular y así analizar la influencia del tratamiento de etanol a corto plazo sobre la liberación de los lípidos recién sintetizados al medio extracelular.

En la Figura 15 se muestran las cinéticas de incorporación del glicerol a triacilglicerol y fosfatidilcolina, las dos fracciones lipídicas que aparecen marcadas en una significativa proporción en el medio. Según se observa, la exposición de las células al alcohol incrementa significativamente, a partir de las 5 h, la radiactividad asociada a la fracción de triacilglicerol recién sintetizado y liberado al medio, sin alterar la secreción de fosfatidilcolina sintetizada *de novo*.

### III.3. DEGRADACIÓN Y SECRECIÓN DE LÍPIDOS ENDÓGENOS

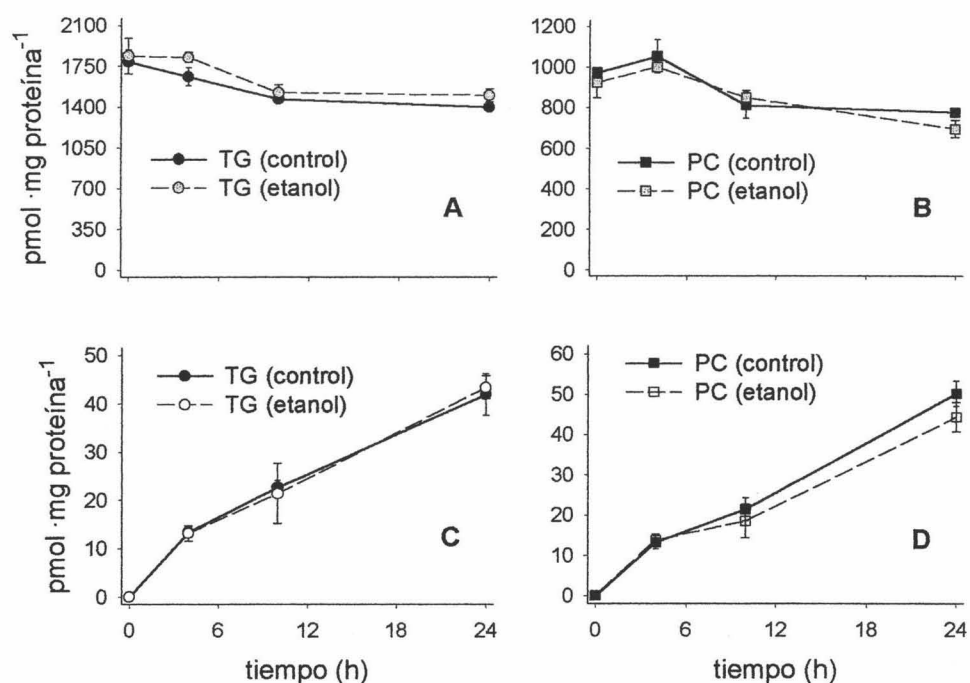
Teniendo en cuenta que el etanol podría afectar también al recambio lipídico en las células HepG2, decidimos examinar la velocidad de degradación metabólica de fosfolípidos y lípidos neutros. Inicialmente, los lípidos endógenos celulares fueron marcados mediante la

incubación de las células con glicerol marcado radiactivamente durante 24 h. El medio fue entonces retirado y reemplazado por medio fresco no radiactivo, en presencia o ausencia de etanol 100 mM. A diferentes tiempos, las células fueron recogidas y se determinó la radiactividad asociada a los distintos lípidos, tanto en las células como en el medio de cultivo.



**Figura 15. Efectos del etanol sobre la liberación de lípidos recién sintetizados al medio extracelular.** Las células HepG2 fueron incubadas en EMEM conteniendo [1,2,3-<sup>3</sup>H]glicerol (25  $\mu$ M, 200 Ci  $\cdot$  mol<sup>-1</sup>). A los tiempos seleccionados, se determinó la radiactividad asociada a las fracciones secretadas de triacilglicerol y fosfatidilcolina en las células tratadas con etanol (----) y en las controles (—). Los datos son media de cinco determinaciones  $\pm$  SEM, expresados como pmol de glicerol incorporados por mg de proteína. El experimento fue repetido obteniéndose similares resultados. La significancia estadística de las diferencias obtenidas con respecto a los controles está indicada por: <sup>a</sup> $P < 0,05$ ; <sup>b</sup> $P < 0,01$ .

En la Figura 16 se muestran los perfiles correspondientes a la degradación y secreción al medio de triacilglicerol y fosfatidilcolina endógenos, las fracciones lipídicas que presentan mayores niveles de incorporación de radiactividad a partir del glicerol marcado. Es interesante destacar que el etanol no altera ni la velocidad de degradación ni la secreción al medio de los distintos lípidos endógenos premarcados analizados. Sólo se muestran los perfiles radiactivos para triacilglicerol y fosfatidilcolina, aunque tampoco se modificaron los perfiles correspondientes a diacilglicerol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol por influencia del alcohol (no mostrado).



**Figura 16. Efectos del etanol sobre la velocidad de degradación y liberación al medio de triacilglicerol y fosfatidilcolina endógenos en células HepG2.** Los lípidos celulares fueron inicialmente marcados mediante incubación de las células con [1,2,3-<sup>3</sup>H]glicerol (25  $\mu$ M, 200 Ci  $\cdot$  mol<sup>-1</sup>) durante 24 h. El medio se reemplazó por nuevo medio no radiactivo, suplementado con etanol 100 mM en las células tratadas. A los

tiempos seleccionados, se determinó la radiactividad asociada a las fracciones de triacilglicerol y fosfatidilcolina, celulares y secretadas, en las células tratadas con etanol (----) y en las controles (—). Los datos son media de al menos dos determinaciones  $\pm$  SEM, expresados como pmol de glicerol incorporados por mg de proteína.

Estos resultados demuestran que los efectos del etanol sobre el metabolismo lipídico en estas células no se ejercen en ningún caso a nivel de los procesos intracelulares de recambio metabólico de fosfolípidos y lípidos neutros.

## **IV. INFLUENCIA DE UN TRATAMIENTO PROLONGADO DE ETANOL SOBRE EL METABOLISMO LIPÍDICO EN CÉLULAS HepG2**

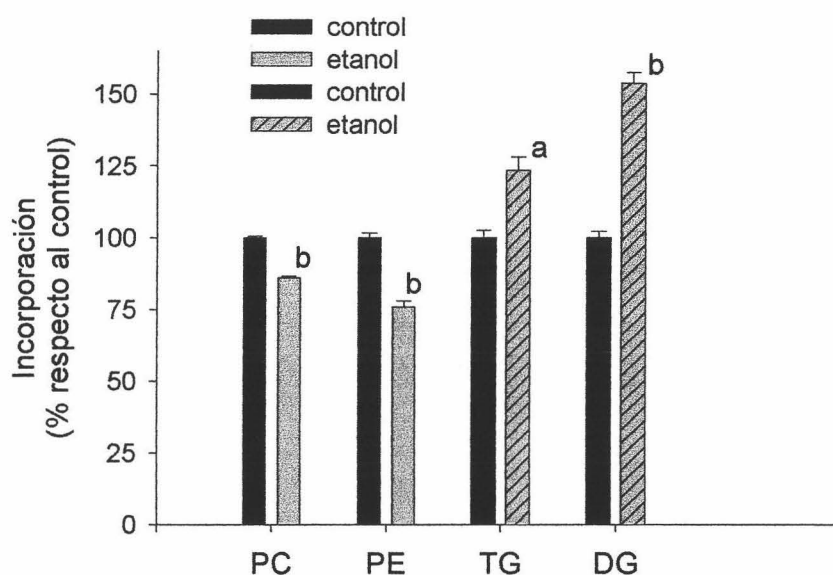
### **IV.1. SÍNTESIS *DE NOVO***

La Figura 17 muestra los efectos del tratamiento de etanol 100 mM durante 7 días sobre la incorporación de glicerol marcado isotópicamente a los dos fosfolípidos mayoritarios, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, en las células HepG2. Según se puede observar, el tratamiento causa una disminución significativa en la incorporación de radiactividad a ambos fosfolípidos, reduciéndose aproximadamente en un 14% y 24%, respectivamente (Figura 17).

Interesantemente, como se muestra en la Tabla XIV, la exposición celular a etanol 100 mM durante 7 días no afecta, sin embargo, a la incorporación de glicerol al resto de los fosfolípidos, indicando que el alcohol ejerce acciones particulares sobre las rutas de biosíntesis de los fosfolípidos mayoritarios, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina.

Los resultados concernientes a los efectos de la exposición crónica de etanol sobre la incorporación de glicerol a lípidos neutros están también presentados en la Figura 17 y en la

Tabla XIV. Como se muestra en esta Figura, la incubación de las células HepG2 con etanol 100 mM origina un leve pero significativo incremento en la incorporación de glicerol a triacilglicerol y diacilglicerol comparado con las células control, indicando que el tratamiento prolongado de etanol estimula ligeramente la lipogénesis celular en estas células.



**Figura 17. Incorporación de [1,2,3-<sup>3</sup>H]glicerol a diferentes lípidos en células HepG2 controles y tratadas durante un periodo prolongado con etanol.** Las células fueron expuestas a etanol 100 mM durante 7 días, incubándose posteriormente en EMEM conteniendo [1,2,3-<sup>3</sup>H]glicerol (25  $\mu$ M, 200 Ci  $\cdot$ mol<sup>-1</sup>) durante 7 h. Las células controles se mantuvieron sin tratamiento de alcohol. Los datos son media de tres determinaciones  $\pm$  SEM, expresados como pmol de glicerol incorporados por mg de proteína. La significancia estadística de las diferencias obtenidas con respecto a los controles está indicada por: <sup>a</sup> $P < 0,02$ ; <sup>b</sup> $P < 0,001$ .

**TABLA XIV. Efecto del tratamiento prolongado de etanol sobre la incorporación de [1,2,3-<sup>3</sup>H]glicerol a lípidos en células HepG2.** Las células fueron sembradas en placas petri de 60 mm de diámetro y tratadas con etanol 100 mM durante 7 días. En la fase logarítmica de crecimiento, las células fueron incubadas durante 7 h en EMEM suplementado con [1,2,3-<sup>3</sup>H]glicerol (25  $\mu$ M, 200 Ci  $\cdot$  mol<sup>-1</sup>), los lípidos fueron extraídos de las células y separados mediante TLC.

	<i>pmol <math>\cdot</math> mg proteína<sup>-1</sup></i>	
	<i>Control</i>	<i>Etanol 100 mM</i>
<b><i>Fosfolípidos</i></b>		
Fosfatidilcolina	899,0 $\pm$ 5,5	774,7 $\pm$ 4,7 <sup>b</sup>
Fosfatidiletanolamina	295,1 $\pm$ 4,9	224,0 $\pm$ 5,8 <sup>b</sup>
Fosfatidilinositol	26,3 $\pm$ 2,9	33,7 $\pm$ 1,8
Fosfatidilserina	21,4 $\pm$ 3,9	22,0 $\pm$ 0,6
Fosfatidato	12,7 $\pm$ 1,0	13,1 $\pm$ 1,8
Fosfatidiletanol	9,8 $\pm$ 2,0	11,7 $\pm$ 5,1
<b><i>Lípidos neutros</i></b>		
Triacilglicerol	1304,2 $\pm$ 32,5	1609,6 $\pm$ 59,2 <sup>a</sup>
Diacilglicerol	127,6 $\pm$ 2,9	196,2 $\pm$ 4,7 <sup>b</sup>
Ácidos grasos	3,9 $\pm$ 0,2	6,4 $\pm$ 1,2

Los resultados son media de tres determinaciones  $\pm$  SEM, expresados como pmol de glicerol incorporados por mg de proteína. La significancia estadística de las diferencias obtenidas con respecto a los controles está indicada por: <sup>a</sup> $P < 0,02$ ; <sup>b</sup> $P < 0,001$ .

## IV.2. SECRECIÓN LIPÍDICA

Después de incubar con glicerol marcado isotópicamente, determinamos también la radiactividad asociada a las diferentes fracciones lipídicas secretadas al medio. Los resultados se

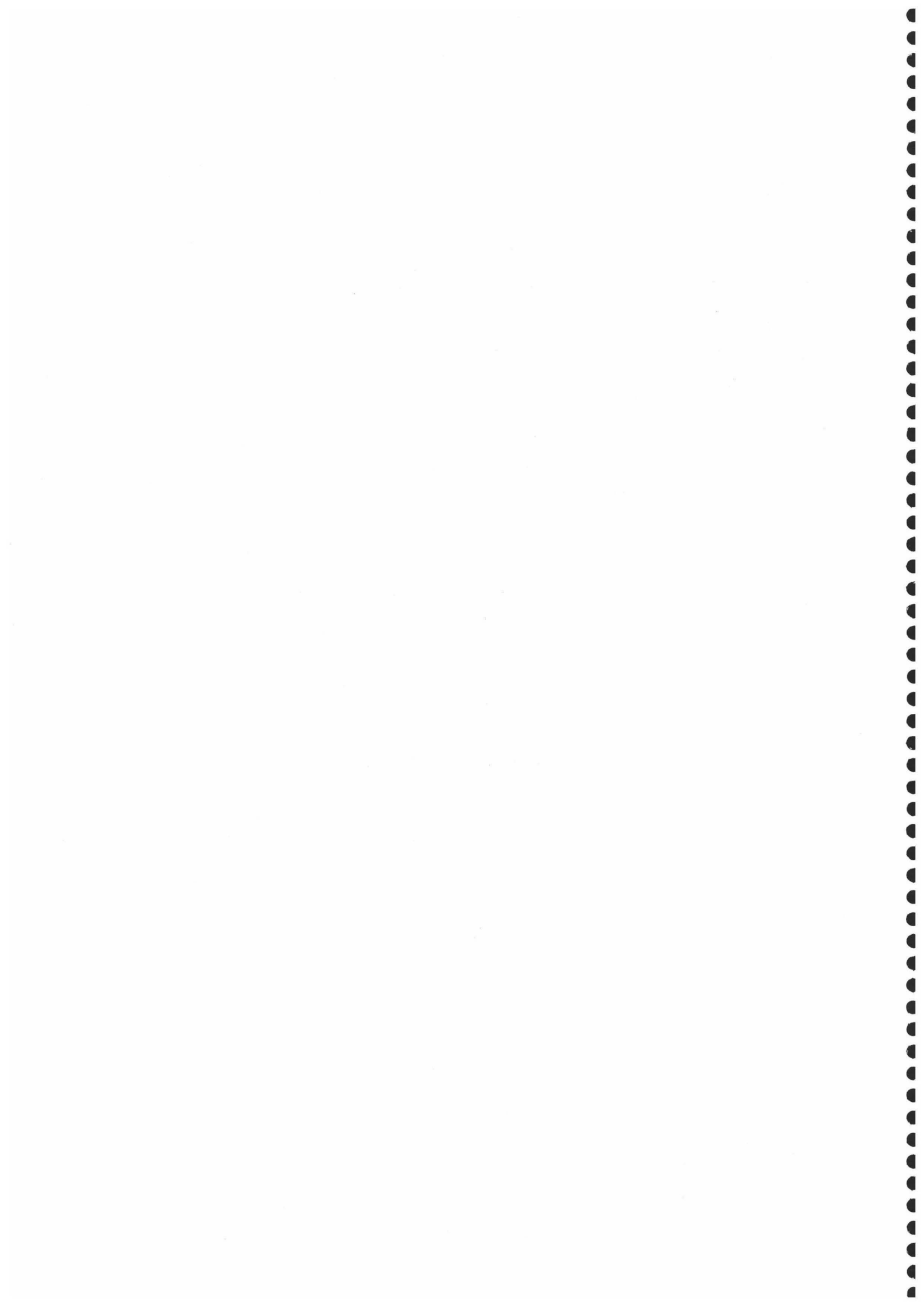


representan en la Tabla XV. Como se aprecia, la exposición crónica al etanol provoca un incremento significativo en los niveles radiactivos de triacilglicerol recién sintetizado y liberado al medio, sin afectar a la secreción de fosfatidilcolina recién sintetizada. El resto de lípidos se exportaron al medio en cantidades insignificantes, por lo que no fueron detectados.

**TABLA XV. Lípidos secretados al medio tras un tratamiento de larga duración con etanol en células HepG2.** Las células fueron sembradas en placas petri de 60 mm de diámetro y tratadas con etanol 100 mM durante 7 días. En fase logarítmica de crecimiento, las células fueron incubadas durante 7 h en EMEM suplementado con [1,2,3-<sup>3</sup>H]glicerol (25 μM, 200 Ci · mol<sup>-1</sup>). Los lípidos fueron extraídos del medio de incubación y separados mediante TLC.

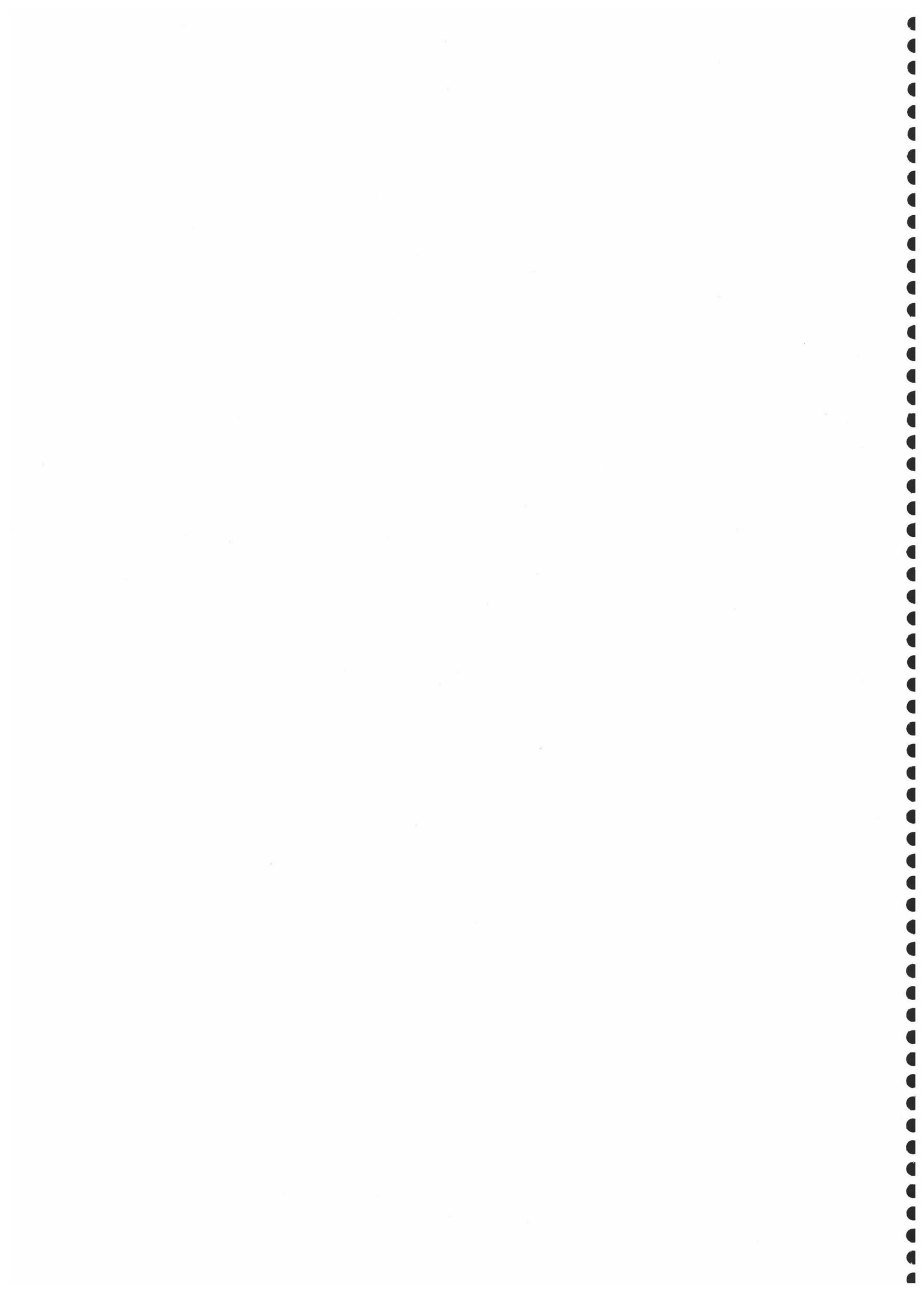
	<i>pmol · mg proteína<sup>-1</sup></i>	
	<i>Control</i>	<i>Etanol 100 mM</i>
Fosfatidilcolina	18,1 ± 0,6	20,1 ± 0,6
Triacilglicerol	31,8 ± 1,8	40,9 ± 1,2 <sup>a</sup>

Los resultados son media de tres determinaciones ± SEM, expresados como pmol de glicerol incorporados por mg de proteína. La significancia estadística de las diferencias obtenidas con respecto a los controles está indicada por: <sup>a</sup>*P* < 0,02.





## **Discusión**



## I. ANÁLISIS DE TOXICIDAD DEL ETANOL EN CÉLULAS HepG2

En el presente trabajo, en primer lugar evaluamos los efectos del etanol sobre la viabilidad celular y toxicidad en las células HepG2, mostrando que los tratamientos de 24 h ó 7 días con etanol 100 mM no producen alteraciones en la permeabilidad de la membrana plasmática, la funcionalidad mitocondrial o la viabilidad celular. Estos resultados contrastan claramente con los descritos por Neuman y colaboradores (1993), quienes demuestran que un tratamiento de etanol semejante al utilizado en nuestro estudio ejerce toxicidad sobre las células HepG2, reduciendo la viabilidad con respecto a las células controles. No tenemos una explicación definitiva para estas discrepancias, aunque otros autores, de acuerdo con nuestros resultados, han descrito que una exposición de las células HepG2 a 100 mM de etanol durante 3-5 días no produce una liberación significativa de LDH en el medio (Dashti *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1994; Wu y Cederbaum, 1996). Kabakibi y colaboradores (1998) han observado, además, que tras un tratamiento agudo de 9 h, sólo concentraciones de alcohol superiores a 400 mM resultan tóxicas en estas células, ocasionando liberación extracelular de LDH.

El grupo de investigación de Cederbaum (Wu y Cederbaum, 1996) ha sugerido que estas diferencias pueden reflejar variaciones en las condiciones de cultivo o el medio utilizado, o incluso diferencias entre las líneas celulares parentales empleadas. Es interesante destacar que las células HepG2 se caracterizan por presentar valores muy reducidos de actividad citocromo P<sub>450</sub>2E1, la isoforma del citocromo P<sub>450</sub> inducible por el alcohol (Lieber, 1997b). Se ha descrito que el citocromo P<sub>450</sub>2E1 se encuentra especialmente implicado en la generación de especies reactivas procedentes del metabolismo del etanol (Cederbaum, 2001), incluyendo el radical 1-hidroxietilo (Stoyanovsky *et al.*, 1998). En este sentido, en nuestro estudio observamos que, a diferencia de lo descrito repetidamente en hepatocitos normales, la exposición al alcohol, en un periodo de tiempo corto o prolongado, no causa peroxidación lipídica detectable en esta línea celular carente de citocromo P<sub>450</sub>2E1. De acuerdo con los resultados obtenidos en nuestro estudio, otros autores han demostrado que la citotoxicidad del etanol se observa únicamente en

células HepG2 que han sido transfectadas con el gen CYP2E1 y, por tanto, expresan la actividad citocromo P<sub>450</sub>2E1 pero no en las células que carecen de esta isoforma (Carroccio *et al.*, 1994; Mari y Cederbaum, 2000; Wu y Cederbaum, 1996). En conjunto, todos estos resultados indican que al menos parte de los efectos hepatotóxicos del etanol están asociados con el estrés oxidativo dependiente de P<sub>450</sub>2E1 (Cederbaum, 1998), que causa una intensificada peroxidación lipídica no observable en la línea celular empleada en nuestro estudio.

## II. METABOLISMO DEL ETANOL EN HepG2

Con el fin de investigar la capacidad de las células HepG2 para metabolizar el etanol, se examinó la incorporación de etanol marcado isotópicamente a las porciones apolares de los lípidos celulares. La radiactividad procedente del [1-<sup>14</sup>C]etanol es activamente incorporada a los distintos lípidos neutros y fosfolípidos, demostrando que el etanol puede ser utilizado, vía acetyl-CoA, como sustrato lipogénico en las células HepG2.

De gran interés resulta el hecho de la inhibición prácticamente total en la incorporación de etanol a lípidos observada en este estudio en presencia del inhibidor del citocromo P<sub>450</sub> metirapona, puesto que demuestra que el etanol es metabolizado en esta línea celular fundamentalmente a través de la vía microsomal dependiente del P<sub>450</sub>. Estos resultados muestran un aspecto claramente diferencial en cuanto al metabolismo del etanol en células HepG2 y hepatocitos normales, ya que estos últimos utilizan preferentemente la vía ADH citosólica y, además, el sistema microsomal de oxidación del alcohol dependiente de citocromo P<sub>450</sub>.

Actualmente existe una clara controversia en cuanto a la existencia y capacidad de inducción del citocromo P<sub>450</sub>2E1 en esta línea celular de hepatoblastoma humano. Así, Tam (1992) ha indicado que la exposición de las células HepG2 a etanol durante 24 horas induce el sistema citocromo P<sub>450</sub>, observándose una correlación positiva entre los niveles de este citocromo y la velocidad de metabolización del etanol y que, además, la actividad anilina p-

hidroxilasa correspondiente a la isoforma P<sub>450</sub>2E1 aumenta 3-4 veces en células tratadas con etanol. Sin embargo, Wu y Cederbaum (1996) han descrito que las células HepG2 no expresan P<sub>450</sub>2E1 a un nivel detectable, determinado mediante análisis 'Western Blot'.

Los datos obtenidos en la presente memoria de Tesis Doctoral indican que la capacidad de metabolización del etanol por las células HepG2 no parece ser afectada por el tratamiento prolongado de alcohol, indicando que el sistema responsable del metabolismo del alcohol no se induce tras la exposición prolongada a este agente. Todos estos datos nos permiten sugerir que el etanol es metabolizado en células HepG2 por formas no inducibles del citocromo P<sub>450</sub> y, por tanto, diferentes del citocromo P<sub>450</sub>2E1 (Jimenez-Lopez *et al.*, 2002).

Por otra parte, el análisis de la incorporación de [1-<sup>14</sup>C]etanol a los diferentes lípidos muestra que todas las fracciones lipídicas presentan marcaje radiactivo, aunque los valores de incorporación reflejan la diferente velocidad de las rutas metabólicas que conducen a los diferentes componentes lipídicos y sus distintos niveles intracelulares. Como es de esperar, en la fracción de fosfolípidos la mayor proporción de radiactividad incorporada se asocia con fosfatidilcolina, el principal componente de las membranas biológicas en eucariotas. Fosfatidiletanolamina también muestra un notable marcaje isotópico, mientras los otros fosfolípidos incorporan sustancialmente menos radiactividad.

En nuestro estudio no se observaron diferencias en la radiactividad asociada a las fracciones de fosfatidato y fosfatidiletanol en células tratadas crónicamente con alcohol y controles. El fosfatidiletanol se produce por una reacción de transfosfatidilación, catalizada por la fosfolipasa D, en presencia de etanol (Liscovitch *et al.*, 2000). Así, el etanol sustituye al agua durante la ruptura de la fosfatidilcolina y otros fosfolípidos para producir fosfatidiletanol, en lugar de ácido fosfático, utilizándose la formación de fosfatidiletanol como índice de activación específica de la fosfolipasa D. Por tanto, en las condiciones experimentales empleadas el etanol no estimula la actividad fosfolipasa D en células HepG2, puesto que en este caso deberían incrementar los niveles radiactivos de fosfatidato y fosfatidiletanol. Es interesante

destacar, además, que la radiactividad asociada a fosfatidiletanol es muy baja, comparada con los niveles observados en hepatocitos normales expuestos al alcohol, indicando que la actividad de transfosfatidilación es muy baja en estas células.

Con respecto a los lípidos neutros, el etanol es incorporado principalmente a triacilglicerol. En conjunto, se observa que la síntesis de fosfatidilcolina y triacilglicerol es especialmente activa en este tipo celular, como han descrito previamente otros autores (Dashti *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 1995; Pakula *et al.*, 1997). Además, el acetil-CoA generado a partir del etanol es también usado para la síntesis de esteroides, puesto que, cuantitativamente, una importante incorporación de radiactividad ocurre en la fracción de colesterol. Notablemente, el colesterol esterificado, que puede incorporar radiactividad tanto en el anillo esteroídico como en el grupo acilo, muestra solamente una ligera radiactividad, sugiriendo que las células HepG2 presentan una baja actividad de esterificación del colesterol bajo nuestras condiciones experimentales.

### III. INFLUENCIA DEL ETANOL SOBRE EL METABOLISMO LIPÍDICO EN CÉLULAS HepG2

Teniendo en cuenta que parte de las acciones tóxicas del etanol han sido adscritas a productos de su oxidación metabólica y que las células HepG2 presentan aspectos claramente diferenciales respecto a hepatocitos en cuanto a las vías utilizadas para oxidar el alcohol, nos propusimos examinar cómo la exposición al etanol podría alterar la síntesis de lípidos en las células tumorales. Para ello, utilizamos glicerol exógeno marcado isotópicamente como precursor lipogénico, analizando el efecto del alcohol sobre la incorporación de este sustrato a lípidos celulares y secretados al medio de cultivo.

Aunque ha sido extensamente descrito que los tratamientos crónico (Carrasco *et al.*, 1996b; Carrasco *et al.*, 2001a; Do Carmo *et al.*, 1996) y agudo (Castro *et al.*, 1987; Carrasco *et*



*al.*, 1996a; Carrasco *et al.*, 1998) de etanol aumentan notablemente la actividad lipogénica en células hepáticas, de manera sorprendente la exposición de las células HepG2 a etanol durante 24 h no produce un cambio significativo en la incorporación de glicerol a la fracción de triacilglicerol o diacilglicerol. Este resultado contrasta claramente con observaciones previas de nuestro grupo de trabajo utilizando hepatocitos aislados de rata, donde la incorporación de [1,2,3-<sup>3</sup>H]glicerol a triacilglicerol ocurre a una velocidad 3 veces superior tras exposición al etanol durante 3 h (Carrasco *et al.*, 1998).

Además, la exposición de las células HepG2 a etanol durante 7 días ocasiona solamente un incremento del 20% en la radiactividad asociada a triacilglicerol y diacilglicerol. Este ligero aumento contrasta fuertemente con el gran incremento observado en hepatocitos aislados de ratas tratadas crónicamente con etanol, en donde se han obtenido velocidades de incorporación del glicerol a triacilglicerol 16 veces superiores a las encontradas en hepatocitos controles aislados de ratas no tratadas (Carrasco *et al.*, 2001a).

La marcada estimulación de la lipogénesis en hígado por el etanol ha sido atribuida entre otros factores al incremento en el estado redox hepatocelular, causado por la oxidación del etanol a través de las actividades ADH y ALDH (French, 2000; Khan y O'Brien, 1999), aunque un aumento en  $\alpha$ -glicerofosfato y otros sustratos lipogénicos (Castro *et al.*, 1987; Yu y Cronholm, 1997) podría también contribuir al incremento en la síntesis de triacilglicerol en el hígado por efecto del etanol. En este sentido, en nuestro laboratorio hemos demostrado que cuando se inhibe el metabolismo del etanol vía ADH mediante la utilización de 4-metilpirazol no se observa una alteración importante de la actividad lipogénica en hepatocitos aislados de rata (Carrasco *et al.*, 1998; 1996a).

Los datos obtenidos en el presente trabajo demuestran que en las células HepG2 el etanol es oxidado fundamentalmente a través del sistema dependiente del citocromo P<sub>450</sub>. La oxidación del alcohol por este sistema genera acetato sin alterar el estado redox intracelular y, por tanto, como se observa en nuestro estudio, la actividad lipogénica en HepG2 sólo es ligeramente

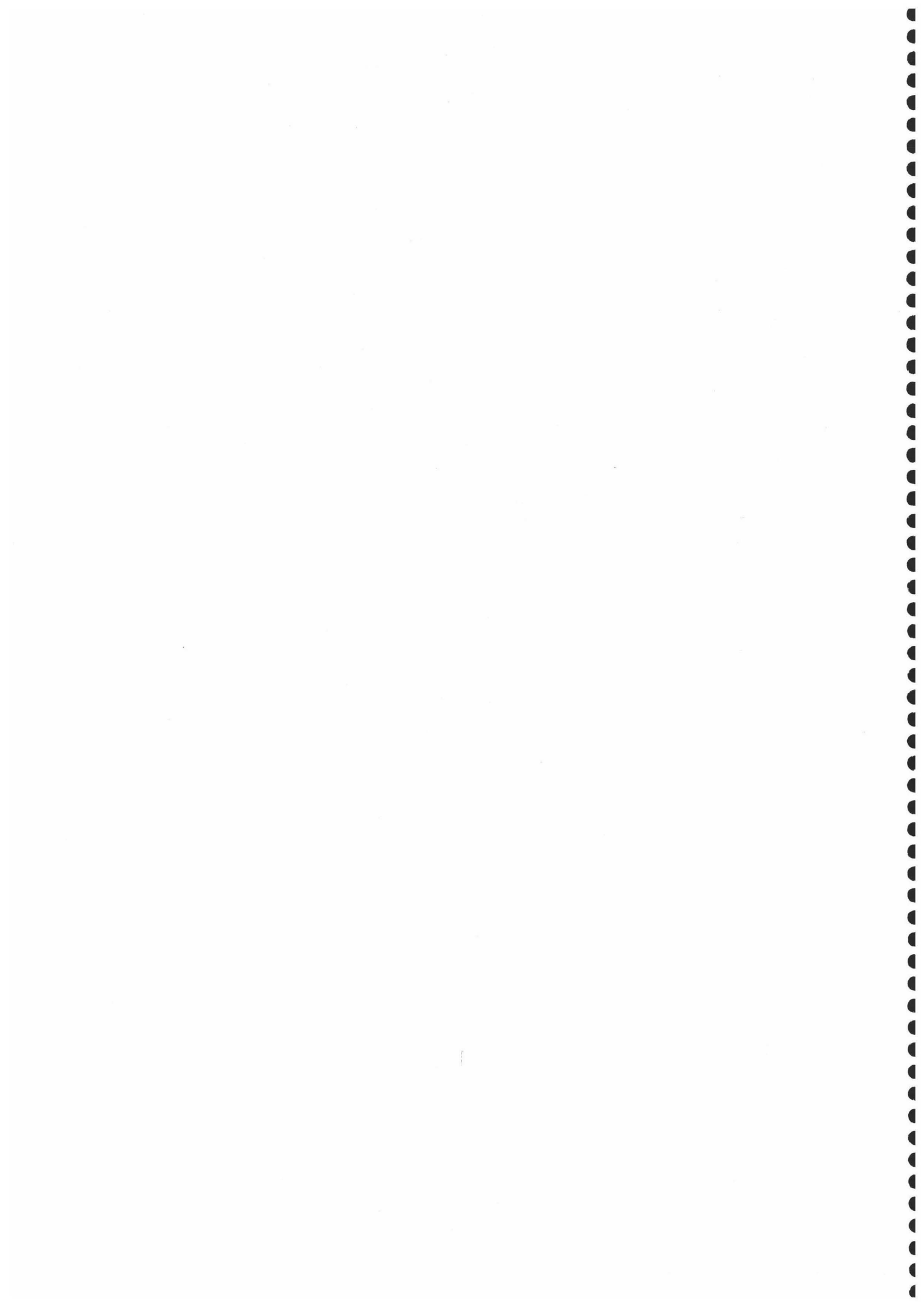
incrementada por el alcohol, confirmando que la estimulación lipogénica producida por el etanol en el hígado, observada en otros estudios, depende fundamentalmente del metabolismo del alcohol vía ADH (Jimenez-Lopez *et al.*, 2002).

Es interesante destacar que la exposición prolongada de las células HepG2 al etanol disminuye la incorporación de glicerol exclusivamente a los fosfolípidos mayoritarios, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina. Este efecto no es debido a una reducción en la producción *de novo* de diacilglicerol, puesto que, según hemos comentado anteriormente, la incorporación de glicerol a este intermediario lipídico fue incluso incrementada en las células tratadas con etanol en comparación con las controles. Así, estos resultados sugieren que el etanol ejerce acciones particulares sobre las diferentes rutas biosintéticas de fosfolípidos, probablemente inhibiendo la ruta de Kennedy para la síntesis *de novo* de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina. En este sentido, en diversos laboratorios, incluido el nuestro, se ha descrito que el etanol disminuye sensiblemente la biosíntesis de fosfatidilcolina en distintos tipos celulares (Chu, 1994; Lamb *et al.*, 1994; Le Petit-Thevenin *et al.*, 1995). Además, utilizando diferentes precursores lipídicos, en nuestro laboratorio hemos demostrado que el etanol *in vitro* inhibe la biosíntesis de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina a través de la ruta de Kennedy en hepatocitos aislados de rata (Carrasco *et al.*, 1996a). Esta inhibición es debida a un efecto directo del etanol a nivel de enzimas específicas de la vía CDP-derivados, siendo observada solamente cuando la ADH se encuentra inhibida por 4-metilpirazol. Además, recientemente hemos descrito que concentraciones de etanol superiores a 50 mM inhiben significativamente *in vitro* la actividad diacilglicerol colinafosfotransferasa de hígado de rata (Carrasco *et al.*, 2001b).

