

The background of the slide is a black and white electron micrograph showing the internal structure of a cell nucleus. It features dense, dark, granular regions (nucleoli or heterochromatin) interspersed with lighter, more diffuse areas (euchromatin or nucleolar periphery).

"MECANISMO DE INCORPORACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN EL NÚCLEO CELULAR "

Sabina María Maté

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP), CONICET-
UNLP.

Ana Ves Losada
Directora

El presente trabajo de Tesis para optar al grado de Doctora en Ciencias Exactas se realizó en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP), Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de la Dra. Ana Ves-Losada.

Mi sincero reconocimiento

Al Dr. Rodolfo R. Brenner y a la Dra. M. Josefa Tacconi de Alaníz quienes, como Directores del INIBIOLP, me permitieron utilizar las instalaciones del Instituto confiando plenamente en mi persona.

A la Cátedra de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Médicas y a la Facultad de Ciencias Médicas, UNLP, por haberme permitido el uso de sus equipos e instalaciones para la realización del trabajo experimental de esta Tesis.

A la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC) y a la Universidad Nacional de La Plata, por las becas que me otorgaran oportunamente.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por haberme brindado los medios, mediante becas y subsidios, para la realización de este trabajo.

Esta Tesis esta dedicada a SARA y MANUEL.....
a mi hermana, mi hermano y mis padres.....
a Anina, a Luisito, en su memoria, a Ana, y a Guille y Luli !!!

Les agradezco profundamente a

Annie, por la dedicación, paciencia y esfuerzo que me brindó durante todos estos años como Directora de Tesis.....

al Dr. Brenner, mi Director de Beca, por su confianza, enseñanzas, estímulo y ejemplo.....

a Susana, Ana, Laurita, Mónica y Margarita, por su gran ayuda y el tiempo que me dedicaron siempre que las necesité.....

a Ruben, Picky, Mabel y Cacho....porque estuvieron, cada uno a su manera, cada vez que pudieron.....

a María.....por su entusiasmo y por estar, siempre....

muy especialmente a Vane, Jole, Maga, Clau y Moni, por acompañarme, escucharme incansablemente y aconsejarme.... por compartir los momentos mas lindos dentro del Instituto.....

....a Cel.....a Pauli.....por ser mis amigas.....por estar siempre....

Los resultados presentados en este Trabajo de Tesis
se encuentran parcialmente publicados en,

Lipids, (2001) 36: 273 – 282.

Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, (2003) 70: 49-57.

Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, (en prensa).

INDICE

Abreviaturas

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Núcleo celular	1
1.1.1. Estructura y ultraestructura nuclear	2
1.1.1.1. Dominios del Núcleo celular	
Cromatina	3
Nucléolo	5
Compartimientos de factores de corte y empalme	5
Corpúsculos de Cajal	6
Corpúsculos de la Oncoproteína de la Leucemia Promielocítica	6
Otros Dominios Nucleares	7
1.1.1.2. Matriz Nuclear	8
1.1.1.3. Envoltura nuclear	9
1.1.1.4. Sistema tubular membranoso intranuclear	11
1.2. Lípidos del Núcleo Celular	12
1.2.1. FC nuclear	13
1.2.2. FE nuclear	15
1.2.3. FI nuclear	15
1.2.4. SM nuclear	16
1.2.5. FS nuclear	18
1.2.6. Colesterol	18
1.2.7. Otros componentes nucleares minoritarios	18
1.2.8. Ácidos grasos	19
1.2.9. Metabolismo nuclear de los eicosanoides	20
1.3. Proteínas que unen ácidos grasos (FABPs) y proteínas que unen acil-CoAs (ACBPs)	
1.3.1. Familia de las FABPs	21
1.3.1.1. Estructura de las FABPs	22

1.3.1.2. Funciones de las FABPs	23
1.3.2. Proteínas transportadoras de acil-CoAs (ACBP)	24
1.4. Factores de transcripción	25
1.4.1. PPARs	25
1.4.2. LXR	27
1.4.3. HNF-4 α	27
1.4.4. SREBP	28
2. OBJETIVOS	30
3. MATERIALES	
3.1. Materiales de Laboratorio, Drogas y Reactivos	31
3.2. Animales de Laboratorio	31
4. MÉTODOS	
4.1. Preparación de las fracciones subcelulares de hígado de rata	
4.1.1. Obtención de núcleos celulares de hígado de rata	33
4.1.1.1. Método de Blobel y Potter, modificado por Kasper	33
4.1.1.2. Método de Spelsberg, Knowler y Moses	34
4.1.2 Obtención de matriz nuclear de células de hígado de rata	35
4.1.3. Obtención de las demás fracciones subcelulares de hígado de rata	35
4.2. Determinación de proteínas	36
4.3. Análisis lipídico	
4.3.1. Extracción y cuantificación de lípidos totales	37
4.3.2. Separación, identificación y cuantificación de las clases lipídicas y fosfolipídicas individuales	37
4.3.2.1. Separación de lípidos neutros	38
4.3.2.2. Análisis de AG	38
4.3.2.2.1. Obtención de esteres metílicos	39

4.3.2.2.3. Identificación de AG por GLC	40
4.3.2.3. Separación de lípidos polares	40
4.3.2.4. Separación de las Especies Moleculares de FC	41
4.3.2.5. Identificación de las EM de FC	42
4.3.2.6. Cuantificación de las Clases Fosfolipídicas Individuales	42

4.4. Incorporación de ácidos grasos saturados y nosaturados en los lípidos nucleares de células de hígado de rata

4.4.1. Condiciones de incubación	43
4.4.2. Cuantificación de la radioactividad incorporada en cada clase lipídica	43
4.4.3. Incorporación de [1- ¹⁴ C]20:4n-6-CoA en las especies moleculares de FC de núcleos celulares de hígado de rata	44

4.5. Remodelado de AG en los Lípidos Nucleares de células hepáticas

4.5.1. Condiciones de Incubación	44
4.5.2. Análisis lipídico y cuantificación de la radioactividad incorporada en cada clase lipídica	45
4.5.3. Remodelado de AG en las EM de FC	45

4.6. Rol de L-FABP en la Incorporación de ácidos grasos saturados y nosaturados en los lípidos nucleares y endonucleares de células de hígado de rata

4.6.1. Condiciones de Incubación	45
----------------------------------	----

4.7. Tratamiento Estadístico de los Resultados

	46
--	----

5. RESULTADOS

5.1. Obtención de núcleos celulares y matrices nucleares de hígado de rata. Elección de la técnica

5.1.1. Obtención de núcleos celulares de hígado de rata	47
5.1.2. Obtención de matrices nucleares de hígado de rata	48

5.2. Composición lipídica de núcleos celulares y matrices nucleares de células de hígado de rata

5.2.1. Composición fosfolipídica y proteica de N y Mx de	54
--	----

células de hígado de rata	
5.2.2. Composición de AG de lípidos totales y de FC	55
5.2.2.1. Composición de AG de lípidos totales y de FC de N y Mx de células de hígado de rata	56
5.2.2.2. Composición de AG de lípidos totales y de FC de homogenato, microsomas y mitocondrias de hígado de rata	57
5.2.3. Composición de las EM de FC	
5.2.3.1. Composición de las EM de FC de núcleos y Mx de hígado de rata	59
5.2.3.2. Composición de las EM de FC de homogenato, microsomas y mitocondrias de hígado de rata	62
5.3. Incorporación de ácidos grasos saturados y nosaturados en los lípidos nucleares de células de hígado de rata	
5.3.1. Incorporación de los AG [1- ¹⁴ C]18:0 (esteárico), [1- ¹⁴ C]18:2 n-6 (linoleico) y [1- ¹⁴ C]20:4n-6 (araquidónico) en los lípidos nucleares	65
5.3.1.1. Incorporación de AG saturados e insaturados en los LT nucleares	65
5.3.1.2. Incorporación de los AG [1- ¹⁴ C]18:0, [1- ¹⁴ C]18:2n-6 y [1- ¹⁴ C]20:4n-6 en las clases lipídicas nucleares, en función del tiempo de incubación	67
5.3.1.3. Efecto del ATP y CoA en la incorporación de AG saturados e insaturados en las fracciones Nc y Mlc	69
5.3.1.4. Incorporación del [1- ¹⁴ C]20:4n-6-CoA en las clases lipídicas nucleares	71
5.3.1.5. Esterificación del [1- ¹⁴ C]20:4n-6 en los fosfolípidos nucleares	72
5.3.1.6. Esterificación de [1- ¹⁴ C]20:4n-6-CoA en las EM de FC nuclear de células de hígado de rata	74
5.4. Remodelado de ácidos grasos en los lípidos nucleares de células hepáticas	
5.4.1. Remodelado de AG en los fosfolípidos nucleares de células de hígado de rata	78
5.5. Rol de la L-FABP en la incorporación de ácidos grasos saturados e insaturados en los pooles lipídicos nucleares y endonucleares de células de hígado de rata	
5.5.1. Incorporación del ácido [1- ¹⁴ C]18:0 unido a L-FABP (18:0-LFABP) en las diferentes clases de lípidos nucleares	88
5.5.1.1. Incorporación de 18:0:L-FABP en las clases lipídicas	88

nucleares	
5.5.1.2. Esterificación de 18:0:L-FABP en los FL nucleares	91
5.5.2. Incorporación del ácido [1- ¹⁴ C]20:4n-6 unido a L-FABP (20:4:L-FABP) en las diferentes clases de lípidos nucleares	95
5.5.2.1. Incorporación de 20:4:L-FABP en las clases lipídicas nucleares	95
5.5.2.2. Esterificación de 20:4:L-FABP en los FL nucleares	97
5.5.3. Incorporación del ácido [1- ¹⁴ C]18:0 libre o unido a L-FABP (18:0:L-FABP) en las diferentes clases de lípidos endonucleares	101
5.5.3.1. Incorporación de 18:0 y 18:0:L-FABP en las clases lipídicas endonucleares	101
5.5.3.2. Esterificación de 18:0 y 18:0:L-FABP en los FL endonucleares	105
5.5.4. Incorporación del ácido [1- ¹⁴ C]20:4 libre o unido a L-FABP (20:4:L-FABP) en las diferentes clases de lípidos endonucleares	107
5.5.4.1. Incorporación de 20:4 y 20:4:L-FABP en las clases lipídicas endonucleares	107
5.5.4.2. Incorporación de 20:4 y 20:4:L-FABP en los FL endonucleares	111

6. DISCUSIÓN

6.1. Composición lipídica de núcleos celulares de hígado de rata	114
6.2. Incorporación de ácidos grasos saturados y insaturados en los lípidos nucleares y endonucleares de células de hígado de rata	117
6.3. Remodelado de ácidos grasos en los lípidos nucleares de células hepáticas	121
6.4. Rol de L-FABP en la incorporación de ácidos grasos saturados e insaturados en los pools lipídicos nucleares y endonucleares de células de hígado de rata	124
BIBLIOGRAFÍA	130

AA: ácido araquidónico.
ACBPs: proteínas que unen acil-CoAs.
AG: ácido graso.
AGL: ácido graso libre.
ATP: trifosfato de adenosina.
CDP: difosfato de citidina.
CK: colina quinasa.
CoA: coenzima A.
Col: colesterol.
CPN: complejo de poro nuclear.
CPT: diacilglicerol:colina fosfotransferasa.
CT: CTP:colina-P citidililtransferasa.
CTP: trifosfato de citidina
DAG: diacilglicerol.
EC: ésteres de colesterol.
ELSD: Detector Evaporativo de la Luz Dispersada.
EM: especie molecular.
FABPs: proteínas que unen ácidos grasos.
FATPs: proteínas que transportan ácidos grasos.
FC: fosfatidilcolina.
FE: fosfatidiletanolamina.
FI: fosfatidilinositol.
FL: fosfolípidos.
FS: fosfatidilserina.
FR: fase reversa.
GLC: cromatografía gas-líquido.
HNF-4 α : factor nuclear hepático 4 α .
HPLC: cromatografía líquida de alta resolución.
IP₃: trifosfato de inositol.

L-FABP: proteína hepática que une ácidos grasos.

Abreviaturas

LisoFL: lisofosfolípido.

LN: lámina nuclear.

LPA: ácido lisofosfatídico.

LT: leucotrienos.

LXR: receptor x hepático.

MN: membrana nuclear.

MNE: membrana nuclear externa.

MNI: membrana nuclear externa.

Mx: matriz nuclear.

N: núcleo celular.

PA: ácido fosfatídico.

PG: prostaglandinas.

PIP₂: fosfatidilinositol 4,5-difosfato.

PKC: proteína quinasa C.

PLA₂: fosfolipasa A₂.

PLC: fosfolipasa C.

PLD: fosfolipasa D.

PPARs: receptores activadores de la proliferación peroxisomal.

RE: retículo endoplásmico.

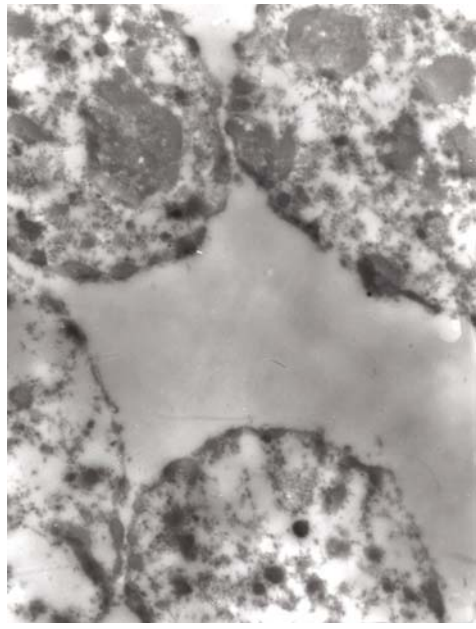
SM: esfingomielina.

SREBP: proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides.