Hemos de tener en cuenta, no obstante, que los cambios inducidos por el alcohol podrían ser debidos en parte a una alteración en la velocidad de recambio lipídico. Por tanto, se analizó además la acción del etanol sobre la tasa de recambio de los diferentes fosfolípidos y lípidos neutros, comprobando que el alcohol actúa sobre el metabolismo lipídico a nivel de la actividad biosintética en células HepG2, sin afectar a la degradación lipídica.

Otro proceso que podría contribuir a una modificación de la radiactividad asociada a los lípidos intracelulares es la alteración de la secreción de lípidos al medio extracelular. Nuestros resultados indican que la exposición de las células HepG2 al etanol produce un incremento en la radiactividad asociada al triacilglicerol exportado al medio tras su síntesis *de novo*. Este efecto parece ser bastante específico para este lípido, puesto que la liberación de fosfatidilcolina recién sintetizada no se modifica por efecto del alcohol. Otros autores han descrito previamente que el etanol incrementa la liberación de triacilglicerol en las células HepG2, un efecto que posiblemente está relacionado con una mayor concentración intracelular de triacilglicerol y un incremento en la secreción de apoB<sub>100</sub> (Dashti *et al.*, 1996; Tam, 1992; Wang *et al.*, 1994). Notablemente, los resultados de nuestro estudio muestran que en células HepG2 el etanol altera exclusivamente la liberación de triacilglicerol recién sintetizado, sin afectar a la exportación del triacilglicerol endógeno previamente marcado, sugiriendo que el incremento en la población de triacilglicerol recién sintetizado es utilizado para la secreción de lipoproteínas en estas células.

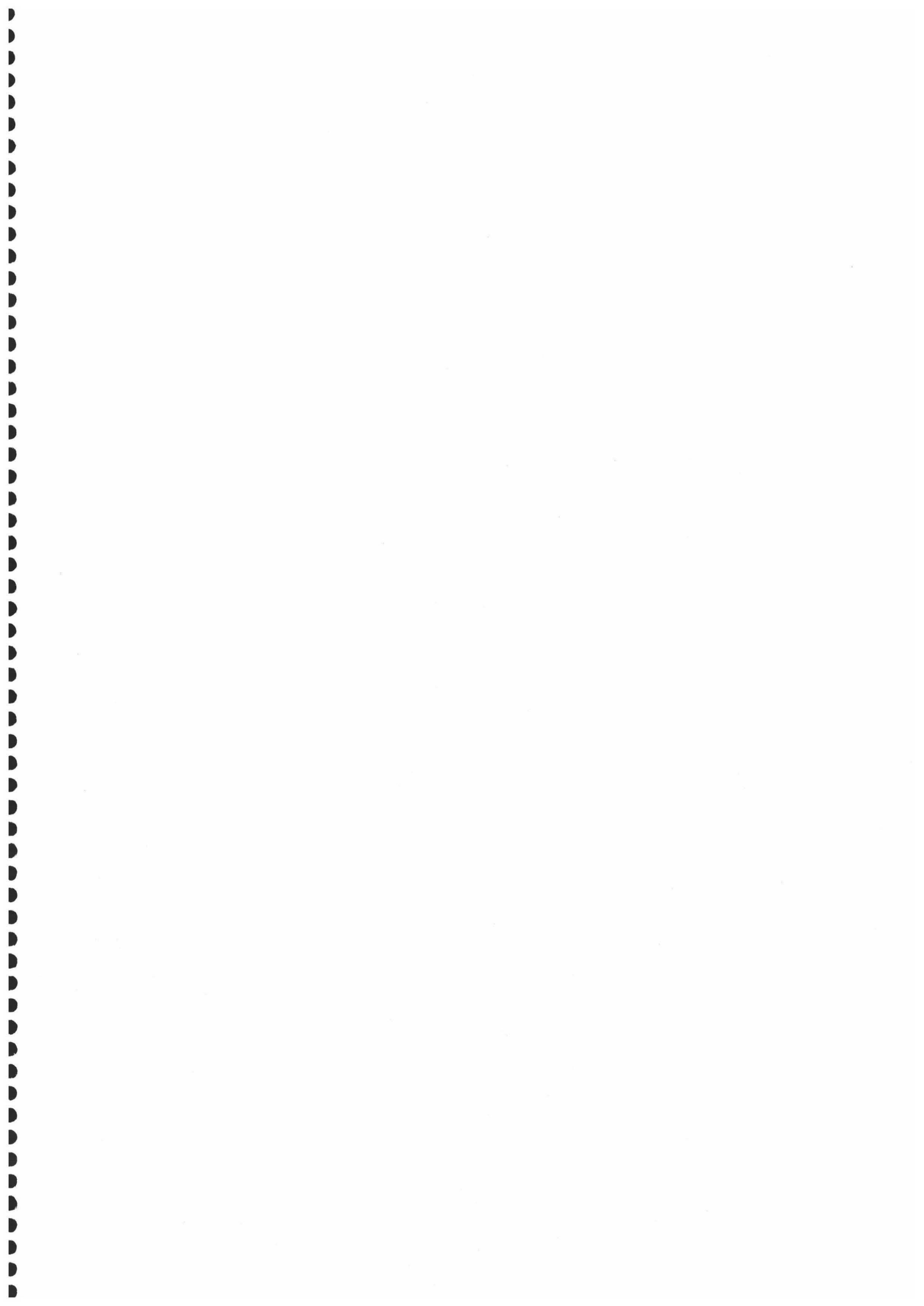
Estos resultados contrastan con los obtenidos por Visioli y colaboradores (1998), que describen una menor liberación al medio de triacilglicerol recién sintetizado como consecuencia de una exposición de las células HepG2 a elevadas concentraciones de etanol, aunque se produce un notable incremento en los niveles radiactivos asociados al triacilglicerol intracelular, sugiriendo que el etanol puede favorecer a elevadas concentraciones aún más la acumulación celular de este compuesto, evitándose su secreción al medio extracelular.





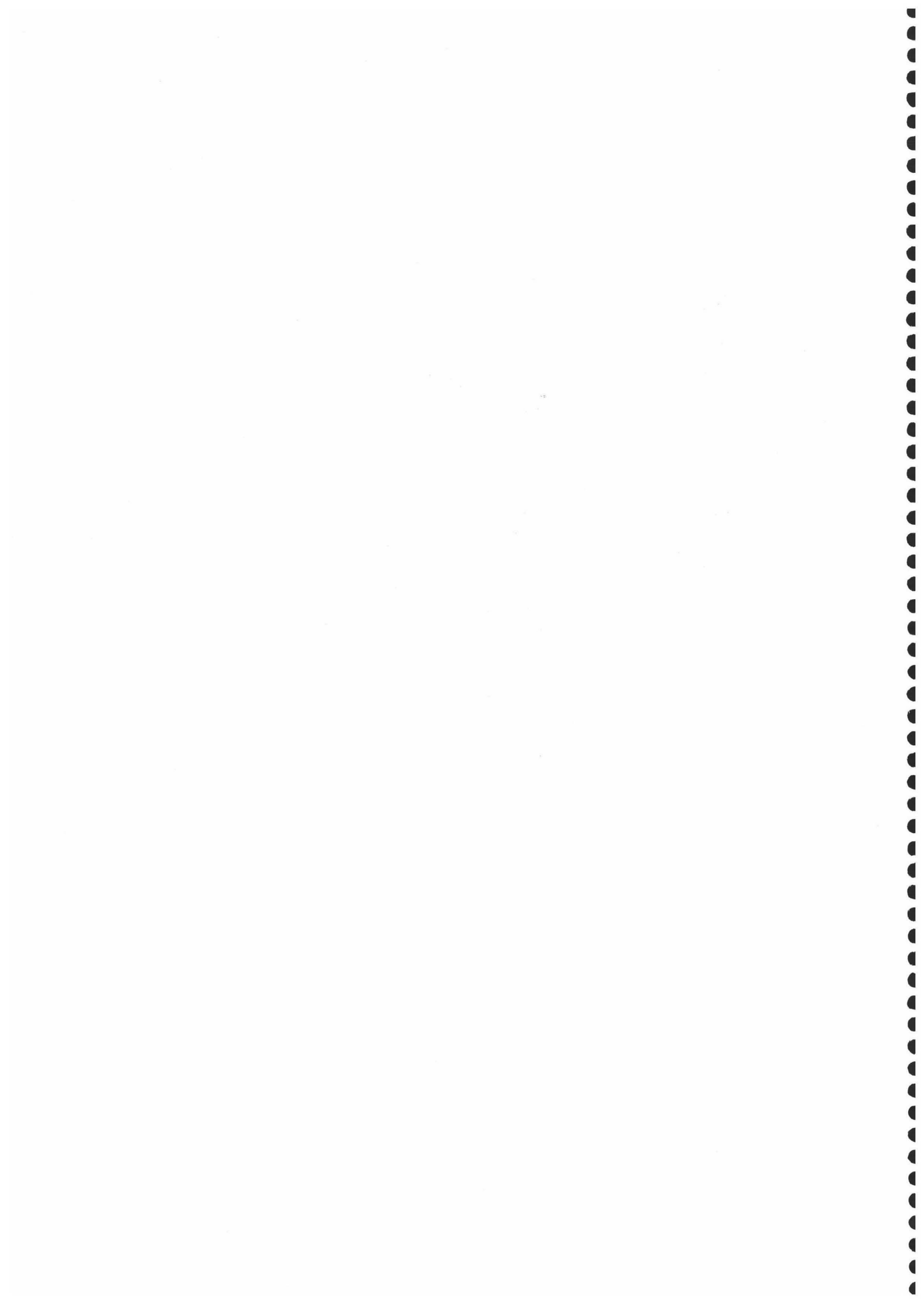
**CAPÍTULO 3**

**ALTERACIONES INDUCIDAS POR  
HEXADECILFOSFOCOLINA EN CÉLULAS  
DE HEPATOMA HUMANO HepG2**





## **Introducción**





## I. ANÁLOGOS SINTÉTICOS DE FOSFOLÍPIDOS CON ACTIVIDAD ANTINEOPLÁSICA

Ciertos compuestos análogos de los fosfolípidos naturales exhiben una citotoxicidad selectiva hacia diversos tipos de células tumorales, siendo determinadas células más sensibles y otras más resistentes, y son relativamente inactivos frente a las células normales bajo las mismas condiciones de tratamiento. Esta especificidad en la acción antitumoral, sin apenas afectar a los tejidos normales, permite un uso terapéutico dirigido contra determinados tumores. Además, estos agentes sintéticos presentan múltiples características de interés biológico, con un alto valor potencial para la terapia antitumoral, siendo capaces de inducir respuestas de diferenciación y apoptosis en células malignas, inhibir la invasión tumoral e incluso modular la respuesta inmune (Berkovic, 1998).

Existe, por tanto, un considerable interés en examinar la actividad biológica de estos compuestos. Interesantemente, inhiben selectivamente el crecimiento de células transformadas sin interaccionar con el DNA (Wieder *et al.*, 1999), por lo que su aplicación puede complementar las quimioterapias antineoplásicas existentes dirigidas contra el DNA.

Sin embargo, a pesar del conocimiento detallado de los efectos biológicos provocados por estos compuestos, aún no se ha establecido el preciso mecanismo molecular responsable de la mayoría de sus acciones y que determina el alto grado de selectividad antitumoral. Además, tampoco se conocen las causas que determinan la distinta sensibilidad mostrada por diferentes líneas celulares tumorales a estos agentes.

Reciente evidencia ha mostrado que estos análogos de fosfolípidos se acumulan en las membranas celulares. Su modo de acción más directo implicaría, pues, una interferencia sustancial con las rutas de señalización intracelular y una alteración del metabolismo lipídico (Arthur y Bittman, 1998; Berkovic, 1998; Wieder *et al.*, 1999).

## ALQUILFOSFOCOLINAS Y ALQUILLISOFOSFOLÍPIDOS

Las alquilfosfocolinas (APC) son un nuevo grupo de agentes antiproliferativos sintéticos y metabólicamente estables, candidatos prometedores en una nueva aproximación a la quimioterapia contra el cáncer (Muschiol *et al.*, 1987; Hilgard *et al.*, 1993). Estos compuestos presentan los mínimos requerimientos estructurales esenciales de los alquillisofosfolípidos (ALP), también denominados lípidos-éter, análogos sintéticos de los lisofosfolípidos de membrana que manifiestan también actividad antineoplásica.

El principal representante de los ALP es 1-O-octadecil-2-O-metil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (ET-18-OCH<sub>3</sub>, edelfosina). La ET-18-OCH<sub>3</sub> es un derivado no metabolizable de la lisofosfatidilcolina, perteneciente a la primera generación de lípidos-éter inhibidores del crecimiento celular, e induce muerte celular por apoptosis en ciertas líneas celulares tumorales (Boggs *et al.*, 1995b).

La hexadecilfosfocolina (HePC, miltefosina), es el principal representante de las APC. Se trata de un compuesto activo de membrana, análogo sintético de la lisofosfatidilcolina, que es actualmente empleado como fármaco para el tratamiento tópico paliativo de metástasis cutáneas derivadas de carcinomas mamarios (Clive *et al.*, 1999; Eue, 2001). Recientemente, determinados estudios pre-clínicos están demostrando además su utilidad para el tratamiento de ciertos linfomas cutáneos (Dummer *et al.*, 1993). Aparte de su eficacia antitumoral, la HePC ejerce una destacable actividad contra enfermedades infecciosas parasitarias causadas por *Tripanosoma* o *Leishmania* (Santa-Rita *et al.*, 2000; Sundar *et al.*, 1998).

La ET-18-OCH<sub>3</sub> produce efectos inhibidores sobre el crecimiento tumoral más potentes que la HePC, sin embargo también es más citotóxica (Wieder *et al.*, 1995). Por otra parte, la ET-18-OCH<sub>3</sub> experimenta una rápida biotransformación *in vivo* (Arnold *et al.*, 1978). Por tanto, su degradación enzimática, incluso inyectándola repetidamente, previene su acumulación en el cuerpo, por lo que no es factible su uso clínico (Erdlenbruch *et al.*, 1998).

## II. APLICACIÓN QUIMIOTERAPÉUTICA DE LAS ALQUILFOSFOCOLINAS

La HePC fue el primer compuesto efectivo del grupo de las APC que se introdujo en terapia contra el cáncer (Clive *et al.*, 1999; Unger *et al.*, 1991). Estos compuestos y sus recientes derivados, como octadecil-1,1-dimetilpiperidino-4-il-fosfato (perifosina), un análogo heterocíclico de HePC (Hilgard *et al.*, 1997), ejercen una destacable actividad antitumoral selectiva, inhibiendo el crecimiento de diversos tumores y líneas celulares tumorales *in vitro* e *in vivo* (Berkovic, 1998; Hilgard *et al.*, 1993; Muschiol *et al.*, 1987; Unger *et al.*, 1989).

Concretamente, la HePC provoca efectos citotóxicos y antiproliferativos, ejerciendo su actividad contra un amplio espectro de líneas celulares tumorales en cultivo (Wieder *et al.*, 1999). La HePC inhibe también el crecimiento de tumores experimentales en ratas (Muschiol *et al.*, 1987; Scherf *et al.*, 1987), e induce respuestas antitumorales en nódulos de la piel procedentes de cánceres de mama humanos (Clive *et al.*, 1999) y en linfomas cutáneos (Dummer *et al.*, 1993), tras aplicarse tópicamente. El tratamiento oral es también efectivo contra la leishmaniasis cutánea y visceral (Fischer *et al.*, 2001).

Breiser y colaboradores (1987) describieron que la HePC se distribuye por todo el cuerpo tras su administración intravenosa u oral en ratones, acumulándose principalmente en hígado, pulmón y riñón. Este compuesto se absorbe bien en el tracto gastrointestinal, y se elimina lentamente de la corriente sanguínea.

Aunque la HePC se usa tópicamente contra metástasis de piel procedentes de carcinomas de mama en humanos, su aplicación sistémica, oral o intravenosa, está limitada a causa de su intolerancia gastrointestinal (Berdel *et al.*, 1992). El tratamiento oral, incluso con dosis no efectivas, provoca náuseas, vómitos y diarrea, y su inyección intravenosa ocasiona hemolisis

severa. Por otra parte, las dispersiones liposomales de HePC, aunque no ejercen actividad hemolítica, son eliminadas rápidamente de la circulación. No obstante, actualmente se están desarrollando formulaciones alternativas de tratamiento con liposomas estabilizados de HePC (Kaufmann-Kolle *et al.*, 1996, 1994; Zeisig *et al.*, 1998; Eue, 2001). Así, se investiga la posibilidad de administrar APC directamente vía oral (Engel *et al.*, 2000; Erdlenbruch *et al.*, 1998) o en forma de liposomas vía parenteral (Eue, 2001; Kaufmann-Kolle *et al.*, 1996; Zeisig *et al.*, 1998), para el tratamiento quimioterapéutico de diversos tipos de cáncer.

Ciertas APC sí son toleradas y permiten su aplicación intravenosa y/o oral, acumulándose en hígado, cerebro, y otros órganos del cuerpo. Por ejemplo, la erucilfosfocolina (ErPC) presenta actividad antineoplásica sobre tumores en cerebro de ratas, acumulándose además en otros órganos tras su aplicación intravenosa, siendo un compuesto muy prometedor para la quimioterapia de los tumores malignos cerebrales (Erdlenbruch *et al.*, 1998).

Las APC, al carecer del esqueleto de glicerol de los ALP, presentan una degradación sustancialmente más baja. Así, se observa que la HePC se metaboliza muy lentamente tras su toma y distribución subcelular, siendo fuertemente retenida por las células (Geilen *et al.*, 1994b), lo cual tiene interés en vistas a su actividad antitumoral efectiva. Su destino metabólico deriva principalmente hacia colina, colina-fosfato, betaína, glicerofosfocolina y fosfatidilcolina, sugiriendo la posible implicación de fosfolipasas C y/o D en su degradación (Breiser *et al.*, 1987; Geilen *et al.*, 1994b).

Es interesante destacar que no se observa una correlación entre la citotoxicidad de estos compuestos y su recambio metabólico, de manera que la acción selectiva hacia las células tumorales no parece ser atribuible a diferencias en el catabolismo del compuesto en las células normales con respecto a las células neoplásicas. Además, la generación de metabolitos tóxicos no parece ser un evento clave de la citotoxicidad de la HePC, puesto que análogos no degradables de la HePC muestran similar actividad antiproliferativa (Ries *et al.*, 1993).

### III. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LAS ALQUILFOSFOCOLINAS

Debido a su carácter lipofílico, las APC se incorporan a las membranas celulares e interaccionan con diversos componentes lipídicos y proteicos de las membranas biológicas (Dodds, 1995), alterando sus propiedades fisicoquímicas y los procesos celulares asociados a membrana.

Utilizando células MDCK (riñón), Fleer y colaboradores (1993) mostraron que la asociación de la HePC con las membranas no está mediada por receptor, ni existe una bomba proteica específica para la HePC, sugiriendo que la aceptación de HePC probablemente ocurre mediante un mecanismo inespecífico de endocitosis, independiente de receptor. Geilen y colaboradores (1994b) describieron que más del 95% de la HePC tomada por las células MDCK se asocia con las membranas celulares. La APC se incorpora mayoritariamente a la membrana plasmática, y posteriormente se distribuye, aunque en menor grado, entre las membranas subcelulares, apenas siendo detectada en forma libre en el citosol. Así, tras la intercalación de la APC en la membrana plasmática, y mediante un mecanismo endocítico, ocurre un intercambio de lípidos entre las membranas plasmática e intracelulares.

Los mecanismos moleculares implicados en la acción antitumoral ejercida por las APC no han sido aún establecidos de manera definitiva. Así, a esta clase de agentes quimioterapéuticos antineoplásicos, derivados de los lípidos-éter, se les ha atribuido una amplia variedad de mecanismos de citotoxicidad (Wieder *et al.*, 1999). No obstante, su incorporación directa a la membrana celular sugiere que el mecanismo(s) de acción subyacente a los efectos que ocasionan implica la alteración de alguna función dependiente de la membrana, la cual parece ser el sitio primario de su actividad (Berkovic, 1998). Existen distintas líneas de evidencia sugiriendo que las APC pueden interferir con un paso temprano en los eventos de

transducción de señales lipídicas en células proliferativas, lo cual puede ser responsable de su capacidad para inhibir el crecimiento celular (Arthur y Bittman, 1998; Uberall *et al.*, 1991).

Varios autores han descrito que la HePC actúa sobre la actividad proteína quinasa C (PKC) en determinadas líneas celulares, pero por ahora el papel de las APC como agonistas o antagonistas de PKC, así como la significación biológica de esta acción, permanece sin aclarar (Heesbeen *et al.*, 1991; Shoji *et al.*, 1991; Uberall *et al.*, 1991). La HePC inhibe a la PKC en células HL-60 (leucemia) (Shoji *et al.*, 1991), sin embargo esta inhibición no se correlaciona con el efecto antiproliferativo de la HePC (Berkovic *et al.*, 1994).

Es posible, asimismo, una acción inhibitoria indirecta de la HePC sobre la biosíntesis *de novo* de fosfatidilcolina a través de la inhibición de la PKC (Geilen *et al.*, 1992), ya que ésta interviene en la regulación de la actividad colina-fosfato citidililtransferasa por fosforilación/desfosforilación (Kolesnick, 1987). No obstante, se observa un efecto inhibitor adicional de la HePC sobre la biosíntesis de fosfatidilcolina que no está mediado indirectamente por la PKC, y que es observable cuando desensibilizamos las células e inactivamos ciertas isoenzimas PKC  $Ca^{2+}$ -dependientes mediante tratamiento prolongado con ésteres de forbol (Geilen *et al.*, 1992; Posse de Chaves *et al.*, 1995; Wieder *et al.*, 1993). Así, distintos autores indican que los efectos ocasionados por la HePC probablemente no están mediados por inhibición de la PKC (Berkovic, 1998; Posse de Chaves *et al.*, 1995; Wieder *et al.*, 1998).

Los lípidos-éter, por ejemplo ET-18-OCH<sub>3</sub> y el análogo tioéter BM 41.440 (ilmofosina), sí parecen presentar un mecanismo de acción vía inhibición de PKC, alterando así las funciones que ésta regula (Pauig y Daniel, 1996). De este modo, inhiben el crecimiento de células neoplásicas, induciendo además apoptosis (Boggs *et al.*, 1995b). No obstante también ocurren otros eventos, como la inhibición de la fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (Pawelczyk y Lowenstein, 1993), del metabolismo de lisofosfolípidos (Herrmann y Neumann, 1986) y de la biosíntesis de fosfatidilcolina (Boggs *et al.*, 1995a; Baburina y Jackowski, 1998). ET-18-OCH<sub>3</sub>, a bajas concentraciones, tiende a estabilizar la estructura en bicapa, disminuyendo la tendencia a

formar estructuras lipídicas no-bicapa, de modo que se espera que actúe como un inhibidor de la PKC (Sanchez-Pinera *et al.*, 1999).

Otros mecanismos de importancia que pueden ser relevantes para los efectos biológicos causados por la HePC son la inhibición de las fosfolipasas C específicas de fosfatidilinositol y fosfatidilcolina (Berkovic *et al.*, 1996; Pawelczyk y Lowenstein, 1993; Uberall *et al.*, 1991) y de la fosfolipasa A<sub>2</sub> (Berkovic *et al.*, 1997), así como la activación de la fosfolipasa D (Lucas *et al.*, 2001; Wieder *et al.*, 1996). Se propone, por tanto, que la acción de las APC sobre las fosfolipasas puede desempeñar un papel importante en su capacidad antineoplásica, aunque los resultados obtenidos por otros autores resultan en ocasiones contradictorios (Ries *et al.*, 1993).

La citotoxicidad causada por HePC puede estar también relacionada con una disrupción de la homeostasis del calcio intracelular (Bergmann *et al.*, 1994), consecuencia indirecta de la interferencia ejercida sobre diversos mecanismos de señalización celular. El calcio es reconocido como un importante regulador de muchas funciones celulares esenciales, incluyendo proliferación y diferenciación (Lu y Means, 1993). Además, una alteración en su regulación puede conducir a un incontrolado y sostenido aumento en su concentración intracelular, lo cual se asocia con muerte celular (Trump y Berezsky, 1995). Así, Henke y colaboradores (1999) han descrito que la HePC induce apoptosis en células KB (carcinoma) provocando a su vez un incremento sostenido en la concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup>. Interesantemente, estas células no manifestaron signos de apoptosis ni aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular cuando se incubaron con HePC en medio libre de Ca<sup>2+</sup>, indicando que la HePC estimuló la entrada de iones Ca<sup>2+</sup>, vía canales de calcio, desde el espacio extracelular.

Otros autores han mostrado que la exposición celular a HePC conlleva una reducción en la biosíntesis de fosfatidilcolina en células MDCK (Wieder *et al.*, 1995), HaCaT (Wieder *et al.*, 1998) o HL-60 (Boggs *et al.*, 1998), mediante una inhibición de la enzima limitante de su síntesis *de novo*, CTP:colina-fosfato citidililtransferasa (CT). Además, se ha descrito que la HePC inhibe también la actividad CT *in vitro* (Boggs *et al.*, 1998; Geilen *et al.*, 1992; Haase *et*

*al.*, 1991; Wieder *et al.*, 1995). La inhibición de la biosíntesis de fosfatidilcolina, fosfolípido mayoritario de la membrana y que, además, está implicado en señalización intracelular, puede estar relacionado, al menos en parte, con los efectos antiproliferativos de la HePC. En neuronas de rata, por otra parte, la HePC disminuye la toma celular de colina e inhibe de este modo la biosíntesis de fosfatidilcolina sin inhibir la actividad CT, reduciendo la elongación axonal (Posse de Chaves *et al.*, 1995).

La importancia fisiológica de la reducción en la producción de fosfatidilcolina para explicar los efectos biológicos ocasionados por los alquilliso-derivados de los fosfolípidos permanece aún controvertida (Berkovic *et al.*, 1995; Zhou y Arthur, 1995). No obstante, cambios sutiles en determinadas poblaciones fosfolípicas pueden tener efectos significativos en la respuesta biológica emitida por la célula. En cualquier caso, la influencia de estos agentes puede ser multifactorial, y ser resultado de acciones combinadas sobre distintos sitios celulares.

Las propiedades inhibitoras de las APC sobre la biosíntesis de fosfatidilcolina dependen de la longitud de la cadena alquilo, siendo además esencial el grupo de cabeza colina para el efecto inhibitor (Geilen *et al.*, 1994a). En este sentido, se observa cómo la HePC inhibe la incorporación de colina marcada isotópicamente a fosfatidilcolina en células MDCK, afectando a la distribución subcelular de la CT, mientras que los compuestos análogos hexadecilfosfoetanolamina y hexadecilfosfoserina no ejercen tales efectos (Geilen *et al.*, 1994b).

La HePC parece perturbar las interacciones lípido-proteína de proteínas de membrana, tanto para PKC como para CT (Geilen *et al.*, 1994b), posiblemente como consecuencia de cambios en las propiedades físicas de las membranas celulares, o bien al actuar como ligando de proteínas de membrana. Como hemos indicado, HePC y ET-18-OCH<sub>3</sub> son análogos de la lisofosfatidilcolina, un regulador fisiológico que inhibe la actividad citidililtransferasa (Boggs *et al.*, 1995a), ocasionando por tanto la inhibición de la biosíntesis de fosfatidilcolina.



Finalmente, hemos de indicar que los efectos causados por estos agentes, tanto citotóxicos como citostáticos, ocurren a concentraciones no líticas, descartándose por completo una acción inespecífica debida a la alteración de la constitución de la membrana (Wieder *et al.*, 1999).

La HePC, y las APC en general, inducen muerte celular por apoptosis en ciertos tipos celulares. Así, Wieder y colaboradores (1998) describieron que una exposición de células HaCaT, una línea celular humana de keratinocitos, a la HePC inhibe la biosíntesis de fosfatidilcolina y esfingomiélin y incrementa la producción de ceramida intracelular, desencadenando a su vez apoptosis. Por tanto, se establece la hipótesis de que la inhibición de la síntesis de fosfatidilcolina en la etapa catalizada por la CT es la causa que subyace a la apoptosis inducida por HePC (Boggs *et al.*, 1998; Wieder *et al.*, 1998) y ET-18-OCH<sub>3</sub> (Baburina y Jackowski, 1998; Boggs *et al.*, 1995b).

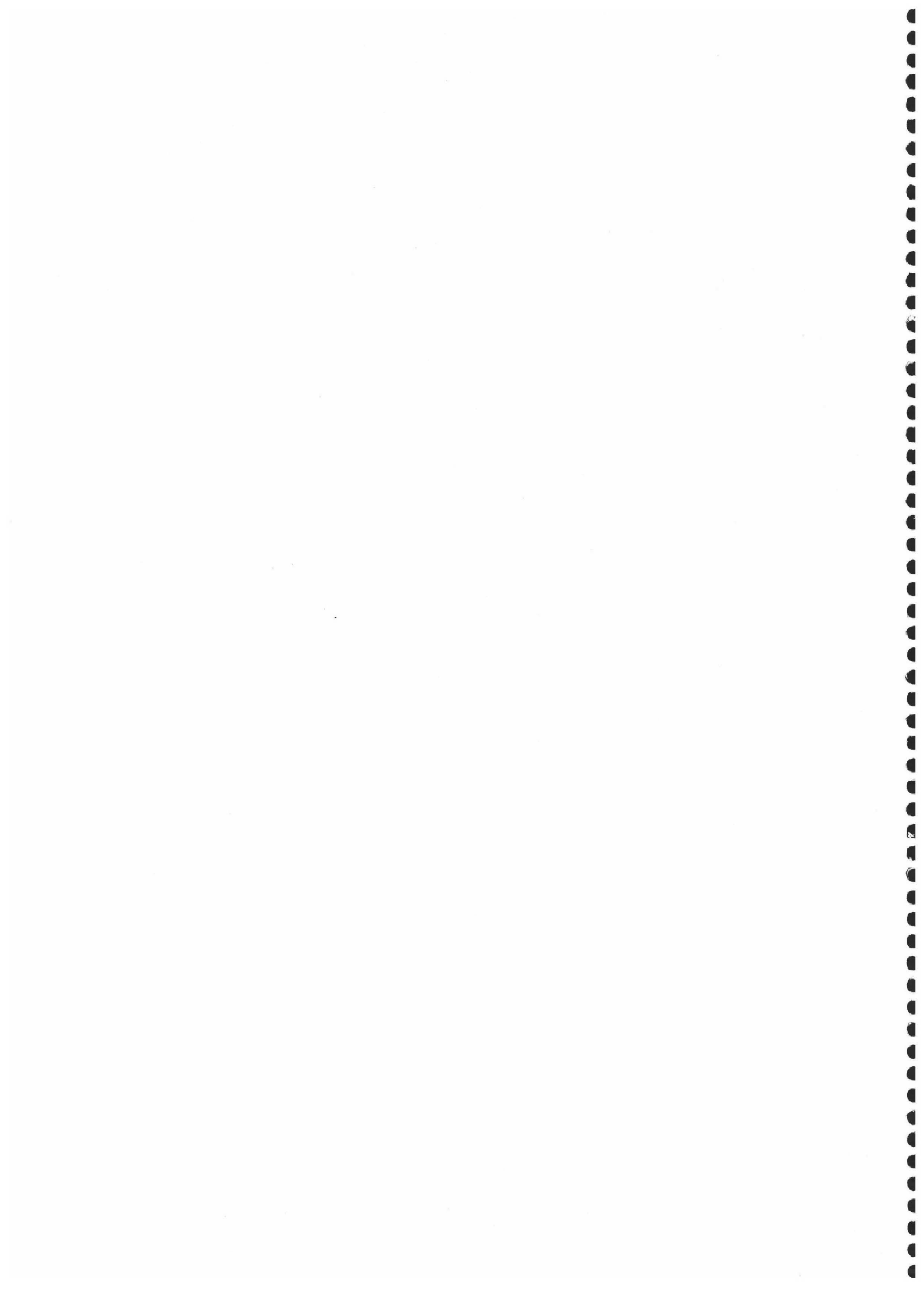
## ESTUDIO DE LAS ACCIONES DE LA HEXADECILFOSFOCOLINA Y SUS EFECTOS EN CÉLULAS HepG2

Se ha demostrado que la HePC ejerce una actividad antineoplásica *in vitro* e *in vivo* (Berkovic, 1998; Holy *et al.*, 2001), especialmente en el tratamiento tópico de metástasis de piel procedentes del carcinoma mamario humano (Clive *et al.*, 1999). Sin embargo, no se ha realizado ningún estudio específico, para nuestro conocimiento, acerca de su influencia y efectos sobre líneas celulares de procedencia hepática.

Como se indicó anteriormente, las APC pueden acumularse en hígado tras administrarse por distintas vías, incorporándose principalmente a las membranas celulares. De este modo, alteran las propiedades físicas de las membranas y los procesos celulares asociados a membrana, provocando efectos antiproliferativos y citotóxicos. Por tanto, en nuestro estudio hemos utilizado el modelo celular hepático HepG2 para analizar las alteraciones ocasionadas por la HePC a nivel

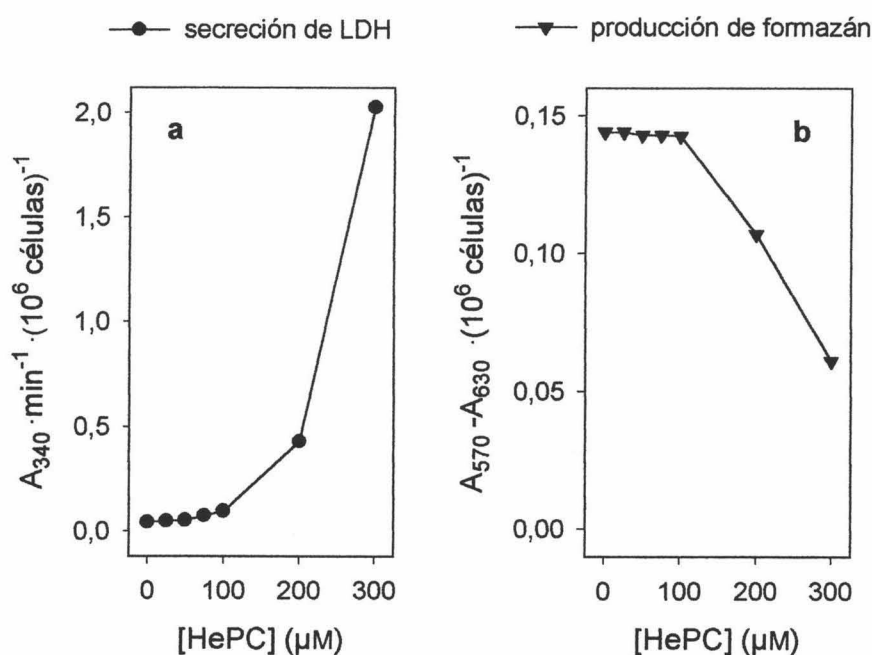
del metabolismo lipídico, tratando de dilucidar los mecanismos bioquímicos por los cuales este agente, representativo de las APC, ejerce su actividad antitumoral.

## **Resultados**



## I. ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y ANTIPROLIFERATIVA DE LA HEXADECILFOSFOCOLINA EN CÉLULAS HepG2

Para examinar el efecto tóxico de la hexadecilfosfocolina, las células HepG2 en proliferación fueron expuestas a distintas concentraciones de hexadecilfosfocolina durante 6 h. Medimos, entonces, la liberación de LDH al medio extracelular y cuantificamos la producción de formazán a partir del MTT.



**Figura 18. Efecto citotóxico de la hexadecilfosfocolina en células HepG2.** Las células, en fase logarítmica de crecimiento, fueron incubadas durante 6 h en EMEM/10% FCS suplementado con diferentes concentraciones de hexadecilfosfocolina. La liberación de LDH al medio se expresa como variación de absorbancia medida a 340 nm por min y millón de células (a), mientras que la producción de formazán a partir del MTT se determina como absorbancia medida a 570 nm, con sustracción del fondo a 630 nm, por millón de células (b). Los resultados son media de tres determinaciones en respuesta a cada dosis.

Como se muestra en la Figura 18(a), concentraciones de hexadecilfosfocolina inferiores a 100  $\mu\text{M}$  no provocan una liberación significativa de LDH al medio, mientras que la exposición de las células a dosis superiores ocasiona un aumento en la LDH liberada al medio extracelular, indicando que las células son lisadas a elevadas concentraciones de hexadecilfosfocolina. Estos resultados son también confirmados mediante la determinación del formazán producido a partir del MTT, puesto que, como se puede apreciar en la Figura 18(b), la viabilidad celular decae a partir de una concentración 100  $\mu\text{M}$  del agente.

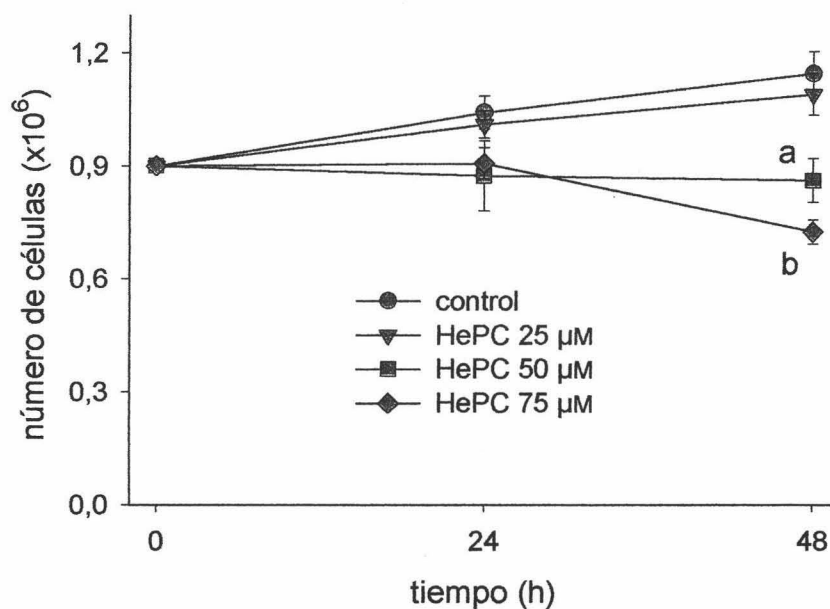
Teniendo en cuenta que la estructura anfifílica de la hexadecilfosfocolina permite su intercalación en la membrana celular, los efectos líticos probablemente son debidos a una permeabilización no específica de la membrana celular. Por tanto, hemos utilizado concentraciones de hexadecilfosfocolina igual o inferiores a 100  $\mu\text{M}$  en todos los experimentos para evitar así la lisis inespecífica de las células.

El efecto antiproliferativo de la hexadecilfosfocolina ha sido demostrado en diferentes tumores y líneas celulares tumorales (Berkovic, 1998), sin embargo no existen datos referentes a su acción sobre células tumorales de procedencia hepática. Para examinar una posible interferencia de la hexadecilfosfocolina en el crecimiento de las células de hepatoma HepG2, las células fueron expuestas a concentraciones 25, 50 y 75  $\mu\text{M}$  de hexadecilfosfocolina durante 48 h.

Como se puede observar en la Figura 19, la concentración de hexadecilfosfocolina 25  $\mu\text{M}$  no afectó significativamente a la velocidad de crecimiento en el transcurso de 48 h, sin embargo concentraciones superiores de hexadecilfosfocolina disminuyeron significativamente la cantidad de células, de forma más acusada a mayor concentración de alquilfosfocolina.

En base a estos datos, se seleccionó una concentración 50  $\mu\text{M}$  de hexadecilfosfocolina para analizar los efectos de la exposición prolongada de las células HepG2 a este agente. La acción citostática observada con esta concentración, en el periodo de tiempo analizado, no puede

ser atribuida a lisis celular, puesto que la reducción en el número de células viables no estuvo acompañada por un incremento significativo en el número de células no viables, como se examinó mediante el ensayo de exclusión del azul de tripán y determinación de la actividad LDH liberada al medio de cultivo.



**Figura 19. Efecto antiproliferativo de la hexadecilfosfocolina en células HepG2.**

Las células, en fase logarítmica de crecimiento, fueron incubadas en EMEM/ 10% FCS suplementado con diferentes concentraciones de hexadecilfosfocolina. A los tiempos seleccionados, realizamos un recuento celular utilizando un hemocitómetro. Los resultados son media de cuatro determinaciones  $\pm$  SEM. La significancia estadística de las diferencias obtenidas con respecto al control está indicada por: <sup>a</sup> $P < 0,02$ ; <sup>b</sup> $P < 0,001$ .

## **II. INFLUENCIA DE LA HEXADECILFOSFOCOLINA SOBRE EL METABOLISMO LIPÍDICO EN CÉLULAS HepG2**

A pesar de haberse establecido, en diversas líneas celulares, múltiples efectos ocasionados por la hexadecilfosfocolina a nivel del metabolismo lipídico, aún no se ha determinado el mecanismo molecular preciso por el cual este compuesto desencadena su actividad antineoplásica. Por tanto, tras examinar la actividad tóxica y antiproliferativa de esta alquilfosfocolina en la línea celular HepG2, nos propusimos analizar los efectos de este agente sobre las principales rutas del metabolismo lipídico en estas células, con objeto de determinar su mecanismo de acción.

### **II.1. INCORPORACIÓN DE PRECURSORES METABÓLICOS A COMPONENTES LIPÍDICOS: SÍNTESIS *DE NOVO* LIPÍDICA**

Las células HepG2 en proliferación fueron incubadas en EMEM/ 10% FCS suplementado con diversos precursores lipogénicos marcados radiactivamente y en presencia de hexadecilfosfocolina, mientras las células controles fueron incubadas en idénticas condiciones pero en ausencia de este agente. De esta manera, hemos examinado la influencia de la hexadecilfosfocolina sobre las principales rutas de síntesis de fosfolípidos y lípidos neutros en estas células, determinando la incorporación de dichos sustratos marcados a los diferentes componentes lipídicos celulares.

#### **II.1.1. INCORPORACIÓN DE [1,2,3-<sup>3</sup>H]GLICEROL**

Teniendo en cuenta la naturaleza lipofílica de la hexadecilfosfocolina y, por tanto, su probable acción a nivel de membranas celulares, se decidió inicialmente analizar los efectos de una exposición celular a este agente durante distintos periodos de tiempo: 30 min, suficiente



para producir efectos a nivel de membrana, y 6 h, con objeto de observar algún tipo de alteración metabólica.

En la Tabla XVI se puede observar que la exposición de las células HepG2 a hexadecilfosfolina durante cortos periodos de tiempo (30 min) no afecta de forma significativa a la incorporación de glicerol a los distintos fosfolípidos, mientras que cuando se prolonga el tratamiento durante 6 h se produce una reducción significativa en la radiactividad asociada a fosfatidilcolina y fosfatidilserina, no modificándose sin embargo los niveles radiactivos asociados al resto de fosfolípidos analizados.

**TABLA XVI. Efectos del tratamiento de hexadecilfosfolina 50  $\mu\text{M}$  sobre la incorporación de [1,2,3- $^3\text{H}$ ]glicerol a fosfolípidos en células HepG2.** Las células en fase logarítmica de crecimiento fueron incubadas durante 6 h en EMEM/ 10% FCS conteniendo [1,2,3- $^3\text{H}$ ]glicerol (25  $\mu\text{M}$ , 680 Ci  $\cdot\text{mol}^{-1}$ ). El tratamiento de HePC 50  $\mu\text{M}$  fue suministrado durante el periodo completo de 6 h o bien durante únicamente los 30 min finales de incubación.

	<i>pmol <math>\cdot</math> mg proteína<math>^{-1}</math></i>		
	<i>Control</i>	<i>HePC 50 <math>\mu\text{M}</math> (0,5 h)</i>	<i>HePC 50 <math>\mu\text{M}</math> (6 h)</i>
Fosfatidilcolina	1107,8 $\pm$ 40,9	1119,7 $\pm$ 9,6	833,9 $\pm$ 57,6 <sup>a</sup>
Fosfatidiletanolamina	695,6 $\pm$ 21,9	720,4 $\pm$ 14,6	729,5 $\pm$ 26,1
Fosfatidilinositol	143,4 $\pm$ 9,0	161,5 $\pm$ 3,5	168,1 $\pm$ 4,5
Fosfatidato	44,9 $\pm$ 1,1	43,6 $\pm$ 1,0	50,7 $\pm$ 2,1
Fosfatidilserina	41,8 $\pm$ 2,4	46,7 $\pm$ 1,1	33,9 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>

Los resultados son media de cuatro determinaciones  $\pm$  SEM, expresados como pmol de glicerol incorporados por mg de proteína. La significancia estadística de las diferencias obtenidas con respecto a los controles está indicada por: <sup>a</sup> $P < 0,02$ ; <sup>b</sup> $P < 0,002$ .

**TABLA XVII. Efectos del tratamiento de hexadecilfosfolina 50  $\mu\text{M}$  sobre la incorporación de [1,2,3- $^3\text{H}$ ]glicerol a lípidos neutros en células HepG2.** Las células en fase logarítmica de crecimiento fueron incubadas durante 6 h en EMEM/ 10% FCS suplementado con [1,2,3- $^3\text{H}$ ]glicerol (25  $\mu\text{M}$ , 680 Ci  $\cdot$  mol $^{-1}$ ). El tratamiento de HePC 50  $\mu\text{M}$  fue suministrado durante el periodo completo de 6 h o bien durante únicamente los 30 min finales de incubación.

	<i>pmol <math>\cdot</math> mg proteína<math>^{-1}</math></i>		
	<i>Control</i>	<i>HePC 50 <math>\mu\text{M}</math> (0,5 h)</i>	<i>HePC 50 <math>\mu\text{M}</math> (6 h)</i>
Triacilglicerol	866,5 $\pm$ 33,1	860,1 $\pm$ 12,3	1124,6 $\pm$ 6,3 <sup>a</sup>
Diacilglicerol	90,3 $\pm$ 2,0	90,8 $\pm$ 0,7	128,7 $\pm$ 1,3 <sup>a</sup>

Los resultados son media de cuatro determinaciones  $\pm$  SEM, expresados como pmol de glicerol incorporados por mg de proteína. La significancia estadística de las diferencias obtenidas con respecto a los controles está indicada por: <sup>a</sup> $P < 0,0004$ .

Con respecto a la incorporación de radiactividad a lípidos neutros, en la Tabla XVII se observa que la adición de hexadecilfosfolina 50  $\mu\text{M}$  durante un periodo de incubación de 6 h ocasiona un aumento significativo en la radiactividad asociada a triacilglicerol y diacilglicerol. Es interesante indicar que cuando las células se exponen a este agente durante tan sólo 30 min no se aprecia modificación en la incorporación de glicerol a ninguno de los lípidos neutros analizados, de modo análogo a lo observado en las fracciones de fosfolípidos.

### II.1.2. INCORPORACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

Las células HepG2 han sido incubadas en presencia de ácidos grasos exógenos marcados isotópicamente y tratadas simultáneamente con hexadecilfosfolina, con objeto de analizar la

influencia del agente sobre la incorporación de dichos ácidos grasos a los diferentes lípidos celulares. Para llevar a cabo este estudio se han utilizado dos ácidos grasos que difieren marcadamente en su grado de saturación: el ácido graso saturado palmitato (16:0), y el ácido graso poliinsaturado araquidonato ( $\Delta^{5,8,11,14}$ -20:4).

#### II.1.2.1. INCORPORACIÓN DE [1- $^{14}$ C]PALMITATO

De manera similar a los experimentos realizados utilizando glicerol como precursor lipogénico, las células fueron tratadas con hexadecilfosfocolina 50  $\mu$ M durante distintos periodos de tiempo. Tras recoger las células, los lípidos fueron extraídos y separados mediante TLC, y se determinó la incorporación de radiactividad procedente del grupo acilo marcado a diferentes componentes lipídicos celulares.

En las Tablas XVIII y XIX se presentan los valores de incorporación de palmitato marcado isotópicamente a los distintos fosfolípidos y lípidos neutros, respectivamente. Según se puede observar, el tratamiento de hexadecilfosfocolina durante 6 h causa una disminución significativa en la incorporación de radiactividad a fosfatidilcolina, fosfatidilserina y esfingomiélna, sin afectar a la de fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol (Tabla XVIII). Tampoco en este caso la exposición de las células a la alquilfosfocolina durante un periodo corto de tiempo modifica de manera apreciable la incorporación del ácido graso a ninguno de los fosfolípidos analizados.

En cuanto a la incorporación de palmitato marcado a los diferentes lípidos neutros analizados, en la Tabla XIX se observa cómo aunque la exposición de las células a hexadecilfosfocolina durante cortos periodos de tiempo no produce alteración en la velocidad de incorporación de palmitato a los distintos lípidos neutros, cuando se prolonga el tratamiento durante 6 h se produce un aumento significativo en la producción de triacilglicerol, diacilglicerol y ceramida, mientras la síntesis de los ésteres de colesterol se muestra drásticamente reducida por la alquilfosfocolina.

**TABLA XVIII. Efectos del tratamiento de hexadecilfosfolina 50  $\mu\text{M}$  sobre la incorporación de  $[1-^{14}\text{C}]$ palmitato a fosfolípidos en células HepG2.** Las células en fase logarítmica de crecimiento fueron incubadas durante 6 h en EMEM/ 10% FCS suplementado con  $[1-^{14}\text{C}]$ palmitato ( $100 \mu\text{M}$ ,  $17 \text{ Ci} \cdot \text{mol}^{-1}$ ). Las células fueron expuestas a la presencia de hexadecilfosfolina  $50 \mu\text{M}$  durante 6 h ó 30 min.

	<i>nmol · mg proteína<sup>-1</sup></i>		
	<i>Control</i>	<i>HePC 50 <math>\mu\text{M}</math> (0,5 h)</i>	<i>HePC 50 <math>\mu\text{M}</math> (6 h)</i>
Fosfatidilcolina	$40,13 \pm 0,73$	$43,27 \pm 1,12$	$36,15 \pm 0,24^b$
Fosfatidiletanolamina	$18,70 \pm 0,71$	$20,72 \pm 0,59$	$18,85 \pm 0,18$
Fosfatidilinositol	$3,18 \pm 0,16$	$3,50 \pm 0,11$	$3,19 \pm 0,08$
Fosfatidilserina	$2,01 \pm 0,08$	$2,13 \pm 0,03$	$1,45 \pm 0,08^b$
Esfingomielina	$1,09 \pm 0,06$	$1,02 \pm 0,07$	$0,82 \pm 0,06^a$

Los resultados son media de tres determinaciones  $\pm$  SEM, expresados como nmol de palmitato incorporados por mg de proteína. El experimento fue repetido, prolongando la incubación de palmitato marcado hasta las 24 h, obteniéndose similares resultados. La significancia estadística de las diferencias obtenidas con respecto a los controles está indicada por: <sup>a</sup> $P < 0,03$ ; <sup>b</sup> $P < 0,008$ .

Hemos de indicar que la prolongación del periodo de exposición a hexadecilfosfolina durante 24 h produjo resultados similares a nivel de fosfolípidos y lípidos neutros.

#### II.1.2.2. INCORPORACIÓN DE $[1-^{14}\text{C}]$ ARAQUIDONATO

De forma similar a como se describió en el apartado anterior utilizando palmitato, hemos examinado la influencia del tratamiento de hexadecilfosfolina sobre la incorporación de araquidonato marcado isotópicamente a los grupos acilo de fosfolípidos y lípidos neutros en

estas células. Dado el menor nivel de incorporación de este ácido graso a los lípidos celulares, se consideró conveniente incrementar el periodo de incubación hasta 24 h. Así, las células HepG2 fueron incubadas durante 24 h en presencia de araquidonato marcado y hexadecilfosfolina, mientras las células controles no fueron tratadas con el agente. Las células fueron recogidas y los lípidos extraídos y separados mediante TLC, determinándose la incorporación de radiactividad procedente del grupo acilo marcado a los diferentes componentes lipídicos celulares. Los resultados obtenidos aparecen recogidos en las Tablas XX y XXI.

**TABLA XIX. Efectos del tratamiento de hexadecilfosfolina 50  $\mu\text{M}$  sobre la incorporación de [1- $^{14}\text{C}$ ]palmitato a lípidos neutros en células HepG2.** Las células en fase logarítmica de crecimiento fueron incubadas durante 6 h en EMEM/ 10% FCS suplementado con [1- $^{14}\text{C}$ ]palmitato (100  $\mu\text{M}$ , 17 Ci  $\cdot\text{mol}^{-1}$ ). Las células fueron expuestas a la presencia de hexadecilfosfolina 50  $\mu\text{M}$  durante 6 h ó 30 min.

	<i>nmol <math>\cdot</math> mg proteína<math>^{-1}</math></i>		
	<i>Control</i>	<i>HePC 50 <math>\mu\text{M}</math> (0,5 h)</i>	<i>HePC 50 <math>\mu\text{M}</math> (6 h)</i>
Triacilglicerol	39,86 $\pm$ 1,91	43,90 $\pm$ 0,91	49,23 $\pm$ 2,01 <sup>a</sup>
Diacilglicerol	2,45 $\pm$ 0,25	3,31 $\pm$ 0,31	5,57 $\pm$ 0,55 <sup>b</sup>
Ésteres de colesterol	0,92 $\pm$ 0,05	1,14 $\pm$ 0,11	0,48 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>
Ceramidas	0,74 $\pm$ 0,03	0,86 $\pm$ 0,06	1,03 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>

Los resultados son media de tres determinaciones  $\pm$  SEM, expresados como nmol de palmitato incorporados por mg de proteína. El experimento fue repetido, prolongando la incubación de palmitato marcado hasta las 24 h, obteniéndose similares resultados. La significancia estadística de las diferencias obtenidas con respecto a los controles está indicada por: <sup>a</sup> $P < 0,03$ ; <sup>b</sup> $P < 0,008$ .

**TABLA XX. Efectos del tratamiento de hexadecilfosfocolina 50  $\mu\text{M}$  sobre la incorporación de  $[1-^{14}\text{C}]$ araquidonato a fosfolípidos en células HepG2.** Las células en fase logarítmica de crecimiento fueron incubadas durante 24 h en EMEM/ 10% FCS suplementado con  $[1-^{14}\text{C}]$ araquidonato (100  $\mu\text{M}$ , 58 Ci  $\cdot\text{mol}^{-1}$ ) y HePC 50  $\mu\text{M}$ .

	<i>nmol <math>\cdot\text{mg proteína}^{-1}</math></i>	
	<i>Control</i>	<i>HePC 50 <math>\mu\text{M}</math></i>
Fosfatidilcolina	$12,29 \pm 0,20$	$10,93 \pm 0,14^b$
Fosfatidiletanolamina	$11,66 \pm 0,35$	$14,05 \pm 0,31^b$
Fosfatidilinositol	$4,11 \pm 0,20$	$4,01 \pm 0,09$
Fosfatidilserina	$2,34 \pm 0,07$	$2,03 \pm 0,04^a$
Esfingomielina	$0,21 \pm 0,01$	$0,19 \pm 0,01$

Los resultados son media de tres determinaciones  $\pm$  SEM, expresados como nmol de araquidonato incorporados por mg de proteína. La significancia estadística de las diferencias obtenidas con respecto a los controles está indicada por: <sup>a</sup> $P < 0,02$ ; <sup>b</sup> $P < 0,007$ .

En la Tabla XX podemos observar cómo, nuevamente, el tratamiento de hexadecilfosfocolina ocasiona una reducción significativa en la incorporación de araquidonato a fosfatidilcolina y fosfatidilserina, aunque en este caso los niveles radiactivos de esfingomielina no aparecen modificados de manera apreciable. Por otra parte, la exposición de las células a hexadecilfosfocolina incrementa la incorporación de radiactividad procedente del araquidonato a fosfatidiletanolamina. El marcaje radiactivo en las fracciones de ceramida y esfingomielina, a partir del araquidonato marcado, procede únicamente del proceso de esterificación de la esfingosina, de manera que los niveles de incorporación observados son notablemente inferiores a los determinados durante la incubación con palmitato marcado. No obstante, la hexadecilfosfocolina sí causa un significativo aumento en la producción de ceramida, sugiriendo

que la población de ceramida intracelular recién sintetizada puede estar incrementada en respuesta a la acción de la hexadecilfosfolina.

**TABLA XXI. Efectos del tratamiento de hexadecilfosfolina 50  $\mu\text{M}$  sobre la incorporación de  $[1-^{14}\text{C}]$ araquidonato a lípidos neutros en células HepG2.** Las células en fase logarítmica de crecimiento fueron incubadas durante 24 h en EMEM/ 10% FCS suplementado con  $[1-^{14}\text{C}]$ araquidonato (100  $\mu\text{M}$ , 58 Ci  $\cdot\text{mol}^{-1}$ ) y HePC 50  $\mu\text{M}$ .

	<i>nmol <math>\cdot</math> mg proteína<sup>-1</sup></i>	
	<i>Control</i>	<i>HePC 50 <math>\mu\text{M}</math></i>
Triacilglicerol	10,45 $\pm$ 0,40	11,35 $\pm$ 0,32
Ésteres de colesterol	0,47 $\pm$ 0,04	0,07 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>
Diacilglicerol	0,26 $\pm$ 0,01	0,39 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>
Ceramidas	0,08 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>

Los resultados son media de tres determinaciones  $\pm$  SEM, expresados como nmol de araquidonato incorporados por mg de proteína. La significancia estadística de las diferencias obtenidas con respecto a los controles está indicada por: <sup>a</sup> $P < 0,02$ ; <sup>b</sup> $P < 0,007$ .

Es interesante indicar que en este caso, aunque la producción de diacilglicerol aparece incrementada como consecuencia del tratamiento de hexadecilfosfolina, la radiactividad asociada a triacilglicerol no muestra alteración por efecto de este agente (Tabla XXI). Asimismo, es de destacar la drástica inhibición que produce la hexadecilfosfolina en la síntesis *de novo* de araquidonato de colesterilo, de forma similar a lo observado tras incubación con palmitato, indicando de nuevo que este agente afecta a la actividad acil-CoA:colesterol O-aciltransferasa (ACAT).

### II.1.3. INCORPORACIÓN DE BASES NITROGENADAS

Los resultados obtenidos tras la incubación con glicerol y ácidos grasos exógenos indican que el tratamiento de hexadecilfosfocolina ocasiona una alteración en la incorporación de radiactividad a distintos fosfolípidos en las células HepG2, sugiriendo efectos específicos de este agente sobre las diversas rutas de síntesis *de novo* de fosfolípidos. Por ello, a continuación, para examinar más en profundidad la influencia de la hexadecilfosfocolina sobre tales rutas biosintéticas, se utilizaron como precursores metabólicos la base nitrogenada constitutiva de la cabeza polar de los distintos fosfolípidos, marcada radiactivamente, siendo expuestas las células simultáneamente a tratamiento de hexadecilfosfocolina.

En primer lugar, incubamos las células en presencia de L-serina marcada, determinando su incorporación, principalmente a través de la reacción de intercambio de bases, a diferentes fosfolípidos celulares. Posteriormente, la incubación con etanolamina marcada nos ha permitido examinar la síntesis de fosfatidiletanolamina a través del intermediario CDP-etanolamina, así como estudiar el proceso de síntesis de fosfatidilcolina mediante metilación sucesiva de la fosfatidiletanolamina. Por último, incubamos las células con colina marcada isotópicamente, analizando de esta forma la ruta de síntesis de fosfatidilcolina vía CDP-colina.

#### **II.1.3.1. INCORPORACIÓN DE L-[3-H<sup>3</sup>]SERINA. INFLUENCIA DE LA HEXADECILFOSFOCOLINA SOBRE LA ACTIVIDAD FOSFATIDILSERINA SINTASA**

La serina exógena, como sustrato metabólico, es incorporada tanto a las cabezas polares de los fosfolípidos, a través de la reacción de intercambio de bases, como a la porción apolar de los distintos lípidos, mediante su transformación en acetyl-CoA y generación de ácidos grasos. En la Tabla XXII están indicados los valores obtenidos acerca de la incorporación de radiactividad procedente de la serina marcada a diferentes lípidos celulares, tanto en células tratadas con hexadecilfosfocolina como en controles. Como se puede comprobar, la alquilfosfocolina produce pequeñas alteraciones en la incorporación de serina a lípidos celulares. Así, los niveles radiactivos de triacilglicerol están levemente incrementados, mientras que los



niveles radiactivos de ceramida, al contrario de lo observado al utilizar ácidos grasos exógenos como precursores lipogénicos, aparecen ligeramente disminuidos en las células tratadas con hexadecilfosfolina.

**TABLA XXII. Efectos del tratamiento de hexadecilfosfolina 50  $\mu\text{M}$  sobre la incorporación de L-[3- $^3\text{H}$ ]serina a distintos lípidos en células HepG2.** Las células en fase logarítmica de crecimiento fueron incubadas durante 6 h en EMEM/ 10% FCS suplementado con L-[3- $^3\text{H}$ ]serina (100  $\mu\text{M}$ , 15 Ci  $\cdot\text{mol}^{-1}$ ) y HePC 50  $\mu\text{M}$ .

	<i>nmol <math>\cdot\text{mg proteína}^{-1}</math></i>	
	<i>Control</i>	<i>HePC 50 <math>\mu\text{M}</math></i>
<i>Fosfolípidos</i>		
Fosfatidilserina	0,517 $\pm$ 0,023	0,462 $\pm$ 0,014
Fosfatidiletanolamina	0,230 $\pm$ 0,010	0,233 $\pm$ 0,004
Fosfatidilcolina	0,109 $\pm$ 0,003	0,104 $\pm$ 0,006
Esfingomielina	0,069 $\pm$ 0,001	0,071 $\pm$ 0,001
Fosfatidilinositol	0,009 $\pm$ 0,001	0,013 $\pm$ 0,001
<i>Lípidos neutros</i>		
Ceramida	0,142 $\pm$ 0,004	0,121 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup>
Triacilglicerol	0,132 $\pm$ 0,005	0,158 $\pm$ 0,003 <sup>a</sup>

Los resultados son media de tres determinaciones  $\pm$  SEM, expresados como nmol de serina incorporados por mg de proteína. El experimento fue repetido obteniéndose resultados similares. La significancia estadística de las diferencias obtenidas con respecto a los controles está indicada por: <sup>a</sup> $P < 0,02$ .

Es de destacar que el tratamiento de hexadecilfosfolina no ocasiona alteraciones significativas en la radiactividad asociada a los distintos fosfolípidos analizados. Estos resultados sugieren que este agente no afecta significativamente al proceso de síntesis de

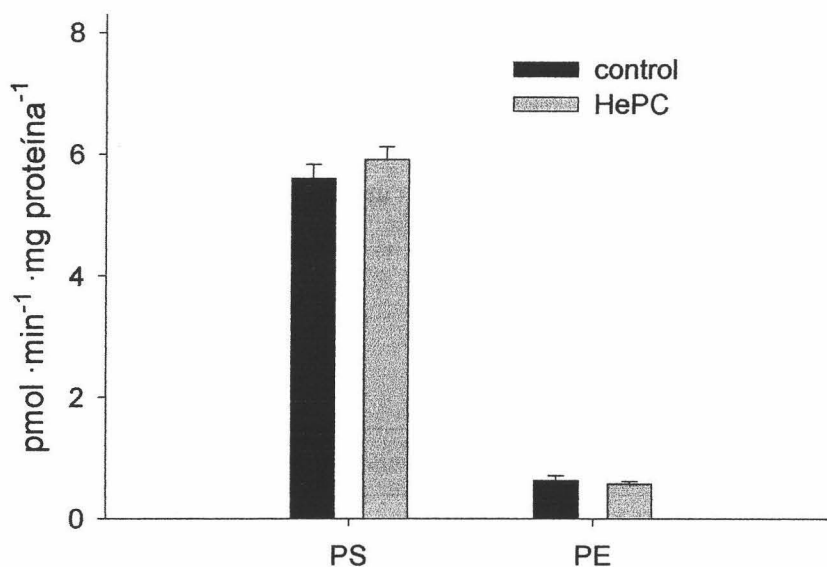
fosfatidilserina vía reacción de intercambio de bases, ni modifica tampoco la producción de fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina a partir de la fosfatidilserina. Con objeto de comprobar que efectivamente la alquilfosfocolina no afecta a la síntesis de fosfatidilserina por reacción de intercambio de bases, decidimos examinar *in vitro* la influencia de este agente sobre la actividad fosfatidilserina sintasa.

Para ello, las células fueron incubadas durante 6 h en presencia de hexadecilfosfocolina 50  $\mu\text{M}$ , y se realizó la medida de la actividad fosfatidilserina sintasa en el homogeneizado celular sonificado. Hemos de indicar que en este sistema de ensayo la actividad fosfatidilserina sintasa vendrá determinada por la suma de las actividades correspondientes a la reacción de intercambio de bases, que produce fosfatidilserina, y de los procesos de transporte y posterior descarboxilación mitocondrial de la fosfatidilserina sintetizada para generar fosfatidiletanolamina. Por ello, tras el ensayo, se determinó la incorporación de radiactividad procedente de la L-[3- $^3\text{H}$ ]serina a fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina.

Como se observa en la Figura 20, el tratamiento de hexadecilfosfocolina 50  $\mu\text{M}$  no afecta a la actividad fosfatidilserina sintasa determinada *in vitro*. Así, los valores de incorporación de radiactividad a fosfatidilserina, sintetizada mediante reacción de intercambio de bases, y a fosfatidiletanolamina, producida por descarboxilación de fosfatidilserina, no están modificados.

### II.1.3.2. INCORPORACIÓN DE [1,2- $^{14}\text{C}$ ]ETANOLAMINA

Aunque, como se ha indicado anteriormente, la alquilfosfocolina no modifica significativamente la incorporación de glicerol o palmitato a fosfatidiletanolamina, incrementa apreciablemente la incorporación de araquidonato a este fosfolípido. Por ello, para analizar con mayor profundidad la influencia del tratamiento de hexadecilfosfocolina sobre la biosíntesis *de novo* de fosfatidiletanolamina, utilizamos como precursor la etanolamina marcada isotópicamente, y se determinó la incorporación de este sustrato tanto a fosfatidiletanolamina como a los distintos intermediarios solubles de la vía CDP-etanolamina.



**Figura 20.** Efecto de la hexadecilfosfocolina sobre la incorporación de L-[3-<sup>3</sup>H]serina a fosfolípidos en un homogeneizado total de células HepG2. Las células en proliferación fueron incubadas durante 6 h en EMEM/ 10% FCS suplementado con HePC 50  $\mu$ M. Las células fueron recogidas y brevemente sonicadas. La actividad fosfatidilserina sintasa fue determinada *in vitro* incubando el homogeneizado celular en presencia de L-[3-<sup>3</sup>H]serina (50  $\mu$ M, 19 Ci · mol<sup>-1</sup>), y manteniendo la concentración 50  $\mu$ M de hexadecilfosfocolina en el medio de reacción para las células tratadas. Los resultados son media de cuatro determinaciones  $\pm$  SEM, expresados como pmol de serina incorporados por min y mg de proteína.

Como se observa en la Tabla XXIII, la hexadecilfosfocolina causa un ligero, pero significativo, aumento en la incorporación de radiactividad a fosfatidiletanolamina. Es interesante que este cambio esté asociado a una reducción significativa en los niveles radiactivos de etanolamina-fosfato, apreciándose, además, un aumento en la incorporación de radiactividad al producto de la reacción catalizada por la citidililtransferasa, la CDP-etanolamina, aunque este

cambio no llega a ser significativo debido probablemente a la dispersión de nuestros resultados experimentales.

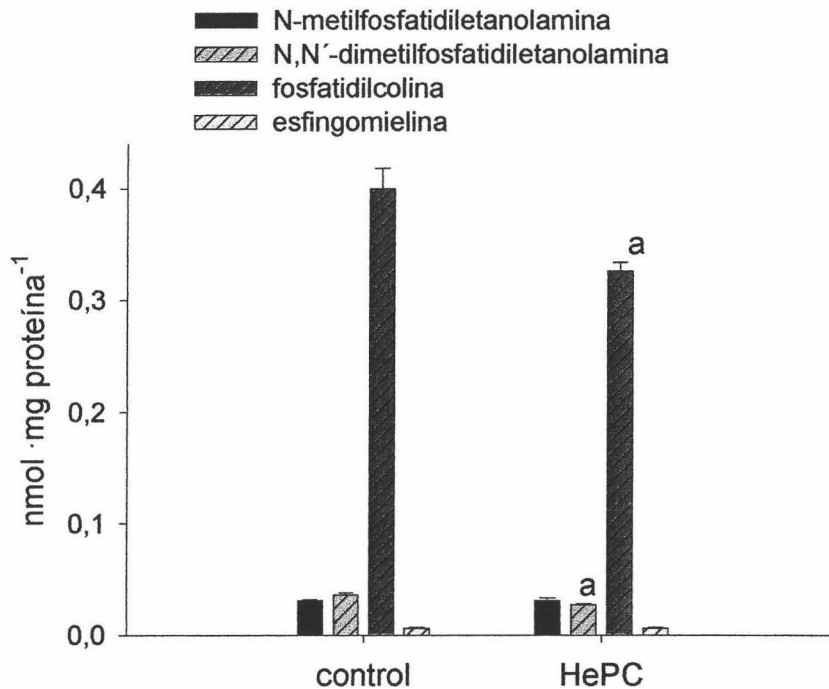
**TABLA XXIII. Efectos de la hexadecilfosfocolina sobre la incorporación de [1,2-<sup>14</sup>C]etanolamina a fosfatidiletanolamina e intermediarios metabólicos de la ruta CDP-etanolamina en células HepG2.** Las células en fase logarítmica de crecimiento fueron incubadas durante 6 h en EMEM/ 10% FCS suplementado con [1,2-<sup>14</sup>C]etanolamina (45  $\mu$ M, 100 Ci  $\cdot$  mol<sup>-1</sup>) y HePC 50  $\mu$ M.

	<i>nmol <math>\cdot</math> mg proteína<sup>-1</sup></i>	
	<i>Control</i>	<i>HePC 50 <math>\mu</math>M</i>
Fosfatidiletanolamina	13,96 $\pm$ 0,30	15,19 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>
Etanolamina	0,06 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,01
Etanolamina-fosfato	5,19 $\pm$ 0,41	4,05 $\pm$ 0,18 <sup>a</sup>
CDP-etanolamina	0,14 $\pm$ 0,01	0,20 $\pm$ 0,05

Los resultados son media de cuatro determinaciones  $\pm$  SEM, expresados como nmol de etanolamina incorporados por mg de proteína. La significancia estadística de las diferencias obtenidas con respecto a los controles está indicada por: <sup>a</sup> $P < 0,05$ ; <sup>b</sup> $P < 0,008$ .

Puesto que la fosfatidiletanolamina puede ser transformada en fosfatidilcolina, durante el ensayo de incorporación de etanolamina marcada, examinamos además la influencia de la hexadecilfosfocolina sobre la síntesis de fosfatidilcolina mediante metilación de fosfatidiletanolamina. En la Figura 21 hemos representado los valores de incorporación de radiactividad a los intermediarios del proceso de metilación de la fosfatidiletanolamina, N-metilfosfatidiletanolamina y N,N'-dimetilfosfatidiletanolamina, y al producto final, fosfatidilcolina. Se incluye, además, la producción de esfingomielina a partir de la

fosfatidilcolina sintetizada por este proceso, marcada por tanto en el grupo de cabeza colinafosfato.



**Figura 21. Efecto de la hexadecilfosfocolina sobre la incorporación de [1,2-<sup>14</sup>C]etanolamina a metilderivados de fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina y esfingomielinea en células HepG2.** Las células en proliferación fueron incubadas durante 6 h en EMEM/ 10% FCS suplementado con [1,2-<sup>14</sup>C]etanolamina (45  $\mu$ M, 100 Ci  $\cdot$ mol<sup>-1</sup>) y HePC 50  $\mu$ M, y se determinó la incorporación de etanolamina marcada a los intermediarios de metilación de fosfatidiletanolamina, así como a fosfatidilcolina y esfingomielinea. Los resultados son media de cuatro determinaciones  $\pm$  SEM, expresados como nmol de etanolamina incorporados por mg de proteína. El experimento fue repetido obteniéndose similares resultados. La significancia estadística de las diferencias obtenidas con respecto a los controles está indicada por: <sup>a</sup> $P < 0,01$ .

Como se observa en la Figura 21, el tratamiento de hexadecilfosfocolina produce una disminución significativa en la incorporación de radiactividad a fosfatidilcolina generada vía metilación de fosfatidiletanolamina. Esta disminución se encuentra asociada a una reducción en los niveles radiactivos del intermediario N,N'-dimetilfosfatidiletanolamina. Estos datos sugieren que la hexadecilfosfocolina inhibe la ruta de metilación de fosfatidiletanolamina en alguna, o varias, de las reacciones catalizadas por las actividades N-metiltransferasa, generando, como consecuencia, una reducción en la síntesis de fosfatilcolina por esta vía de metilación.