TAG: triacilglicerol.

TLC: cromatografía en capa delgada.

INTRODUCCIÓN

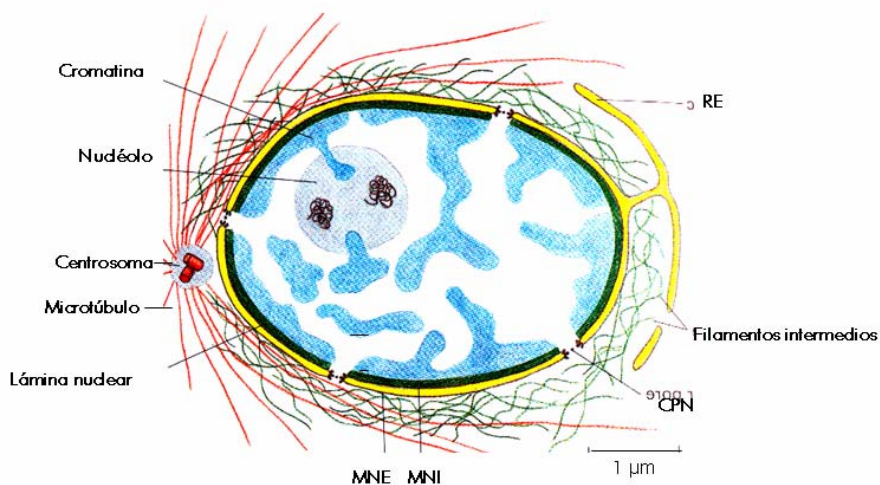


1.1. Núcleo celular

El núcleo celular es la adquisición evolutiva que define a las células eucariotas.

El núcleo (N) fue la primera estructura intracelular descubierta, hace ya más de 200 años (1).

El siguiente esquema corresponde a un núcleo celular típico con sus componentes estructurales característicos.



(Adaptado de *Molecular Biology of the Cell*, Alberts y col. 4º ed.)

El núcleo celular se encuentra delimitado por la envoltura nuclear, formada por dos bicapas lipídicas concéntricas, la membrana nuclear interna (MNI) y la membrana nuclear externa (MNE), interrumpidas a nivel de los complejos del poro nuclear (CPN), a través de los cuales se lleva a cabo el transporte de moléculas entre el N y el citosol.

La envoltura nuclear presenta una relación de continuidad con las membranas del retículo endoplasmático (RE) y se encuentra

estructuralmente relacionada con dos redes de filamentos intermedios: una, llamada lámina nuclear (LN), constituye una malla delgada y altamente organizada que tapiza internamente a la MNI mientras que la segunda, más laxa, rodea externamente a la MNE (2).

El N celular contiene el patrimonio genético de la célula, protegiéndolo del daño ambiental y asegurando su duplicación, transcripción y reparación.

La composición química general del N se determinó hace ya muchos años (3). Las proteínas son las biomoléculas mayoritarias alcanzando más del 60 % del total, seguidas por el ADN, que representa casi el 30 %, los lípidos, que constituyen casi el 5 % y el ARN, que alcanza al 3 %.

Los fosfolípidos (FL) son los lípidos mayoritarios alcanzando el 3.7 % de la composición química general, siendo fosfatidilcolina (FC) el constituyente más abundante del N celular seguido por fosfatidiletanolamina (FE), fosfatidilinositol (FI), esfingomielina (SM) y fosfatidilserina (FS).

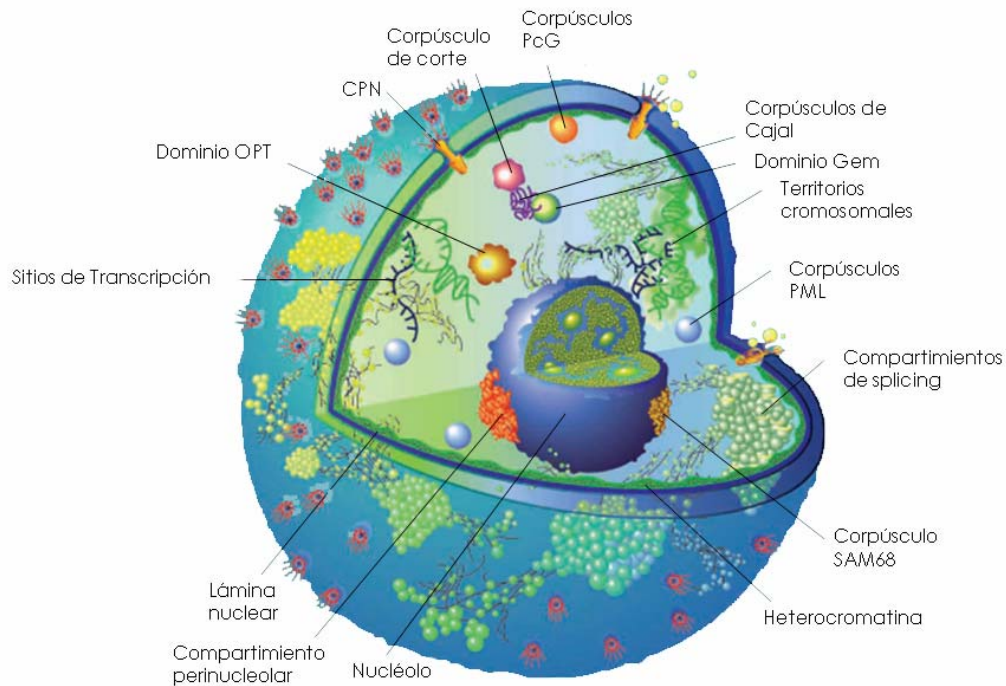
1.1.1. Estructura y ultraestructura nuclear

El N celular es una estructura altamente dinámica formada por distintos dominios intranucleares que, a diferencia de los citoplasmáticos, no están rodeados por membranas. A pesar de ello, tres razones fundamentales hacen que se acepte el término "dominio" para referirse a estas estructuras intranucleares: 1- cada uno se caracteriza por poseer determinado conjunto de proteínas, 2- puede ser morfológicamente identificado por microscopía óptica y/o electrónica y, al menos algunos de ellos, 3- pueden ser aislados y purificados (1).

La existencia de estos dominios representa una manera de organización espacial de las funciones nucleares tales como los

procesos de replicación, transcripción, procesamiento del ARN y reparación del ADN, entre otros (4).

El siguiente esquema corresponde a un modelo del N celular y sus dominios intranucleares, los que se describen a continuación.



(Adaptado de David L. Spector, 2001, *Journal of Cell Science* 114, 2891-2893).

1.1.1.1. Dominios del Núcleo celular

Cromatina

Se define a la cromatina como el componente nuclear formado por el ADN asociado a dos clases de proteínas, las proteínas histónicas y las proteínas cromosomales no histónicas (2).

Las proteínas representan entre el 60 y el 65 % del total de los componentes de la cromatina mientras que el ADN alcanza aproximadamente el 30 %. Los FL representan un componente

minoritario de la cromatina alcanzando el 0.2 % (5). Los porcentajes relativos de cada clase fosfolipídica son: FC (52.8 %), FI (15.5 %), FE (13.9 %), SM (13.3 %) y FS (3.9 %) (6).

Tradicionalmente se realiza la distinción entre dos tipos de cromatina en el N interfásico: una forma altamente condensada y organizada, denominada heterocromatina, y otra forma más laxa, menos condensada, llamada eucromatina.

Según un modelo propuesto recientemente por Cremer y colaboradores (7) el núcleo celular sería una estructura altamente compartimentalizada formada por territorios cromosomales (TCs) y un compartimiento de intercromatina (CI), antes denominado dominio de intercromatina (8).

Este modelo TC-CI postula que el CI es un dominio tridimensional de lagunas y canales, que comienza a nivel del complejo del poro nuclear y se extiende entre, y hacia el interior, de los TCs vecinos. Las fronteras entre los TCs y el CI se denominan regiones de pericromatina (RP).

En el CI se localizan numerosos dominios de variadas dimensiones, siendo los más caracterizados el nucléolo, los cúmulos de gránulos de intercromatina (IGCs, por sus siglas en inglés), los corpúsculos de Cajal y los corpúsculos de la oncoproteína de la leucemia promielocítica.

Los mismos autores hipotetizan (9) que los CI y las RP definen una topología espacial crucial para el desarrollo de procesos nucleares como la transcripción, la replicación, el corte y empalme del ARN y, presumiblemente, la reparación del ADN.

Según este modelo, la organización estructural de la cromatina se relacionaría directamente con la actividad genómica de la célula y constituiría una primera instancia de regulación de la expresión genética. Es así que las RP corresponderían a sitios activos de replicación y transcripción, donde se concentrarían factores de transcripción, transcriptos nacientes y la maquinaria de procesamiento

de ARN, mientras que los genes silenciados se encontrarían en el interior de los TCs. Sin embargo, observaciones recientes demuestran que en las RP también se puede encontrar genes inactivos (10) lo que determinaría que la separación entre zonas activas e inactivas no sería tan absoluta.

Nucléolo

El nucléolo es el dominio más llamativo del N celular, cuando se lo observa al microscopio óptico. Es el sitio donde se lleva a cabo la síntesis y procesamiento del ARN ribosómico (rARN) y el ensamblado de las partículas ribosómicas y otros complejos de ARN-proteínas, como las telomerasas y las partículas de ribonucleoproteínas nucleares pequeñas U6 (U6 snRNP), que participan en el corte y empalme del pre-mARN (2).

El nucléolo constituye un gran agregado de macromoléculas que incluye los genes para los rARNs, pre-rARNs, rARNs maduros, enzimas que procesan los rARNs, partículas de ribonucleoproteínas nucleolares pequeñas (snoRNPs), subunidades proteicas ribosomales y ribosomas parcialmente ensamblados (2).

Esta estructura nuclear se desensambla durante la mitosis, cuando los cromosomas se condensan, y se reorganiza una vez finalizado este proceso de división celular.

El tamaño del nucléolo refleja el número de ribosomas que la célula está produciendo por lo que varía mucho de un tipo celular a otro y aún en una misma célula, según la etapa del ciclo celular.

Compartimientos de factores de corte y empalme

Las denominadas "pecas nucleares" o "compartimientos de factores de corte y empalme" (Nuclear Speckles o Splicing-Factor Compartments; SFCs, por sus siglas en inglés), corresponden a dominios nucleares donde se concentran factores de corte y empalme (splicing) del pre-mARN (11). Estos dominios se presentan en número de 20 a 25 por N celular, difusamente distribuidos en el interior nuclear.

En este dominio nuclear se concentran también algunos de los componentes del ciclo de fosfoinosítidos nuclear, incluidos varias isoformas de la enzima *fosfatidilinositol fosfato quinasa*, el fosfatidilinositol 4,5-bifosfato, la *fosfoinosítido 3-quinasa* y la *diacilglicerol quinasa- α* (12).

En estos dominios, si bien corresponden a sitios donde se lleva a cabo el ensamblado, reserva y reciclado de complejos de splicing (13) no se llevarían a cabo los procesos de transcripción, corte y empalme de ARN pero sí el control de calidad de los mismos, previo a su exportación (9).

Corpúsculos de Cajal

Los corpúsculos de Cajal (Cajal Bodies; CB, por sus siglas en inglés) corresponden a otros dominios nucleares donde se acumulan factores de splicing del ARN (1). Estos dominios son pequeñas estructuras esféricas que se presentan en número de 1 a 5 por N celular.

En función del tamaño se reconocen dos subtipos de CB, uno mayor -llamado CB- y uno menor -llamado mini-CB-. Contienen una amplia gama de componentes como maquinaria espliceosomal, factores de transcripción, factores específicos de corte y de poliadenilación y ciertos componentes nucleolares (14).

Se considera que los CB funcionarían como centros de distribución donde se concentran determinados factores de transcripción y de splicing del ARN para ser distribuidos a los sitios donde se lleva a cabo la transcripción (15). Más aún, en los CB se produciría

también el pre-ensamblado de la maquinaria de la *ARN pol III* y I con la maquinaria de procesamiento del ARN para conformar los transcriptosomas de *pol III* y *pol I* (14;16).

Corpúsculos de la Oncoproteína de la Leucemia Promielocítica

Estos dominios nucleares (Promyelocytic Leukaemia Oncoprotein; PML, por sus siglas en inglés) son pequeños dominios esféricos conocidos también como "dominio nuclear 10", "cuerpos de Kremer" y "dominios oncogénicos PML" (17). Los PML se presentan distribuidos por el N celular en número de 10 a 30.

Estos corpúsculos son de gran interés clínico para el diagnóstico y tratamiento de la leucemia promielocítica aguda (18).

Además de los dominios intranucleares descritos anteriormente, el N celular presenta un conjunto de dominios poco caracterizados en sus aspectos estructural y funcional, que se describen someramente a continuación.

Los **dominios OPT** (el nombre hace alusión a determinados factores de transcripción que allí se concentran) se ensamblan durante la fase G₁ del ciclo celular y desaparecen al inicio de la fase S. Estos dominios se asocian preferencialmente con determinados cromosomas para intervenir en la transcripción de genes específicos (18).

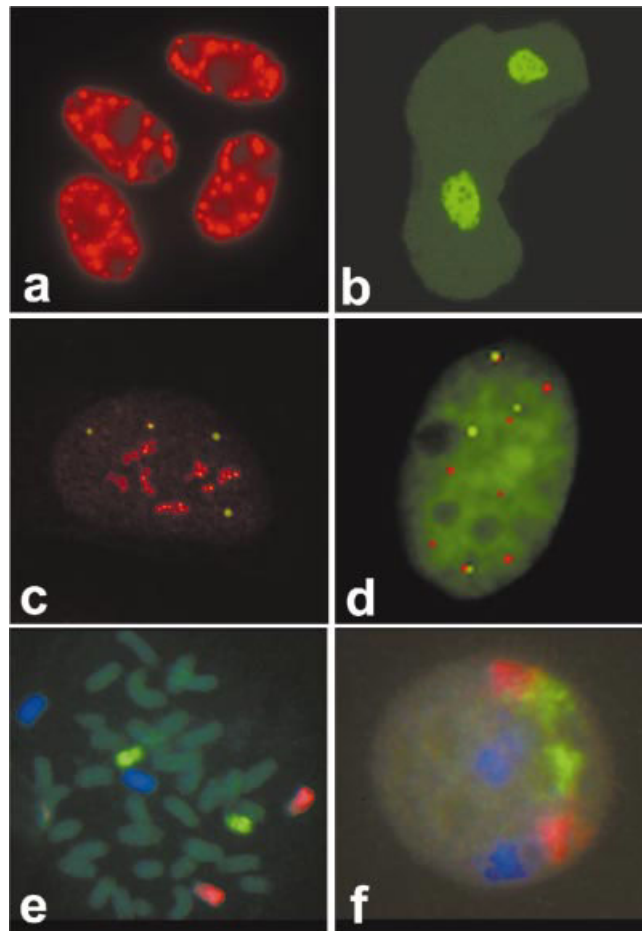
El compartimiento perinucleolar (**PNC**, por sus siglas en inglés) y los corpúsculos nucleares **SAM 68** son dominios nucleares localizados en la periferia del nucléolo, con el que presentan contacto directo (19). En estos dominios se concentran determinados ARNs transcriptos por la enzima *ARN pol III*. Su función no se conoce aún pero la presencia de este dominio se correlaciona con transformación oncogénica.

Los corpúsculos **PcG** son dominios nucleares que varían en tamaño y número y se presentan asociados a regiones de pericromatina (20). Su función no se conoce aún con precisión pero se postula que estarían involucrados en el silenciamiento génico (10).

Los **Gems** son dominios nucleares adyacentes a los CB caracterizados por la presencia de determinados factores proteicos, como la proteína de supervivencia de neuronas motoras y el factor asociado Gemin2. Estos dominios intervienen en la maduración de snRNP y presentan correlación clínica con una enfermedad degenerativa de neuronas motoras, la atrofia muscular espinal (21).

Los corpúsculos de corte (**Cleavage Bodies**, en inglés) son dominios donde se concentran factores que intervienen en el corte y la poliadenilación durante el procesamiento del pre-mARN (22).

Las siguientes microfotografías de fluorescencia corresponden a algunos de los dominios nucleares mencionados. La foto **a** corresponde a los SFCs; la **b** al nucléolo; la **c** a los CB (verde) y al nucléolo (rojo); la **d** al corpúsculo PML (rojo) y al los CB (verde); la **e** a los cromosomas de ratón 13 (azul), 14 (rojo) y 15 (verde) en metafase y, por ultimo, la foto **f** corresponde a los mismos cromosomas de la foto anterior que, en interfase, se visualizan como territorios cromosomales.



(Miroslav Dundr y col., 2001, *Biochem. J.* 356, 297-310).

1.1.1.2. Matriz Nuclear

Este componente nuclear fue descrito por primera vez en 1948 (23) pero mucho más tarde, en el año 1974, se la comenzó a denominar "matriz nuclear" (Mx) (24).

En 1996 Don Fawcett definió a la Mx como la "estructura nuclear no cromatínica observada con el microscopio electrónico" (25).

Actualmente se acepta que la Mx no es un concepto sino una estructura nuclear bien concreta.

El principal componente estructural de la misma lo constituye una red fibrogranular de ribonucleoproteínas identificada por primera vez en los años 60 (26), limitada periféricamente por la LN.

La composición química de la Mx matriz nuclear se determinó hace una década siendo el componente mayoritario las proteínas, seguidas por el ADN y los FL (27).

La Mx le otorga al N celular el andamiaje estructural donde se anclan los dominios de la cromatina (28). El anclado de la cromatina a proteínas específicas de la Mx nuclear y a la lámina nuclear tiene una base molecular dada por la presencia de secuencias de ADN llamadas regiones de unión a la matriz (MARs, por sus siglas en inglés) (29).

A la red de fibras de la Mx también se fijarían durante la replicación y la transcripción los complejos de *ADN polimerasa* (30) y *ARN polimerasa* (31) y algunas de las enzimas y complejos enzimáticos requeridos para el remodelado de la cromatina y la activación génica (32-34).

Las investigaciones existentes acerca de la Mx han puesto especial énfasis en la ultraestructura y composición proteica; en este sentido, se conoce un número limitado de proteínas y de interacciones proteína-proteína de la Mx nuclear como ribonucleoproteínas, ARN, actina nuclear y proteínas que ligan actina, incluidas la miosina y la proteína estructural 4.1 (35-40). Sin embargo, no se ha realizado aún su caracterización lipídica.

1.1.1.3. Envoltura nuclear

Rodeando los dominios nucleares se encuentra la envoltura nuclear que separa espacial y temporalmente los procesos nucleares como replicación y transcripción, de los citoplasmáticos, como la traducción (41). Curiosamente, existe un dato bibliográfico que describe

que, en el interior del N celular de mamíferos, existiría acoplamiento entre los procesos de transcripción y traducción (42).

La carioteca o membrana nuclear (MN) consiste en dos membranas o bicapas lipídicas concéntricas, interrumpidas a nivel de los CPN y separadas por un espacio perinuclear. Si bien las membranas nucleares interna y externa son continuas, presentan distinta composición proteica. La MNE presenta una relación de continuidad con el RE y está caracterizada por la presencia de ribosomas en su cara citoplasmática. La MNI contiene proteínas específicas que actúan como sitios de unión para la cromatina y para la LN. El espacio entre las dos membranas nucleares, llamado espacio intermembrana, es continuo con el lumen del RE (2).

La MN posee el 13 % de la proteínas nucleares, el 3 % del ARN y menos del 1 % del ADN (43).

La composición química general de la membrana nuclear incluye proteínas, el componente mayoritario, que representan el 97.4 % del total, ADN, que constituye el 0.9 % y FL, que alcanzan el 1.7 % (27). Los porcentajes relativos de cada clase fosfolipídica son: FC (60.6 %), FE (23.5 %), FI (10.1 %), SM (3.9 %) y FS (1.7 %) (44).

La LN esta constituida por filamentos intermedios de tipo V, llamados laminas, que se organizan en una trama bi o tridimensional - según el tipo celular-que tapiza internamente a la MNI (45).

Los filamentos de la LN pueden ser clasificados en dos subtipos: las laminas B, de distribución ubicua y las laminas A/C, que se encuentran sólo en células diferenciadas (46) (47). Estas proteínas presentan señales de localización nuclear (NLS) (48) y, en muchos casos, el extremo carboxilo se encuentra isoprenilado o metilado (49) (50) (51). Estas proteínas determinan la forma y el tamaño del núcleo celular, así como también el posicionamiento del CPN y de proteínas de la MNI (45).

A través del CPN se lleva a cabo un continuo tráfico núcleo-citoplasmático, bidireccional y selectivo.

En células animales los CPN se encuentran distribuidos en toda la superficie del N celular y están formados por más de 50 proteínas diferentes, denominadas nucleoporinas, que determinan una estructura de simetría octogonal. La envoltura nuclear de una célula de mamífero típica consta de 3000 a 4000 CPN (52).

Cada CPN consta de uno o más canales acuosos de 9 nm de diámetro y 15 nm de longitud, a través de los cuales difunden pasivamente moléculas pequeñas y medianas (con un tamaño menor a 50 kDa) solubles en medios acuosos. Las moléculas cuyo tamaño es mayor de 50 kDa no pueden pasar a través del CPN y son vehiculizadas a través de la envoltura nuclear mediante mecanismos de transporte activo que involucran receptores específicos y NLS (53). Se ha descrito la presencia de lípidos con AG de cadena muy larga asociados al CPN, necesarios tanto para su estructura como para su función (54).

1.1.1.4. Sistema tubular membranoso intranuclear

En el año 1979 se describió por primera vez la presencia de un sistema tubular membranoso intranuclear (55). En la última década este sistema, también llamado retículo nucleoplásmico, se caracterizó más detalladamente (4) (56) (57) (58).

La morfología de este retículo nucleoplásmico es específica de cada tipo celular pudiendo estar constituida por cortos tubos hasta múltiples y complejas estructuras ramificadas. Algunas invaginaciones atraviezan enteramente el núcleo celular, abriéndose en dos puntos de la superficie nuclear, mientras que otras alcanzan, o terminan cerca, del nucléolo. Estas invaginaciones están limitadas por membranas derivadas de la envoltura nuclear, presentan CPN y, en algunos casos, son particularmente abundantes los receptores de inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃R) (56).

El interior de estas invaginaciones presenta continuidad con el citoplasma; inclusive se han observado ribosomas, mitocondrias, pequeñas vesículas y elementos del citoesqueleto en su interior. El espacio entre la membrana interna y la membrana externa de las invaginaciones presenta proteínas solubles características del RE.

Este sistema tubular membranoso intranuclear se observó en numerosos tipos celulares diferentes, a saber: vegetales (59), insectos (60) (61) y mamíferos (55) (62), inclusive en células en cultivo primario (4). En los núcleos celulares de hepatocitos de rata normal se ha observado entre 0-3 canales por núcleo.

En lo que respecta a las funciones de este controvertido sistema de "túbulos citoplasmáticos que penetran el núcleo celular", se ha propuesto que aumentaría la superficie de contacto entre el N celular y el citoplasma, lo que facilitaría el transporte núcleo-citoplasmático (63) así como también intervendría en los mecanismos de señalización nucleares dependientes de Ca^{+2} (56) (64) (58).

1.2. Lípidos del Núcleo Celular

La primera demostración de la existencia de lípidos, especialmente FL, en el N celular corresponde al trabajo publicado por Chayen y col., en 1957 (65). Posteriormente se demostró la existencia de lípidos neutros (66) y de numerosas enzimas del metabolismo lipídico en el núcleo celular de una gran variedad de tejidos e, inclusive, en líneas celulares (67) (68).

En este compartimiento celular los lípidos se encuentran no sólo formando parte de la envoltura nuclear sino también en su interior, asociados a la matriz nuclear y a la cromatina de una gran variedad de tipos celulares (65) (69) (70) (71) (5) (72).

Se ha propuesto que los FL del N celular se encuentran asociadas a moléculas de ARN en zonas de cromatina descondensada (73) (74); otras investigaciones proponen que los lípidos del N celular existen como complejos proteolipídicos, muy probablemente, asociados a la Mx (75) (76).

Como se dijo anteriormente, los FL son los lípidos mayoritarios del N celular. Los porcentajes relativos de cada clase fosfolipídica nuclear de hígado de rata son: FC (57.9 %), FE (21.6 %), FI (12.2 %), FS (2.7 %) y SM (5.5 %) (77).

En cuanto a las composiciones de ácidos grasos (AG) de los FL nucleares se ha demostrado la existencia de elevados niveles de AG polinosaturados, principalmente ácido araquidónico (20:4n-6) y docosahexaenoico (22:6) (78).

Además de los FL en el N celular se encuentran otros componentes lipídicos como colesterol (col), ésteres de colesterol (EC), diacilglicéridos (DAG), triacilglicéridos (TAG) y ácidos grasos libres (AGL) (44).

En las últimas décadas se realizaron numerosísimas investigaciones que demuestran la existencia de un metabolismo lipídico nuclear muy

activo que involucra procesos como síntesis *de novo*, desaturación, peroxidación y síntesis de eicosanoides, entre otros. Los lípidos del N celular no representan meros componentes estructurales inertes de la membrana nuclear sino que intervienen en la regulación de una gran variedad de procesos, por ejemplo, al constituir precursores de moléculas mensajeros generadas en numerosas vías de transducción de señales (79) y en la regulación de la estructura de la cromatina y de la expresión genética (80).

Al presente se han descrito las vías de señalización nuclear de fosfoinosítidos (81), FC, FS, esfingolípidos, eicosanoides y AG (82-84) (85).

A continuación se realizará una breve actualización acerca del metabolismo y las funciones de los lípidos del N celular.

1.2.1. FC nuclear

La FC es el FL mayoritario del núcleo celular, donde se encuentra formando parte tanto de la membrana nuclear como en su interior.

En el N celular se encuentran enzimas responsables de la síntesis y de la degradación de la FC nuclear.

La síntesis nuclear se puede llevar a cabo por tres vías o mecanismos diferentes:

1. "vía de la CDP-colina" o "vía de Kennedy", responsable de la síntesis del 85 % de la FC nuclear. Se encuentran las tres enzimas encargadas de la síntesis *de novo* de la FC: *colina quinasa* (CK), *CTP-: fosfocolina citidililtransferasa α* (CCT α) y la enzima *CDP-colina: 1,2- diacilglicerol colinafosfotransferasa* (CPT) (86) (87) (88) (89) (90);
2. el complejo enzimático de intercambio de base que cambia serina por colina en la FS, responsable del 5-10 % de la síntesis total de FC nuclear (91);

3. la *SMSintasa reversa*, que sintetiza FC a partir de SM y DAG, liberando ceramida (92).

Las ultimas dos vías han sido demostradas en núcleo de células de hígado de rata (86) (88).

El catabolismo de la FC nuclear depende de la actividad de las siguientes enzimas:

- *fosfolipasa D-dependiente de FC* (PC-PLD). Esta enzima posee dos isoformas con diferente regulación y localización: la PC-PLD1 localizada en la membrana nuclear (93) y la PC-PLD2, de localización intranuclear (94).

La activación de la *PLD* nuclear produce finalmente un incremento de los niveles nucleares de DAG, los que actúan como moléculas mensajeras produciendo la activación de las isoformas de la proteína quinasa C (PKC) dependientes de DAG.