### II.1.3.3. INCORPORACIÓN DE [METIL-<sup>14</sup>C]COLINA

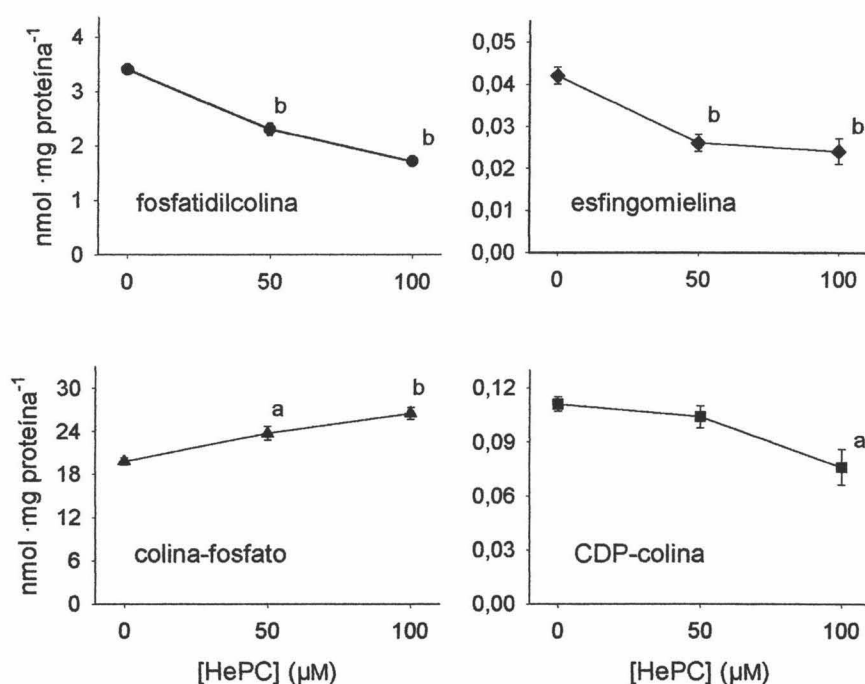
En la presente memoria de Tesis Doctoral, hemos examinado también el efecto de la hexadecilfosfocolina sobre la síntesis de fosfatidilcolina vía CDP-colina usando colina marcada isotópicamente como precursor exógeno. Como se observa en la Figura 22, la hexadecilfosfocolina inhibe la incorporación de colina tanto a fosfatidilcolina como a esfingomielina, siendo el efecto más acusado a mayor concentración de hexadecilfosfocolina.

Respecto a los intermediarios solubles de la vía CDP-colina, en la Figura 22 observamos cómo la hexadecilfosfocolina 50  $\mu\text{M}$  ocasiona un aumento significativo en la radiactividad asociada a colina-fosfato y una disminución en los niveles radiactivos de CDP-colina, comparando con los valores obtenidos en las células controles (ver, además, la Tabla XXIV). De nuevo, estos efectos fueron superiores a una concentración 100  $\mu\text{M}$  de hexadecilfosfocolina.

Es de destacar que la incorporación de radiactividad a betaína, el producto de oxidación de la colina, disminuye tras la exposición de las células a hexadecilfosfocolina 100  $\mu\text{M}$ , como se muestra en la Tabla XXIV, mientras que ninguna de las concentraciones ensayadas causa cambios apreciables en la radiactividad asociada a colina intracelular.

#### II.1.3.3.1. INFLUENCIA DE LA HEXADECILFOSFOCOLINA SOBRE LA TOMA INTRACELULAR DE COLINA EN CÉLULAS HepG2

Puesto que las alteraciones ocasionadas por la hexadecilfosfocolina sobre la incorporación de colina a fosfatidilcolina podían ser debidas a una acción directa sobre el transporte de colina a través de la membrana plasmática, decidimos examinar a continuación un posible efecto de la hexadexadecilfosfocolina sobre la toma de colina exógena.



**Figura 22. Efecto de la hexadecilfosfocolina sobre la incorporación de [metil- $^{14}\text{C}$ ]colina a lípidos en células HepG2.** Las células en proliferación fueron incubadas durante 6 h en EMEM/ 10% FCS suplementado con [metil- $^{14}\text{C}$ ]colina ( $60 \mu\text{M}$ ,  $50 \text{ Ci} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) y diferentes concentraciones de HePC, y se determinó la incorporación de colina a lípidos celulares e intermediarios de la ruta CDP-colina. Los resultados son media de cuatro determinaciones  $\pm$  SEM, expresados como nmol de colina incorporados por mg de proteína. El experimento fue repetido obteniéndose similares resultados. La significancia estadística de las diferencias obtenidas con respecto a los controles está indicada por:  $^a P < 0,03$ ;  $^b P < 0,003$ .

**TABLA XXIV. Efectos de la hexadecilfosfocolina sobre la incorporación de [metil-<sup>14</sup>C]colina a los intermediarios metabólicos de la ruta CDP-colina en células HepG2.** Las células en fase logarítmica de crecimiento fueron incubadas durante 6 h en EMEM/ 10% FCS suplementado con [metil-<sup>14</sup>C]colina (60  $\mu$ M, 50 Ci  $\cdot$  mol<sup>-1</sup>) y diferentes concentraciones de HePC.

	<i>nmol <math>\cdot</math> mg proteína<sup>-1</sup></i>		
	<i>Control</i>	<i>HePC 50 <math>\mu</math>M</i>	<i>HePC 100 <math>\mu</math>M</i>
Colina	0,34 $\pm$ 0,03	0,39 $\pm$ 0,04	0,32 $\pm$ 0,02
Colina-fosfato	19,79 $\pm$ 0,50	23,70 $\pm$ 0,96 <sup>a</sup>	26,50 $\pm$ 0,83 <sup>b</sup>
CDP-colina	0,11 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
Betaína	0,77 $\pm$ 0,04	0,74 $\pm$ 0,06	0,64 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>

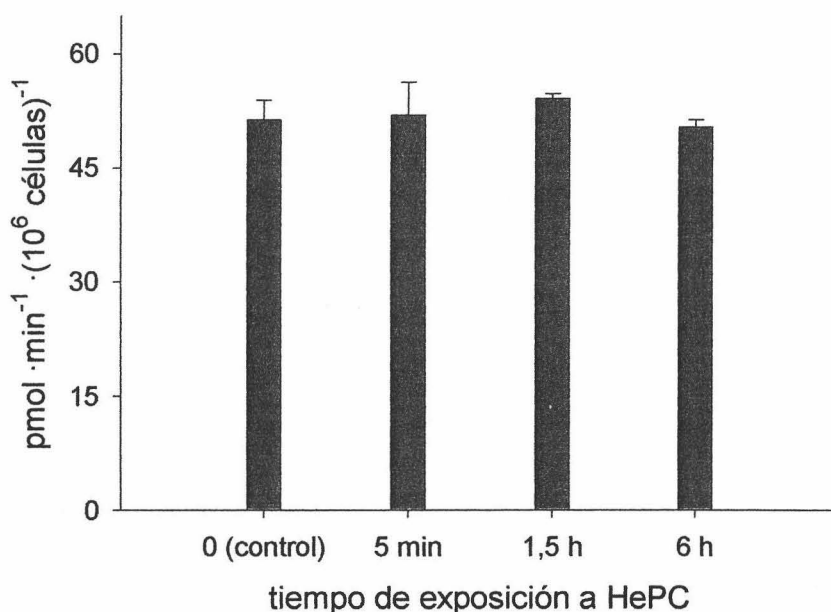
Los resultados son media de cuatro determinaciones  $\pm$  SEM, expresados como nmol de colina incorporados por mg de proteína. La significancia estadística de las diferencias obtenidas con respecto a los controles está indicada por: <sup>a</sup> $P < 0,03$ ; <sup>b</sup> $P < 0,003$ .

Las células HepG2 fueron expuestas a hexadecilfosfocolina 50  $\mu$ M durante diferentes periodos de tiempo, e incubadas inmediatamente con [metil-<sup>14</sup>C]colina durante 3 min, determinándose la radiactividad asociada a las células. Seleccionamos este corto periodo de tiempo para evitar un uso metabólico intracelular de la colina. Como se puede apreciar en la Figura 23, la exposición de las células HepG2 a hexadecilfosfocolina 50  $\mu$ M hasta un tiempo de 6 h no alteró los niveles intracelulares de intermediarios solubles marcados procedentes de la colina radiactiva y, por tanto, tampoco la toma intracelular de colina.

## II.2. EFECTOS DE LA HEXADECILFOSFOCOLINA SOBRE LA SECRECIÓN DE LÍPIDOS RECIÉN SINTETIZADOS



Teniendo en cuenta que esta alquilfosfocolina podría afectar también a la secreción al medio extracelular de lípidos sintetizados *de novo*, analizamos la influencia del tratamiento de hexadecilfosfocolina 50  $\mu\text{M}$  sobre la liberación al medio de los lípidos recién sintetizados. Para ello, en los ensayos de incorporación de glicerol o colina marcados radiactivamente, recogimos el medio de cultivo simultáneamente a la recogida de las células y se determinó la incorporación de radiactividad procedente de los sustratos marcados a los distintos lípidos recién sintetizados y exportados al medio.



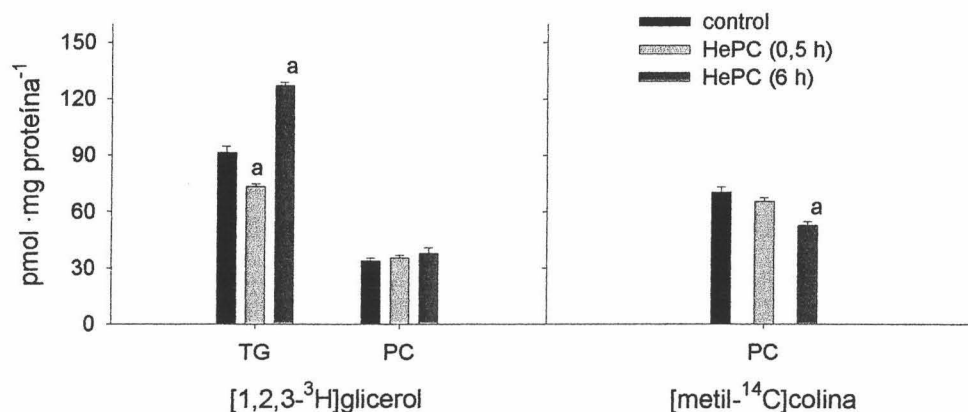
**Figura 23. Influencia de la hexadecilfosfocolina sobre la toma de colina en células HepG2.** Las células en proliferación fueron incubadas en EMEM/ 10% FCS suplementado con HePC 50  $\mu\text{M}$  durante 5 min, 1,5 h ó 6 h, mientras que las no tratadas fueron usadas como control. Las células fueron expuestas inmediatamente, a 37°C durante 3 min, a un pulso de [metil-<sup>14</sup>C]colina (60  $\mu\text{M}$ , 50 Ci · mol<sup>-1</sup>), y se determinó la radiactividad intracelular. Los resultados son media de cuatro determinaciones  $\pm$  SEM, expresados como pmol de colina incorporados por min y millón de células.

En los diagramas de la Figura 24 está representado el efecto de la exposición de las células HepG2 a hexadecilfosfolina, durante 30 min ó 6 h, sobre los lípidos secretados al medio que presentan un significativo marcaje radiactivo. En el diagrama de la izquierda aparecen recogidos los valores de incorporación procedente del glicerol marcado, mientras a la derecha se indican los resultados de incorporación a partir de la colina marcada.

Como se puede observar, la exposición de las células HepG2 durante 30 min a hexadecilfosfolina no modifica significativamente los niveles de radiactividad asociados a la fosfatidilcolina secretada, aunque produce una ligera reducción en los niveles radiactivos de triacilglicerol en el medio. Es interesante indicar que el tratamiento prolongado de hexadecilfosfolina durante 6 h causa un significativo aumento en la radiactividad asociada al triacilglicerol liberado al medio, mientras la secreción de fosfatidilcolina disminuye ligeramente cuando el sustrato exógeno es colina marcada.

A continuación, en la Tabla XXV indicamos los porcentajes de secreción al medio de triacilglicerol y fosfatidilcolina a partir de los valores obtenidos de incorporación de radiactividad tanto a las fracciones lipídicas exportadas al medio como a las correspondientes fracciones celulares.

Según se aprecia, la exposición de las células a hexadecilfosfolina no ocasiona diferencias significativas en los porcentajes de exportación al medio de triacilglicerol o fosfatidilcolina. Se observa, por tanto, una notable correlación entre las alteraciones a nivel de la síntesis *de novo* lipídica y la subsecuente secreción al medio. Estos resultados indican que la hexadecilfosfolina no afecta directamente a la secreción lipídica en estas células, de manera que las modificaciones observadas en los niveles radiactivos de lípidos secretados reflejan los cambios en su síntesis intracelular causados por el agente.



**Figura 24. Efecto de la hexadecilfosfocolina sobre la secreción de lípidos recién sintetizados.** Las células HepG2 en proliferación fueron incubadas durante 6 h en EMEM/ 10% FCS suplementado con [1,2,3-<sup>3</sup>H]glicerol (25  $\mu$ M, 680 Ci  $\cdot$  mol<sup>-1</sup>) o [metil-<sup>14</sup>C]colina (60  $\mu$ M, 38 Ci  $\cdot$  mol<sup>-1</sup>), y tratadas simultáneamente con HePC 50  $\mu$ M durante 30 min ó 6 h de incubación. Determinamos, entonces, la incorporación de radiactividad a triacilglicerol y fosfatidilcolina liberados al medio de incubación. Los resultados son media de cuatro determinaciones  $\pm$  SEM, expresados como pmol de glicerol o colina incorporados, respectivamente, por mg de proteína. La significancia estadística de las diferencias obtenidas con respecto al control está indicada por: <sup>a</sup> $P < 0,003$ .

### II.3. EFECTOS DE LA HEXADECILFOSFOCOLINA SOBRE LA DEGRADACIÓN Y SECRECIÓN DE LÍPIDOS ENDÓGENOS PREEXISTENTES

Otro de los procesos que podría estar alterado como consecuencia de la exposición de las células HepG2 a hexadecilfosfocolina es el recambio metabólico de los diferentes constituyentes metabólicos. Por ello, para examinar esta última posibilidad, los lípidos celulares fueron premarcados con [metil-<sup>14</sup>C]colina o [1,2,3-<sup>3</sup>H]glicerol durante 24 h. En este punto, recogimos células para así determinar el valor inicial de radiactividad incorporada a los diferentes lípidos.

Seguidamente, el resto de las células fueron incubadas en medio fresco durante un periodo adicional de 6 h, tanto en presencia de hexadecilfosfocolina como en su ausencia (controles).

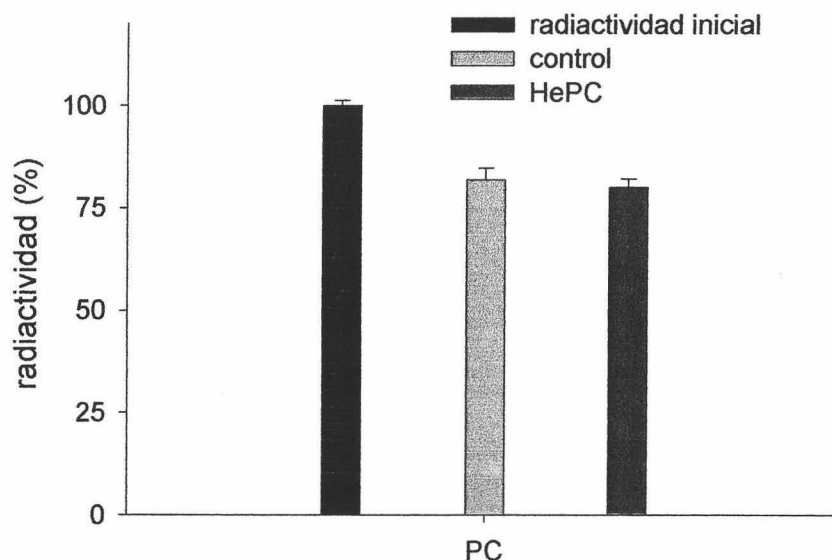
**TABLA XXV. Porcentajes de secreción al medio de triacilglicerol y fosfatidilcolina recién sintetizados en células HepG2 controles y tratadas con hexadecilfosfocolina.** Se determinó el porcentaje de liberación al medio para ambas fracciones lipídicas con respecto al total sintetizado *de novo* a partir de glicerol o de colina, marcados isotópicamente, en estas células.

	% secretado		
	<i>Control</i>	<i>HePC 50 μM (0,5 h)</i>	<i>HePC 50 μM (6 h)</i>
<i>[1,2,3-<sup>3</sup>H]glicerol</i>			
Triacilglicerol	9,6	7,8	10,1
Fosfatidilcolina	3,0	3,0	4,3
<i>[metil-<sup>14</sup>C]colina</i>			
Fosfatidilcolina	1,5	1,5	1,8

Los resultados son media de cuatro determinaciones  $\pm$  SEM, expresados como % secretado respecto al total sintetizado. El experimento fue repetido obteniéndose resultados similares.

En la Figura 25 se representa la tasa de degradación de fosfatidilcolina, marcada por incorporación de colina radiactiva. Los niveles radiactivos remanentes de esfingomielina premarcada tampoco sufren alteración por efecto de la hexadecilfosfocolina (no mostrado). La radiactividad inicial se expresó con el valor 100% y, por tanto, indicamos el porcentaje de radiactividad remanente transcurrido el periodo de 6 h, tanto para las células tratadas con hexadecilfosfocolina como para las controles. Los datos indican que la hexadecilfosfocolina no afecta a la velocidad de degradación intracelular de la fosfatidilcolina o esfingomielina

endógenas, puesto que la radiactividad asociada a ambas fracciones al cabo de las 6 h fue similar en las células tratadas con hexadecilfosfocolina y en las controles.



**Figura 25. Efecto de la hexadecilfosfocolina sobre la degradación de fosfatidilcolina endógena.** Las células HepG2 en proliferación fueron incubadas durante 24 h en EMEM/ 10% FCS suplementado con [metil- $^{14}\text{C}$ ]colina ( $60\ \mu\text{M}$ ,  $13\ \text{Ci}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). Se retiró entonces el medio radiactivo y añadimos medio fresco durante 2 h. Reemplazamos nuevamente el medio e incubamos durante un periodo de 6 h en presencia o ausencia de hexadecilfosfocolina  $50\ \mu\text{M}$ , determinando el porcentaje de radiactividad en la fracción celular de fosfatidilcolina. El experimento fue repetido obteniéndose similares resultados. Los datos son media de cuatro determinaciones  $\pm$  SEM.

En la Tabla XXVI se muestran los valores de radiactividad correspondientes a la incorporación inicial y al marcaje remanente en lípidos, transcurrido un periodo de 6 h, tras incubación con glicerol radiactivo. Según se observa, la hexadecilfosfocolina no afecta a la velocidad de recambio metabólico de los distintos lípidos endógenos analizados.

**TABLA XXVI. Efecto de la hexadecilfosfolina sobre la degradación de lípidos endógenos premarcados.** Las células HepG2 en proliferación fueron incubadas durante 24 h en EMEM/10% FCS suplementado con [1,2,3-<sup>3</sup>H]glicerol (25 μM, 280 Ci · mol<sup>-1</sup>). El medio fue entonces reemplazado por medio fresco no radiactivo e incubamos durante un periodo adicional de 6 h en presencia o ausencia de hexadecilfosfolina 50 μM. Determinamos la radiactividad remanente, al cabo de las 6 h, en los diferentes lípidos analizados.

	<i>pmol · mg proteína<sup>-1</sup></i>		
	<i>Incorporación<sub>o</sub></i>	<i>Control, 6 h</i>	<i>HePC, 6 h</i>
<i>Fosfolípidos</i>			
Fosfatidilcolina	1561,6 ± 85,0	1396,1 ± 49,3	1423,9 ± 32,9
Fosfatidiletanolamina	361,5 ± 16,4	303,0 ± 10,6	320,3 ± 6,4
Fosfatidilserina	49,2 ± 3,7	42,9 ± 1,9	41,6 ± 2,6
Fosfatidilinositol	47,4 ± 3,3	41,6 ± 3,2	43,9 ± 2,9
<i>Lípidos neutros</i>			
Triacilglicerol	213,7 ± 11,5	209,3 ± 5,1	216,8 ± 2,5
Diacilglicerol	18,2 ± 1,0	17,8 ± 0,7	23,1 ± 0,8

Los resultados son media de cuatro determinaciones ± SEM, expresados como pmol de glicerol incorporados por mg de proteína. La significancia estadística de las diferencias obtenidas con respecto al control está indicada por: <sup>a</sup>*P* < 0,001.

Con la finalidad de examinar la influencia de la hexadecilfosfolina sobre la secreción de los lípidos endógenos premarcados, el medio de cultivo fue además recogido transcurrido el periodo de 6 h y se determinó la radiactividad asociada a las fracciones lipídicas liberadas al medio. De nuevo, solamente el triacilglicerol y la fosfatidilcolina fueron exportados al medio extracelular en una significativa proporción. Indicamos que, en este caso, la radiactividad inicial se considera nula, es decir, correspondiente a la ausencia de lípidos liberados al medio.

En la Tabla XXVII aparecen indicados los resultados obtenidos tanto para la incubación con colina como con glicerol marcados isotópicamente. Según se observa, la exposición a hexadecilfosfolina no altera significativamente la secreción de triacilglicerol o fosfatidilcolina endógenos preexistentes en las células y marcados radiactivamente.

**TABLA XXVII. Influencia de la hexadecilfosfolina sobre la secreción de lípidos endógenos premarcados.** Las células HepG2 en proliferación fueron incubadas durante 24 h en EMEM/ 10% FCS suplementado con [metil- $^{14}\text{C}$ ]colina ( $60 \mu\text{M}$ ,  $18 \text{ Ci} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) ó [1,2,3- $^3\text{H}$ ]glicerol ( $25 \mu\text{M}$ ,  $280 \text{ Ci} \cdot \text{mol}^{-1}$ ). El medio fue reemplazado por medio fresco no radiactivo e incubamos durante un periodo adicional de 6 h en presencia o ausencia de hexadecilfosfolina  $50 \mu\text{M}$ . Recogimos entonces el medio de incubación y determinamos la radiactividad asociada a los distintos lípidos exportados al medio.

	<i>Incorporación</i>		
	<i>Incorporación,</i>	<i>Control, 6 h</i>	<i>HePC, 6 h</i>
<i>[metil-<math>^{14}\text{C}</math>]colina</i>			
Fosfatidilcolina	-	$0,631 \pm 0,028$	$0,644 \pm 0,013$
% secretado		5,5	5,7
<i>[1,2,3-<math>^3\text{H}</math>]glicerol</i>			
Fosfatidilcolina	-	$82,0 \pm 3,1$	$87,4 \pm 1,3$
% secretado		5,5	5,8
Triacilglicerol	-	$18,1 \pm 0,9$	$19,4 \pm 0,1$
% secretado		8,0	8,2

Los resultados son media de cuatro determinaciones  $\pm$  SEM, expresados como nmol de colina o pmol de glicerol, respectivamente, incorporados por mg de proteína. Se indica, además, el porcentaje de secreción correspondiente a cada fracción lipídica analizada.

## II.4. COMPOSICIÓN LIPÍDICA

Puesto que hemos comprobado que la hexadecilfosfocolina causa modificaciones en los procesos de síntesis *de novo* de ciertos componentes lipídicos en las células HepG2, a continuación hemos examinado la influencia del tratamiento prolongado con hexadecilfosfocolina sobre los niveles intracelulares de distintos lípidos en estas células.

**TABLA XXVIII. Influencia de un tratamiento prolongado de hexadecilfosfocolina sobre los niveles lipídicos en células HepG2.** Las células fueron sembradas en placas petri de 60 mm de diámetro y mantenidas en EMEM/ 10% FCS. Cuando alcanzaron la fase logarítmica de crecimiento se incubaron en presencia de hexadecilfosfocolina 50  $\mu\text{M}$  durante 48 h.

	$\mu\text{g} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$	
	Control	HePC
<i>Fosfolípidos</i>		
Fosfatidilcolina	4,46 $\pm$ 0,12	4,31 $\pm$ 0,15
Fosfatidiletanolamina	2,13 $\pm$ 0,12	1,97 $\pm$ 0,11
Fosfatidilserina	0,90 $\pm$ 0,04	0,93 $\pm$ 0,09
Fosfatidilinositol	0,70 $\pm$ 0,03	0,80 $\pm$ 0,06
Esfingomiélinea	0,38 $\pm$ 0,03	0,55 $\pm$ 0,07
<i>Lípidos neutros</i>		
Triacilglicerol	135,74 $\pm$ 8,91	196,31 $\pm$ 8,47 <sup>a</sup>
Colesterol total	44,84 $\pm$ 2,55	41,70 $\pm$ 2,85

Los resultados son media de tres determinaciones  $\pm$  SEM, expresados como  $\mu\text{g}$  de fósforo fosfolipídico, triacilglicerol o colesterol total, respectivamente, por  $\text{mg}$  de proteína. El experimento fue repetido, y se obtuvieron resultados similares.



Las células en la fase logarítmica de crecimiento fueron incubadas durante 48 h en EMEM/ 10% FCS conteniendo hexadecilfosfocolina 50  $\mu$ M. Entonces se recogieron, y los lípidos fueron extraídos y separados mediante TLC. Los niveles de los diferentes fosfolípidos se determinaron mediante cuantificación de fósforo lipídico, y los niveles de triacilglicerol y colesterol total se cuantificaron enzimáticamente, utilizando un kit comercial.

En la Tabla XXVIII se aprecia que la hexadecilfosfocolina no afecta a los niveles intracelulares de las distintas fracciones lipídicas analizadas, cuando son referidos a la cantidad de proteína celular, con excepción de la fracción de triacilglicerol que incrementa marcadamente tras la exposición al agente.

Es interesante destacar que estas medidas de niveles lipídicos intracelulares se llevaron a cabo mientras las células estaban en proliferación, en la fase de crecimiento exponencial. Debido al hecho de que la hexadecilfosfocolina presenta actividad citostática, la cantidad de proteína celular disminuyó sensiblemente en las células tratadas con el agente a largo plazo. Por tanto, a pesar de observarse una reducción en los niveles de fosfatidilcolina para las células tratadas con hexadecilfosfocolina, los valores específicos calculados en relación a la cantidad de proteína celular no difieren con los obtenidos en las células controles, lo cual manifiesta la importancia fisiológica de mantener los niveles intracelulares de fosfatidilcolina, como componente esencial de membrana, para conservar la viabilidad celular. No obstante, sí puede apreciarse un incremento causado por efecto de la hexadecilfosfocolina en la cantidad de triacilglicerol, normalizada a la cantidad de proteína celular.

### **III. EFECTOS DE LA HEXADECILFOSFOCOLINA SOBRE LAS ACTIVIDADES DE LA RUTA CDP-COLINA EN CÉLULAS HepG2**

Los resultados mostrados hasta ahora indican que el tratamiento de las células HepG2 con el agente antitumoral hexadecilfosfocolina produce una inhibición específica en la síntesis *de novo* de fosfatidilcolina, y esta alteración metabólica puede ser uno de los factores desencadenantes de los efectos citotóxicos y actividad citostática causados por el agente en estas células. Por tanto, decidimos examinar con mayor profundidad el mecanismo molecular por el cual la hexadecilfosfocolina afecta a la ruta biosintética de fosfatidilcolina vía CDP-colina, analizando la influencia de la alquilfosfocolina sobre las actividades enzimáticas implicadas en la ruta CDP-colina.

Las células HepG2 fueron expuestas a hexadecilfosfocolina 50  $\mu\text{M}$  durante 6 h, y trascurrido el periodo de incubación las sonicamos y obtuvimos mediante ultracentrifugación tanto el citosol como una fracción particulada.

En la Tabla XXIX están indicados los valores de actividad enzimática medidos en la fracción subcelular correspondiente. Como se puede observar, la hexadecilfosfocolina no afecta ni a la actividad colina quinasa (CK) ensayada en el citosol ni a la actividad diacilglicerol colinafosfotransferasa (CPT) determinada en la fracción de membranas. La exposición de las células HepG2 a hexadecilfosfocolina ocasiona, sin embargo, una significativa inhibición de la actividad colina fosfato citidililtransferasa (CT) en la fracción particulada, sin afectar a la actividad CT citosólica.

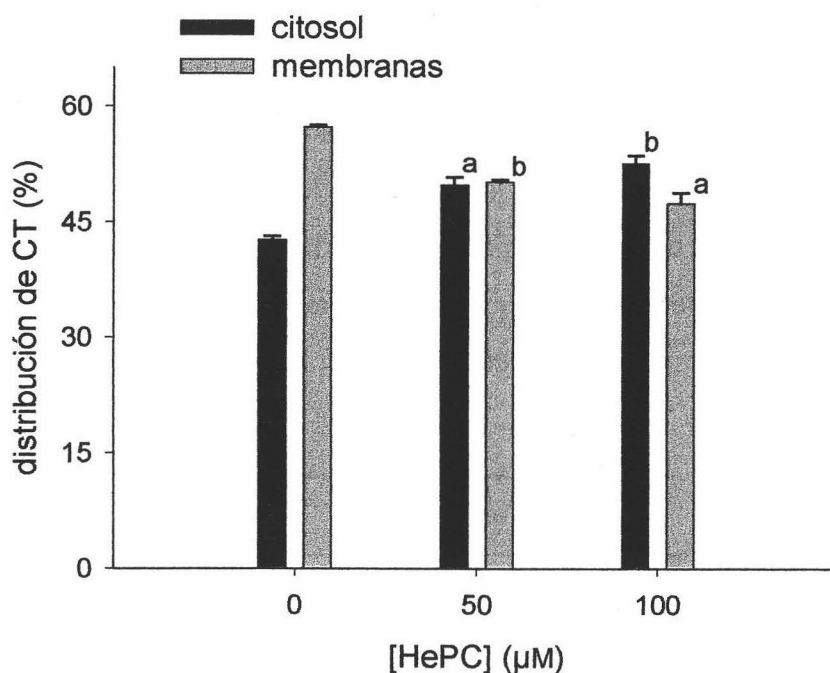
Se ha calculado la actividad total en placa correspondiente a ambas formas intracelulares de la enzima CT, soluble y unida a membrana. De este modo, determinamos el efecto de la hexadecilfosfocolina sobre la distribución intracelular de la CT. En la Figura 26 se muestra cómo la hexadecilfosfocolina causa un aumento, dependiente de la dosis, en la actividad CT citosólica, produciendo simultáneamente una disminución en la actividad CT unida a membranas. Hemos de indicar, además, que la cantidad total de actividad CT no se modificó significativamente por efecto del tratamiento de hexadecilfosfocolina.

**TABLA XXIX. Influencia del tratamiento de hexadecilfosfocolina 50  $\mu$ M durante 6 h sobre las actividades enzimáticas de la ruta de síntesis de fosfatidilcolina vía CDP-colina.** Las células en fase logarítmica de crecimiento fueron incubadas durante 6 h en EMEM/ 10% FCS suplementado con hexadecilfosfocolina 50  $\mu$ M, mientras las células no tratadas se usaron como control. Entonces fueron recogidas y sonicadas, y el homogeneizado total se centrifugó a 105.000 g durante 30 min, obteniéndose el citosol y una fracción enriquecida en membranas. Las diferentes actividades enzimáticas fueron determinadas como se describe en la sección Material y Métodos.

<i>Actividad</i>	<i>Control</i>	<i>HePC</i>
CK	7,77 $\pm$ 0,13	7,04 $\pm$ 0,29
CT (citosol)	1,85 $\pm$ 0,16	1,78 $\pm$ 0,16
CT (membranas)	0,89 $\pm$ 0,02	0,73 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>
CPT	1,19 $\pm$ 0,05	1,20 $\pm$ 0,03

Los resultados son media de tres determinaciones, realizadas en duplicado,  $\pm$  SEM, expresados como nmol del sustrato radiactivo correspondiente incorporados por min y mg de proteína. La significancia estadística de las diferencias obtenidas con respecto al control está indicada por: <sup>a</sup> $P < 0,02$ .

Estos datos indican que la hexadecilfosfocolina actúa a nivel de la síntesis de fosfatidilcolina vía CDP-colina modulando la translocación de la CT entre la membrana y el citosol, de manera que la reducción en la forma activa ligada a membrana ocasiona una inhibición de esta ruta biosintética.



**Figura 26. Influencia del tratamiento de hexadecilfosfocolina sobre la distribución intracelular de la colina-fosfato citidililtransferasa en células HepG2.** Las células en proliferación fueron incubadas durante 6 h en EMEM/ 10% FCS suplementado con HePC 50 ó 100  $\mu\text{M}$ , mientras las células no tratadas fueron usadas como control. Las células fueron recogidas y sonicadas, y el homogeneizado celular fue centrifugado a 105.000 g durante 30 min. La actividad citidililtransferasa fue ensayada tanto en el sobrenadante citosólico como en la fracción particulada. Los resultados son media de tres determinaciones en duplicado  $\pm$  SEM, expresados como porcentajes de distribución por placa de la CT citosólica o unida a membrana. La significancia estadística de las diferencias obtenidas con respecto al control está indicada por: <sup>a</sup> $P < 0,004$ ; <sup>b</sup> $P < 0,002$ .

A continuación, decidimos estudiar la influencia *in vitro* de la hexadecilfosfocolina sobre las actividades enzimáticas de la vía CDP-colina. Para ello, incubamos la correspondiente fracción subcelular en presencia de hexadecilfosfocolina durante el ensayo y medimos las distintas actividades de la ruta. Nuestros resultados, mostrados en la Tabla XXX, indican que la hexadecilfosfocolina a una concentración 50  $\mu\text{M}$  no afecta *in vitro* a las actividades CK o CPT,

ni altera las actividades CT en citosol o en membranas. El ensayo de determinación *in vitro* de la actividad CT en membranas fue además realizado en presencia de hexadecilfosfocolina 100  $\mu\text{M}$ , aunque el incremento de concentración tampoco afectó significativamente a las medidas en comparación con las obtenidas en las células controles ( $1,62 \pm 0,12$  en las células tratadas con hexadecilfosfocolina *in vitro*, frente a  $1,83 \pm 0,13$  en las controles, expresado como  $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ ;  $n=3$ ).

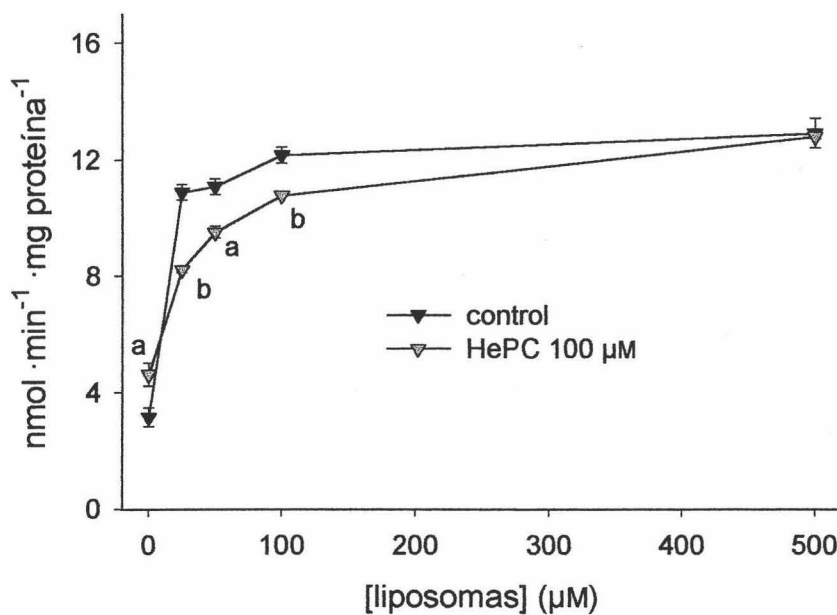
**TABLA XXX. Efecto *in vitro* de la hexadecilfosfocolina sobre las actividades enzimáticas de la ruta CDP-colina.** Las células en fase logarítmica de crecimiento fueron recogidas y sonicadas, y el homogeneizado total se centrifugó a 105.000 g durante 30 min, obteniéndose el citosol y una fracción enriquecida en membranas. Para examinar el efecto *in vitro* de la hexadecilfosfocolina, suplementamos el medio de ensayo con el agente a una concentración final de 50  $\mu\text{M}$ . Las diferentes actividades enzimáticas fueron determinadas como se describe en la sección Material y Métodos.

<i>Actividad</i>	<i>Control</i>	<i>HePC in vitro</i>
CK	$7,77 \pm 0,13$	$7,49 \pm 0,08$
CT (citosol)	$1,85 \pm 0,16$	$1,89 \pm 0,17$
CT (membranas)	$0,89 \pm 0,02$	$0,83 \pm 0,04$
CPT	$1,19 \pm 0,05$	$1,11 \pm 0,02$

Los resultados son media de tres determinaciones, realizadas en duplicado,  $\pm$  SEM, expresados como nmol del sustrato radiactivo correspondiente incorporados por min y mg de proteína.