Todavía no se estableció con precisión el rol del ácido fosfatídico (PA) nuclear producido por actividad de PLD. Se sabe que en el citoplasma el PA esta involucrado en la regulación de la polimerización de las fibras de actina y que estimula la actividad de la enzima *fosfatidilinositol 4-fosfato 5-quinasa* incrementando la síntesis de PIP₂ (95). En relación a lo antes dicho, la actina es uno de los principales componentes estructurales de la matriz nuclear (23) y la enzima *fosfatidilinositol 4-fosfato 5-quinasa* se encuentra asociada a los speckles del N celular (96) (12) por lo que se postula que el PA cumpliría un rol en la polimerización de las fibras de actina.

- *fosfolipasa C-dependiente de FC* (PC-PLC). Esta enzima se encuentra asociada a la cromatina (87);
- *SMSintasa o PC:ceramida fosfocolintransferasa*, también asociada a la cromatina (97);
- *fosfolipasas A₂ nucleares* (PLA₂).

Se determinó la presencia de una PLA₂ neutra, que se encontraría asociada a la Mx y que desempeñaría un rol en la proliferación celular (98) (27); se ha descrito también la presencia de una isoforma citosólica de PLA₂ de 85-kDa, la cPLA₂-α, que reside predominantemente en el N celular (99) y de otros tipos de PLA₂ que, ante ciertos estímulos, translocan al N celular. Estas son una iPLA₂ que en respuesta a la hipoxia transloca al núcleo de células de LA-N-1-neuroblastoma (100) (101) y la PLA₂-I, una PLA₂ secretoria de células de páncreas, que estimula la síntesis de ADN en una línea celular derivada de estroma uterino de rata normal (102).

Las PLA₂s nucleares cumplen un rol en la regulación del crecimiento y la proliferación celular mediante el incremento de la producción de ácido araquidónico (AA) y de lisofosfatidilcolina (lisoFC). El mecanismo específico a través del cual estas moléculas mensajeras afectan la tasa de proliferación no ha sido aun completamente elucidado (103). Estas enzimas modifican la composición de AG de los FL nucleares -FC, FE, FI y FS- en relación con la regeneración hepática (104).

La FC nuclear, además de intervenir en las vías de señalización, actúa también como FL de contra flujo para el importe neto del FI al interior nuclear, proceso mediado por la proteína transportadora de fosfatidilinositol (PITP) ya que se demostró que la isoforma alfa (PITP_α) de esta proteína es tanto de localización extra como intranuclear (105).

La FC nuclear constituye uno de los principales sustratos de la PLA₂, cuya actividad produce la liberación del ácido araquidónico, precursor de eicosanoides (106).

1.2.2. FE nuclear

La FE es el segundo FL en abundancia del N celular donde se encuentra asociado tanto a la membrana nuclear como a la cromatina (5). Sin embargo, en la literatura existe poca información acerca del metabolismo y los posibles roles de este FL nuclear. Al respecto se ha demostrado que, en hepatocitos tratados con insulina, se produce un incremento de los niveles de FE y SM de la cromatina transcripcionalmente activa (107).

1.2.3. FI nuclear

El FI es el tercer FL en masa del N celular, donde se encuentra a nivel de la membrana nuclear como así también asociado a la cromatina (5).

A diferencia de lo que ocurre con la FC, para el FI no se ha demostrado que exista síntesis *de novo* nuclear.

El perfil de fosfoinosítidos nucleares se remodela en respuesta a estímulos externos por la acción de determinadas enzimas desencadenando una cascada de señales que lleva a la regulación de procesos como la diferenciación y proliferación celular, adaptación al estrés y apoptosis (108). Los fosfoinosítidos nucleares tendrían también un rol estructural y/o regulatorio en los procesos de splicing del mRNA (109) y de la estructura de la cromatina (110) (111).

En lo concerniente al catabolismo del FI nuclear, las actividades enzimáticas caracterizadas son las siguientes:

- *fosfolipasa C-dependiente de FI* (PI-PLC). En el N de numerosos tipos celulares se demostró la existencia de las siguientes isoformas de esta enzima: β_1 , β_2 , β_3 , β_4 y γ_1 . Cada una de las isoformas de PI-PLC presenta diferentes y características localización subnuclear (cromatina, MN), actividad y regulación. (112). La actividad de esta enzima genera DAG y trifosfato de inositol (IP₃) (106);

- *PI-3-quinasas*, enzimas que fosforilan al fosfatidilinositol para formar fosfoinosítidos (*PI 4-quinasa*) y a éstos para formar polifosfoinosítidos (*PI 4-quinasa*, *PI4P 5-quinasa*, *PIP-quinasas tipo I y II*, *PI3-quinasas tipo I, II y III*) (106);
- PC-PLC, que cataliza la hidrólisis del fosfatidilinositol para formar DAG e inositolfosfato y a los fosfoinosítidos para formar DAG y polifosfoinosítidos (94).

Tanto el DAG como los polifosfoinosítidos generados a partir del catabolismo del PI activan a PKC, la que fosforila determinadas proteínas diana. En el N celular de hígado de rata se demostró la existencia de una isoforma de PKC independiente de la citosólica, además de la de otras PKC (PKC α y PKC β) que translocan a núcleo desde el citosol cuando se elevan los niveles nucleares de DAG (106) (108).

1.2.4. SM nuclear

La SM es un componente minoritario del núcleo celular que se encuentra asociado a la membrana y, principalmente, a la cromatina (77).

Recientemente se estableció que el N celular constituye un importante sitio para la generación de esfingolípidos bioactivos.

En el N celular se encontró actividad de las siguientes enzimas relacionadas con el metabolismo nuclear de la SM:

- *Esfingomielinasa neutra (nSMasa)*, es una enzima dependiente de Mg⁺² que se encuentra asociada a membrana nuclear (113), a Mx (27) y a cromatina (114) (115); estas isoformas presentan diferentes características fisicoquímicas (pH óptimo, V_{max} y K_m), regulación y actividades a lo largo del ciclo celular (115);

- *Ceramidasa* (116);
- *Esfingosina quinasa* (117);
- *SMsintasa* o *Fosfatidilcolina:ceramida fosfocolina transferasa*. Esta enzima se encuentra en la MN y en la cromatina; la actividad de la isoforma presente en MN es mayor que la de cromatina y las mismas difieren también en cuanto a pH óptimo y K_m (118) (108).

La ceramida, esfingosina y esfingosina 1-fosfato son moléculas con numerosos efectos biológicos (119). Estos efectos biológicos mediados por SM y sus catabolitos son tanto dependientes como independientes de PKC y de otras quinasas dependientes de SM (108).

La SM del interior nuclear se encuentra asociada principalmente a los ácidos nucleicos, posiblemente cumpliendo un rol tanto estructural - estabilización de la estructura de la cromatina- (120) como funcional. En este último sentido, se ha demostrado que los productos metabólicos de la SM, particularmente la ceramida, cumplen importantes roles en la proliferación celular (121) y en la apoptosis (122) (123) (120); también pueden afectar el splicing alternativo de genes involucrados en la diferenciación celular (124). Por último, el metabolismo nuclear de la esfingosina está implicado en la regulación de la concentración del Ca^{+2} intranuclear la que desencadena una serie de eventos que llevan, finalmente, a la regulación de la expresión de determinados genes (125).

1.2.5. FS nuclear

La FS representa un pequeño porcentaje de los FL nucleares. Esta clase fosfolipídica presenta localización a nivel de membrana nuclear y, principalmente, intranuclear, asociada al ARN (6).

Las enzimas responsables de la síntesis de esta clase fosfolipídica han sido descritas en el núcleo celular asociadas, principalmente, a la membrana nuclear interna (126). Dicha síntesis es un mecanismo dependiente de Ca^{+2} en el cual el grupo base -colina o etanolamina- de un FL preexistente es cambiado por serina libre. La isoforma enzimática presente en el N celular es la PSS I, mientras que la PSS II no ha sido aún descrita en este compartimiento subcelular (127) (86).

La FS presente en el núcleo celular estimula la actividad de las enzimas *DNA y RNA polimerasas* (128) y de todas las isoformas de *PKC* (129).

1.2.6. Colesterol

El colesterol del núcleo celular se encuentra tanto en la membrana nuclear, principalmente asociado a membrana externa (130), como en el interior nuclear, asociado a la cromatina y a la matriz nuclear (131) (132). Se determinaron dos fracciones de colesterol en cromatina, una soluble y otra ligada a complejos de SM-proteína. La relación colesterol/FC en el interior nuclear es tres veces mayor que en la membrana nuclear, lo que indica una estructura intranuclear más rígida (94).

El colesterol asociado a la cromatina esta involucrado en la proliferación celular, específicamente en la transición de la fase G_0 a la fase G_1 del ciclo celular y en el inicio de la fase S, probablemente mediante activación de ciclinas, mientras que la fracción asociada a Mx se relaciona con la unión del ADN a la Mx (94).

1.2.7. Otros componentes nucleares minoritarios

Se ha descrito la presencia de glicoesfingolípidos, más específicamente de gangliósidos, asociados a la membrana nuclear de células del sistema nervioso (52) y de hígado de rata (133).

1.2.8. Ácidos grasos

En N celulares se demostró la existencia de elevados niveles de AG polinosaturados, principalmente ácido araquidónico (20:4n-6) y docosahexaenoico (22:6) (78).

Los ácidos grasos del núcleo celular provienen en primera instancia del citosol, donde se sintetizan o se captan de la dieta. Si bien en nuestro laboratorio se demostró que el ácido araquidónico, además de sintetizarse en el RE, se sintetiza en el núcleo por desaturación del ácido 20:3n-6 por la $\Delta 5$ desaturasa, en primera instancia, el ácido 20:3n-6 debe provenir del citosol (134).

Históricamente se consideraba que la función biológica de los ácidos grasos se restringía a ser nutrientes, sustratos de energía metabólica y componentes estructurales de las membranas al estar esterificados formando lípidos complejos. En la actualidad se sabe que los ácidos grasos así como también algunos productos de su metabolismo poseen *per se* propiedades fisiológicas y farmacológicas.

Los AG intervienen también en la regulación de la expresión de determinados genes del metabolismo lipídico y glucídico hepáticos (135) (136) (137), de los genes de las proteínas que unen AG (FABPs) (138) y de las proteínas transportadoras de AG (FATPs).

La regulación de la expresión genética es un evento que se desarrolla dentro del núcleo en las células eucarióticas. Los mecanismos mediante los cuales los AG regulan el inicio de la transcripción son diversos y dependen del entorno celular y del gen blanco (139). Entre estos mecanismos el más estudiado es el que implica la unión de los AG a determinados receptores hormonales nucleares denominados receptores activadores de la proliferación peroxisomal (PPARs, por sus

siglas en inglés) aunque actualmente se reconoce la existencia de otros receptores diferentes a los PPARs; los AG intervienen también en otras vías que no implican la interacción con factores de transcripción, esto sería por un efecto directo de los AG.

Los ácidos grasos son moléculas poco solubles en medios acuosos, muy reactivas y que se esterifican fácilmente a otros lípidos; su limitada hidrosolubilidad determina que los AG no esterificados se desplacen por la célula unidos a las FABPs.

El control de la expresión genética por AG, independientemente del mecanismo a través del cual se lleve a cabo -efecto directo de los AG o interacción con diferentes factores de transcripción-, implica obligatoriamente el transporte de los AG hacia el núcleo. La L-FABP constituye un candidato obvio para esta función ya que ha sido descrita en el citosol y también en el interior nuclear (140).

1.2.9. Metabolismo nuclear de los eicosanoides

Los metabolitos oxigenados del AA son los leucotrienos (LT), tromboxanos y prostaglandinas (PG), conjuntamente denominados eicosanoides. Son un grupo de potentes metabolitos lipídicos con actividad biológica que regulan procesos homeostáticos normales y promueven respuestas inflamatorias agudas (141).

El primer paso en la producción de leucotrienos implica la conversión del AA en leucotrieno A₄ (LTA₄) por acción de la enzima *5-lipoxigenasa* (5-LO), la cual se encuentra tanto en el N como en el citoplasma (142).

El LTA₄ se une al ADN y al ARN por lo que se postula que afectaría la transcripción (143). El LTA₄ es un compuesto inestable que, en el N celular, por acción de la enzima *LTA₄-hidrolasa* se convierte en LTB₄, el cual constituye un ligando del PPARα (144).

Las primeras enzimas que intervienen en las vías de síntesis de PG son las *ciclooxigenasas* (COXs). Estas enzimas metabolizan al AA en un proceso de dos etapas que comprende una reacción inicial en la que el AA se compleja con dos moléculas de O₂ para formar la PGG₂, la cual es posteriormente reducida a PGH₂ por actividad peroxidasa de COXs (145). Se determinó que COX-1 y COX-2 se localizan en la membrana nuclear y en la zona de pericromatina, respectivamente, a pesar de que todavía no se elucidó con certeza el rol intranuclear de COXs (146) (147).

Las PG y LT ejercen sus funciones mediante la unión a receptores ligados a proteína G (GPCR) y también serían ligandos de los PPARs. Por ejemplo, el LTB₄ y ciertas PG se unen a PPAR α y γ , respectivamente (144) (148).

1.3. Proteínas que unen ácidos grasos (FABPs) y proteínas que unen acil-CoAs (ACBPs)

En la regulación de la expresión genética por AG y acil-CoAs están involucrados dos grupos de proteínas: 1- proteínas intracelulares que unen y transportan AG y acil-CoAs (FABPs y ACBPs) y 2- receptores nucleares que funcionan como factores de transcripción activados por ligando.

1.3.1. Familia de las FABPs

Las FABPs constituyen una familia de proteínas citosólicas que evolucionaron a partir de una forma ancestral milenaria y que se expresan de manera específica en diferentes órganos de una gran variedad de animales. Como se dijo anteriormente, en la actualidad estas proteínas han sido descritas también en el interior del N celular.

Los miembros de esta familia de proteínas tienen un peso molecular de 14-15 kDa y entre 126 y 134 aminoácidos forman parte de su estructura primaria (149).

A pesar de que recientemente se adoptó una nomenclatura numérica, las FABPs se siguen denominando haciendo alusión al tejido en el cual se encuentran en abundancia, sin embargo, su distribución tisular no es exclusiva ya que algunos tejidos e, inclusive, tipos celulares presentan más de una clase de FABP. Es así como se reconocen diferentes tipos de FABPs, las L-FABP (hígado), I-FABP (intestino), H-FABP (corazón), A-FABP (tejido adiposo), E-FABP (epidermis), IL-FABP (ileal), B-FABP (cerebro), M-FABP (mielina) y T-FABP (testículo).

Si bien la similitud en la secuencia de aminoácidos de las diferentes isoformas de FABPs puede variar entre el 22 y el 73 %, su estructura terciaria es altamente conservada (149). El estudio de esta

familia de proteínas a nivel molecular se utiliza para realizar análisis de filogenia.

La I-FABP y L-FABP presentan una gran diversidad de ligandos hidrofóbicos como AG, acilCoAs, lisoFL, prostaglandinas, ácidos biliares, eicosanoides y ciertas drogas; es así que se considera a la L-FABP como la proteína más «promiscua» de esta familia de proteínas (150) (151) (152), además de ser la única con dos sitios de unión a ligandos (153).

En el hígado de rata se expresa únicamente la denominada isoforma hepática de esta familia de proteínas, la L-FABP (154).

1.3.1.1. Estructura de las FABPs

Análisis cristalográficos y de resonancia magnética nuclear revelan que todas las FABPs presentan una estructura terciaria similar de barril β , formado por 10 láminas β antiparalelas ($\beta A - \beta J$) (155) (156) (157) (158) (159). Esta estructura de barril delimita una cavidad interna hidrofóbica donde se une el ligando, cuya entrada esta limitada por un dominio portal con estructura de hélice-giro-hélice, la cual no es requerida para mantener la integridad de la cavidad interna pero sí para regular la entrada y salida del ligando y para la interacción con membranas durante la transferencia del mismo. El volumen de esta cavidad esta determinado por cadenas laterales de aminoácidos tanto hidrofóbicos como polares que determinan también la especificidad por el ligando, parámetro que varía entre los diferentes tipos de FABP. Las moléculas polares que forman el interior de la cavidad contribuirían a la estabilización de la estructura proteica y a la liberación del ligando.

Como se dijo anteriormente, sólo L-FABP puede unir dos ligandos, con orientaciones opuestas, sean estos AG, eicosanoides o lisoFL. La afinidad por el primer ligando es mucho mayor que la del segundo. El grupo carboxilo de uno de los dos AG interacciona con la Arg 122 quedando poco expuesto al solvente mientras que el del segundo AG

queda más expuesto al solvente en la cercanía del dominio portal con estructura hélice-giro-hélice que limita uno de los extremos del barril β . Los dos sitios de unión al ligando serían interdependientes principalmente debido a la existencia de interacciones hidrofóbicas entre las dos cadenas alifáticas de los AG (160).

Las diferencias estructurales entre las isoformas de FABPs afectan la selectividad y afinidad de ligandos así como también la interacción de las mismas con membranas y con otras proteínas.

La L- FABP representa el 5 % de las proteínas solubles citosólicas hepáticas (161).

1.3.1.2. Funciones de las FABPs

Transporte citosólico de AG

Las FABPs aumentan la solubilidad de los AG y facilitan su transporte desde la membrana plasmática hacia los sitios donde estos serán metabolizados como, por ejemplo, hacia las mitocondrias y peroxisomas donde los AG son oxidados, hacia membranas donde los AG se esterifican a FL y TAG o hacia el núcleo celular para cumplir funciones regulatorias (149). Se postula que la unión de los ligandos a FABPs incrementa la difusión intracelular de los mismos al reducir la unión de éstos a las membranas intracelulares (162).

La transferencia de AG desde las FABPs hacia membranas puede ocurrir por distintos mecanismos: mediante interacción colisional o mediante difusión (163). El mecanismo colisional involucra interacciones electrostáticas entre las membranas y la proteína transportadora mientras que el difusional implica obligatoriamente la liberación inicial del ligando en el medio acuoso.

Si bien los datos experimentales acerca del mecanismo de transferencia de AG desde la L-FABP hacia membranas son

contrastantes existe consenso sobre que este sería de tipo difusional (164) (154).

Modulación de la transducción de señales y transcripción génica

Los AG, acil-CoAs, eicosanoides y lisoFL pueden regular, directa o indirectamente, varios procesos celulares mediante la interacción con enzimas, membranas, canales iónicos, receptores o genes. Se postula que las FABPs tendrían injerencia indirecta en dichos procesos al modular la concentración disponible de estos mensajeros lipídicos y sus derivados (149).

1.3.2. Proteínas transportadoras de acil-CoAs (ACBP)

Los acil-CoA son moléculas muy versátiles que cumplen roles muy diversos en la célula, entre ellos, el de intervenir en la regulación de la expresión genética; esta regulación se puede llevar a cabo mediante la interacción de los mismos con los receptores nucleares HNF-4 α . Las funciones biológicas de los acil-CoAs dependen, en gran medida, de las ACBPs, proteínas formadoras y transportadoras de pools de acil-CoA en el medio acuoso intracelular, protegiéndolos de la hidrólisis por *tioesterasas* (165). Las ACBP son proteínas de bajo PM (10 kDa), altamente conservadas, que ligan acil-CoAs con una K_D en el rango de los nmoles (166) (167).

Al igual que las FABPs, las ACBP presentan localización nuclear, además de citosólica (165).

1.4. Factores de transcripción

La regulación de la expresión genética por AG se produce a través de cambios en la actividad o en la cantidad de, al menos, 4 familias de factores de transcripción, a saber: PPAR, receptor x hepático (LXR, por sus siglas en inglés), factor nuclear hepático 4 α (HNF-4 α , por sus siglas en inglés) y proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides (SREBP, por sus siglas en inglés) (168). Todos ellos, excepto SREBP, pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares de hormonas tiroideas y esteroideas.

El mecanismo general de acción implica la interacción de los ligandos lipídicos con los respectivos receptores nucleares produciéndose, en éstos, un cambio conformacional que facilita la interacción con el ADN, la liberación de correpresores y/o el reclutamiento de complejos coactivadores estimulando, en última instancia, la expresión de los genes blanco (169).

1.4.1. PPARs

Los PPARs conforman una importante subfamilia de la superfamilia de receptores hormonales nucleares.

La denominación "PPAR" se debe a la observación que la primera isoforma clonada de estos receptores nucleares inducía proliferación peroxisomal hepática dependiente de ligando (170).

Se caracterizaron 3 isotipos de PPARs llamados PPAR α , PPAR β y PPAR γ .

Los PPARs de mamíferos se unen al promotor de los genes cuya expresión regulan a nivel de los PPRE, o "elementos de respuesta a los PPAR", formando heterodímeros con receptores del ácido 9-*cis* retinoico (RXR) (171). Los PPARs establecen interacciones proteína-proteína con otras proteínas nucleares coactivadoras o represoras las que median el

contacto entre el heterodímero PPAR-RXR, la cromatina y la maquinaria transcripcional basal promoviendo la activación o la represión de la expresión génica, respectivamente (172).

Los PPARs presentan ligandos naturales y sintéticos. Entre los primeros se encuentran los AG de cadena media y larga en concentraciones μM , principalmente polinosaturados -linoleico, linolénico, araquidónico, eicosapentaenoico, etc- y algunos de sus metabolitos, como el LTB₄ y la PGJ₂. Entre los agonistas sintéticos más caracterizados se encuentran los proliferadores peroxisomales como Wy 14.643, compuestos hipolipidémicos como fibratos -clofibratos, bezafibratos-, drogas antiinflamatorias no esteroideas como ibuprofeno, indometacina y fenoprofeno, entre otros (173).

Los tres isotipos diferentes de PPARs, α , β (o δ) y γ presentan patrones distintivos de expresión tejido-específicos y especificidad de ligandos. Estos receptores desempeñan roles claves en el metabolismo y la homeostasis lipídica.

En humanos y en roedores los PPAR α se expresan predominantemente en el hígado y el tejido adiposo; este isotipo se expresa también en corazón, riñón, músculo esquelético, intestino páncreas, pulmón y placenta (174) (175).

Los agonistas naturales más potentes del PPAR α son AG poliinsaturados de cadena larga, como el AA y el ácido linoleico, mientras que los agonistas más débiles son los AG saturados de cadena corta (176).

PPAR α interviene en la regulación de los genes involucrados en la captación, activación y degradación de AG, mecanismos que contribuyen a la homeostasis lipídica, en procesos inflamatorios y en la aterosclerosis (171).

Los PPAR β representan la isoforma con la distribución tisular más amplia entre los PPARs; se expresan en tejidos de roedores y humanos con un activo metabolismo lipídico como adiposo, intestino delgado,

corazón y músculo esquelético donde regulan la expresión de genes implicados en la captación, activación y recambio de AG; para este isotipo se indicó también un potencial rol en procesos como proliferación y diferenciación celular (177), implantación embrionaria y mielinización (178) (179). Entre los agonistas naturales más potentes de esta isoforma se encuentra el metilpalmitato (180).

Los PPAR γ se expresan predominantemente en los adipocitos (181), donde están involucrados en la regulación de la adipogénesis y la diferenciación de los adipocitos en tejido adiposo blanco y marrón (182) (183) (184).

Los PPAR γ intervienen también en la homeostasis de la glucosa, en el control del ciclo celular, en procesos cancerosos, inflamatorios (185) (186) y en la aterosclerosis (171).

PPAR γ se diferencia de las otras dos isoformas de PPARs porque presenta un número más restringido de ligandos, principalmente AG poliinsaturados como AA y ácido linoleico, y una distribución tisular más limitada.

Para la completa comprensión de la regulación de la expresión genética mediada por los PPARs es necesario caracterizar exhaustivamente la composición y cuantificación de los pools citosólicos e intranucleares de AG así como también los mecanismos concernientes a su tráfico núcleo-citoplasmático.

1.4.2. LXR

Se determinó la existencia de dos isoformas de estos receptores nucleares denominadas LXR α y LXR β cuyos ligandos son ácidos grasos de cadena larga y oxisteroles, como el 22 R-hidroxicolesterol y el 24, 25 epoxicoolesterol (187).

Cuando el colesterol celular en el hígado se incrementa se generan oxisteroles que activan al LXR. Estos receptores regulan la

expresión de genes que intervienen en la síntesis hepática de ácidos biliares (188) mediante, al igual que los PPARs, la formación de heterodímeros con RXR. LXR también estimula la expresión de proteínas ABC que transportan colesterol hacia la bilis o hacia lipoproteínas que circulan en la sangre. Promueve además la producción de lipoproteínas y la modificación y expresión de SREBP-1c, que luego activa la transcripción de genes necesarios para la síntesis de AG (189).

1.4.3. HNF-4 α

Los ácil-CoAs de cadena larga constituyen los principales ligandos de esta clase de receptores nucleares (190). HNF-4 α también une, pero con menor afinidad, AG no esterificados, como AA (191) (192).

El tipo de ligando determina la actividad de estos receptores de manera que la unión a acil-CoAs saturados, como los tioésteres de CoA de los ácidos mirístico y palmítico, produce una estimulación de la actividad transcripcional de HNF-4 α mientras que la unión a acil-CoAs poliinsaturados, como los tioésteres de CoA de los AG 18:3, 20:5 y 22:6, tiene un efecto inhibitorio (193).

Estos factores de transcripción regulan la expresión de genes que codifican proteínas del metabolismo de las lipoproteínas hepáticas apo CII, CIII, AII y AIV (194), del metabolismo del hierro (195), del metabolismo de los carbohidratos (196) (197) y del metabolismo anabólico de los ácidos biliares (198).

Al igual que los receptores nucleares PPARs y LXR, HNF-4 α heterodimeriza con los receptores RXR para regular la expresión genética.

1.4.4. SREBP

Estos factores de transcripción regulan la expresión de genes del metabolismo lipídico mediante la unión a un corto segmento localizado en la región 5' del promotor de dichos genes, denominado elemento regulador de esteroides (SRE-1, por sus siglas en inglés) (199).

Las proteínas SREBPs se caracterizan por sintetizarse como precursores inactivos que se localizan en la membrana del RE y, para alcanzar el N celular donde actúan como factores de transcripción, deben migrar al Golgi donde son clivadas en su dominio NH₂ terminal por dos proteasas distintas, la proteasa de sitio 1 y la proteasa de sitio 2 (200) (201). La migración de las SREBPs al Golgi requiere de una proteína "escolta", la proteína activadora del clivaje de SREBPs (SCAP), que posee un dominio sensor de esteroides.

Se clonaron tres isoformas de SREBPs: SREBP-1a y 1c, derivadas de sitios de inicio de la transcripción alternativos en un mismo gen, y SREBP-2, codificada por otro gen. La proteína SREBP-1c actúa principalmente aumentando la transcripción de genes que intervienen en la síntesis de AG, TAG y PL mientras que SREBP-1a y SREBP-2 activan genes involucrados en la síntesis de colesterol (200) (201).

A diferencia de los mecanismos de acción de los tres receptores nucleares antes descritos (PPAR, LXR y HNF 4 α), la regulación de la expresión génica por AG y colesterol mediada por las proteínas SREBP no involucra cambios en la actividad de estos factores de transcripción, sino en las concentraciones nucleares de los mismos.