La determinación *in vitro* de la actividad CT citosólica máxima requiere la adición de liposomas conteniendo lípidos aniónicos activadores a la mezcla de reacción, utilizándose generalmente la combinación fosfatidilcolina/ oleato (500  $\mu\text{M}$ :500  $\mu\text{M}$ ). No obstante, puesto que otros autores han descrito que los efectos de la hexadecilfosfocolina pueden estar modulados por

la cantidad de lípido activador (Boggs *et al.*, 1998), decidimos ensayar la actividad CT citosólica en presencia de distintas cantidades de liposomas de fosfatidilcolina/ oleato. Como se puede observar en la Figura 27, esta actividad es aproximadamente 4 veces superior en presencia de liposomas que en su ausencia, demostrando la existencia en células HepG2 de una forma activa de CT en el citosol, la cual puede corresponder a la 'forma H' previamente descrita (Weinhold *et al.*, 1991).



**Figura 27. Efectos *in vitro* de la hexadecilfosfocolina sobre la actividad colina-fosfato citidililtransferasa citosólica en células HepG2.** Las células en fase logarítmica de crecimiento fueron recogidas y sonicadas brevemente, y la fracción de citosol fue obtenida mediante ultracentrifugación. La actividad CT citosólica fue ensayada en la ausencia (controles) o presencia de hexadecilfosfocolina 100 μM y diferentes concentraciones de liposomas de fosfatidilcolina/ oleato (relación molar 1:1). Los resultados son media de tres determinaciones ± SEM, expresados como nmol de colina-fosfato incorporados por min y mg de proteína. La significancia estadística de las diferencias obtenidas con respecto al control está indicada por: <sup>a</sup> $P < 0,05$ ; <sup>b</sup> $P < 0,007$ .

La Figura 27 muestra cómo la actividad CT citosólica es inhibida por la hexadecilfosfocolina en presencia de niveles de lípido activador inferiores o igual a 100  $\mu\text{M}$ , aunque el grado de inhibición disminuye concomitantemente con el incremento en la cantidad de liposomas presentes en la mezcla de ensayo. De forma sorprendente, en ausencia de liposomas de fosfatidilcolina/ oleato la adición de hexadecilfosfocolina 100  $\mu\text{M}$  aumenta sensiblemente la actividad CT soluble. La hexadecilfosfocolina es un lípido que origina estructuras en no-bicapa presentando forma micelar en solución acuosa (Dittrich *et al.*, 1998), con lo cual puede actuar a modo de liposomas durante el ensayo, es decir, como un sistema que permite reconstituir la CT soluble inactiva, incrementando así su actividad enzimática.

#### **IV. REVERSIBILIDAD DE LAS ALTERACIONES PRODUCIDAS POR LA HEXADECILFOSFOCOLINA EN CÉLULAS HepG2**

Según se ha podido comprobar, el tratamiento con hexadecilfosfocolina produce notables alteraciones a nivel del metabolismo lipídico en estas células. Por otra parte, puesto que este compuesto presenta una aplicación quimioterapéutica como agente antitumoral, puede ser interesante desde un punto de vista farmacológico examinar la posible reversión de sus acciones a nivel metabólico.

Por tanto, con objeto de comprobar la persistencia de los efectos causados por este agente sobre la incorporación de distintos precursores metabólicos, las células HepG2 fueron expuestas a hexadecilfosfocolina durante 6 h, en presencia de glicerol o colina marcados isotópicamente, y seguidamente retiramos la alquilfosfocolina del medio de incubación, examinando si ello lleva consigo la restauración del estado metabólico que caracteriza a las células controles.

Está descrito, por otra parte, que el oleato estimula la translocación de la CT desde el citosol a las membranas. Por tanto, y puesto que nuestros datos indican que la hexadecilfosfocolina actúa a este nivel, se ha analizado también la posible reversión de la acción de la hexadecilfosfocolina por oleato.

#### **IV.1. SUPRESIÓN DEL TRATAMIENTO DE HEXADECILFOSFOCOLINA**

Hemos examinado la posible reversión de las alteraciones causadas por hexadecilfosfocolina a nivel de la síntesis *de novo* lipídica. Para ello, las células HepG2 en fase logarítmica de crecimiento fueron incubadas durante 6 h en EMEM/ 10% FCS suplementado con glicerol o colina marcados radiactivamente y en presencia o ausencia de hexadecilfosfocolina 50  $\mu$ M, y tras las 6 h de incubación se recogieron células y medio para determinar la incorporación de radiactividad a las distintas fracciones lipídicas. En el resto de placas el medio de incubación fue retirado y reemplazado por nuevo medio radiactivo, de modo que el tratamiento de hexadecilfosfocolina fue suprimido aunque se mantuvo la misma radiactividad específica del sustrato marcado. Transcurrido un periodo de 16 h, las células y el medio de incubación se recogieron, y los lípidos fueron extraídos y separados mediante TLC, determinándose entonces la radiactividad asociada a las distintas fracciones lipídicas, tanto para las células pretratadas con hexadecilfosfocolina como para las controles.

En la Tabla XXXI presentamos los resultados obtenidos acerca de la incorporación de glicerol marcado isotópicamente a los distintos lípidos celulares y liberados al medio. Como se puede apreciar, tras suprimir el tratamiento de hexadecilfosfocolina se produce una reducción, al menos parcial, de las modificaciones causadas por el agente en los niveles radiactivos asociados a las distintas fracciones lipídicas.

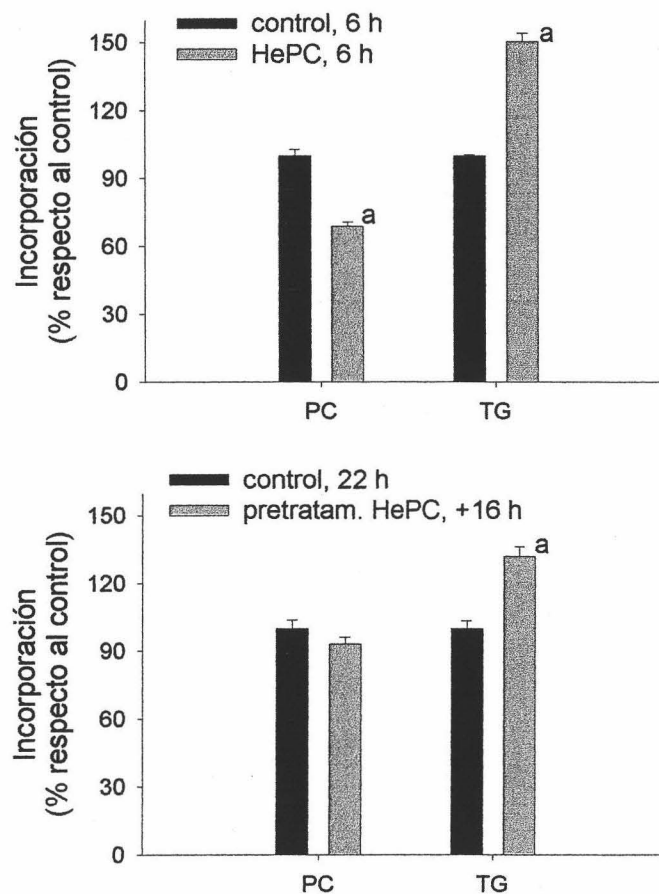


**TABLA XXXI. Efectos de la supresión del tratamiento de hexadecilfosfocolina sobre la incorporación de [1,2,3-<sup>3</sup>H]glicerol a lípidos en células HepG2.** Las células en fase logarítmica de crecimiento fueron incubadas durante 6 h en EMEM/ 10% FCS suplementado con [1,2,3-<sup>3</sup>H]glicerol (25  $\mu$ M, 280 Ci  $\cdot$  mol<sup>-1</sup>), conteniendo hexadecilfosfocolina 50  $\mu$ M en las células tratadas. Se sustituyó entonces el medio de incubación por nuevo medio radiactivo y se retiró el tratamiento de hexadecilfosfocolina. Transcurridas 16 h, los lípidos fueron extraídos de las células y del medio de incubación y separados mediante TLC.

	<i>pmol <math>\cdot</math> mg proteína<sup>-1</sup></i>			
	<i>Control, 6 h</i>	<i>HePC, 6 h</i>	<i>Control, 22h</i>	<i>Pretratamiento de HePC, +16 h</i>
<u>Lípidos celulares</u>				
<i>Fosfolípidos</i>				
Fosfatidilcolina	580,0 $\pm$ 16,9	398,5 $\pm$ 12,1 <sup>b</sup>	2120,5 $\pm$ 81,0	1975,4 $\pm$ 64,6
Fosfatidiletanolamina	494,6 $\pm$ 10,6	533,0 $\pm$ 12,5	529,0 $\pm$ 22,0	537,1 $\pm$ 14,0
Fosfatidilinositol	88,9 $\pm$ 1,7	97,5 $\pm$ 3,2	112,9 $\pm$ 5,5	127,2 $\pm$ 5,0
Fosfatidilserina	25,0 $\pm$ 1,1	17,0 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>	76,2 $\pm$ 1,1	50,0 $\pm$ 2,4 <sup>b</sup>
Fosfatidato	15,5 $\pm$ 0,5	20,8 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	50,2 $\pm$ 2,3	51,9 $\pm$ 1,2
<i>Lípidos neutros</i>				
Triacilglicerol	364,4 $\pm$ 1,7	547,4 $\pm$ 14,2 <sup>b</sup>	618,5 $\pm$ 21,3	815,6 $\pm$ 26,7 <sup>a</sup>
Diacilglicerol	26,5 $\pm$ 0,5	47,3 $\pm$ 0,7 <sup>b</sup>	27,5 $\pm$ 1,0	38,6 $\pm$ 0,9 <sup>b</sup>
<u>Lípidos secretados</u>				
Fosfatidilcolina	16,9 $\pm$ 1,7	19,9 $\pm$ 0,6	147,7 $\pm$ 8,6	151,9 $\pm$ 4,9
Triacilglicerol	39,5 $\pm$ 2,2	72,7 $\pm$ 0,8 <sup>b</sup>	186,3 $\pm$ 7,4	264,8 $\pm$ 8,3 <sup>b</sup>

Los resultados son media de cuatro determinaciones  $\pm$  SEM, expresados como pmol de glicerol incorporados por mg de proteína. La significancia estadística de las diferencias obtenidas con respecto a los controles está indicada por: <sup>a</sup> $P < 0,005$ ; <sup>b</sup> $P < 0,0005$ .

En la Figura 28, recogidos de la anterior Tabla, se representan los valores porcentuales, referidos al control, de incorporación de radiactividad procedente del glicerol marcado, en función del tiempo, a fosfatidilcolina y triacilglicerol, como representativos de los distintos lípidos analizados.



**Figura 28. Reversión de la acción de la hexadecilfosfocolina tras su retirada del medio de incubación.** Las células en fase logarítmica de crecimiento fueron incubadas durante 6 h en EMEM/ 10% FCS suplementado con [1,2,3-<sup>3</sup>H]glicerol (25  $\mu$ M, 280  $\cdot$ Ci  $\text{mol}^{-1}$ ), conteniendo hexadecilfosfocolina 50  $\mu$ M en las células tratadas. Se substituyó entonces el medio de incubación por nuevo medio radiactivo y se retiró el tratamiento de hexadecilfosfocolina. Transcurridas 16 h, los lípidos fueron extraídos de las células y

separados mediante TLC. Los resultados son media de cuatro determinaciones  $\pm$  SEM, expresados como porcentaje de radiactividad en relación al control. La significancia estadística de las diferencias obtenidas con respecto al control está indicada por:  $^aP < 0,002$ .

Tras la retirada de la hexadecilfosfocolina del medio de incubación se produce una reversión completa de la acción ocasionada por el agente, de manera que la velocidad de incorporación de glicerol marcado se equipara en las células pretratadas con hexadecilfosfocolina en relación a los controles, apreciándose por tanto una reversión del efecto causado por el agente sobre la incorporación de radiactividad a fosfatidilcolina (Figura 28). De manera interesante, estos datos indican que la presencia y actuación directa de la hexadecilfosfocolina es necesaria para que se produzca una interferencia sobre los diferentes procesos de síntesis *de novo* lipídica.

Puesto que incubando con glicerol radiactivo no aparece marcada la esfingomielina, decidimos realizar este mismo experimento utilizando colina radiactiva como precursor exógeno, permitiendo así determinar la posible reversión de la acción de la hexadecilfosfocolina sobre la biosíntesis *de novo* de este esfingolípido. En la Tabla XXXII se observa cómo la retirada del tratamiento de hexadecilfosfocolina, al igual que ocurría en el caso de la incubación con glicerol, revierte la acción producida por el agente, de forma que la velocidad de incorporación de colina se iguala en las células controles y preincubadas con hexadecilfosfocolina.

Como se puede apreciar, el efecto inicial de disminución en la radiactividad asociada a fosfatidilcolina o esfingomielina, provocado por la hexadecilfosfocolina, es interrumpido cuando ésta es retirada del medio, lo cual indica nuevamente que la presencia del agente en el medio es necesaria para ejercer su acción.

**TABLA XXXII. Efectos de la supresión del tratamiento de hexadecilfosfocolina sobre la incorporación de [metil-<sup>14</sup>C]colina a lípidos en células HepG2.** Las células en fase logarítmica de crecimiento fueron incubadas durante 6 h en EMEM/ 10% FCS suplementado con [metil-<sup>14</sup>C]colina (60  $\mu$ M, 14 Ci  $\cdot$ mol<sup>-1</sup>), conteniendo hexadecilfosfocolina 50  $\mu$ M en las células tratadas. Se substituyó entonces el medio de incubación por nuevo medio radiactivo y se retiró el tratamiento de hexadecilfosfocolina. Transcurridas 16 h, los lípidos fueron extraídos de las células y del medio de incubación y separados mediante TLC.

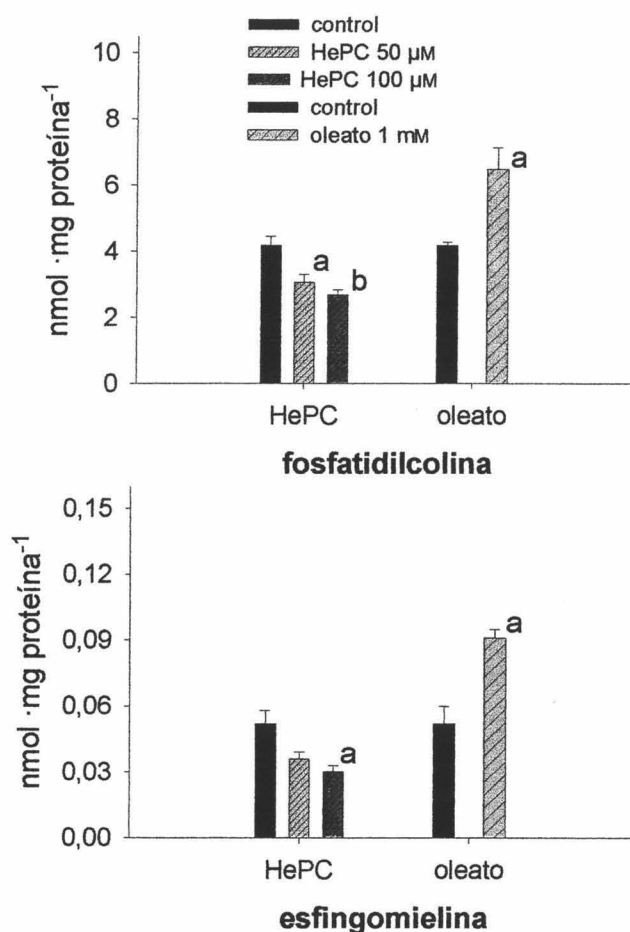
	<i>nmol <math>\cdot</math> mg proteína<sup>-1</sup></i>			
	<i>Control, 6 h</i>	<i>HePC, 6 h</i>	<i>Control, 22h</i>	<i>Pretratamiento de HePC, +16 h</i>
<u>Lípidos celulares</u>				
Fosfatidilcolina	3,00 $\pm$ 0,11	1,73 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>	16,0 $\pm$ 0,7	14,4 $\pm$ 0,4
Esfingomielina	0,032 $\pm$ 0,002	0,021 $\pm$ 0,001 <sup>b</sup>	0,488 $\pm$ 0,039	0,531 $\pm$ 0,021
<u>Lípidos secretados</u>				
Fosfatidilcolina	0,067 $\pm$ 0,005	0,046 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup>	0,993 $\pm$ 0,058	0,949 $\pm$ 0,036

Los resultados son media de cuatro determinaciones  $\pm$  SEM, expresados como nmol de colina incorporados por mg de proteína. La significancia estadística de las diferencias obtenidas con respecto a los controles está indicada por: <sup>a</sup> $P < 0,02$ ; <sup>b</sup> $P < 0,008$ .

## IV.2. ANTAGONISMO DEL OLEATO FRENTE A LA ACCIÓN DE LA HEXADECILFOSFOCOLINA

En las células HepG2 está descrito que el oleato activa la enzima colina-fosfato citidililtransferasa tanto en citosol como en membranas y, además, promueve la translocación de la enzima a membranas, activándola (Weinhold *et al.*, 1991). Por tanto, en los siguientes experimentos hemos analizado conjuntamente la acción de oleato y hexadecilfosfocolina sobre

la biosíntesis de fosfatidilcolina vía CDP-colina. Para ello, hemos utilizado colina marcada radiactivamente, determinándose la incorporación de radiactividad a lípidos y a los intermediarios metabólicos solubles de la ruta CDP-colina.



**Figura 29. Influencia del oleato y de la hexadecilfosfocolina sobre la incorporación de [metil-<sup>14</sup>C]colina a lípidos en células HepG2.** Las células en fase logarítmica de crecimiento fueron incubadas durante 6 h en EMEM/ 10% FCS suplementado con [metil-<sup>14</sup>C]colina (60 μM, 14 Ci · mol<sup>-1</sup>), glicerol 25 μM y etanolamina 50 μM, y conteniendo, además, oleato 1 mM/ BSA 1% o bien hexadecilfosfocolina 50 ó 100 μM. Los lípidos e intermediarios solubles de colina fueron extraídos de las células y separados mediante TLC. Los resultados son media de tres determinaciones ± SEM,

expresados como nmol de colina incorporados por mg de proteína. La significancia estadística de las diferencias obtenidas con respecto a los controles está indicada por: <sup>a</sup> $P < 0,04$ ; <sup>b</sup> $P < 0,008$ .

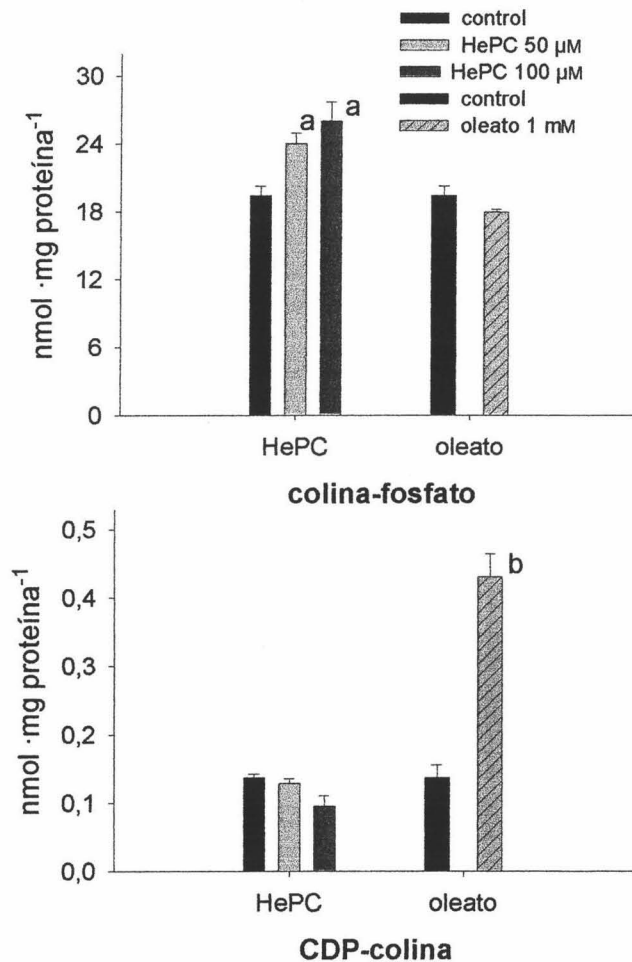
En la Figura 29 se muestran los resultados obtenidos acerca de la incorporación de radiactividad procedente de la colina marcada a fosfatidilcolina y esfingomiélin, tanto en las células incubadas en presencia de oleato 1 mM/ BSA 1% como de hexadecilfosfocolina 50 ó 100  $\mu$ M. Como se puede observar, los efectos ocasionados por ambos agentes son opuestos, lo que sugiere una acción antagónica sobre la ruta de Kennedy de síntesis de fosfatidilcolina. Así, mientras la hexadecilfosfocolina, tal y como venimos observando en los experimentos anteriores, disminuye la incorporación de colina marcada tanto a fosfatidilcolina como a esfingomiélin, de una manera dosis dependiente, el oleato estimula la ruta CDP-colina, incrementando sensiblemente la radiactividad asociada a ambos fosfolípidos.

Como se indica en la Figura 30, la hexadecilfosfocolina incrementa significativamente los niveles radiactivos de colina-fosfato y reduce el marcaje asociado a CDP-colina. Sin embargo, el oleato disminuye ligeramente la radiactividad asociada a colina-fosfato y aumenta significativamente la asociada a CDP-colina. Estos datos demuestran la acción antagónica de ambos agentes sobre la etapa catalizada por la colina-fosfato citidililtransferasa, de manera que la hexadecilfosfocolina inhibe la enzima, como ya fue mostrado anteriormente, mientras que el oleato parece activar esta enzima.

Una vez estudiada la acción de ambos agentes por separado, decidimos examinar la posible reversión por oleato del efecto de inhibición en la síntesis *de novo* de fosfatidilcolina ocasionado por hexadecilfosfocolina.

En la Figura 31 se muestran los valores de incorporación de radiactividad al producto final, fosfatidilcolina. Interesantemente, la hexadecilfosfocolina ejerce su acción de inhibición en la producción de fosfatidilcolina recién sintetizada tanto en ausencia como en presencia de oleato en el medio de incubación. No obstante, el tratamiento simultáneo con oleato disminuye

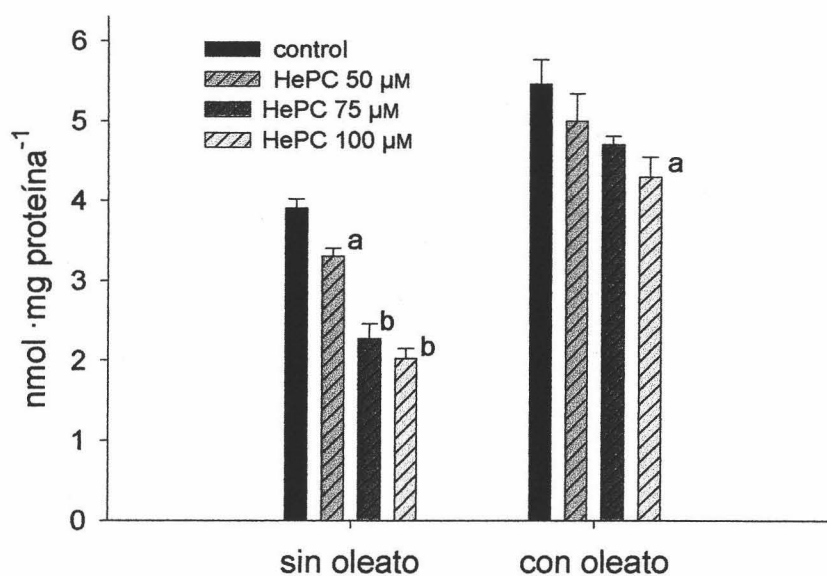
apreciablemente el grado de inhibición causado por la hexadecilfosfocolina. Por otra parte, se observa también cómo el oleato causa una estimulación en la síntesis *de novo* de fosfatidilcolina independientemente de la presencia de hexadecilfosfocolina durante la incubación.



**Figura 30. Influencia del oleato y de la hexadecilfosfocolina sobre la incorporación de [metil-<sup>14</sup>C]colina a intermediarios de la ruta CDP-colina en células HepG2.** Las células en fase logarítmica de crecimiento fueron incubadas durante 6 h en EMEM/ 10% FCS suplementado con [metil-<sup>14</sup>C]colina (60 μM, 14 Ci · mol<sup>-1</sup>), glicerol 25 μM y etanolamina 50 μM, y conteniendo, además, oleato 1 mM/ BSA 1% o bien hexadecilfosfocolina 50 ó 100 μM. Los lípidos e intermediarios solubles de colina

fueron extraídos de las células y separados mediante TLC. Los resultados son media de tres determinaciones  $\pm$  SEM, expresados como nmol de colina incorporados por mg de proteína. La significancia estadística de las diferencias obtenidas con respecto a los controles está indicada por: <sup>a</sup> $P < 0,03$ ; <sup>b</sup> $P < 0,002$ .

Estos datos sugieren que la acción de ambos compuestos es independiente, de manera que no interfieren uno con el otro aunque ambos actúen a nivel de la etapa catalizada por la enzima colina-fosfato citidililtransferasa, como sugieren los valores de incorporación de radiactividad a partir de la colina marcada.



**Figura 31. Influencia del tratamiento simultáneo con oleato y diferentes concentraciones de hexadecilfosfolina sobre la incorporación de [metil-<sup>14</sup>C]colina a fosfatidilcolina en células HepG2.** Las células en fase logarítmica de crecimiento fueron incubadas durante 6 h en EMEM/ 10% FCS suplementado con [metil-<sup>14</sup>C]colina (60  $\mu$ M, 7 Ci  $\cdot$  mol<sup>-1</sup>), glicerol 25  $\mu$ M y etanolamina 50  $\mu$ M, conteniendo, además, oleato 1 mM/ BSA 1% y diferentes concentraciones de hexadecilfosfolina. Los lípidos fueron



extraídos de las células y separados mediante TLC, y se determinó la incorporación de radiactividad a fosfatidilcolina. Los resultados son media de tres determinaciones  $\pm$  SEM, expresados como nmol de colina incorporados por mg de proteína. La significancia estadística de las diferencias obtenidas con respecto a los controles está indicada por: <sup>a</sup> $P < 0,05$ ; <sup>b</sup> $P < 0,002$ .

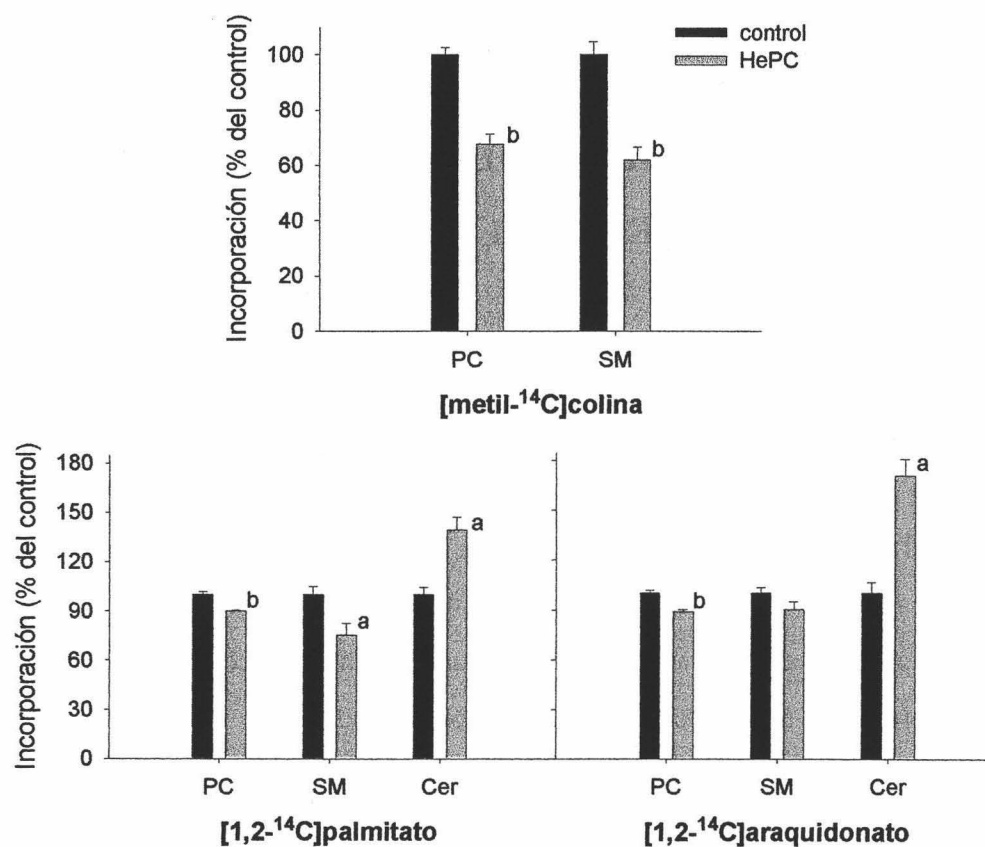
## V. ALTERACIONES MORFOLÓGICAS E INDUCCIÓN DE APOPTOSIS POR HEXADECILFOSFOCOLINA EN LAS CÉLULAS HepG2

Está descrito que la inhibición selectiva de la biosíntesis de fosfatidilcolina interrumpe la progresión del ciclo celular y provoca apoptosis (Cui *et al.*, 1996), debido probablemente a la pérdida de la integridad de membrana. Además, la reducción del precursor fosfatidilcolina inhibe la síntesis *de novo* de esfingomielina, ocasionando un acúmulo intracelular de ceramida. Se sugiere, por otra parte, una implicación de este segundo mensajero como mediador celular en la consecución del programa apoptótico (Hannun y Luberto, 2000).

En nuestro estudio hemos demostrado que el tratamiento de las células HepG2 con el agente antitumoral hexadecilfosfocolina produce diversos efectos, especialmente a nivel del metabolismo de lípidos que contienen colina. En este sentido, resulta bastante interesante la reducción en la incorporación de colina a esfingomielina, que ha sido además confirmada mediante el marcaje metabólico de su esqueleto carbonado, utilizando ácidos grasos exógenos marcados isotópicamente. Por otra parte, es de destacar un incremento simultáneo en la incorporación de ambos ácidos grasos, palmitato y araquidonato, a la fracción de ceramida.

En la Figura 32, a modo de resumen, están representados los porcentajes, relativos al control, de incorporación de radiactividad procedente de distintos sustratos metabólicos a las

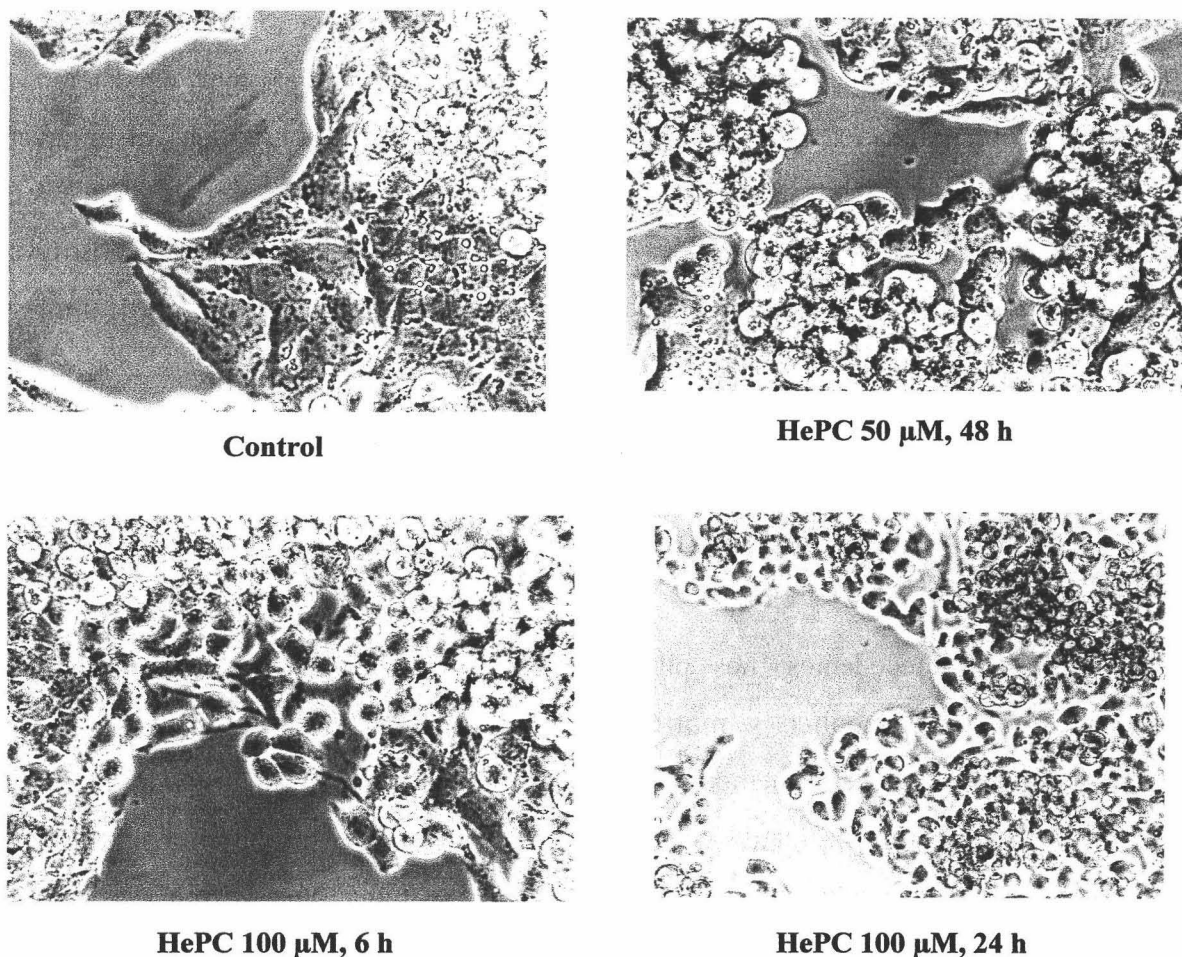
fracciones celulares de fosfatidilcolina, esfingomielina y ceramida, tanto en células controles como en células expuestas durante 6 h a un tratamiento de hexadecilfosfocolina 50  $\mu\text{M}$ .



**Figura 32.** Influencia del tratamiento de hexadecilfosfocolina sobre la incorporación de distintos sustratos metabólicos a fosfatidilcolina, esfingomielina y ceramida en células HepG2. Las células en fase logarítmica de crecimiento fueron incubadas durante 6 h en EMEM/ 10% FCS suplementado con [metil-<sup>14</sup>C]colina (60  $\mu\text{M}$ , 50 Ci  $\cdot\text{mol}^{-1}$ ), [1-<sup>14</sup>C]palmitato (100  $\mu\text{M}$ , 17 Ci  $\cdot\text{mol}^{-1}$ ) ó [1-<sup>14</sup>C]araquidonato (100  $\mu\text{M}$ , 58 Ci  $\cdot\text{mol}^{-1}$ ), y hexadecilfosfocolina 50  $\mu\text{M}$ . Los lípidos fueron extraídos de las células y separados mediante TLC, y se determinó la incorporación de radiactividad a fosfatidilcolina, esfingomielina y ceramida. Los resultados son media de al menos tres determinaciones  $\pm$  SEM, expresados como porcentaje de radiactividad incorporada

respecto al control. La significancia estadística de las diferencias obtenidas con respecto a los controles está indicada por: <sup>a</sup> $P < 0,04$ ; <sup>b</sup> $P < 0,01$ .

### V.1. CAMBIOS MORFOLÓGICOS PROVOCADOS POR LA HEXADECILFOSFOCOLINA EN CÉLULAS HepG2



**Figura 33.** Alteraciones morfológicas ocasionadas por diferentes tratamientos de hexadecilfosfocolina en células HepG2. Las células en fase logarítmica de crecimiento fueron incubadas durante diferentes periodos de tiempo en EMEM/ 10% FCS suplementado con distintas concentraciones de hexadecilfosfocolina.

En la Figura 33 se muestran fotografías de microscopía óptica, a diversos aumentos, de las células HepG2 expuestas a distintos tratamientos de hexadecilfosfolina. Como se puede observar, este agente ocasiona una pérdida de adherencia celular que se manifiesta por un cambio de apariencia de las células, cuya morfología adquiere una forma más redondeada en comparación con el aspecto epitelial (fusiforme) de las células no tratadas. No obstante, las células permanecen completamente adheridas a la superficie de cultivo.