El tratamiento de células CHO con PUFA produce un incremento del colesterol en el RE que inhibe la maduración proteolítica de SREBP, con la consecuente disminución de su abundancia en el N celular (202).

Los PUFA disminuyen la transcripción de los genes de SREBP-1a y 1c (no así la de SREBP-2), a través de un mecanismo que involucra a LXR, regulador positivo del gen del SREBP-1 (203) (204).

SREBP-1c aumenta la transcripción de genes que codifican enzimas regulatorias de la síntesis de AG (205) de manera que la

disminución de los niveles nucleares de dicho factor de transcripción representa, probablemente, el principal mecanismo mediante el cual los PUFA suprimen la síntesis de AG.

La disminución de los niveles celulares de esteroides produce la activación proteolítica de SREBP 1a y SREBP 2 para, finalmente, estimular la expresión de genes que intervienen en la colesterologénesis y así mantener la homeostasis del colesterol (199) (206).

OBJETIVOS



El objetivo general de este trabajo es contribuir a la determinación de la constitución, la topografía, y las transformaciones de los lípidos en el núcleo celular. Es, además, determinar los mecanismos de acción en los que los lípidos están involucrados que conducen, entre otros, a la regulación de la expresión genética.

Se propusieron los siguientes objetivos específicos:

1- Determinar la constitución y la localización de los pools lipídicos nucleares de células de hígado de rata normal.

2- Determinar los posibles mecanismos por los cuales los ácidos grasos procedentes del citosol se internalizan, interaccionan y redistribuyen en los pools lipídicos del núcleo celular.

3- Determinar el rol de L-FABP en la internalización, interacción y redistribución de los AG en los pools lipídicos del núcleo celular.

Con esos objetivos se plantearon las siguientes hipótesis:

- Los pools lipídicos nucleares y endonucleares están constituidos mayoritariamente por fosfolípidos y por un alto porcentaje de AG polinosaturados.
- Los AG llegan al interior nuclear como AGL o como acil-CoAs e interaccionan con los pools lipídicos nucleares y endonucleares por un mecanismo acil-CoA dependiente.
- La L-FABP favorece de manera específica la interacción de los AG con los pools lipídicos nucleares y endonucleares.

MATERIALES



3.1. Materiales de Laboratorio, Drogas y Reactivos

Se utilizaron placas de Sílica gel para cromatografía en capa fina (TLC) de 10 x 20 cm y 20 x 20 cm, con y sin zona de concentración, de Merk (Alemania) y columnas de High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) de Alltech Associates (Deerfield, IL). Todos los solventes utilizados fueron de grado analítico y de HPLC. Los cofactores utilizados fueron adquiridos a Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO., U.S.A). Los ácidos grasos no radioactivos utilizados como estándares fueron provistos por Nu-Chek-Prep Inc. (Elysian, MN); el 1,2-Diarachidonoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine fue provisto por Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, AL., U.S.A).

Los ácidos [1-¹⁴C]esteárico (act.esp. 56 mCi/mmol), [1-¹⁴C]linoleico (act.esp. 54.7 mCi/mmol) y [1-¹⁴C]araquidónico (act.esp. 54.9 mCi/mmol) fueron provistos por New England Nuclear Corp. (Boston, MA., U.S.A). El 1-¹⁴C]araquidonil-CoA (act.esp. 51.6 mCi/mmol) fue adquirido a ARC (St. Louis, MO., U.S.A).

El plásmido pET11-a con el gen que codifica la L-FABP de rata insertado fue generosamente provisto por los Dres. Alan Kleinfeld y Ron Ogata a la Dra. Betina Córscico, quien nos suministró la L-FABP purificada a partir de un cultivo de *E. coli* que sobreexpresa esta proteína.

3.2. Animales de Laboratorio

En nuestro Instituto se posee amplia experiencia en el uso de animales de laboratorio. El protocolo de utilización de ratas se ajusta a las normas éticas vigentes de tratamiento humanitario que debe aplicarse a los animales vertebrados utilizados en investigación biomédica. Tales

cuestiones fueron supervisadas por el Comité Interno de Bienestar Animal integrado por personal de nuestro Instituto (CIBA-INIBIOLP).

Los animales fueron provistos por el Bioterio General de la Facultad de Ciencias Médicas, de la Universidad Nacional de La Plata.

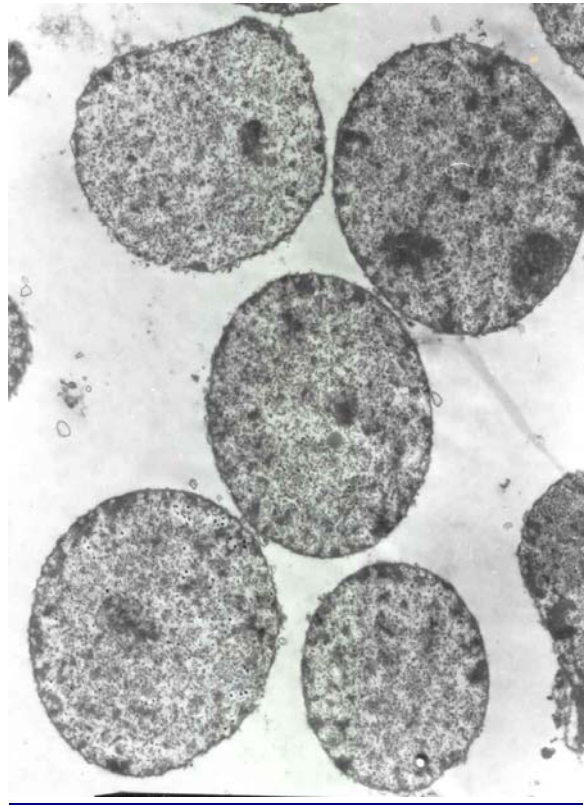
Se trabajó con ratas macho jóvenes endocriadas de la cepa Wistar de 60-70 días de edad, con un peso aproximado de 180-200 g. Se optó por trabajar con ratas macho ya que estos animales no presentan las variaciones hormonales debidas al ciclo estral que se observa en las hembras y, por lo tanto, se evita la necesidad de sincronizar los animales en una misma etapa, como debe hacerse cuando se trabaja con hembras.

Los animales estuvieron alojados en jaulas compartidas entre 4-5 ratas, en un ambiente con la temperatura controlada en $24 \pm 2^{\circ} \text{C}$ y sujetos a periodos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad, siendo la medianoche el punto medio del periodo de oscuridad.

Las ratas fueron alimentadas con una dieta comercial para roedores (Alimento para Ratas y Ratones Cargill, Pilar, Argentina). El alimento y el agua se les administró *ad libitum*. La composición de la dieta fue la siguiente: 24 % de proteínas y 8 % de lípidos totales, con una composición de ácidos grasos (peso %) de 1.7% de 14:0, 20.3% de 16:0, 1.8% de 16:1, 11.4% de 18:0, 27.5% de 18:1n-9, 2.1% de 18:1n-7, 31.4% de 18:2-6, 3.1% de 18:3n-3, 0.2% de 20:4n-6 y 0.6% de 22:6n-3.

La eutanasia de los animales se implementó mediante decapitación, procedimiento virtualmente indoloro por su rapidez, que permite obtener fluidos y tejidos anatómicamente intactos y no contaminados químicamente. Dicho procedimiento se realizó por personal experimentado del Bioterio, a las 8 a.m para evitar variaciones en los datos debidas a ritmos circadianos.

MÉTODOS



4.1. Preparación de las fracciones subcelulares de hígado de rata

4.1.1. Obtención de núcleos celulares de hígado de rata

Para obtener núcleos puros aislados de células de hígado de rata se ensayaron dos técnicas alternativas: la de Blobel y Potter (207), modificada por Kasper (208) y la de Spelsberg, Knowler y Moses (209). Se ensayaron dos técnicas diferentes con el objetivo de determinar cuál de las dos cumplía con los siguientes propósitos fundamentales: 1-mantener la integridad nuclear, 2-separar los núcleos de contaminantes citoplasmáticos, principalmente del retículo endoplásmico y 3-conseguir un alto rendimiento.

4.1.1.1. Método de Blobel y Potter, modificado por Kasper

La eutanasia de los animales se implementó mediante una rápida decapitación, a las 8 am.

Todos los pasos descriptos a continuación se llevaron a cabo a 4 °C. Se utilizaron soluciones frías y material de vidrio.

Se extrajeron los hígados y se sumergieron inmediatamente en una solución de sacarosa 0.25 M en buffer TKM [Tris-HCl 0.05 M pH: 7.5, MgCl₂ 0.005 M y KCl 0.0025 M], en adelante solución homogeneizadora. Los hígados se pesaron y se lavaron en solución homogeneizadora, luego se cortaron con tijera hasta obtener pequeños trozos y se lavaron nuevamente hasta que la solución quedó límpida. Se agregó sacarosa 0.25 M TKM (1:2, p/v) y se homogenizó en homogenizador vidrio-teflón. El homogenato resultante se filtró por 4 capas de gasa previamente separadas y embebidas en sacarosa 0.25 M TKM. Se hizo un pool con 3-6 hígados de rata.

Se cargaron tubos para un rotor SW 28 con 9 ml de homogenato y

16 ml de sacarosa 2.3 M TKM; posteriormente, los mismos se agitaron por inversión a fin de obtener una solución de sacarosa 1.6 M TKM. A cada tubo se le agregó un colchón de 4 ml de sacarosa 2.3 M TKM.

Los tubos se centrifugaron a 87300 x g durante 74 minutos, a 4 ° C. De esta manera se obtuvieron pellets blancos que corresponden a los núcleos libres de contaminación citoplasmática. El gradiente discontinuo determina que los núcleos, al atravesar la interfase y sedimentar, se separen de los demás componentes citoplasmáticos, principalmente RE, los cuales no logran atravesar la interfase debido a que por su menor densidad tienden a flotar.

Los núcleos puros se lavaron dos veces con soluciones decrecientes de sacarosa -primero con sacarosa 1.0 M TKM y, luego, con sacarosa 0.25 M TKM- y, por último, se resuspendieron en glicerol 25% Tris-HCl 0.010 M, pH: 7.9, se fraccionaron y se congelaron a -70°C hasta su posterior utilización, con una concentración final de aproximadamente 30 mg prot./ml.

4.1.1.2. Método de Spelsberg, Knowler y Moses

Los hígados, pesados y lavados, se homogeneizaron en sacarosa 0.32 M en buffer TKM (1:2 p/v) [Tris-HCl 0.05 M pH: 7.5, MgCl₂ 0.005 M y KCl 0.0025 M]. El homogenato resultante se filtró por 4 capas de gasa. Se hizo un pool con 3-6 hígados de rata. Se centrifugó a 600 x g durante 10 min. El pellet resultante se resuspendió en 20 ml de sacarosa 2.0 M TKM, se filtró por gasa y se centrifugó a 205028 x g durante 39 min en un rotor 70 Ti. El pellet resultante se resuspendió en 15 ml de sacarosa 1.7 M TKM, se colocó en un tubo de Sorvall sobre 15 ml de sacarosa 1.8 M TKM y se centrifugó a 15000 x g durante 20 min. El pellet resultante se lavó dos veces con soluciones decrecientes de sacarosa (1.0 M TKM y 0.25 M TKM), se agitó con vórtex y se centrifugó a 2000 x g durante 10 min. El pellet final se resuspendió en glicerol 25 % Tris-HCl pH: 7.9, se fraccionó y

se congeló a -70 °C hasta su posterior utilización, con una concentración final de aproximadamente 30 mg prot./ml.

La pureza e integridad de los núcleos obtenidos con ambas técnicas se verificó por microscopía electrónica y medición de enzimas marcadoras.

4.1.2 Obtención de matriz nuclear de células de hígado de rata

La fracción correspondiente a núcleos sin membrana se obtuvo siguiendo la técnica de Vann y colaboradores (210), ligeramente adaptada. Se incubaron núcleos enteros de células de hígado de rata en presencia de un detergente no iónico, Tritón X-100, a fin de solubilizar la doble membrana nuclear. Luego de dicha incubación se procedió a la separación de las matrices y la membrana nuclear como se detalla a continuación: se mezcló una alícuota de 0.5 ml de núcleos (8 mg proteína/ml) en solución A [Tris-HCl 0.01 M pH 7.5; MgCl₂ 0.002 M; sacarosa 0.25 M] con 20 ml de solución de resuspensión [Tris-HCl 0.005 M pH: 7.4, MgCl₂ 0.005 M, KCl 0.0015 M, sacarosa 0.29 M, EGTA 0.001 M]. Dicha mezcla se incubó en hielo, sin agitación, durante 20 min. El detergente TX-100 se agregó a la solución de resuspensión, antes del agregado de los núcleos, en una concentración final de 0.04 o 0.08 % (p/v). Los núcleos sin membrana se separaron del sobrenadante centrifugando a 165 x g durante 6 min, a 4 °C; luego se les agregó 5 ml de Sol. A y se resuspendieron cuidadosamente. Una vez resuspendidos se les agregó un colchón de 10 ml de sacarosa 0.5 M [Tris-HCl 0.01 M pH 7.5, MgCl₂ 0.002 M] y se centrifugó a 165 x g durante 6 min, a 4 °C. Este procedimiento se repitió una vez más. El pellet resultante, correspondiente a los núcleos sin la doble membrana -de ahora en más

Matriz nuclear: Mx-, se resuspendió en 0.5 ml de Sol. A. En los casos en que los núcleos sin membrana no fueron inmediatamente utilizados se procedió al agregado de glicerol 25% (Tris-HCL 0.01 M pH 7.9) para su conservación a -70°C hasta su posterior utilización, a razón de 10-20 mg prot./ml.

La pureza e integridad de la fracción correspondiente a la Mx, obtenida como se detallara anteriormente, se chequeó por microscopía electrónica.