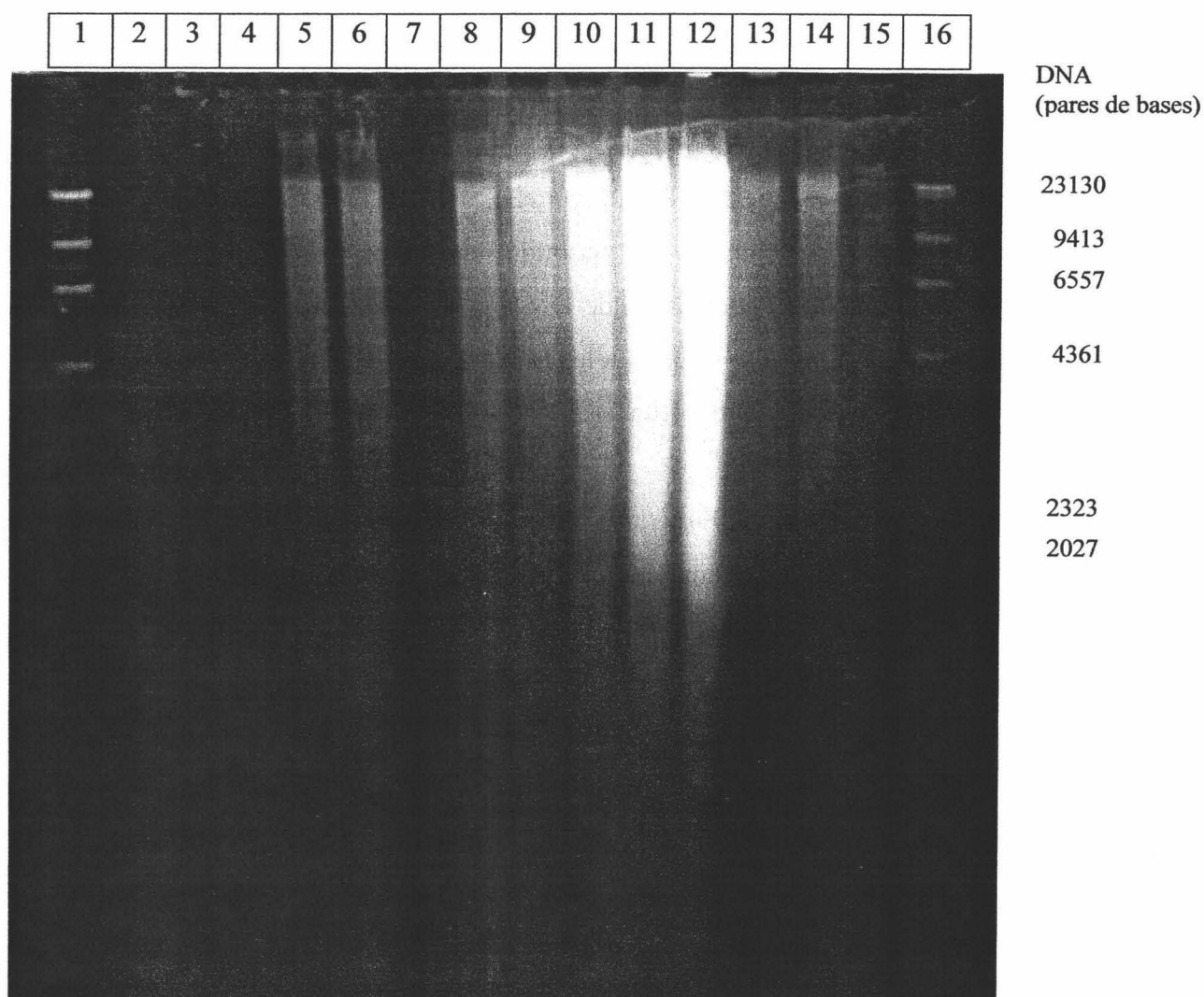
Tales alteraciones sugieren que las células son conducidas, por exposición a la hexadecilfosfolina, hacia un programa apoptótico. Las células apoptóticas disminuyen de tamaño, se condensan y luego fragmentan, para liberar pequeños cuerpos apoptóticos, limitados por membrana, que suelen ser fagocitados por otras células. Sin embargo, los constituyentes intracelulares no se liberan al medio extracelular, donde podrían ejercer efectos dañinos sobre las células vecinas.

## **V.2. FRAGMENTACIÓN DE DNA PROVOCADA POR LA HEXADECILFOSFOCOLINA EN CÉLULAS HepG2**

Ante estos antecedentes, nos planteamos examinar la posible conexión entre las alteraciones a nivel metabólico y morfológico causadas por la hexadecilfosfolina y el programa apoptótico. Para ello, hemos expuesto las células HepG2 a distintos tratamientos de hexadecilfosfolina, tras los cuales hemos realizado un ensayo de determinación de DNA fragmentado. Hemos utilizado como controles positivos dos inductores del proceso apoptótico, el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) en presencia de cicloheximida, que produce apoptosis en las células HepG2 (Bai y Cederbaum, 2000), y N-acetil-D-esfingosina (C<sub>2</sub>-ceramida), una ceramida sintética y permeable.

Las células HepG2 han sido incubadas en EMEM/ 10% FCS conteniendo hexadecilfosfolina 50  $\mu$ M durante 24 y 48 h, o bien en presencia de una concentración 100  $\mu$ M durante 6 y 24 h. Como controles positivos, las células fueron incubadas durante 6, 8, 11 y 24 h

en medio suplementado con TNF- $\alpha$  15 ng/mL y cicloheximida 40  $\mu$ M, o bien en medio conteniendo C<sub>2</sub>-ceramida 100  $\mu$ M durante 24 y 48 h. Como control negativo, hemos utilizado células mantenidas sin aditivos en el medio. Las células fueron entonces recogidas y se llevó a cabo la extracción del DNA fragmentado y su análisis mediante electroforesis en agarosa, como se describe en la sección de Material y Métodos.



**Figura 34. Fragmentación de DNA producida por tratamientos a largo plazo de hexadecilfosfolina en células HepG2.** Las células en fase logarítmica de crecimiento fueron incubadas en EMEM/ 10% FCS y tratadas con hexadecilfosfolina 50  $\mu$ M durante 24 y 48 h, hexadecilfosfolina 100  $\mu$ M durante 6 y 24 h, TNF- $\alpha$  15 ng/mL +

cicloheximida 40  $\mu\text{M}$  durante 6, 8, 11 y 24 h,  $\text{C}_2$ -ceramida 100  $\mu\text{M}$  durante 24 y 48 h, o ningún aditivo (controles). Entonces, las células fueron recogidas y se realizó una extracción del DNA fragmentado. Posteriormente, se llevó a cabo la electroforesis del DNA en un gel de agarosa al 1,5%. Líneas 1 y 16, marcador de tamaños del DNA; líneas 2 y 3, controles; línea 4, hexadecilfosfocolina 50  $\mu\text{M}$  durante 24 h; líneas 5 y 6, hexadecilfosfocolina 50  $\mu\text{M}$  durante 48 h; líneas 7 y 8, hexadecilfosfocolina 100  $\mu\text{M}$  durante 6 y 24 h, respectivamente; líneas 9-12,  $\text{TNF-}\alpha$  15 ng/mL + cicloheximida 40  $\mu\text{M}$  durante 6, 8, 11 y 24 h, respectivamente; líneas 13 y 14,  $\text{C}_2$ -ceramida 100  $\mu\text{M}$  durante 24 y 48 h, respectivamente.

Los resultados se muestran en la Figura 34, y hemos incluido un marcador de tamaños del DNA, a partir de la digestión de un plásmido, en ambos extremos del gel. Como se puede observar, no se aprecia fragmentación de DNA en los carriles correspondientes a las muestras controles sin tratamiento (filas 2 y 3) y a los tratamientos de hexadecilfosfocolina 50  $\mu\text{M}$  durante 24 h (fila 4) y 100  $\mu\text{M}$  durante 6 h (fila 7).

El tratamiento de  $\text{TNF-}\alpha$ / cicloheximida origina claramente la aparición de DNA fragmentado apoptótico, resultante del corte internucleosomal del DNA, a partir de las 11 h de incubación (filas 11 y 12), mientras que la exposición durante menos tiempo no permite la visualización de aquellos fragmentos de DNA de menor peso molecular (filas 9 y 10).

Es de destacar la aparición de DNA fragmentado en las células tratadas a largo plazo con la alquilfosfocolina, de manera que la incubación con hexadecilfosfocolina 50  $\mu\text{M}$  durante 48 h (filas 5 y 6) y 100  $\mu\text{M}$  durante 24 h (fila 7) ocasiona la fragmentación del DNA. Hemos de indicar que no se observó una liberación significativa de LDH al medio extracelular durante la incubación de las células en presencia de hexadecilfosfocolina 50  $\mu\text{M}$  hasta un periodo de 48 h, lo cual indica que la membrana plasmática permanece intacta. Por tanto, las células no presentaron un daño físico severo que implique la ruptura de la membrana plasmática, como ocurre durante la muerte celular necrótica. Así, los cambios morfológicos y metabólicos fueron

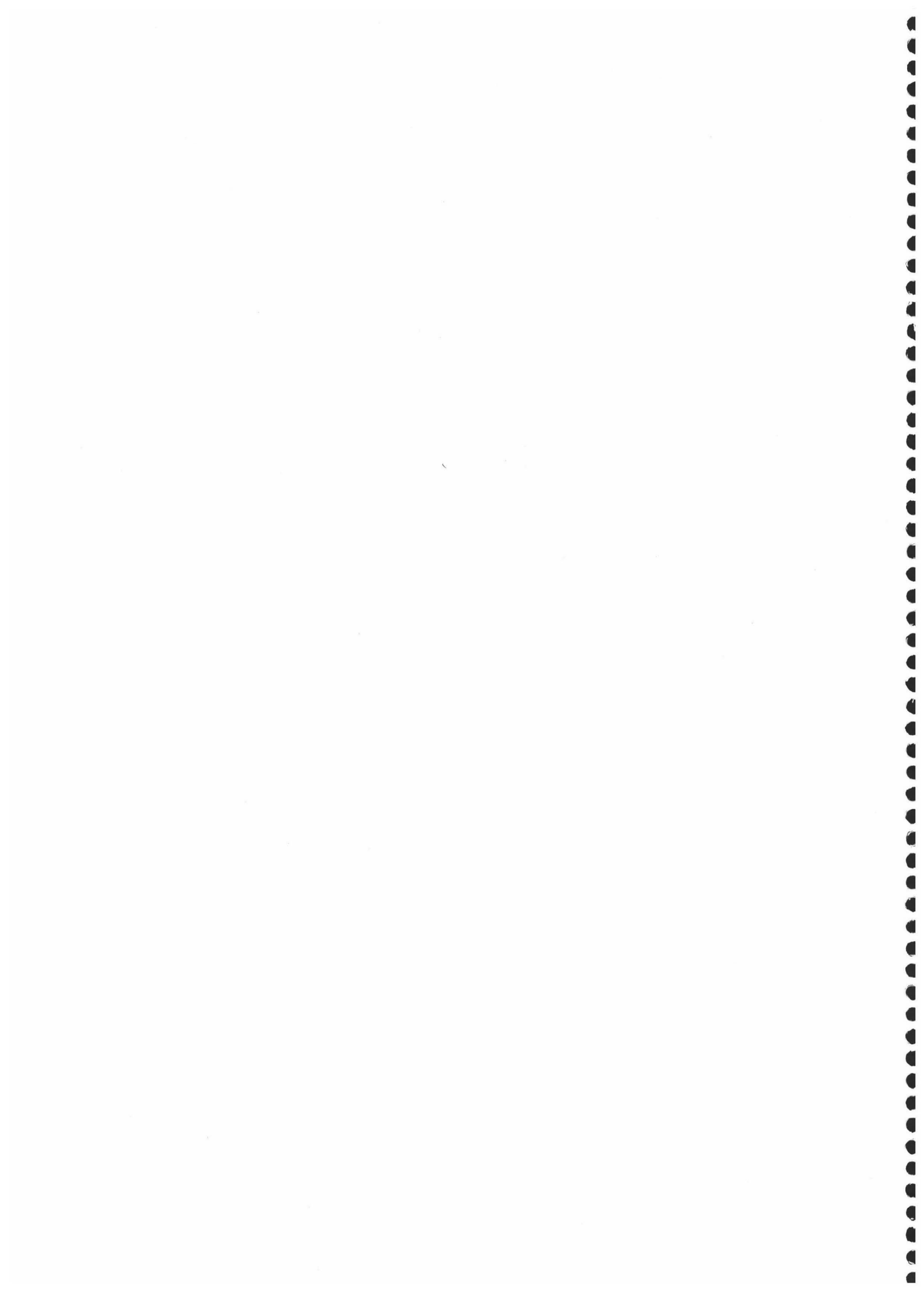
observados antes de ser aparente un daño severo de las células, determinado por la liberación de LDH y mediante tinción con azul de tripán.

No obstante, la administración de hexadecilfosfolina en nuestras condiciones experimentales solamente induce una respuesta apoptótica limitada en las células HepG2. Es posible que sea necesario establecer una concentración crítica de hexadecilfosfolina, o bien incrementar el tiempo de exposición al agente, para alcanzar una etapa tardía de fragmentación apoptótica del DNA que permita visualizar los fragmentos de menor tamaño molecular.

Por último, hemos de indicar que el tratamiento de las células HepG2 con C<sub>2</sub>-ceramida 100 µM durante 24 y 48 h (filas 13 y 14) induce una leve fragmentación del DNA, indicando que esta alta concentración de ceramida exógena de corta cadena produce sólo un efecto apoptótico marginal en estas células, como previamente se describió (di Bartolomeo y Spinedi, 2001).

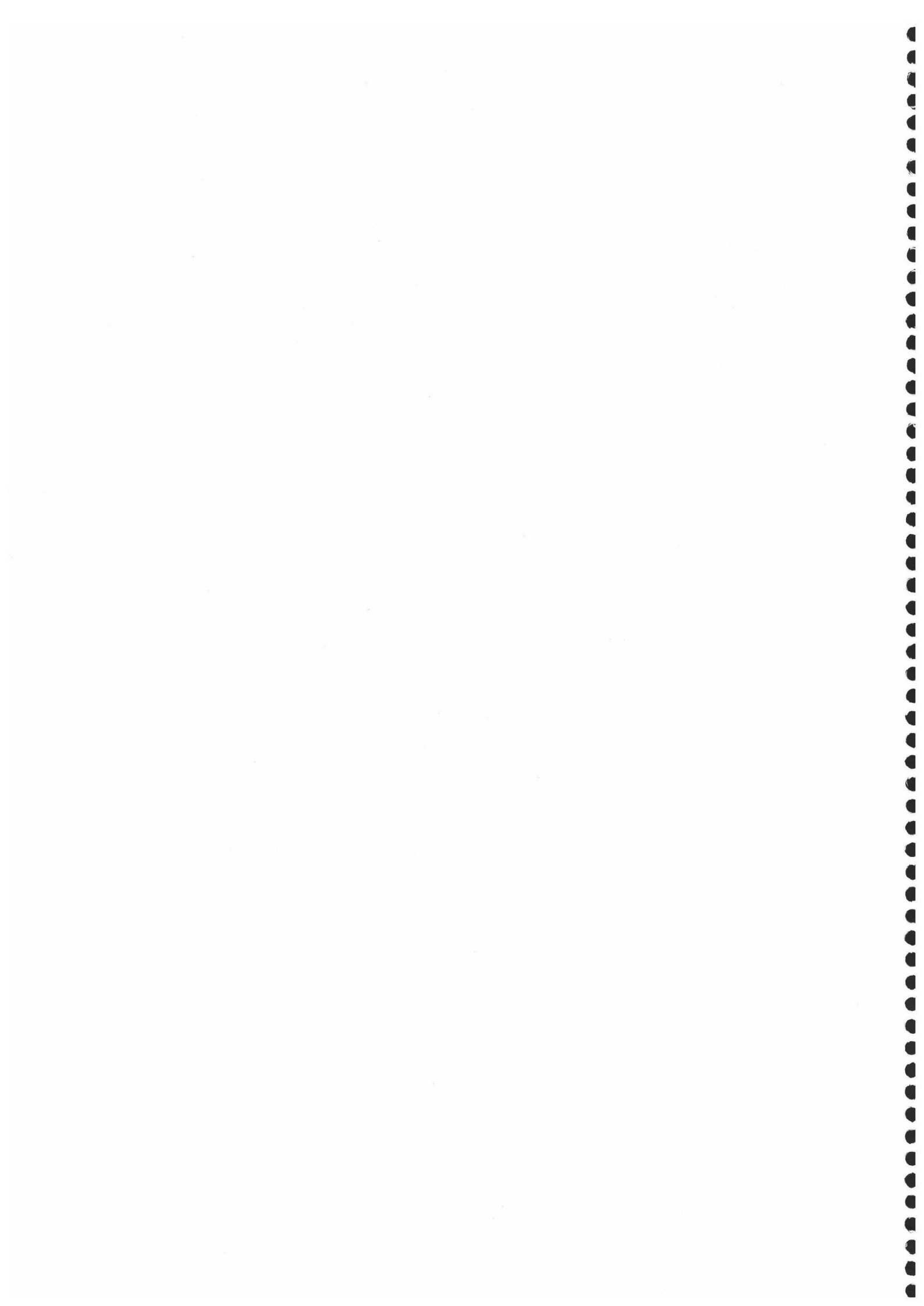
Nuestro estudio sugiere que las células HepG2 tratadas con hexadecilfosfolina a bajas concentraciones mueren por apoptosis a largo plazo, sin ocurrir una destrucción inespecífica de la membrana plasmática.







## **Discusión**



## **I. ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y CITOSTÁTICA DE LA HEXADECILFOSFOCOLINA EN CÉLULAS HepG2**

Las APC se unen fácilmente a la albúmina y a las lipoproteínas presentes en el suero, disminuyendo de esta manera la concentración efectiva del compuesto y, por tanto, la actividad biológica ejercida (Fleer *et al.*, 1993; Geilen *et al.*, 1994b). En consecuencia, y para mantener unas condiciones más cercanas a la situación fisiológica, todos los experimentos que implicaron un tratamiento con HePC fueron realizados incubando las células en medio completo suplementado con suero (EMEM/ 10% FCS).

En primer lugar, evaluamos la actividad citotóxica y antiproliferativa de la HePC, en función de la dosis y del tiempo de exposición, en las células HepG2. Nuestros datos indican que concentraciones superiores a 100  $\mu\text{M}$  durante 6 h producen alteraciones de permeabilidad de la membrana plasmática y, en consecuencia, causan un efecto lítico, rápido e inespecífico.

No obstante, la exposición de las células a concentraciones de HePC 50-75  $\mu\text{M}$  produce una reducción en el número de células viables sin indicios aparentes de toxicidad. Este resultado indica que el efecto citostático ejercido por la HePC es específico, aboliendo la proliferación celular cuando aún las células son viables. Las cantidades de HePC requeridas para producir esta acción antiproliferativa están de acuerdo con aquellas encontradas utilizando otras líneas celulares tumorales, tales como células MDCK (Wieder *et al.*, 1995), HeLa (Wieder *et al.*, 1993) y HL-60 (Boggs *et al.*, 1998), indicando que las células HepG2 son moderadamente sensibles a la actividad tóxica y citostática de concentraciones de HePC en el rango micromolar.

## **II. EFECTOS DE LA HEXADECILFOSFOCOLINA SOBRE EL METABOLISMO LIPÍDICO EN CÉLULAS HepG2**

Se desconocen los mecanismos bioquímicos exactos por los cuales la HePC, y probablemente también otros análogos lipídicos antineoplásicos, desencadena una acción antiproliferativa. Estos compuestos son absorbidos directamente en las membranas biológicas, donde se acumulan (Geilen *et al.*, 1994b). Primero se asocian a la membrana plasmática y posteriormente se internan mediante endocitosis, distribuyéndose por las membranas intracelulares. Puede asumirse, por tanto, que estos agentes interfieren con la composición lipídica de las membranas y, en consecuencia, con distintos procesos metabólicos.

Los efectos de la HePC sobre la proliferación celular y el metabolismo pueden no obstante diferir dependiendo del tipo celular (Fleer *et al.*, 1996) y/o de la tasa de aceptación por parte de la célula (Ries *et al.*, 1993).

## II.1. SÍNTESIS *DE NOVO* DE FOSFATIDILCOLINA

Un efecto sistemático causado por la HePC es la reducción en la biosíntesis *de novo* de fosfatidilcolina en distintos tipos celulares (Berkovic *et al.*, 1995; Detmar *et al.*, 1994; Geilen *et al.*, 1992; Haase *et al.*, 1991; Posse de Chaves *et al.*, 1995; Wieder *et al.*, 1998). De modo similar, nuestros resultados demuestran que la HePC dificulta la incorporación de varios precursores exógenos a fosfatidilcolina, el producto final de la ruta CDP-colina, en la línea celular de hepatoma HepG2. Así, incubando las células en presencia de glicerol, ácidos grasos o colina, marcados isotópicamente, la exposición a HePC causa una disminución significativa en la producción *de novo* de fosfatidilcolina.

La reducción en la incorporación de colina no fue debida a una alteración en su aceptación por las células HepG2, un resultado que está de acuerdo con los datos aportados por Geilen y colaboradores utilizando células MDCK cells (1992), pero que se opone a las observaciones hechas por otros investigadores trabajando con neuronas de rata (Posse de Chaves *et al.*, 1995) o con células KB (carcinoma) y Raji (linfoma) (Berkovic *et al.*, 1995), mostrando que la HePC interfiere con la toma de colina por parte de aquellas células y ocasiona de esta manera una disminución en la biosíntesis de fosfatidilcolina. Estos últimos autores indicaron que

Geilen y colaboradores (1992) no observan una alteración en la toma intracelular de colina por HePC debido a que incubaron las células en presencia de este agente durante solamente 2 min, tiempo insuficiente para producir algún efecto observable. Nosotros, sin embargo, expusimos las células a la HePC desde 5 min hasta 6 h, y aún no observamos ningún cambio en la aceptación de colina por parte de las células HepG2, demostrando que el mecanismo por el cual la HePC actúa en esta línea celular no está relacionado, al menos, con la disponibilidad de colina intracelular.

Nuestros resultados indican también que la menor incorporación de radiactividad, procedente de la colina exógena marcada, a fosfatidilcolina en las células tratadas con HePC, comparada con la observada en las células controles, no fue debida a un efecto de la HePC sobre la velocidad de recambio de la fosfatidilcolina intracelular o su secreción al medio. Estos datos contrastan con aquellos obtenidos con otras líneas celulares, como por ejemplo usando las células KB y Raji, en las cuales se observó una pronunciada disminución en la incorporación de colina a fosfatidilcolina para las células tratadas con HePC en paralelo con un incremento en la degradación de la fosfatidilcolina recién sintetizada (Berkovic *et al.*, 1995).

Merece destacar que la reducción observada en la incorporación de colina exógena a fosfatidilcolina fue acompañada por una acumulación de la radiactividad asociada a colina-fosfato, y por una reducción en los niveles radiactivos de CDP-colina, sugiriendo que la colina-fosfato citidililtransferasa (CT) podía ser diana de acción de la HePC en células HepG2. Por otra parte, el grado de disminución en la producción de fosfatidilcolina recién sintetizada fue dependiente de la dosis de HePC, así como del tiempo de exposición, de manera que una incubación en presencia de la alquilfosfocolina durante sólo 30 min no alteró la incorporación de ácidos grasos (apartado II.1.2) o colina exógenos (no mostrado) a las diferentes fracciones lipídicas.

La actividad citosólica colina quinasa y la actividad ligada a membrana diacilglicerol colinafosfotransferasa permanecieron inalteradas por la HePC, mientras la actividad CT fue

sensiblemente modificada. Está bien documentado que la CT es inactiva en forma soluble y se activa cuando se une a membranas, por tanto un posible modo de regulación de su actividad sería vía translocación entre membranas y citosol (Vance, 1990). Después de exponer las células HepG2 a un tratamiento de HePC 50  $\mu\text{M}$  durante 6 h, la actividad CT disminuyó significativamente en la fracción particulada de las células e incrementó en la fracción soluble, como puede observarse cuando los valores se expresan como porcentajes de la actividad CT total. Nuestros resultados demuestran que la HePC afecta a la distribución subcelular de la CT sin modificar su actividad total, lo cual confirma los resultados descritos anteriormente en células MDCK (Geilen *et al.*, 1992; Wieder *et al.*, 1995), HeLa (Wieder *et al.*, 1993), HL-60 (Boggs *et al.*, 1998) y queratinocitos (Detmar *et al.*, 1994).

Por tanto, en células HepG2 la HePC parece actuar sobre el mecanismo de translocación de la CT, bien promoviendo la liberación de la enzima desde la membrana al citosol u obstaculizando la inserción de la forma soluble a la membrana. Para explorar ambas posibilidades, realizamos experimentos *in vitro* analizando el efecto de la HePC sobre la actividad CT, tanto soluble en el citosol como asociada a membranas en una fracción particulada aislada de las células HepG2. Con respecto a la actividad CT citosólica, investigamos el efecto de la HePC en presencia de diferentes cantidades de vesículas de fosfatidilcolina/ oleato actuando como lípidos activadores. Incluyendo bajos niveles de liposomas de fosfatidilcolina/ oleato en la mezcla de ensayo, la actividad CT citosólica fue inhibida significativamente por HePC, indicando que este compuesto interfiere con la translocación de la forma soluble e inactiva de la enzima a los liposomas.

Este efecto inhibitorio no fue observado en presencia de altas concentraciones de liposomas de fosfatidilcolina/ oleato, aboliéndose la acción de la HePC como inhibidor competitivo del activador lipídico (Boggs *et al.*, 1998). El efecto estimulador de la HePC sobre la actividad CT citosólica en ausencia de liposomas puede explicarse en base a la habilidad de este compuesto anfifílico para formar micelas en medio acuoso, de manera que la CT soluble podría reconstituirse en parte y mostrar una mayor actividad en presencia de tales micelas. Por

otra parte, y de acuerdo con nuestra hipótesis, la actividad CT ligada a membranas no fue alterada *in vitro*, demostrándose que la HePC no promueve la liberación de la enzima desde la membrana a la fracción soluble.

Wieder y colaboradores (1995) describieron que la HePC 50  $\mu\text{M}$  inhibe *in vitro* la actividad CT procedente de un homogeneizado de células MDCK, ensayada en presencia de liposomas de fosfatidilcolina/ oleato (100  $\mu\text{M}$ :100  $\mu\text{M}$ ). En nuestro estudio, sin embargo, no observamos una disminución de la actividad CT cuando la HePC fue añadida directamente a un homogeneizado de células HepG2 durante ensayos *in vitro* en presencia o ausencia de liposomas (no mostrado). Geilen y colaboradores (1992), de acuerdo con nuestros resultados, describieron la ausencia de un efecto inhibitorio de la HePC sobre la actividad CT *in vitro* cuando se utilizaron liposomas conteniendo fosfatidilcolina 400  $\mu\text{M}$  y oleato 400  $\mu\text{M}$ , sugiriendo que la cantidad de lípido activador en la mezcla de ensayo puede ser un factor importante para la observación del efecto inhibitorio causado por la HePC *in vitro*. En este sentido, los niveles de lípidos endógenos contenidos en las membranas utilizadas podrían influir también en el efecto final observado. No obstante, la actividad CT ensayada en la fracción soluble sí fue modulada en nuestro estudio por las cantidades relativas de HePC y lípido activador, como se indicó anteriormente.

Nuestros resultados demuestran que la HePC ejerce una acción específica de inhibición de la biosíntesis *de novo* de fosfatidilcolina a nivel de la actividad CT en células HepG2, interfiriendo con el proceso de translocación de la CT soluble a la membrana, lo cual puede ser finalmente responsable de la acción antiproliferativa ejercida por la HePC en estas células. Otros autores han descrito igualmente una correlación entre la inhibición de la biosíntesis de fosfatidilcolina causada por acción de la APC y el efecto de inhibición ejercido sobre la proliferación celular y el crecimiento tumoral (Wieder *et al.*, 1995). Por tanto, la inhibición de la biosíntesis de fosfatidilcolina puede estar relacionada, al menos en parte, con los efectos antiproliferativos ocasionados por esta clase de fármacos citotóxicos.

Nuestras conclusiones están apoyadas por los descubrimientos realizados por Boggs y colaboradores (1998), demostrando que la adición de lisofosfatidilcolina a células HL-60 tratadas con HePC revierte la actividad citotóxica y antiproliferativa de este agente, y además evita que se desencadene un programa de apoptosis. Así, la lisofosfatidilcolina exógena suministra una ruta alternativa, a través de su acilación, para la síntesis de fosfatidilcolina. Por tanto, estos autores sugieren que la acción de inhibición de la biosíntesis *de novo* de fosfatidilcolina a nivel de la CT es el mecanismo primario por el cual la HePC inhibe el crecimiento celular.

Estos investigadores describen un posible mecanismo de acción para la HePC, y otros compuestos análogos de lisofosfatidilcolina, actuando como inhibidores no fisiológicos de la CT (Boggs *et al.*, 1995a). Así, la inhabilidad de las células para metabolizar eficientemente estos compuestos conlleva la aparición de efectos citotóxicos. Según este modelo, estos agentes alteran la estructura física de la bicapa, perturbando la interacción citidililtransferasa-membrana. Nuestros resultados están de acuerdo con esta hipótesis, y sugieren que la presencia de HePC en las membranas afecta a la distribución intracelular de la CT obstaculizando su inclusión a la membrana, donde alcanza la conformación activa por unión a lípidos.

## II.2. SÍNTESIS *DE NOVO* DE OTROS GLICEROFOSFOLÍPIDOS

De manera muy interesante, la HePC modifica la utilización de glicerol o ácidos grasos marcados isotópicamente para la síntesis *de novo* de fosfatidilcolina y fosfatidilserina en células HepG2, sin afectar a la producción del resto de fosfolípidos recién sintetizados.

Se utilizó serina marcada radiactivamente con objeto de comprobar un posible efecto de la HePC sobre la biosíntesis de fosfatidilserina, comprobando que la exposición celular al agente no afecta a la incorporación de serina exógena a fosfatidilserina vía reacción de intercambio de bases, ni tampoco altera los procesos de transporte y descarboxilación implicados en la síntesis posterior de fosfatidiletanolamina en mitocondrias. Este resultado se confirma además por la



ausencia de efectos de la alquilfosfocolina sobre la actividad fosfatidilserina sintasa determinada *in vitro*.

Por tanto, nuestros resultados indican claramente que la reducción en el marcaje asociado a la fracción de fosfatidilserina, en las células tratadas con HePC, procede de la inhibición ocasionada por este compuesto en la biosíntesis de su principal precursor metabólico, la fosfatidilcolina. En conjunto, nuestros datos demuestran que la HePC ejerce una acción específica de inhibición de la síntesis de fosfatidilcolina vía CDP-colina, sin afectar de modo directo a la producción *de novo* del resto de fosfolípidos mayoritarios analizados.

No obstante, la exposición de las células a HePC aumenta levemente la incorporación de etanolamina exógena a fosfatidiletanolamina, sugiriendo un posible mecanismo de compensación del efecto de reducción en la producción de fosfatidilcolina de nueva síntesis mediante un incremento en la biosíntesis *de novo* de fosfatidiletanolamina.

### **II.3. SÍNTESIS *DE NOVO* DE ESFINGOMIELINA Y CERAMIDA**

Asimismo, la inhibición de la síntesis *de novo* de fosfatidilcolina por acción de la HePC puede también explicar, al menos parcialmente, la reducción observada en los niveles radiactivos de esfingomielina sintetizada a partir de fosfatidilcolina de nueva síntesis, como puede observarse cuando se utilizan colina y ácidos grasos exógenos marcados isotópicamente como precursores metabólicos. No obstante, no podemos descartar que algún paso en la ruta biosintética de este esfingolípido pudiera estar además inhibido por acción de la HePC.

Otros autores, de acuerdo con nuestros resultados, han observado una correlación positiva entre la inhibición de los procesos biosintéticos de fosfatidilcolina y esfingomielina (Wieder *et al.*, 1998), sugiriendo que la inhibición en la producción del precursor fosfatidilcolina limita la reacción de síntesis de este esfingolípido catalizada por la ceramida:fosfatidilcolina colinafosfotransferasa.

Es interesante destacar el significativo aumento causado por la HePC en la producción de ceramidas de nueva síntesis. Este efecto puede estar correlacionado con la inhibición observada en la síntesis *de novo* de esfingomielina, de manera que el precursor ceramida se acumularía intracelularmente. Estos datos sugieren que la HePC puede interferir con el ciclo de la esfingomielina, una ruta de transducción intracelular de señales que está implicada en procesos tales como la proliferación, diferenciación y muerte celular. Wieder y colaboradores (1998) indicaron que la inducción de apoptosis por HePC depende posiblemente de la relación entre las concentraciones intracelulares de ceramida y diacilglicerol. Puesto que esta APC provoca un aumento en la producción *de novo* de ambos, es posible que sea necesaria una concentración crítica de HePC para provocar apoptosis, tal y como hemos observado en nuestro estudio.

Tras incubar con serina exógena, los niveles radiactivos de ceramida aparecen disminuidos como consecuencia del tratamiento con HePC. Este efecto, contrario al observado incubando con ácidos grasos exógenos, puede explicarse si la mayoría del marcaje asociado a ceramida procediera de la síntesis de esfingosina a partir de serina, de modo que la utilización del palmitato para procesos de esterificación lipídica limite el proceso de síntesis *de novo* de ceramida.

#### **II.4. SÍNTESIS *DE NOVO* DE DIFERENTES LÍPIDOS NEUTROS**

Tras incubar las células con glicerol o ácidos grasos exógenos radiactivos, se observa cómo la HePC produce un incremento en la incorporación de estos sustratos a diacilglicerol y triacilglicerol. Asimismo, tras incubar con serina exógena también se aprecia el aumento en los niveles radiactivos de triacilglicerol, de modo que la APC favorece la captura de los ácidos grasos sintetizados a partir de serina.

Tal y como describió Geilen y colaboradores (1992), el acúmulo en la producción de diacilglicerol recién sintetizado puede ser una consecuencia del bloqueo ocasionado por HePC a nivel de la CT en la ruta de síntesis *de novo* de fosfatidilcolina, impidiendo su retirada hacia esta vía por limitación del sustrato CDP-colina. No obstante, posibles alteraciones locales en la

población de diacilglicerol podrían también afectar a la actividad CT o bien limitar el paso final de la ruta CDP-colina. Wieder y colaboradores (1993) describieron un incremento del contenido celular de diacilglicerol en células MDCK y HeLa incubadas simultáneamente con HePC y ésteres de forbol, sugiriendo por tanto que la interferencia ejercida por la HePC sobre la translocación de la CT no está mediada por una disminución de diacilglicerol intracelular.

Debido al acúmulo de diacilglicerol marcado por efecto de la HePC, se observa también un incremento notable en los niveles radiactivos de triacilglicerol. Además, es de destacar que los niveles radiactivos de fosfatidiletanolamina no aparecen modificados cuando utilizamos glicerol o palmitato marcados isotópicamente, a pesar del aumento en la producción de diacilglicerol recién sintetizado. Estos resultados sugieren que la población de diacilglicerol no utilizada en la ruta CDP-colina deriva principalmente hacia la producción de triacilglicerol. Por el contrario, el incremento de incorporación de radiactividad a diacilglicerol tras incubación con araquidonato radiactivo se reflejó, además, en un aumento significativo del marcaje asociado a fosfatidiletanolamina, indicando que la población de diacilglicerol conteniendo este ácido graso poliinsaturado, desviada de la vía CDP-colina, deriva eficientemente hacia la síntesis *de novo* de este fosfolípido.

Es de gran interés resaltar que, a pesar del incremento generalizado en la producción *de novo* de acilgliceroles causado por la HePC, la radiactividad asociada a los ésteres de colesterol se muestra marcadamente reducida, determinado tras incubación con ácidos grasos exógenos, sugiriendo una acción específica de este agente a nivel del proceso de esterificación de colesterol, catalizado por la colesterol O-aciltransferasa.

## II.5. DEGRADACIÓN LIPÍDICA

Según hemos demostrado en nuestro estudio, la HePC no afecta en células HepG2 a la velocidad de recambio metabólico de los distintos lípidos endógenos analizados. Por tanto, el efecto de disminución en los niveles radiactivos de fosfatidilcolina no puede deberse a la degradación de este fosfolípido por acción de la alquilfosfocolina. Boggs y colaboradores

(1998), de acuerdo con nuestros resultados, tampoco observaron una alteración en la velocidad de degradación de fosfatidilcolina, marcada a partir de colina, por efecto de la HePC. Este resultado indica, además, que los niveles radiactivos asociados a los intermediarios metabólicos de la ruta CDP-colina no están alterados por una degradación vía fosfolipasas C y/o D estimulada por HePC de la fosfatidilcolina marcada recién sintetizada.

Lucas y colaboradores (2001), sin embargo, han descrito una activación dosis dependiente de la fosfolipasa D por efecto de la HePC en varios tipos de células. En nuestro estudio, los niveles radiactivos de fosfatidato, sintetizado a partir de glicerol marcado exógeno, no son modificados por efecto de la alquilfosfocolina, descartándose nuevamente una acción estimuladora de este agente sobre la fosfolipasa D en la línea celular HepG2.

## II.6. COMPOSICIÓN LIPÍDICA

Como indicamos anteriormente, la disminución en la producción *de novo* de fosfatidilcolina por acción de la alquilfosfocolina probablemente ocasiona el efecto de inhibición del crecimiento celular. El tratamiento de las células HepG2 con HePC 50  $\mu\text{M}$  disminuye el contenido celular de fosfatidilcolina después de 48 h de incubación, tal y como se describió también en células MDCK (Haase *et al.*, 1991) o células HL-60 (Boggs *et al.*, 1998).

No obstante, la acción citostática ejercida por este agente no permite observar una reducción en la cantidad específica celular de fosfatidilcolina cuando ésta se refiere a la cantidad de proteína celular. Así, no se puede dissociar la inhibición en la producción de fosfatidilcolina del bloqueo en el crecimiento celular en respuesta a la HePC. De hecho, Berkovic y colaboradores (1995) observaron solamente cambios insignificantes en los niveles de fosfatidilcolina tras el tratamiento de células KB y Raji con HePC durante 24 h.

Por otra parte, y como era de esperar, la inhibición de la biosíntesis de fosfatidilcolina conlleva una reducción en la masa del resto de especies fosfolipídicas mayoritarias. Los niveles

intracelulares de triacilglicerol, referidos a la cantidad de proteína, fueron incrementados por acción de la HePC, debido probablemente al acúmulo intracelular de diacilglicerol como consecuencia de la inhibición en la producción de fosfatidilcolina.

### III. REVERSIBILIDAD DE LAS ALTERACIONES PRODUCIDAS POR HEXADECILFOSFOCOLINA EN CÉLULAS HepG2

La supresión del tratamiento de HePC anula su acción, de manera que los efectos ocasionados a nivel metabólico sólo son observados cuando la alquilfosfocolina está presente en el medio de incubación. Con respecto al efecto sobre la biosíntesis *de novo* de fosfatidilcolina, dado que la translocación de la CT entre las membranas y la fracción soluble es un proceso reversible, es posible que sólo por acción directa de la alquilfosfocolina cambie la distribución intracelular de la enzima, revirtiendo el efecto cuando ésta es retirada. La reversibilidad de los efectos causados por la HePC demuestra su especificidad de su acción, descartando que estos efectos sean debidos simplemente a muerte celular.

Wieder y colaboradores (1995) describieron también el efecto de inhibición reversible provocado por HePC y ET-18-OCH<sub>3</sub> sobre la biosíntesis de fosfatidilcolina, estando mediada esta inhibición por translocación de la CT desde membranas al citosol. Igualmente, Posse de Chaves y colaboradores (1995) indicaron que el efecto ocasionado por la HePC sobre el crecimiento neuronal es reversible y no se debe a un efecto citotóxico directo.

Desde un punto de vista farmacológico, estos resultados indican que la exposición continuada de las células al compuesto puede requerir una periodicidad en el tratamiento, de modo que la concentración efectiva del agente sea la adecuada para ejercer su actividad. En células Caco-2T, derivadas de una línea celular procedente de un cáncer de colon humano, una significativa cantidad (aprox. 35%) de la HePC tomada por las células es detectada incluso

después de 48 h tras su retirada del medio de incubación (Steelant *et al.*, 1995), indicando que este agente es fuertemente retenido en las membranas celulares.

Por otra parte, en nuestro estudio hemos demostrado que el oleato ejerce una acción antagónica, con respecto a la HePC, sobre la biosíntesis de fosfatidilcolina vía CDP-colina. Así, se observa un incremento en la incorporación de colina a fosfatidilcolina y una disminución en la incorporación de este sustrato al intermediario colina-fosfato, sugiriendo una interferencia nuevamente a nivel de la etapa catalizada por la colina-fosfato citidililtransferasa.

Hemos de indicar que la acción ejercida por el oleato también revierte rápidamente en cuanto éste es retirado del medio de incubación (resultados no mostrados). Por tanto, nuestros datos apoyan un mecanismo de acción por el cual la actividad colina-fosfato citidililtransferasa es modulada mediante un proceso de translocación reversible por acción de HePC y oleato. En este sentido, Geilen y colaboradores (1994a) indican que aquellos lípidos conteniendo colina como grupo de cabeza, tales como alquilfosfocolinas, alquillisofosfatidilcolinas o fosfatidilcolina, inhiben el proceso de translocación a membranas de la CT, mientras que lípidos que no presentan el grupo de cabeza colina, tales como oleato o diacilglicerol, pueden activar la translocación a membranas de la CT presente en forma soluble.

#### **IV. CAMBIOS MORFOLÓGICOS Y APOPTOSIS INDUCIDOS POR HEXADECILFOSFOCOLINA EN CÉLULAS HepG2**

Las observaciones mediante microscopía óptica de las células HepG2 expuestas a tratamiento con HePC muestran alteraciones en la morfología celular, sugiriendo la participación de cambios metabólicos causados por este agente. Como describieron Kaufmann-Kolle y colaboradores (1996), la disminución de densidad celular puede ser debida a una inhibición del crecimiento y a la pérdida de adherencia como resultado de un desbalance del

$\text{Ca}^{2+}$  intracelular y daños en el citoesqueleto. Los efectos inhibidores del crecimiento sobre células tumorales pueden resultar también por inducción de muerte celular programada (Berkovic, 1998).

Está descrito que la inhibición selectiva de la biosíntesis de fosfatidilcolina interrumpe la progresión del ciclo celular y provoca apoptosis. Así, células CHO mutantes presentando una colina-fosfato citidililtransferasa termosensible experimentan apoptosis cuando son expuestas a temperaturas restrictivas que inactivan esta enzima (Cui *et al.*, 1996), y las células HL-60 son rescatadas de la apoptosis causada por inhibidores de la síntesis de fosfatidilcolina (ET-18-OCH<sub>3</sub>, HePC) si se sobreexpresa la citidililtransferasa (Baburina y Jackowski, 1998) o si se suministra lisofosfatidilcolina como fuente alternativa de fosfatidilcolina (Boggs *et al.*, 1998; 1995b). Es posible, por tanto, que la respuesta apoptótica resulte directamente de una pérdida de la integridad o funcionalidad de membrana debido a una reducción en la producción de fosfatidilcolina.

La alteración de la estructura de las membranas, incluyendo fragmentación y reducción en el tamaño celular, es un componente de la transición morfológica que caracteriza al proceso de degeneración citológica asociado con la muerte celular programada. Por consiguiente, la inhibición de la síntesis de fosfatidilcolina puede ser un componente de la fase de ejecución del programa apoptótico (Anthony *et al.*, 1999; Miquel *et al.*, 1998). Hemos de indicar, además, que las células transformadas son más sensibles frente a la inhibición de la biosíntesis de fosfatidilcolina, ya que presentan una mayor demanda de este fosfolípido para mantener la biomasa de los fosfolípidos de membrana.

No obstante, el mecanismo por el cual la inhibición de la biosíntesis de fosfatidilcolina conduce a muerte celular por apoptosis no es conocido. La fosfatidilcolina es un precursor metabólico de la esfingomielina, de manera que la reducción en su producción inhibe la biosíntesis de esfingomielina, ocasionando un acúmulo intracelular de ceramida. Se sugiere, además, la implicación de este segundo mensajero como mediador celular en la consecución del

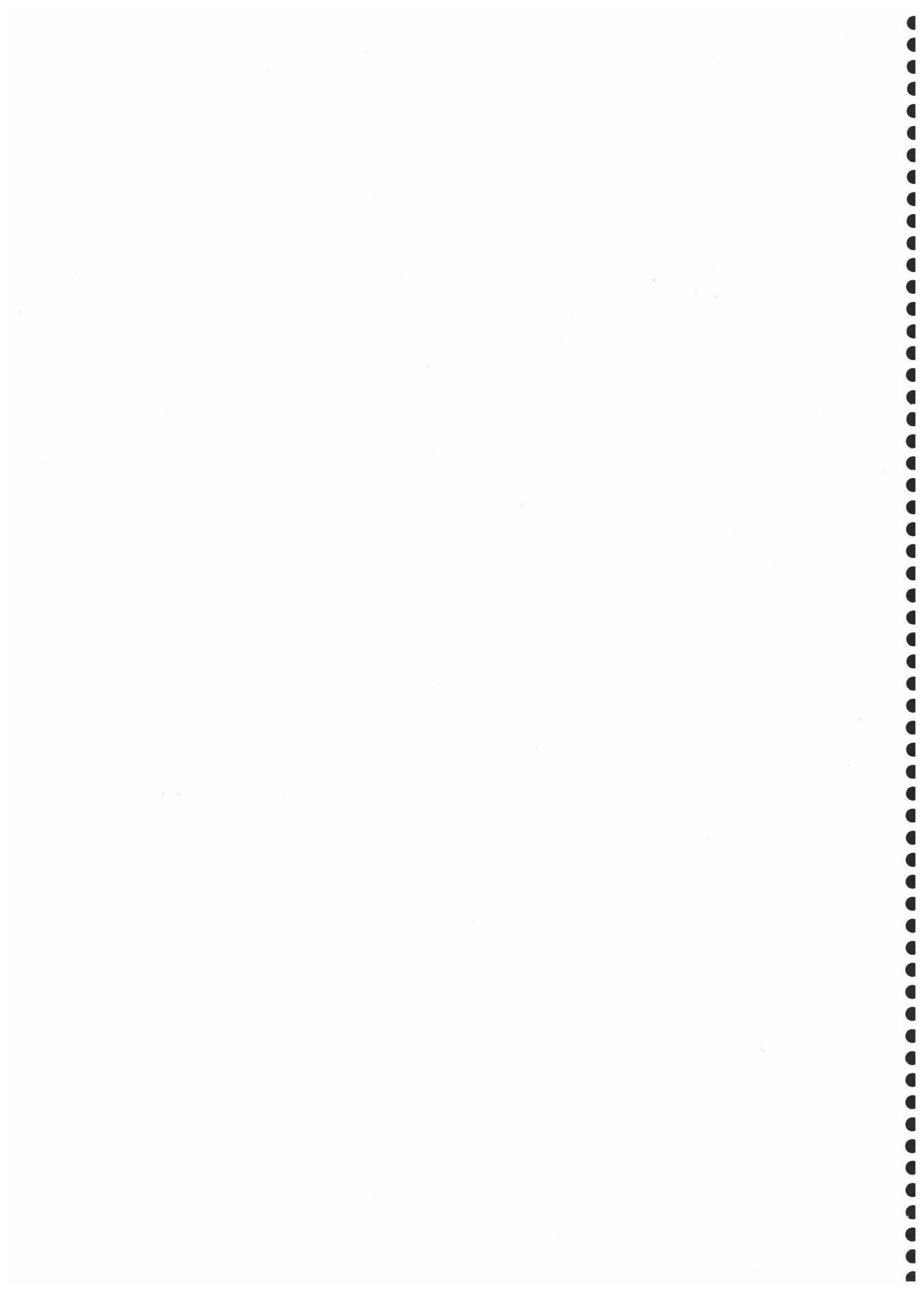
programa apoptótico, ya que se ha observado que la ceramida es un potente inductor del proceso en diferentes tipos celulares (Allan, 2000; Hannun y Obeid, 1995).

En este sentido, en nuestro estudio hemos observado que el tratamiento de las células HepG2 con HePC, a concentraciones no líticas, incrementa la incorporación de radiactividad, procedente de ácidos grasos exógenos marcados, a ceramida celular. Además, hemos demostrado que esta alquilfosfolina inhibe la biosíntesis *de novo* de fosfatidilcolina y, consecuentemente, también la biosíntesis de esfingomielina. Finalmente, el tratamiento prolongado de las células con HePC produce fragmentación de DNA, sin ocasionar un daño significativo de la membrana plasmática. Así, nuestros resultados indican que la HePC induce apoptosis en células HepG2, pudiendo ser la ceramida el mediador intracelular que conecta la inhibición de la biosíntesis de fosfatidilcolina, a nivel de la CT, con el programa apoptótico, tal y como describieron también Wieder y colaboradores (1998) utilizando células HaCaT.





## **CONCLUSIONES**



1.- La línea celular HepG2 resiste considerablemente efectos adversos del etanol, tales como alteraciones de permeabilidad de la membrana, formación de peróxidos o activación de la biosíntesis de lípidos neutros, los cuales han sido ampliamente descritos en cultivos primarios de hepatocitos o en hepatocitos aislados. En este estudio demostramos que las células HepG2 metabolizan activamente el etanol vía MEOS, principalmente por isoformas P<sub>450</sub> no inducibles. Por tanto, la resistencia al alcohol parece ser debida a que estas células carecen de ADH y de la isoforma inducible P<sub>450</sub>2E1.

2.- Interesantemente, el etanol ejerce acciones particulares sobre las diferentes rutas biosintéticas de fosfolípidos en células HepG2, causando específicamente una disminución en la producción *de novo* de los fosfolípidos mayoritarios, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina. Además, el alcohol actúa exclusivamente a nivel de la actividad biosintética, sin afectar al recambio metabólico o la secreción al medio extracelular de los distintos fosfolípidos analizados.

3.- Al contrario de lo descrito en hepatocitos normales, la exposición a corto plazo o prolongada al etanol provoca sólo una leve estimulación lipogénica en células HepG2, debida al ligero incremento en la producción de acetyl-CoA como consecuencia de su oxidación. El aumento en la secreción de triacilglicerol al medio de cultivo en las células tratadas con alcohol deriva del acúmulo intracelular de triacilglicerol recién sintetizado, puesto que la exportación del triacilglicerol endógeno no se afecta por exposición al etanol.

4.- La línea celular HepG2 es sensible a la actividad citotóxica y citostática del compuesto antitumoral hexadecilfosfocolina. Así, la exposición a este agente produce diversas alteraciones morfológicas, además de causar cambios metabólicos que, a largo plazo, inducen apoptosis.

5.- La hexadecilfosfocolina inhibe específicamente la ruta de biosíntesis de fosfatidilcolina vía CDP-colina en células HepG2, concretamente a nivel de la etapa limitante

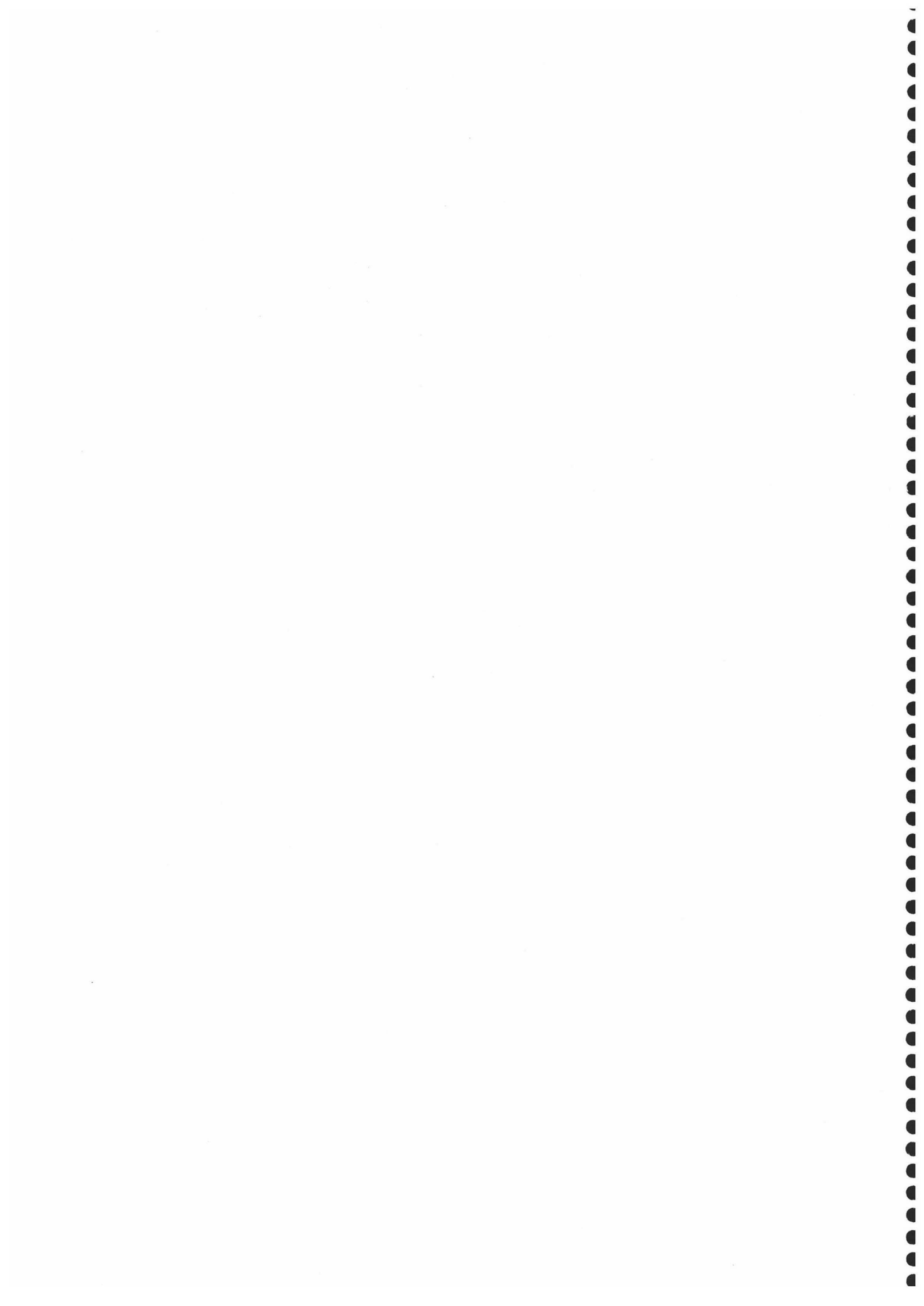
catalizada por la CTP:colina-fosfato citidililtransferasa, obstaculizando la translocación de la enzima soluble a las membranas, donde es activa. Además, la acción de la alquilfosfocolina revierte cuando es suprimida del medio de incubación, confirmando la interferencia directa del agente sobre la distribución reversible de la citidililtransferasa.

6.- El resto de las alteraciones ocasionadas por acción de la hexadecilfosfocolina derivan de la inhibición de la síntesis *de novo* de fosfatidilcolina, ocasionando una disminución en la producción de esfingomielina de nueva síntesis y, como consecuencia, el acúmulo de la ceramida precursora. Así, la interferencia con el ciclo de la esfingomielina puede ser el factor que desencadene apoptosis en estas células.

7.- Nuestros estudios utilizando la línea celular de hepatoma HepG2 confirman, nuevamente, el potencial del análogo lipídico HePC como agente antineoplásico, de modo que la aplicación sistémica de alquilfosfocolinas podría ser útil en el tratamiento quimioterapéutico de tumores de procedencia hepática.



## **BIBLIOGRAFÍA**



Adachi M, Ishii H (2002) Role of mitochondria in alcoholic liver injury(1)(2). *Free Radic. Biol. Med.* 32, 487-491.

Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles BB (1979) Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 282, 615-616.

Albi E, Magni MV (1999) Sphingomyelin synthase in rat liver nuclear membrane and chromatin. *FEBS Lett.* 460, 369-372.

Alessenko AV (2000) The role of sphingomyelin cycle metabolites in transduction of signals of cell proliferation, differentiation and death. *Membr. Cell. Biol.* 13, 303-320.

Allan D (2000) Lipid metabolic changes caused by short-chain ceramides and the connection with apoptosis. *Biochem. J.* 345, 603-610.

Alley MC, Scudiero DA, Monks A (1988) Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* 48, 589-601.

Anthony ML, Zhao M, Brindle KM (1999) Inhibition of phosphatidylcholine biosynthesis following induction of apoptosis in HL-60 cells. *J. Biol. Chem.* 274, 19686-19692.

Antonsson B (1997) Phosphatidylinositol synthase from mammalian tissues. *Biochim. Biophys. Acta* 1348, 179-186.

Aoyama C, Yamazaki N, Terada H, Ishidate K (2000) Structure and characterization of the genes for murine choline/ethanolamine kinase isozymes alpha and beta. *J. Lipid. Res.* 41, 452-464.

Aridor-Piterman O, Lavie Y, Liscovitch M (1992) Bimodal distribution of phosphatidic acid phosphohydrolase in NG108-15 cells. Modulation by the amphiphilic lipids oleic acid and sphingosine. *Eur. J. Biochem.* 204, 561-568.

Arnold B, Reuther R, Weltzien HU (1978) Distribution and metabolism of synthetic alkyl analogs of lysophosphatidylcholine in mice. *Biochim. Biophys. Acta* 530, 47-55.

Arthur G, Bittman R (1998) The inhibition of cell signaling pathways by antitumor ether lipids. *Biochim. Biophys. Acta* 1390, 85-102.

Avramoglu RK, Cianflone K, Sniderman AD (1995) Role of the neutral lipid accessible pool in the regulation of secretion of apoB-100 lipoprotein particles by HepG2 cells. *J. Lipid Res.* 36, 2513-2528.

Baburina I, Jackowski S (1998) Apoptosis triggered by 1-O-octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine is prevented by increased expression of CTP:phosphocholine cytidyltransferase. *J. Biol. Chem.* 273, 2169-2173.

Bai J, Rodriguez AM, Melendez JA, Cederbaum AI (1999) Overexpression of catalase in cytosolic or mitochondrial compartment protects HepG2 cells against oxidative injury. *J. Biol. Chem.* 274, 26217-26224.

Baraona E, Lieber CS (1998) Alcohol and lipids. *Recent Dev. Alcohol* 14, 97-134.

Bartlett GR (1959) Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.* 234, 466-469.

Benoist F, Grand-Perret T (1995) A sensitive method to analyze in vitro secretion of lipoproteins: distribution of apolipoproteins is modulated by oleic acid in HepG2 cells. *J. Lipid Res.* 36, 2243-2250.



Berdel WE, Becher R, Edler L, *et al.* (1992) Phase II trial of oral miltefosine (Mil) in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 33, 416.

Bereziat G (1996) Diversity of phospholipases A2 and their functions. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* 190, 409-416.

Bergmann J, Junghahn I, Brachwitz H, Langen P (1994) Multiple effects of antitumor alkyllysophospholipid analogs on the cytosolic free  $Ca^{2+}$  concentration in a normal and a breast cancer cell line. *Anticancer Res.* 14, 1549-1556.

Berkovic D (1998) Cytotoxic etherphospholipid analogues. *Gen. Pharmac.* 31, 511-517.

Berkovic D, Berkovic K, Fler EA, Eibl H, Unger C (1994) Inhibition of calcium-dependent protein kinase C by hexadecylphosphocholine and 1-O-octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine do not correlate with inhibition of proliferation of HL60 and K562 cell lines. *Eur. J. Cancer* 30A, 509-515.

Berkovic D, Goeckenjan M, Luders S, Hiddemann W, Fler EA (1996) Hexadecylphosphocholine inhibits phosphatidylinositol and phosphatidylcholine phospholipase C in human leukemia cells. *J. Exp. Ther. Oncol.* 1, 302-311.

Berkovic D, Grunwald U, Menzel W, Unger C, Hiddemann W, Fler EAM (1995) Effects of hexadecylphosphocholine on membrane phospholipid metabolism in human tumour cells. *Eur. J. Cancer* 31, 2080-2081.

Berkovic D, Luders S, Goeckenjan M, Hiddemann W, Fler EA (1997) Differential regulation of phospholipase A2 in human leukemia cells by the etherphospholipid analogue hexadecylphosphocholine. *Biochem. Pharmacol.* 53, 1725-1733.

- Berridge MJ, Irvine RF (1989) Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 341, 197-205.
- Bladergroen BA, Bussiere M, Klein W, Geelen MJ, Van Golde LM, Houweling M (1999) Inhibition of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine biosynthesis in rat-2 fibroblasts by cell-permeable ceramides. *Eur. J. Biochem.* 264, 152-160.
- Bladergroen BA, van Golde LM (1997) CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta* 1348, 91-99.
- Bladergroen BA, Wensing T, Van Golde LM, Geelen MJ (1998) Reversible translocation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase from cytosol to membranes in the adult bovine liver around parturition. *Biochim. Biophys. Acta* 1391, 233-240.
- Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911-917.
- Blusztajn JK, Wurtman RJ (1981) Choline biosynthesis by a preparation enriched in synaptosomes from rat brain. *Nature* 290, 417-418.
- Boggs KP, Rock CO, Jackowski S (1998) The antiproliferative effect of hexadecylphosphocholine toward HL60 cells is prevented by exogenous lysophosphatidylcholine. *Biochim. Biophys. Acta* 1389, 1-12.
- Boggs KP, Rock CO, Jackowski S (1995a) Lysophosphatidylcholine and 1-O-octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine inhibit the CDP-choline pathway of phosphatidylcholine synthesis at the CTP:phosphocholine cytidyltransferase step. *J. Biol. Chem.* 270, 7757-7764.

- Boggs KP, Rock CO, Jackowski S (1995b) Lysophosphatidylcholine attenuates the cytotoxic effects of the antineoplastic phospholipid 1-O-octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine. *J. Biol. Chem.* 270, 11612-11618.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Breiser A, Kim D-J, Fleer EAM, Damenz W, Drube A, Berger M, Nagel GA, Eibl H, Unger C (1987) Distribution and metabolism of hexadecylphosphocholine in mice. *Lipids* 22, 925-926.
- Brindley DN (1984) Intracellular translocation of phosphatidate phosphohydrolase and its possible role in the control of glycerolipid synthesis. *Prog. Lipid Res.* 23, 115-133.
- Brooks PJ (1997) DNA damage, DNA repair, and alcohol toxicity--a review. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 21, 1073-1082.
- Buege JA, Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52, 302-310.
- Buhman KK, Chen HC, Farese RV Jr (2001) The enzymes of neutral lipid synthesis. *J. Biol. Chem.* 276, 40369-40372.
- Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB (1987) Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 47, 936-942.
- Carrasco MP, Jimenez-Lopez JM, Segovia JL, Marco C (2002) Comparative study of the effects of short- and long-term ethanol treatment and alcohol withdrawal on phospholipid biosynthesis in rat hepatocytes. *Comp. Biochem. Phys. B* 131, 491-497.

Carrasco MP, Marco C, Segovia JL (2001a) Chronic ingestion of ethanol stimulates lipogenic response in rat hepatocytes. *Life Sci.* 68, 1295-1304.

Carrasco MP, Sánchez-Amate MP, Marco C, Segovia JL (1996a) Evidence of differential effects produced by ethanol on specific phospholipid biosynthetic pathways in rat hepatocytes. *British J. Pharmacol.* 119, 233-238.

Carrasco MP, Sánchez-Amate MC, Segovia JL, Marco C (1996b) Studies on phospholipid biosynthesis in hepatocytes from alcoholic rats by using radiolabeled exogenous precursors. *Lipids* 31, 393-397.

Carrasco MP, Segovia JL, Marco C (2001b) Modulation of biosynthesis of phosphatidylcholine via CDP-choline in rat liver. Influence of ethanol on the microsomal cholinephosphotransferase activity. *Mol. Cell. Biochem.* 217, 43-50.

Carrasco MP, Segovia JL, Marco C (1998) Incorporation of exogenous precursors into neutral lipids and phospholipids in rat hepatocytes: Effect of ethanol in vitro. *Biochem. Pharmacol.* 56, 1639-1644.

Carroccio A, Wu D, Cederbaum AI (1994) Ethanol increases content and activity of human cytochrome P450 2E1 in a transduced HepG2 cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203, 727-733.

Cascales C, Mangiapane EH, Brindley DN (1984) Oleic acid promotes the activation and translocation of phosphatidate phosphohydrolase from the cytosol to particulate fractions of isolated rat hepatocytes. *Biochem. J.* 219, 911-916.

Cases S, Smith SJ, Zheng YW, Myers HM, Lear SR, Sande E, Novak S, Collins C, Welch CB, Lusis AJ, Erickson SK, Farese RV Jr (1998) Identification of a gene encoding an acyl

CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 13018-13023.

Castro J, Maquedano A, Guzman M (1987) Stimulation by ethanol of triglyceride synthesis in fasted rat hepatocytes is dependent on the increase of glycerol 3-phosphate levels. *Biochem. Int.* 14, 475-482.

Cederbaum AI (2001) Introduction—serial review: alcohol, oxidative stress and cell injury. *Free Rad. Biol. Med.* 31, 1524-1526.

Cederbaum AI (1998) Ethanol-related cytotoxicity catalysed by CYP2E1-dependent generation of reactive oxygen intermediates in transduced HepG2 cells. *Biofactors* 8, 93-96.

Chatterjee S, Mayor S (2001) The GPI-anchor and protein sorting. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 1969-1987.

Chen Q, Galleano M, Cederbaum AI (1997) Cytotoxicity and apoptosis produced by arachidonic acid in Hep G2 cells overexpressing human cytochrome P4502E1. *J. Biol. Chem.* 272, 14532-14541.

Chu AJ (1994) Mechanism by which ethanol inhibits phosphatidylcholine biosynthesis in human leukemic monocyte-like U937 cells. *Cell. Biochem. Funct.* 12, 45-55.

Clemens DL, Halgard CM, Miles RR, Sorrell MF, Tuma DJ (1995) Establishment of a recombinant hepatic cell line stably expressing alcohol dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 321, 311-318.

Clive S, Gardiner J, Leonard RC (1999) Miltefosine as a topical treatment for cutaneous metastases in breast carcinoma. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 44, S29-S30.

Cornell RB (1992) Cholinephosphotransferase from mammalian sources. *Methods Enzymol.* 209, 267-272.

Cornell RB (1991) Regulation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase by lipids. 1. Negative surface charge dependence for activation. 2. Surface curvature, acyl chain length, and lipid-phase dependence for activation. *Biochemistry* 30, 5873-5888.

Cornell RB, Northwood IC (2000) Regulation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase by amphitropism and relocalization. *Trends Biochem. Sci.* 25, 441-447.

Crooke ST, Bennett CF (1989) Mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C isoenzymes. *Cell. Calcium* 10, 309-323.

Cui Z, Houweling M, Chen MH, Record M, Chap H, Vance DE, Terce F (1996) A genetic defect in phosphatidylcholine biosynthesis triggers apoptosis in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 271, 14668-14671.

Dan L, Laposata M (1997) Ethyl palmitate and ethyl oleate are the predominant fatty acid ethyl esters in the blood after ethanol ingestion and their synthesis is differentially influenced by the extracellular concentrations of their corresponding fatty acids. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 21, 286-292.

Dashti N, Feng Q, Franklin FA (2000) Long-term effects of cis and trans monounsaturated (18:1) and saturated (16:0) fatty acids on the synthesis and secretion of apolipoprotein A-I- and apolipoprotein B-containing lipoproteins in HepG2 cells. *J. Lipid Res.* 41, 1980-1990.

Dashti N, Franklin FA, Abrahamson DR (1996) Effect of ethanol on the synthesis and secretion of apoA-I- and apoB-containing lipoproteins in HepG2 cells. *J. Lipid Res.* 37, 810-824.

Dashti N, Wolfbauer G (1987) Secretion of lipids, apolipoproteins, and lipoproteins by human hepatoma cell line, HepG2: effects of oleic acid and insulin. *J. Lipid Res.* 28, 423-436.

Day CP, Yeaman SJ (1992) Physical evidence for the presence of two forms of phosphatidate phosphohydrolase in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* 1127, 87-94.

Detmar M, Geilen CC, Wieder T, Orfanos CE, Reutter W (1994) Phospholipid analogue hexadecylphosphocholine inhibits proliferation and phosphatidylcholine biosynthesis of human epidermal keratinocytes *in vitro*. *J. Invest. Dermatol.* 102, 490-494.

di Bartolomeo S, Spinedi A (2001) Differential chemosensitizing effect of two glucosylceramide synthase inhibitors in hepatoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288, 269-274.

Dixon JL, Ginsberg HN (1993) Regulation of hepatic secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins: information obtained from cultured liver cells. *J. Lipid Res.* 34, 167-179.

Do Carmo MG, Do Nascimento CM, Martin-Hidalgo AM, Herrera E (1996) Effects of ethanol intake on lipid metabolism in the lactating rat. *Alcohol* 13, 443-448.

Dodds PF (1995) Xenobiotic lipids: the inclusion of xenobiotic compounds in pathways of lipid biosynthesis. *Prog. Lipid Res.* 34, 219-247.

Dummer R, Krasovec M, Roger J, Sinderman H, Burg G (1993) Topical administration of hexadecylphosphocholine in patients with cutaneous lymphomas: results of a phase I/II study. *J. Am. Acad. Dermatol.* 29, 963-970.

Durocher V, Miller M, Rodriguez MA (1990) Microsomal glycerolphosphate acyltransferase inactivation by fatty acids. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 68, 1255-1260.

- Engel J, Hilgard P, Klenner T, Kutscher B, Nossner G, Traiser M, Voss V (2000) Perifosine: D-21266. *Drugs of the Future* 25, 1257-1260.
- Erdlenbruch B, Jendrossek V, Marx M, Hunold A, Eibl H, Lakomek M (1998) Antitumor effects of erucylphosphocholine on brain tumor cells in vitro and in vivo. *Anticancer Res.* 18, 2551-2558.
- Erickson SK, Fielding PE (1986) Parameters of cholesterol metabolism in the human hepatoma cell line, HepG2. *J. Lipid Res.* 27, 875-883.
- Eue I (2001) Growth inhibition of human mammary carcinoma by liposomal hexadecylphosphocholine: Participation of activated macrophages in the antitumor mechanism. *Int. J. Cancer* 92, 426-433.
- Exton JH (2000) Phospholipase D. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 905, 61-68.
- Farooqui AA, Horrocks LA, Farooqui T (2000) Glycerophospholipids in brain: their metabolism, incorporation into membranes, functions, and involvement in neurological disorders. *Chem. Phys. Lipids* 106, 1-29.
- Fischer C, Voss A, Engel J (2001) Development status of miltefosine as first oral drug in visceral and cutaneous leishmaniasis. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* 190, 85-87.
- Fleer EAM, Berkovic D, Eibl H, Unger C (1993) Investigations on the cellular uptake of hexadecylphosphocholine. *Lipids* 28, 731-736.



Fleer EAM, Berkovic D, Grunwald U, Hiddemann W (1996) Induction of resistance to hexadecylphosphocholine in the highly sensitive human epidermoid tumour cell line KB. *Eur. J. Cancer* 32A, 506-511.

Folch J, Lees B, Sloane-Stanley GY (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509.

Forman DT (1988) The effect of ethanol and its metabolites on carbohydrate, protein, and lipid metabolism. *Ann.Clin. Lab. Sci.* 18, 181-189.

French SW (2000) Mechanisms of alcoholic liver injury. *Can. J. Gastroenterol.* 14, 327-332.

French SW (1989) Biochemical basis for alcohol-induced liver injury. *Clin. Biochem.* 22, 41-49.

Furth EE, Sprecher H, Fisher EA, Fleishman HD, Laposata M (1992) An in vitro model for essential fatty acid deficiency: HepG2 cells permanently maintained in lipid-free medium. *J. Lipid Res.* 33, 1719-1726.

Futerman AH, Stieger B, Hubbard AL, Pagano RE (1990) Sphingomyelin synthesis in rat liver occurs predominantly at the cis and medial cisternae of the Golgi apparatus. *J. Biol. Chem.* 265, 8650-8657.

Gadeholt G (1984) Ethanol and isoniazid induce a hepatic microsomal cytochrome P-450-dependent activity with similar properties towards substrate and inhibitors and different properties from those induced by classical inducers. *Biochem. Pharmacol.* 33, 3047-3051.

Gaits F, Fourcade O, Le Balle F, Gueguen G, Gaige B, Gassama-Diagne A, Fauvel J, Salles JP, Mauco G, Simon MF, Chap H (1997) Lysophosphatidic acid as a phospholipid mediator: pathways of synthesis. *FEBS Lett.* 410, 54-58.

Gatti C, Brunetti M, Gaiti A (1989) Serine incorporation into phospholipids in vivo and serine phosphoglyceride metabolic transformations in cerebral areas from adult and aged rats. *Neurobiol. Aging* 10, 241-245.

Geilen CC, Haase A, Wieder T, Arndt D, Zeisig R, Reutter W (1994a) Phospholipid analogues: side chain- and polar head group-dependent effects on phosphatidylcholine biosynthesis. *J. Lipid Res.* 35, 625-632.

Geilen CC, Wieder T, Haase A, Reutter W, Morre DM, Morre DJ (1994b) Uptake, subcellular distribution and metabolism of the phospholipid analogue hexadecylphosphocholine in MDCK cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1211, 14-22.