4.1.3. Obtención de las demás fracciones subcelulares de hígado de rata

4.1.3.1. La **fracción microsomal** hepática se aisló por centrifugación a 10000 x g durante 20 min del homogenato correspondiente obtenido utilizando una relación 1:3 (p/v). El sobrenadante resultante se filtró a través de gasa, luego se centrifugó a 100000 x g durante 60 min. El pellet rosado obtenido corresponde a la fracción Microsomal (retículo endoplásmico). Dicha fracción se resuspendió en la misma solución homogeneizadora y se congeló a -70° C hasta su posterior utilización, a razón de 35-45 mg prot./ml.

4.1.3.2. La **fracción citosólica** se obtuvo centrifugando 3 veces el sobrenadante pos-microsomal a 100000 x g durante 60 min. Se congeló a -70° C hasta su posterior utilización, a razón de 18 mg prot./ml.

4.1.3.3. La **fracción mitocondrial** se preparó siguiendo el método de Hogeboom y colaboradores (211). Los hígados se homogeneizaron en sacarosa 0.25 M en buffer fosfato de potasio 0.01 M pH 7.4, (9:1, p/v). Se centrifugaron 10 ml de homogenato con 10 ml de sacarosa 0.34 M a 700 x g durante 10 min; el pellet, formado por núcleos, glóbulos rojos, tejido conectivo y células intactas se descartó y el sobrenadante se centrifugó

a 5000 x g durante 10 min. El pellet resultante, amarronado y con forma de corazón, corresponde a la fracción mitocondrial. El mismo se resuspendió en sacarosa 0.25 M y se centrifugó a 24000 x g durante 10 min. Esta etapa se repitió dos veces más y la fracción mitocondrial obtenida finalmente se resuspendió en sacarosa 0.25 M y se congeló a -70° C hasta su posterior utilización, a razón de 30-35 mg prot./ml.

4.2. Determinación de proteínas

El contenido de proteínas de las fracciones subcelulares antes mencionadas se determinó utilizando el método de Lowry y colaboradores (212). Para ello, alícuotas de diferentes volúmenes, según la fracción subcelular de que se trate, fueron llevadas a una determinada dilución y se les agregó 1 ml de una solución formada por CO_3Na_2 2 % en NaOH 0.1 M, tartrato de Na y K 2 % en H_2O y SO_4Cu 1 % en H_2O (100:1:1, v/v/v). Este primer paso implica la formación de un complejo cobre-proteína en una disolución alcalina. Transcurridos 10 min, se agregaron 200 μl de reactivo de Folin. El complejo cobre-proteína redujo este reactivo fosfomolibdico-fosfowolfrámico desarrollando un color azul intenso. Después de 30 min la reacción colorimétrica se cuantificó en un espectrofotómetro, a una longitud de onda de 750 nm. La calibración del método colorimétrico se realizó utilizando albúmina sérica bovina cristalizada como estándar.

4.3. Análisis lipídico

4.3.1. Extracción y cuantificación de lípidos totales

Los lípidos totales (LT) de las distintas fracciones subcelulares se extrajeron por el procedimiento de Folch y colaboradores (213). La muestra se homogeneizó en un homogeneizador vidrio-teflón con

cloroformo: metanol (2:1, v/v) en una relación de una parte de muestra a veinte partes de mezcla extractiva. La mezcla resultante se filtró por papel de filtro. Luego se agregó al filtrado un 20 % de su volumen de agua, se agitó y se dejó toda la noche a 4 °C para permitir la separación de dos fases: una superior metanólica acuosa y una inferior, clorofórmica. La fase superior se separó por sifonación y la inferior, con el extracto lipídico, se llevó a seco mediante corriente de N₂. Dicho extracto se conservó en un pequeño volumen de éter de petróleo a -20 °C en atmósfera de N₂ para su posterior análisis.

La cuantificación de los lípidos fue determinada gravimétricamente, tomando una pequeña fracción del extracto clorofórmico total y evaporando el solvente con nitrógeno hasta peso constante.

4.3.2. Separación, identificación y cuantificación de las clases lipídicas y fosfolipídicas individuales

Las distintas clases de lípidos se separaron mediante la utilización de diferentes técnicas cromatográficas, eligiéndose la más adecuada para cada caso en particular.

4.3.2.1. Separación de lípidos neutros

Las diferentes clases de lípidos neutros se separaron por cromatografía en capa fina (TLC), utilizando placas de vidrio de 20 x 20 cm y silicagel G como fase estacionaria. Las placas se activaron previamente durante 1 hora a 120 °C. Se utilizó como fase móvil la siguiente mezcla de solventes: hexano: éter etílico: AcH (80:20:1, v/v/v)

(214). Las cubas de desarrollo se saturaron con la mezcla de solventes. Los lípidos se sembraron en forma puntual. El tiempo de desarrollo de la corrida cromatográfica fue de 60 min. Una vez completado el desarrollo de la cromatografía los solventes de corrida se evaporaron bajo corriente de N₂. Utilizando esta metodología se separaron las diferentes clases de lípidos de la siguiente manera: la fracción correspondiente a FL quedó en el punto de siembra, mientras que los lípidos neutros corrieron en mayor o menor medida con la fase móvil según su polaridad, a saber: MAG, 1,2 y 1,3-DAG, col, AGL, TAG y EC.

El revelado de las manchas se realizó con vapores de yodo en una cuba dispuesta a tal efecto, que contenía yodo bisublimado, en la cual se colocó la placa desarrollada y seca. El yodo es un reactivo inespecífico; las zonas en las cuales existían lípidos se tiñeron de color pardo, que se distinguió del fondo claro de la placa. Este procedimiento no permite la identificación exacta de los distintos lípidos pero sí permite comparar los R_f con los estándares que se siembran en forma simultánea en la misma placa.

4.3.2.2. Análisis de AG

La composición de AG se determinó por cromatografía gas-líquido (GLC) de los respectivos ésteres metílicos.

Si bien los AG pueden separarse como tales por GLC, las mejores separaciones se obtienen con ácidos grasos de cadena corta. En una muestra biológica se encuentran habitualmente no sólo AG de cadena corta, sino también de cadena media y larga, saturados y no saturados. Es así que se hace necesario transformar a los mismos en sus ésteres metílicos. Estos son más volátiles, debido a una reducción en su polaridad al formarse el éster y relativamente más estables que los ácidos grasos libres.

4.3.2.2.1. Obtención de esteres metílicos

La obtención de los AG totales requiere la saponificación previa de las muestras tratándolas con álcali para hidrolizar los AG de los ésteres de colesterol, acilglicéridos y fosfoglicéridos y convertirlos en jabones insolubles en solventes orgánicos poco polares, utilizados para la extracción de lípidos.

Para ello se tomaron alícuotas de cada uno de los distintos materiales biológicos, se les agregó una solución de KOH al 10 % (p/v) en etanol absoluto (libre de carbonatos) en una proporción de 8 ml por g de lípido, se gasearon con N₂ para evitar oxidaciones y se calentaron en tubos tapados a 80 °C durante 45 min. (215). Los lípidos insaponificables se extrajeron por agitación de la fase alcohólica con 2 ml de éter de petróleo, repitiendo esta operación tres veces. Completada la extracción de lípidos insaponificables se acidificó el medio con HCL pro-análisis para desplazar el equilibrio hacia la formación de AG, los cuales fueron extraídos por agitación de la fase alcohólica con 2 ml de éter de petróleo tres veces. Estos extractivos fueron almacenados en tubos cónicos bajo atmósfera de N₂, en la oscuridad y a -20 °C, hasta el momento de su análisis.

Los AG libres provenientes de la saponificación de los LT fueron metilados de acuerdo a la metodología desarrollada por Morrison y Smith (216).

La muestra a esterificar se cargó en tubos de vidrio con tapa esmerilada a los que se les agregó 2 ml de trifluoruro de boro en metanol al 10 %. Los tubos se gasearon con N₂, se taparon y se colocaron a 64°C durante 1-3 h. Una vez transcurrido el tiempo y cuando los tubos estuvieron fríos, se agregó a cada uno 3 ml de cloroformo y se agitó, luego se agregaron 2 ml de agua y se volvió a agitar. Se aceleró la separación de las fases centrifugando. La fase

superior acuosa se descartó por sifonación y la inferior clorofórmica se lavó dos veces con agua destilada, utilizando 2 ml por vez.

Por último, el extracto clorofórmico se evaporó a sequedad bajo N₂ y los ésteres metílicos de ácidos grasos (EMAG) se volvieron a resuspender con n-hexano. Así se conservaron a -20 °C, bajo atmósfera de N₂, hasta el momento de ser utilizados.

4.3.2.2.2. Identificación de AG por GLC

Los EMAG fueron analizados en un cromatógrafo gas-líquido Hewlett Packard modelo 6890 con detector de ionización de llama, sobre una columna capilar DB-23 (J y W Scientific) de 30 m de largo.

El método de identificación de los EMAG se basó en el tiempo de retención relativo, que es característico de cada éster metílico, dependiente de la columna utilizada, de la fase móvil y de la temperatura, e independiente de otras condiciones experimentales. Los picos fueron identificados comparando sus tiempos de retención con los de una mezcla de estándares de EMAG conocidos.

4.3.2.3. Separación de lípidos polares

4.3.2.3.1. TLC

Las diferentes clases de lípidos polares se separaron por TLC, utilizando placas de vidrio de 20 x 20 cm con banda de concentración y silicagel G como fase estacionaria. Las placas se activaron previamente durante 1 hora a 120 °C. Se utilizó como fase móvil la siguiente mezcla de solventes: cloroformo: metanol: AcH: agua (50:37,5:3,5:2, v/v/v/v) (217). Las cubas de desarrollo se saturaron previamente con las mezclas de solventes de la fase móvil. La cromatografía se desarrolló durante 1 h 40

min. Una vez completado el desarrollo de la cromatografía las placas se secaron bajo corriente de N₂. De esta manera se procedió a la separación de los FL en el siguiente orden desde el punto de siembra: lisoFC, SM, FC, FS, FI y FE.

El revelado de las manchas se realizó por impregnación con vapores de yodo.

4.3.2.3.2. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

En determinadas ocasiones (ver ítem 4.3.2.4.) fue necesario aislar la FC por HPLC. Se utilizó un equipo Merck-Hitachi L-6200 pump (Daarmstadt, Alemania) y una columna de Econosil Silica de 250 x 4.6 mm, 10 µm. Como fase móvil se utilizó un gradiente con las siguientes mezclas de solventes I: hexano: isopropanol: diclorometano (40:48:12, v/v/v) y mezcla de solventes II: hexano: isopropanol: diclorometano: agua (40:42:8:8, v/v/v/v). Se pasó de la mezcla I a la II en 15 min, seguido por 15 min con la mezcla de solventes II (218). La FC se colectó manualmente del efluente de la columna mediante un splitt localizado entre la salida de la columna y la entrada al detector. La detección se realizó con un Detector Evaporativo de Dispersión de la Luz (Evaporative Light-Scattering Detector, ELSD) provisto por Alltech Associates (Deerfield, IL).

El principio de detección del ELSD implica la nebulización del efluente de la columna de HPLC y la evaporación del solvente quedando el soluto como una nube de "gotitas" que se detectan por la luz dispersada al ser iluminadas con un láser.

4.3.2.4. Separación de las Especies Moleculares de FC

La FC aislada por HPLC de la forma previamente descrita (ítem

4.3.2.4.2.) se resolvió en las respectivas especies moleculares (EM) por FR-HPLC utilizando dos columnas conectadas en serie de fase reversa RP18 Lichro Cart de 250 x 4 mm, 5 μ , en corrida isocrática. Se utilizó como fase móvil la siguiente mezcla de solventes: trietilamina: acetonitrilo: metanol (2:40:58) (219). La mayor parte del eluido de la columna (90 %) se colectó cada 30 seg utilizando un colector de fracciones LKB 2212 Helirac (Bomma, Sweden). El 10 % restante del eluido de la columna se analizó en un detector ELSD.

Cuando la detección de las EM de FC separadas por FR-HPLC se realiza con un ELSD la FC aislada no debe provenir de una TLC ya que la FC separada por TLC retiene sílica de la placa, lo que determina una línea de base con demasiado ruido, imposible de eliminar.

4.3.2.5. Identificación de las EM de FC

Las EM de FC se identificaron determinando la composición de ácidos grasos de cada pico del cromatograma de RF-HPLC-ELSD por GLC y por comparación con datos bibliográficos (220). Cada EM de FC se aisló juntando los tubos del colector de fracciones que correspondían al eluido de un pico en particular según el cromatograma obtenido con el ELSD.

4.3.2.6. Cuantificación de las Clases Fosfolipídicas Individuales

Los fosfolípidos se cuantificaron midiendo el contenido de fósforo en la muestra mediante el método de Chen y colaboradores (221). Este procedimiento para la determinación de fósforo es una modificación del de Fiske y Subbarow (222). La cuantificación de cada clase fosfolipídica se realizó previa separación de las mismas por cromatografía en capa fina. La zona correspondiente a cada especie fosfolipídica fue raspada y recogida en tubos de mineralización. Las

muestras se mineralizaron con ácido perclórico a 160 °C hasta cenizas blancas. El fósforo inorgánico (Pi) liberado por este procedimiento se cuantificó utilizando el reactivo de Fiske y Subbarrow. Después de la mineralización, las muestras se diluyeron con agua y la reacción colorimétrica se desarrolló a 100 °C durante 15 min, en presencia de molibdato de amonio y reactivo de Fiske. El color azul resultante se leyó contra un blanco de silica gel preparado en las mismas condiciones que las muestras a una longitud de onda de 820 nm. La calibración del método colorimétrico se realizó utilizando una solución de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ como estándar.