Geilen CC, Wieder T, Reutter W (1992) Hexadecylphosphocholine inhibits translocation of CTP:choline-phosphate cytidyltransferase in Madin-Darby canine kidney cells. *J. Biol. Chem.* 267, 6719-6724.

Gibbons GF, Islam K, Pease RJ (2000) Mobilisation of triacylglycerol stores. *Biochim. Biophys. Acta* 1483, 37-57.

Gibbons GF, Khurana R, Odwell A, Seelaender MCL (1994) Lipid balance in HepG2 cells: active synthesis and impaired mobilization. *J. Lipid Res.* 35, 1801-1808.

Goodlett CR, Horn KH (2001) Mechanisms of alcohol-induced damage to the developing nervous system. *Alcohol. Res. Health* 25, 175-184.

Gordon DA, Jamil H (2000) Progress towards understanding the role of microsomal triglyceride transfer protein in apolipoprotein-B lipoprotein assembly. *Biochim. Biophys. Acta* 1486, 72-83.

Haagsman HP, de Haas CG, Geelen MJ, van Golde LM (1982) Regulation of triacylglycerol synthesis in the liver. Modulation of diacylglycerol acyltransferase activity in vitro. *J. Biol. Chem.* 257, 10593-10598.

Hannun YA, Luberto C, Argraves KM (2001) Enzymes of sphingolipid metabolism: from modular to integrative signaling. *Biochemistry* 40, 4893-4903.

Hannun YA, Luberto C (2000) Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends Cell. Biol.* 10, 73-80.

Hannun YA, Obeid LM (1995) Ceramide: an intracellular signal for apoptosis. *Trends Biochem. Sci.* 20, 73-77.

Hazel JR (1990) Adaptation to temperature: phospholipid synthesis in hepatocytes of rainbow trout. *Am. J. Physiol.* 258, 1495-1501.

Heacock AM, Agranoff BW (1997) CDP-diacylglycerol synthase from mammalian tissues. *Biochim. Biophys. Acta* 1348, 166-172.

Heesbeen EC, Verdonck LF, Hermans SW, Van Heugten HG, Staal GE, Rijksen G (1991) Alkyllysophospholipid ET-18-OCH<sub>3</sub> acts as an activator of protein kinase C in HL-60 cells. *FEBS Lett.* 290, 231-234.

Henke J, Engelmann J, Kutscher B, Nssner G, Engel J, Voegeli R, Leibfritz D (1999) Changes of intracellular calcium, fatty acids and phospholipids during miltefosine-induced apoptosis monitored by fluorescence- and <sup>13</sup>C NMR-spectroscopy. *Anticancer Res.* 19, 4027-4032.

- Henneberry AL, McMaster CR (1999) Cloning and expression of a human choline/ethanolaminephosphotransferase: synthesis of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine. *Biochem. J.* 339, 291-298.
- Hernandez-Alcoceba R, Fernandez F, Lacal JC (1999) In vivo antitumor activity of choline kinase inhibitors: a novel target for anticancer drug discovery. *Cancer Res.* 59, 3112-3118.
- Herrmann DB, Neumann HA (1986) Cytotoxic ether phospholipids. Different affinities to lysophosphocholine acyltransferases in sensitive and resistant cells. *J. Biol. Chem.* 261, 7742-7747.
- Higgins JA (1987) Separation and analysis of membrane lipid components. *Biological Membranes: A Practical Approach* (Findlay JBC and Evan WH, eds.) 1, 103-137.
- Hilgard P, Klenner T, Stekar J, Nössner G, Kutscher B, Engel J (1997) D-21266, a new heterocyclic alkylphospholipid with antitumour activity. *Eur. J. Cancer* 33, 442-446.
- Hilgard P, Klenner T, Stekar J, Unger C (1993) Alkylphosphocholines: a new class of membrane-active anticancer agents (review). *Cancer Chemother. Pharmacol.* 32, 90-95.
- Hjelmstad RH, Bell RM (1991) sn-1,2-diacylglycerol choline- and ethanolaminephosphotransferases in *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleotide sequence of the EPT1 gene and comparison of the CPT1 and EPT1 gene products. *J. Biol. Chem.* 266, 5094-5103.
- Holy A, Otova B, Budesinsky M, Emerson D, Wiles ME (2001) O-Phosphonatomethylcholine, its analogues, alkyl esters, and their biological activity. *J. Med. Chem.* 44, 4462-4467.

Homan R, Grossman JE, Pownall HJ (1991) Differential effects of eicosapentaenoic acid and oleic acid on lipid synthesis and secretion by HepG2 cells. *J. Lipid Res.* 32, 231-241.

Hu ZY, Sun GY, Rhodes PG (1992) In utero ethanol exposure decreases the biosynthesis of phosphatidylserine in rat pup cerebrum. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 16, 432-435.

Igal RA, Wang S, Gonzalez-Baro M, Coleman RA (2001) Mitochondrial glycerol phosphate acyltransferase directs the incorporation of exogenous fatty acids into triacylglycerol. *J. Biol. Chem.* 276, 42205-42212.

Ishidate K (1997) Choline/ethanolamine kinase from mammalian tissues. *Biochim. Biophys. Acta* 1348, 70-78.

Javitt NB (1990) Hep G2 cells as a resource for metabolic studies: lipoproteins, cholesterol and bile acids. *FASEB J.* 4, 161-168.

Jimenez-Lopez JM, Carrasco MP, Segovia JL, Marco C (2002) Resistance of HepG2 cells against the adverse effects of ethanol related to neutral lipid and phospholipid metabolism. *Biochem. Pharmacol.* 63, 1485-1490.

Jimenez-Lopez JM, Carrasco MP, Segovia JL, Marco C (2002) Hexadecylphosphocholine inhibits phosphatidylcholine biosynthesis and the proliferation of HepG2 cells. (En prensa).

Johnson JE, Aebersold R, Cornell RB (1997) An amphipathic alpha-helix is the principle membrane-embedded region of CTP:phosphocholine cytidyltransferase. Identification of the 3-(trifluoromethyl)-3-(m-[<sup>125</sup>I]iodophenyl) diazirine photolabeled domain. *Biochim. Biophys. Acta* 1324, 273-284.

Jones DR, Varela-Nieto I (1998) The role of glycosyl-phosphatidylinositol in signal transduction. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 30, 313-326.

Kabakibi A, Morse CR, Laposata M (1998) Fatty acid ethyl esters and HepG2 cells: intracellular synthesis and release from the cells. *J. Lipid Res.* 39, 1568-1582.

Kallen KJ, Allan D, Whatmore J, Quinn P (1994) Synthesis of surface sphingomyelin in the plasma membrane recycling pathway of BHK cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1191, 52-58.

Kapitulnik J, Weil E, Rabinowitz R, Krausz MM (1987) Fetal and adult human liver differ markedly in the fluidity and lipid composition of their microsomal membranes. *Hepatology* 7, 55-60.

Kato S, Alderman J, Lieber CS (1987) Ethanol metabolism in alcohol dehydrogenase deficient deermice is mediated by the microsomal ethanol oxidizing system, not by catalase. *Alcohol Alcohol.* 1, 231-234.

Kaufmann-Kolle P, Berger MR, Unger C, Eibl H (1996) Systemic administration of alkylphosphocholines. Erucylphosphocholine and liposomal hexadecylphosphocholine. *Adv. Exp. Med. Biol.* 416, 165-168.

Kaufmann-Kolle P, Fleer EAM, Kötting J, Behnert C, Unger C, Eibl H (1994) Liposomal hexadecylphosphocholine: Characterization and effects on adherent tumor cells. *J. Liposome Res.* 4, 1115-1134.

Kawasaki K, Kuge O, Yamakawa Y, Nishijima M (2001) Purification of phosphatidylglycerophosphate synthase from Chinese hamster ovary cells. *Biochem. J.* 354, 9-15.

- Kennedy EP (1986) In *Lipids and Membranes: Past, Present, and Future*, ed. JAF Op den Kamp, B Roelofsen, KWA Wirtz, pp. 171-206. Amsterdam: Elsevier.
- Kent C (1997) CTP:phosphocholine cytidyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta* 1348, 79-90.
- Kent C (1995) Eukaryotic phospholipid biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 315-343.
- Kent C (1990) Regulation of phosphatidylcholine biosynthesis. *Prog. Lipid Res.* 29, 87-105.
- Khan S, O'Brien PJ (1999) Role of the cellular redox state in modulating acute ethanol toxicity in isolated hepatocytes. *Clin. Biochem.* 32, 585-589.
- Kiss Z (1999) Regulation of mitogenesis by water-soluble phospholipid intermediates. *Cell. Signal.* 11, 149-157.
- Knowles BB, Howe CC, Aden DP (1980) Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* 209, 497-499.
- Kocsis MG, Weselake RJ (1996) Phosphatidate phosphatases of mammals, yeast, and higher plants. *Lipids* 31, 785-802.
- Kolesnick RN (1987) Thyrotropin-releasing hormone and phorbol esters induce phosphatidylcholine synthesis in GH3 pituitary cells. Evidence for stimulation via protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 262, 14525-14530.
- Koumanov KS, Momchilova-Pankova AB, Wang SR, Infante R (1990) Membrane phospholipid composition, fluidity and phospholipase A2 activity of human hepatoma cell line HepG2. *Int. J. Biochem.* 22, 1453-1455.

Kuge O, Nishijima M (1997) Phosphatidylserine synthase I and II of mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1348, 151-156.

Kuge O, Saito K, Kojima M, Akamatsu Y, Nishijima M (1996) Post-translational processing of the phosphatidylserine decarboxylase gene product in Chinese hamster ovary cells. *Biochem. J.* 319, 33-38.

Kuge O, Saito K, Nishijima M (1999) Control of phosphatidylserine synthase II activity in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 274, 23844-23849.

Lamb RG, Koch JC, Snyder JW, Huband SM, Bush SR (1994) An in vitro model of ethanol-dependent liver cell injury. *Hepatology* 19, 174-182.

Lane BP, Lieber CS (1966) Ultrastructural alterations in human hepatocytes following ingestion of ethanol with adequate diets. *Am. J. Pathol.* 49, 593-603.

Laposata M, Szczepiorkowski ZM, Brown JE (1995) Fatty acid ethyl esters: non-oxidative metabolites of ethanol. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 52, 87-91.

Le Petit-Thevenin J, Nobili O, Verine A, Boyer J (1995) Differential in vitro effects of ethanol on glycerolipid acylation and biosynthesis in rat reticulocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1257, 103-110.

Lichtenstein AH, Brecher P (1980) Properties of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase in rat liver microsomes. Topological localization and effects of detergents, albumin, and polar steroids. *J. Biol. Chem.* 255, 9098-9104.

Lieber CS (2001) Alcoholic liver injury: pathogenesis and therapy in 2001. *Pathol. Biol. (Paris)* 49, 738-752.



- Lieber CS (1997a) Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. *Clin. Chim. Acta* 257, 59-84.
- Lieber CS (1997b) Cytochrome P-450 2E1: its physiological and pathological role. *Physiol. Rev.* 77, 517-544.
- Lieber CS (1994a) Alcohol and the liver: 1994 update. *Gastroenterology* 106, 1085-1105.
- Lieber CS (1994b) Metabolic consequences of ethanol. *Endocrinologist* 4, 127-139.
- Lieber CS (1988) The microsomal ethanol oxidizing system: its role in ethanol and xenobiotic metabolism. *Biochem. Soc. Trans.* 16, 232-239.
- Lieber CS, DeCarli LM (1970) Hepatic microsomal ethanol-oxidizing system. In vitro characteristics and adaptive properties in vivo. *J. Biol. Chem.* 245, 2505-2512.
- Lieber CS, Robins SJ, Leo MA (1994) Hepatic phosphatidylethanolamine methyltransferase activity is decreased by ethanol and increased by phosphatidylcholine. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 18, 592-595.
- Lin Y, Smit MJ, Havinga R, Verkade HJ, Vonk RJ, Kuipers F (1995) Differential effects of eicosapentaenoic acid on glycerolipid and apolipoprotein B metabolism in primary human hepatocytes compared to HepG2 cells and primary rat hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1256, 88-96.
- Liscovitch M, Czarny M, Fiucci G, Tang X (2000) Phospholipase D: molecular and cell biology of a novel gene family. *Biochem. J.* 345, 401-415.

Lu KP, Means AR (1993) Regulation of the cell cycle by calcium and calmodulin. *Endocrine Rev.* 14, 40-58.

Luberto C, Hannun YA (1999) Sphingolipid metabolism in the regulation of bioactive molecules. *Lipids* 34, S5-11.

Lucas L, Hernandez-Alcoceba R, Penalva V, Lacal JC (2001) Modulation of phospholipase D by hexadecylphosphorylcholine: a putative novel mechanism for its antitumoral activity. *Oncogene* 20, 1110-1117.

Lykidis A, Baburina I, Jackowski S (1999) Distribution of CTP:phosphocholine cytidyltransferase (CCT) isoforms. Identification of a new CCTbeta splice variant. *J. Biol. Chem.* 274, 26992-27001.

Lykidis A, Jackowski S (2001) Regulation of mammalian cell membrane biosynthesis. *Prog. Nucleic Acid Res.* 65, 361-393.

Lykidis A, Jackson PD, Rock CO, Jackowski S (1997) The role of CDP-diacylglycerol synthetase and phosphatidylinositol synthase activity levels in the regulation of cellular phosphatidylinositol content. *J. Biol. Chem.* 272, 33402-33409.

Lykidis A, Murti KG, Jackowski S (1998) Cloning and characterization of a second human CTP:phosphocholine cytidyltransferase. *J. Biol. Chem.* 273, 14022-14029.

Lykidis A, Wang J, Karim MA, Jackowski S (2001) Overexpression of a mammalian ethanolamine-specific kinase accelerates the CDP-ethanolamine pathway. *J. Biol. Chem.* 276, 2174-2179.

MacDonald JI, Kent C (1994) Identification of phosphorylation sites in rat liver CTP: phosphocholine cytidyltransferase. *J. Biol. Chem.* 269, 10529-10537.

MacDonald JI, Sprecher H (1991) Phospholipid fatty acid remodeling in mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1084, 105-121.

Mari M, Cederbaum AI (2000) CYP2E1 overexpression in HepG2 cells induces glutathione synthesis by transcriptional activation of gamma-glutamylcysteine synthetase. *J. Biol. Chem.* 275, 15563-15571.

Mathias S, Pena LA, Kolesnick RN (1998) Signal transduction of stress via ceramide. *Biochem. J.* 335, 465-480.

Mayorek N, Bar-Tana J (1987) Inhibition of diacylglycerol acyltransferase by 2-bromooctanoate in cultured rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 260, 6528-6532.

McMaster CR, Bell RM (1997a) CDP-choline :1,2-diacylglycerol cholinephosphotransferase. *Biochim. Biophys. Acta* 1348, 100-110.

McMaster CR, Bell RM (1997b) CDP-ethanolamine :1,2-diacylglycerol ethanolaminephosphotransferase. *Biochim. Biophys. Acta* 1348, 117-123.

Miquel K, Pradines A, Terce F, Selmi S, Favre G (1998) Competitive inhibition of choline phosphotransferase by geranylgeraniol and farnesol inhibits phosphatidylcholine synthesis and induces apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 cells. *J. Biol. Chem.* 273, 26179-26186.

Mok AY, McDougall GE, McMurray WC (1993) Comparative studies of CDP-diacylglycerol synthase in rat liver mitochondria and microsomes. *Biochem. Cell. Biol.* 71, 183-189.

Muschiol C, Berger MR, Schuler B, Scherf HR, Garzon FT, Zeller WJ, Unger C, Eibl HJ, Schmähl D (1987) Alkyl phosphocholines: toxicity and anticancer properties. *Lipids* 22, 930-934.

Nakashima A, Hosaka K, Nikawa J (1997) Cloning of a human cDNA for CTP-phosphoethanolamine cytidyltransferase by complementation in vivo of a yeast mutant. *J. Biol. Chem.* 272, 9567-9572.

Neuman MG, Koren G, Tiribelli C (1993) In vitro assessment of the ethanol-induced hepatotoxicity on HepG2 cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197, 932-941.

Nishijima M, Kuge O, Akamatsu Y (1986) Phosphatidylserine biosynthesis in cultured Chinese hamster ovary cells. I. Inhibition of de novo phosphatidylserine biosynthesis by exogenous phosphatidylserine and its efficient incorporation. *J. Biol. Chem.* 261, 5784-5789.

Nishizuka Y (1992) Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258, 607-614.

Northwood IC, Tong AH, Crawford B, Drobniec AE, Cornell RB (1999) Shuttling of CTP:phosphocholine cytidyltransferase between the nucleus and endoplasmic reticulum accompanies the wave of phosphatidylcholine synthesis during the G(0)→G(1) transition. *J. Biol. Chem.* 274, 26240-26248.

Ohtsuka T, Nishijima M, Suzuki K, Akamatsu Y (1993) Mitochondrial dysfunction of a cultured Chinese hamster ovary cell mutant deficient in cardiolipin. *J. Biol. Chem.* 268, 22914-22919.

Pakula R, Rubin M, Moser AM, Lichtenberg D, Tietz A (1997) Biosynthesis of medium-chain triacylglycerols and phospholipids by HepG-2 cells. *Lipids* 32, 489-495.

- Pauig SB, Daniel LW (1996) Protein kinase C inhibition by ET-18-OCH<sub>3</sub> and related analogs. A target for cancer chemotherapy. In *Platelet-Activating Factor and Related Lipid Mediators 2*, edited by Nigam *et al.*, Plenum Press, New York, 29- 173-180.
- Pelech SL, Power E, Vance DE (1983) Activities of the phosphatidylcholine biosynthetic enzymes in rat liver during development. *Can. J. Biochem. Cell. Biol.* 61, 1147-1152.
- Pelech SL, Pritchard PH, Vance DE (1982) Prolonged effects of cyclic AMP analogues of phosphatidylcholine biosynthesis in cultured rat hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 713, 260-269.
- Pessayre D, Mansouri A, Haouzi D, Fromenty B (1999) Hepatotoxicity due to mitochondrial dysfunction. *Cell. Biol. Toxicol.* 15, 367-373.
- Piomelli D (1993) Arachidonic acid in cell signaling. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 5, 274-280.
- Podskalny JM, Takeda S, Silverman RE, Tran D, Carpentier JL, Orci L, Gorden P (1985) Insulin receptors and bioresponses in a human liver cell line (Hep G-2). *Eur. J. Biochem.* 150, 401-407.
- Posse de Chaves E, Vance DE, Campenot RB, Vance JE (1995) Alkylphosphocholines inhibit choline uptake and phosphatidylcholine biosynthesis in rat sympathetic neurons and impair axonal extension. *Biochem. J.* 312, 411-417.
- Post JA, Bijvelt JJ, Verkleij AJ (1995) Phosphatidylethanolamine and sarcolemmal damage during ischemia or metabolic inhibition of heart myocytes. *Am. J. Physiol.* 268, H773-80.
- Preedy VR, Adachi J, Asano M, Koll M, Mantle D, Niemela O, Parkkila S, Paice AG, Peters T, Rajendram R, Seitz H, Ueno Y, Worrall S (2002) Free radicals in alcoholic myopathy: indices of damage and preventive studies(1). *Free Radic. Biol. Med.* 32, 683-687.

Rash JM, Rothblat GH, Sparks CE (1981) Lipoprotein apolipoprotein synthesis by human hepatoma cells in culture. *Biochim. Biophys. Acta* 666, 294-298.

Ridgway ND (1989) In *Phosphatidylcholine Metabolism*, ed. DE Vance, pp. 103-120. Boca Raton, FL : CRC.

Ridgway ND, Yao Z, Vance DE (1989) Phosphatidylethanolamine levels and regulation of phosphatidylethanolamine N-methyltransferase. *J. Biol. Chem.* 264, 1203-1207.

Ries UJ, Flee EA, Breiser A, Unger C, Stekar J, Fenneberg K, Eibl H (1993) In vitro and in vivo antitumoral activity of alkylphosphonates. *Eur. J. Cancer* 29A, 96-101.

Rodriguez MA, Dias C, Lau TE (1982) Reversible ATP-dependent inactivation of adipose diacylglycerol acyltransferase. *Lipids* 27, 577-581.

Ruckpaul K, Rein H, Blank J (1989) Basic mechanism of regulation of cytochrome P-450 (Ruckpaul K, Rein H eds.). *Akademie-Verlag, Berlin*. Vol.1, pp. 1-65.

Saggerson ED, Carpenter CA, Cheng CH, Sooranna SR (1980) Subcellular distribution and some properties of N-ethylmaleimide-sensitive and-insensitive forms of glycerol phosphate acyltransferase in rat adipocytes. *Biochem. J.* 190, 183-189.

Saito N, Kikkawa U, Nishizuka Y (2002) The family of protein kinase C and membrane lipid mediators. *J. Diabetes Complications* 16, 4-8.

Sakurai K, Cederbaum AI (1998) Oxidative stress and cytotoxicity induced by ferric-nitritotriacetate in HepG2 cells that express cytochrome P450 2E1. *Mol. Pharmacol.* 54, 1024-1035.

- Samson HH, Harris RA (1992) Neurobiology of alcohol abuse. *Trends Pharmacol. Sci.* 13, 206-211.
- Sanchez-Pinera P, Aranda FJ, Micol V, de Godos A, Gomez-Fernandez JC (1999) Modulation of polymorphic properties of dielaidoylphosphatidylethanolamine by the antineoplastic ether lipid 1-O-octadecyl-2-O-methyl-glycero-3-phosphocholine. *Biochim. Biophys. Acta* 1417, 202-210.
- Santa-Rita RM, Santos-Barbosa H, Meirelles MN, de Castro SL (2000) Effect of the alkyllysophospholipids on the proliferation and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 75, 219-228.
- Santos WL, Rossi JA, Boggs SD, MacDonald TL (2000) The molecular pharmacology of lysophosphatidate signaling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 905, 232-241.
- Scherf HR, Schuler B, Berger MR, Schmahl D (1987) Therapeutic activity of ET-18-OCH<sub>3</sub> and hexadecylphosphocholine against mammary tumors in BD-VI rats. *Lipids* 22, :927-929.
- Schlame M, Haldar D (1993) Cardiolipin is synthesized on the matrix side of the inner membrane in rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 268, 74-79.
- Schlame M, Hostetler KY (1997) Cardiolipin synthase from mammalian mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1348, 207-213.
- Schmid PC, Johnson SB, Schmid HH (1991) Remodeling of rat hepatocyte phospholipids by selective acyl turnover. *J. Biol. Chem.* 266, 13690-13697.
- Segovia JL, Carrasco MP, Marco C (1998) Ethanol and lipid metabolism. Alterations of lipid composition and fluidity in hepatic subcellular membranes. *Recent Res. Devel. in Lipid Res.* 2, 1-9.

- Shields DJ, Agellon LB, Vance DE (2001) Structure, expression profile and alternative processing of the human phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (PEMT) gene. *Biochim. Biophys. Acta* 1532, 105-114.
- Shoji M, Raynor RL, Fleer EA, Eibl H, Vogler WR, Kuo JF (1991) Effects of hexadecylphosphocholine on protein kinase C and TPA-induced differentiation of HL60 cells. *Lipids* 26, 145-149.
- Sleight R, Kent C (1980) Regulation of phosphatidylcholine biosynthesis in cultured chick embryonic muscle treated with phospholipase C. *J. Biol. Chem.* 255, 10644-10650.
- Snyder F, Lee TC, Blank ML (1992) The role of transacylases in the metabolism of arachidonate and platelet activating factor. *Prog. Lipid Res.* 31, 65-86.
- Steelant WFA, Bruyneel EA, Mareel MM, Van den Eeckhout EG (1995) Capillary gas chromatography of hexadecylphosphocholine in Caco-2T cells and cell culture media. *Anal. Biochem.* 227, 246-250.
- Stubbs EB Jr, Agranoff BW (1993) Lithium enhances muscarinic receptor-stimulated CDP-diacylglycerol formation in inositol-depleted SK-N-SH neuroblastoma cells. *J. Neurochem.* 60, 1292-1299.
- Stoyanovsky DA, Wu D, Cederbaum AI (1998) Interaction of 1-hydroxyethyl radical with glutathione, ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol. *Free Rad. Biol. Med.* 24, 132-138.
- Szczepiorkowski ZM, Dickersin GR, Laposata M (1995) Fatty acid ethyl esters decrease human hepatoblastoma cell proliferation and protein synthesis. *Gastroenterology* 108, 515-522.



Sun AY, Sun GY (2001) Ethanol and oxidative mechanisms in the brain. *J. Biomed. Sci.* 8, 37-43.

Sundar S, Rosenkaimer F, Makharia MK, Goyal AK, Mandal AK, Voss A, Hilgard P, Murray HW (1998) Trial of oral miltefosine for visceral leishmaniasis. *Lancet* 352, 1821-1823.

Sundler R, Akesson B, Nilsson A (1974) Quantitative role of base exchange in phosphatidylethanolamine synthesis in isolated rat hepatocytes. *FEBS Lett.* 43, 303-307.

Suzuki TT, Kanfer JN (1985) Purification and properties of an ethanolamine-serine base exchange enzyme of rat brain microsomes. *J. Biol. Chem.* 260, 1394-1399.

Takagi T, Alderman J, Gellert J, Lieber CS (1986) Assessment of the role of non-ADH ethanol oxidation in vivo and in hepatocytes from deermice. *Biochem. Pharmacol.* 35, 3601-3606.

Tam SP (1992) Effect of ethanol on lipoprotein secretion in two human hepatoma cell lines, HepG2 and Hep3B. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 16, 1021-1028.

Thrift RN, Forte TM, Cahoon BE, Shore VG (1986) Characterization of lipoproteins produced by the human liver cell line, Hep G2, under defined conditions. *J. Lipid Res.* 27, 236-250.

Tijburg LB, Geelen MJ, van Golde LM (1989) Regulation of the biosynthesis of triacylglycerol, phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in the liver. *Biochim. Biophys. Acta* 1004, 1-19.

Tijburg LB, Maquedano A, Bijleveld C, Guzman M, Geelen MJ (1988) Effects of ethanol feeding on hepatic lipid synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 267, 568-579.

- Tronchere H, Record M, Terce F, Chap H (1994) Phosphatidylcholine cycle and regulation of phosphatidylcholine biosynthesis by enzyme translocation. *Biochim. Biophys. Acta* 1212, 137-151.
- Trump BF, Berezsky IK (1995) Calcium-mediated cell injury and cell death. *FASEB J.* 9, 219-228.
- Uberall F, Oberhuber H, Maly K, Zaknun J, Demuth L, Grunicke HH (1991) Hexadecylphosphocholine inhibits inositol phosphate formation and protein kinase C activity. *Cancer Res.* 51, 807-812.
- Unger C, Damenz W, Fleer EA, Kim DJ, Breiser A, Hilgard P, Engel J, Nagel G, Eibl H (1989) Hexadecylphosphocholine, a new ether lipid analogue. Studies on the antineoplastic activity in vitro and in vivo. *Acta Oncol.* 28, 213-217.
- Unger C, Eibl H (1991) Hexadecylphosphocholine: Preclinical and the first clinical results of a new antitumor drug. *Lipids* 26, 1412-1417.
- Valentin E, Lambeau G (2000) Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A<sub>2</sub> and their receptors and binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1488, 59-70.
- van Blitterswijk WJ, Houssa B (2000) Properties and functions of diacylglycerol kinases. *Cell. Signal.* 12, 595-605.
- Vance DE (1990) Boehringer Mannheim Award lecture. Phosphatidylcholine metabolism: masochistic enzymology, metabolic regulation, and lipoprotein assembly. *Biochem. Cell Biol.* 68, 1151-1165.

Vance DE, Trip EM, Paddon HB (1980) Poliovirus increases phosphatidylcholine biosynthesis in HeLa cells by stimulation of the rate-limiting reaction catalyzed by CTP: phosphocholine cytidyltransferase. *J. Biol. Chem.* 255, 1064-1069.

Vance JE (1991) Newly made phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine are preferentially translocated between rat liver mitochondria and endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 266, 89-97.

Vancura A, Haldar D (1994) Regulation of mitochondrial and microsomal phospholipid synthesis by liver fatty acid-binding protein. *J. Biol. Chem.* 267, 14353-14359.

Venkatakrishnan K, Von Moltke LL, Greenblatt DJ (2001) Human drug metabolism and the cytochromes P450: application and relevance of in vitro models. *J. Clin. Pharmacol.* 41, 1149-1179.

Veitch DP, Gilham D, Cornell RB (1998) The role of histidine residues in the HXGH site of CTP:phosphocholine cytidyltransferase in CTP binding and catalysis. *Eur. J. Biochem.* 255, 227-234.

Vermeulen PS, Geelen MJH, Tijburg LBM, Van Golde LMG (1997) The CDP-ethanolamine pathway in mammalian cells. In *Advances in Lipobiology* (Gross RW, ed.), pp.287-322. JAI Press, Greenwich, CT.

Vermeulen PS, Tijburg LB, Geelen MJ, van Golde LM (1993) Immunological characterization, lipid dependence, and subcellular localization of CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase purified from rat liver. Comparison with CTP:phosphocholine cytidyltransferase. *J. Biol. Chem.* 268, 7458-7464.

- Visioli F, Monti S, Colombo C, Galli C (1998) Ethanol enhances cholesterol synthesis and secretion in human hepatoma cells. *Alcohol* 15, 209-303.
- Voelker DR (1997) Phosphatidylserine decarboxylase. *Biochim. Biophys. Acta* 1348, 236-244.
- Voelker DR (1990) Characterization of phosphatidylserine synthesis and translocation in permeabilized animal cells. *J. Biol. Chem.* 265, 14340-14346.
- Voelker DR (1985) Disruption of phosphatidylserine translocation to the mitochondria in baby hamster kidney cells. *J. Biol. Chem.* 260, 14671-14676.
- Voelker DR (1984) Phosphatidylserine functions as the major precursor of phosphatidylethanolamine in cultured BHK-21 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 2669-2673.
- von Wartburg JP, Buhler R (1984) Biology of disease. Alcoholism and aldehydism: new biomedical concepts. *Lab. Invest.* 50, 5-15.
- Walkey CJ, Yu L, Agellon LB, Vance DE (1998) Biochemical and evolutionary significance of phospholipid methylation. *J. Biol. Chem.* 273, 27043-27046.
- Wang SR, Pessah M, Infante J, Catala D, Salvat C, Infante R (1988) Lipid and lipoprotein metabolism in HepG2 cells. *Biochim. Biophys. Acta* 961, 351-363.
- Wang TWM, Byrne CD, Hales CN (1994) Effect of ethanol on hepatic apolipoprotein B synthesis and secretion in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* 1211, 234-238.
- Wang Y, Kent C (1995) Identification of an inhibitory domain of CTP:phosphocholine cytidyltransferase. *J. Biol. Chem.* 270, 18948-18952.

Wang Y, MacDonald JI, Kent C (1995) Identification of the nuclear localization signal of rat liver CTP:phosphocholine cytidylyltransferase. *J. Biol. Chem.* 270, 354-360.

Warden CH, Friedkin M (1985) Regulation of choline kinase activity and phosphatidylcholine biosynthesis by mitogenic growth factors in 3T3 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 260, 6006-6011.

Watkins JD, Kent C (1990) Phosphorylation of CTP:phosphocholine cytidylyltransferase in vivo. Lack of effect of phorbol ester treatment in HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 265, 2190-2197.

Weinhold PA, Barrett D (1998) Studies on the regulation of CTP:phosphocholine cytidylyltransferase using permeabilized HepG2 cells: evidence that both active and inactive enzyme are membrane-bound. *Biochim. Biophys. Acta* 1391, 307-319.

Weinhold PA, Charles L, Feldman DA (1994) Regulation of CTP:phosphocholine cytidylyltransferase in HepG2 cells: effect of choline depletion on phosphorylation, translocation and phosphatidylcholine levels. *Biochim. Biophys. Acta* 1210, 335-347.

Weinhold PA, Charles L, Rounsifer ME, Feldman DA (1991) Control of phosphatidylcholine synthesis in HepG2 cells. Effect of fatty acids on the activity and immunoreactive content of choline phosphate cytidylyltransferase. *J. Biol. Chem.* 266, 6093-6100.

Weinhold PA, Feldman DA (1992) Choline-phosphate cytidylyltransferase. *Methods Enzymol.* 209, 248-258.

Weinhold PA, Rounsifer ME, Feldman DA (1986) The purification and characterization of CTP:phosphorylcholine cytidylyltransferase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 261, 5104-5110.

Wieder T, Geilen CC, Reutter W (1993) Antagonism of phorbol-ester-stimulated phosphatidylcholine biosynthesis by the phospholipid analogue hexadecylphosphocholine. *Biochem. J.* 291, 561-567.

Wieder T, Haase A, Geilen CC, Orfanos CE (1995) The effect of two synthetic phospholipids on cell proliferation and phosphatidylcholine biosynthesis in Madin-Darby canine kidney cells. *Lipids* 30, 389-393.

Wieder T, Orfanos CE, Geilen CC (1998) Induction of ceramide-mediated apoptosis by the anticancer phospholipid analog, hexadecylphosphocholine. *J. Biol. Chem.* 273, 11025- 11031.

Wieder T, Reutter W, Orfanos CE, Geilen CC (1999) Mechanisms of action of phospholipid analogs as anticancer compounds. *Prog. Lipid Res.* 38, 249-259.

Wieder T, Zhang Z-C, Geilen CC, Orfanos CE, Giuliano AE, Cabot MC (1996) The antitumor phospholipid analog, hexadecylphosphocholine, activates cellular phospholipase D. *Cancer Lett.* 100, 71-79.

Wiggins D, Gibbons GF (1992) The lipolysis/esterification cycle of hepatic triacylglycerol. Its role in the secretion of very-low-density lipoprotein and its response to hormones and sulphonylureas. *Biochem. J.* 284, 457-462.

Wolfla CE, Ross RA, Crabb DW (1988) Induction of alcohol dehydrogenase activity and mRNA in hepatoma cells by dexamethasone. *Arch. Biochem. Biophys.* 263, 69-76.

Wu D, Cederbaum AI (1996) Ethanol cytotoxicity to a transfected HepG2 cell line expressing human cytochrome P450 2E1. *J. Biol. Chem.* 271, 23914-23919.

- Yamashita A, Sugiura T, Waku K (1997) Acyltransferases and transacylases involved in fatty acid remodeling of phospholipids and metabolism of bioactive lipids in mammalian cells. *J. Biochem.* 122, 1-16.
- Yang EK, Blusztajn JK, Pomfret EA, Zeisel SH (1988) Rat and human mammary tissue can synthesize choline moiety via the methylation of phosphatidylethanolamine. *Biochem. J.* 256, 821-828.
- Yang MX, Cederbaum AI (1997) Characterization of cytochrome P4502E1 turnover in transfected HepG2 cells expressing human CYP2E1. *Arch. Biochem. Biophys.* 341, 25-33.
- Yang W, Boggs KP, Jackowski S (1995) The association of lipid activators with the amphipathic helical domain of CTP:phosphocholine cytidyltransferase accelerates catalysis by increasing the affinity of the enzyme for CTP. *J. Biol. Chem.* 270, 23951-23957.
- Yao Z, Tran K, McLeod RS (1997) Intracellular degradation of newly synthesized apolipoprotein B. *J. Lipid Res.* 38, 1937-1953.
- Yao ZM, Vance DE (1988) The active synthesis of phosphatidylcholine is required for very low density lipoprotein secretion from rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 263, 2998-3004.
- Yu BY, Cronholm T (1997) Coupling of ethanol metabolism to lipid biosynthesis: labelling of the glycerol moieties of sn-glycerol-3-phosphate, a phosphatidic acid and a phosphatidylcholine in liver of rats given [1,1-2H<sub>2</sub>]ethanol. *Biochim. Biophys. Acta* 1344, 165-170.
- Zammit VA (1995) Effects of hydration state on the synthesis and secretion of triacylglycerol by isolated rat hepatocytes. Implications for the actions of insulin and glucagon on hepatic secretion. *Biochem. J.* 312, 57-62.

Zborowski J, Dygas A, Wojtczak L (1983) Phosphatidylserine decarboxylase is located on the external side of the inner mitochondrial membrane. *FEBS Lett.* 157, 179-182.

Zegers MM, Hoekstra D (1998) Mechanisms and functional features of polarized membrane traffic in epithelial and hepatic cells. *Biochem. J.* 336, 257-269.

Zeisig R, Arndt D, Stahn R, Fichtner I (1998) Physical properties and pharmacological activity in vitro and in vivo of optimised liposomes prepared from a new cancerostatic alkylphospholipid. *Biochim. Biophys. Acta* 1414, 238-248.

Zhou X, Arthur G (1995) Effect of 1-O-octadecyl-2-O-methyl-glycerophosphocholine on phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine synthesis in MCF-7 and A549 cells and its relationship to inhibition of cell proliferation. *Eur. J. Biochem.* 232, 881-888.