4.4. Incorporación de ácidos grasos saturados y nosaturados en los lípidos nucleares de células de hígado de rata

4.4.1. Condiciones de incubación

Las reacciones de incorporación se iniciaron con la adición de núcleos celulares (6 mg de proteína nuclear) a tubos de ensayo que contenían, salvo otra indicación, 68 µg de proteínas citosólicas, ácido $[1-^{14}\text{C}]$ graso 2 µM (18:0, 18:2 n-6 o 20:4n-6), NaF 0.417 M, buffer fosfato de potasio 0.42 M pH 7.4, KCl 0.15 M, sacarosa 0.25 M, MgCl_2 0.005 M y *N*-acetilcisteína 0.0016 M, con un pH final de 7.4, CoA (sal sódica) 60 µM y ATP 1.3 mM en un volumen final de 1.6 ml. Cuando se estudió la incorporación de $[1-^{14}\text{C}]20:4\text{n-6-CoA}$ se utilizaron estas mismas condiciones experimentales pero se omitió el agregado de ATP y CoA al

medio de incubación. Las incubaciones se realizaron con los tubos abiertos, a 36 °C, con agitación constante. Transcurrido el tiempo de incubación los núcleos (N) se separaron del medio de incubación (MI) mediante centrifugación a 2000 x g, a 4 °C, durante 10 min.

4.4.2. Cuantificación de la radioactividad incorporada en cada clase lipídica

Los lípidos correspondientes a la fracción nuclear (N) y al medio de incubación (MI) se extrajeron por el procedimiento de Folch y col. (213) y la radioactividad correspondiente a las fases clorofórmica (c) y metanólica-acuosa (a) se cuantificó por centelleo líquido.

La cuantificación de la radiactividad se efectuó en viales de plástico, conteniendo 3 ml de líquido de centelleo. Se utilizó líquido de centelleo comercial. Cada vial se contó durante 1 min en un contador de centelleo líquido Wallac 1214 RackBeta (Pharmacia, Turku, Finland).

Los lípidos totales se recuperaron del correspondiente extracto clorofórmico (Nc y Mlc) y se separaron en las diferentes clases lipídicas por TLC, como ya se describiera.

La radioactividad incorporada en cada fracción se determinó por escaneo radiocromatográfico en un Dunnschicht Scanner LB 2723 Berthold.

4.4.3. Incorporación de [1-¹⁴C]20:4n-6-CoA en las especies moleculares de FC de núcleos celulares de hígado de rata

Los experimentos de incorporación se realizaron como se detallara anteriormente en el ítem 4.4.1. Los lípidos correspondientes a la fracción nuclear (N) y al medio de incubación (MI) se extrajeron por el procedimiento de Folch y col. (213) y la radioactividad correspondiente

a las fases clorofórmica (c) y metanólica-acuosa (a) se cuantificó por centelleo líquido, como ya se describiera.

Las EM de FC marcadas radiactivamente se resolvieron por FR-HPLC-ELSD como se detallara anteriormente, el efluente de la columna se colectó cada 30 seg y se juntaron los tubos correspondientes a cada EM de FC. La radioactividad incorporada en cada EM de FC se determinó mediante la utilización de un contador de centelleo líquido, como se detallara anteriormente.

4.5. Remodelado de AG en los Lípidos Nucleares de células hepáticas

4.5.1. Condiciones de Incubación

Con el fin de determinar si en el N celular aislado de hígado de rata se llevan a cabo los procesos de remodelado de AG se procedió como se indica a continuación:

En una primera etapa las EM de FC nuclear que poseen AA se marcaron radiactivamente como se indicara anteriormente (ítem 4.4.3).

En una segunda etapa los núcleos marcados radiactivamente se reincubaron bajo diferentes condiciones experimentales: 1) en presencia de medio de incubación frío (sin [1-¹⁴C]20:4n-6-CoA), durante diferentes tiempos, con o sin el agregado de ATP 1.3 mM y CoA (sal sódica) 60 µM; 2) en presencia de medio de incubación frío, durante 80 min con 4.5 o 14.5 mg de proteína citosólica, con o sin el agregado de ATP 1.3 mM y CoA (sal sódica) 60 µM.

En todos los casos, al finalizar la incubación, los N se separaron del MI mediante centrifugación en las condiciones descriptas anteriormente y los lípidos nucleares se extrajeron inmediatamente por el Método de Folch y col. (213). La radioactividad correspondiente a las fases

clorofórmica (c) y metanólica-acuosa (a) se cuantificó por centelleo líquido, como ya se describió.

4.5.2. Análisis lipídico y cuantificación de la radioactividad incorporada en cada clase lipídica

Los lípidos totales se recuperaron del extracto clorofórmico y se separaron en las diferentes clases lipídicas por TLC como se describió previamente (217). La radioactividad incorporada se cuantificó por escaneo radiocromatográfico como ya se indicara.

4.5.3. Remodelado de AG en las EM de FC

La radioactividad incorporada en las EM de FC en cada una de las condiciones experimentales descritas se analizó como se detallara en el ítem 4.4.3.

4.6. Rol de L-FABP en la Incorporación de ácidos grasos saturados y nosaturados en los lípidos nucleares y endonucleares de células de hígado de rata

4.6.1. Condiciones de Incubación

Las reacciones de incorporación se iniciaron con la adición de núcleos celulares o matrices nucleares (6 mg de proteína nuclear o endonuclear respectivamente) a tubos de ensayo que contenían, salvo otra indicación, ácido [1-¹⁴C]graso 2 μ M (18:0 o 20:4n-6) libre o ligado a L-FABP 2 μ M, buffer fosfato de potasio 0.042 M pH 7.4, KCl 0.015 M, sacarosa 0.25 M, MgCl₂ 0.005 M y *N-acetilcisteína* 0.0016 M, con un pH final de 7.4, CoA (sal sódica) 60 μ M y ATP 1.3 mM en un volumen final de 1.6 ml.

Las concentraciones de AG libre y ligado a L-FABP se eligieron con el objetivo de trabajar en condiciones en las que el sitio de unión de alta afinidad de la L-FABP estuviera saturado. Para dicho sitio se tuvo en cuenta que las K_D para los ácidos 18:0 y 20:4n-6 son de 9 (223) y 110 μM (224), respectivamente. Por lo tanto, al incubar 2 μM de ambos AG con 2 μM de L-FABP, todo el AG estará ligado a L-FABP. Para proceder al ligado AG-FABP se incubaron los sustratos con L-FABP en buffer fosfato a 25 °C durante 1 min.

El análisis lipídico y la incorporación de los AG marcados radiactivamente en las diferentes clases de lípidos neutros y polares de núcleos y Mx incubados en las condiciones experimentales elegidas se realizaron como se detallara en el ítem 4.4.2.

4.7. Tratamiento Estadístico de los Resultados

Los resultados experimentales se expresaron como el promedio de, según el caso, 3 a 10 determinaciones $\pm$ el error estándar.

Las hipótesis estadísticas se ensayaron mediante el test t de Student. Aquellas diferencias de medias en las cuales el estadístico t quedó comprendido en el intervalo de confianza impuesto por un valor de $\alpha = 0.001$ se consideraron altamente significativas (*); para $\alpha = 0.01$ significativas (**); para $\alpha = 0.05$ poco significativas (***) y para valores de $\alpha > 0.05$ no significativas.

RESULTADOS



5.1. Obtención de núcleos celulares y matrices nucleares de hígado de rata. Elección de la técnica

5.1.1. Obtención de núcleos celulares de hígado de rata

Se ensayaron dos técnicas diferentes para la obtención de los N celulares a fin de seleccionar la más rigurosa. En ambos casos se partió del homogenato total de hígado, el que se sometió a centrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa. La presencia de un gradiente discontinuo permite la separación del RE y demás contaminantes citosólicos debido a que éstos tienden a flotar mientras que los núcleos, más densos, atraviesan la interfase y sedimentan. Una vez optimizadas ambas técnicas se estudió la pureza e integridad estructural de los núcleos por microscopía electrónica y enzimas marcadoras.

5.1.1.1. Técnica de Blobel y Potter, modificada por Kasper

La Figura 5.1 corresponde a microfotografías electrónicas en la que se observan núcleos de células de hígado de rata obtenidos por la técnica de Blobel y Potter, modificada por Kasper.

En la Figura 5.1. se observa que los núcleos están enteros, redondeados y con todos los componentes estructurales que los caracterizan como la doble membrana nuclear (MN), las zonas de hetero y eucromatina (C) y el nucléolo (Nu). En las microfotografías B y C se observan ribosomas asociados a la MNE, la MNI y el espacio intermembrana. No se observan contaminantes citoplasmáticos como mitocondrias, retículo endoplásmico, restos de membranas o citosol.

Para descartar con mayor seguridad una posible contaminación (con RE, citosol, lisosomas y mitocondrias) de los N celulares obtenidos con la técnica descrita se midieron las siguientes enzimas marcadoras:

arilesterasa -marcadora de retículo endoplásmico-, lactato deshidrogenasa -citosólica-, ácido fosfatasa -lisosomal- y succinato deshidrogenada -mitocondrial-. Cada ensayo se realizó por duplicado y en condiciones de linealidad entre la formación de producto y los factores tiempo y concentración de proteína.

Los niveles de actividad de las enzimas marcadoras ensayadas en el N celular fueron insignificantes (134).

En conclusión, con los ensayos morfológicos y bioquímicos realizados se corroboró la pureza e integridad de la fracción nuclear aislada en las condiciones experimentales descritas.

5.1.1.2. Técnica de Spelsberg, Knowler y Moses

La Figura 5.2 corresponde a una microfotografía electrónica de núcleos celulares de hígado de rata obtenidos por la técnica de Spelsberg, Knowler y Moses.

En la Figura 5.2 se observa una muy elevada contaminación citoplasmática que incluye mitocondrias, retículo endoplásmico, aparato de Golgi y demás componentes citoplasmáticos.

A partir de los resultados presentados se optó por la técnica de Kasper para el aislamiento de los núcleos celulares y se descartó la de Spelsberg y col.

5.1.2. Obtención de matrices nucleares de hígado de rata

Para la obtención de las Mx se eligió la técnica de Vann y colaboradores, ya que es específica para obtener Mx de N de células de hígado de rata (210).

Las Mx se obtuvieron incubando núcleos aislados de células hepáticas con el detergente no iónico Tritón X-100, utilizando dos concentraciones, 0.04 y 0.08 % (p/v) y centrifugando posteriormente en gradiente de sacarosa. La integridad de las mismas fue chequeada por microscopía electrónica.

En las Figura 5.3 se observan microfotografías electrónicas de las Mx obtenidas utilizando 0.04 % (p/v) de TX-100 mientras que la Figura 5.4 corresponde a las Mx obtenidas con la mayor concentración de TX-100 ensayada, 0.08 % (p/v).

En estas Figuras se observa que las Mx conservan su integridad estructural puesto que se observan como estructuras redondeadas, no colapsadas ni deformadas; se observa también que el tratamiento con el detergente no iónico TX-100, a partir de una concentración de 0.04 % (p/v), remueve completamente las dos membranas nucleares mientras que se conservan la lámina y el complejo del poro nuclear, el nucléolo y las zonas de hetero y eucromatina. Estos resultados concuerdan con lo observado por Vann y colaboradores al utilizar las mismas concentraciones de TX-100.

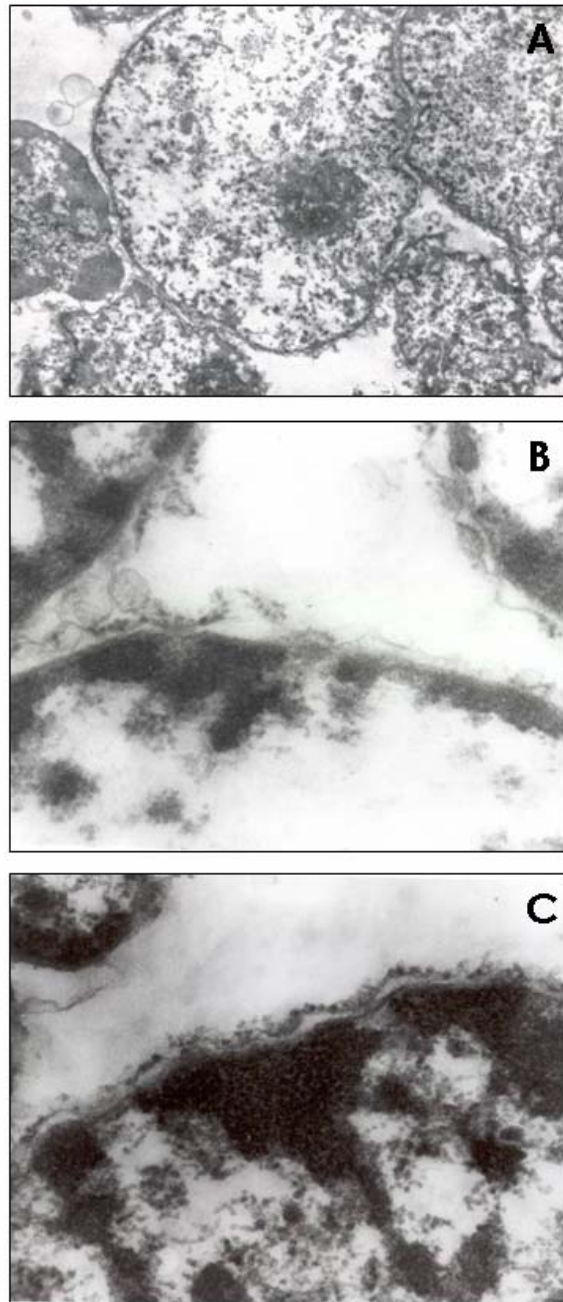


Fig. 5.1. Microfotografías electrónicas de N celulares de hígado de rata. Los N celulares se obtuvieron según la Técnica de Blobel y Potter, como se describió en Métodos. A: vista general x 5K. B: detalle x 50K. C: detalle x 350K.

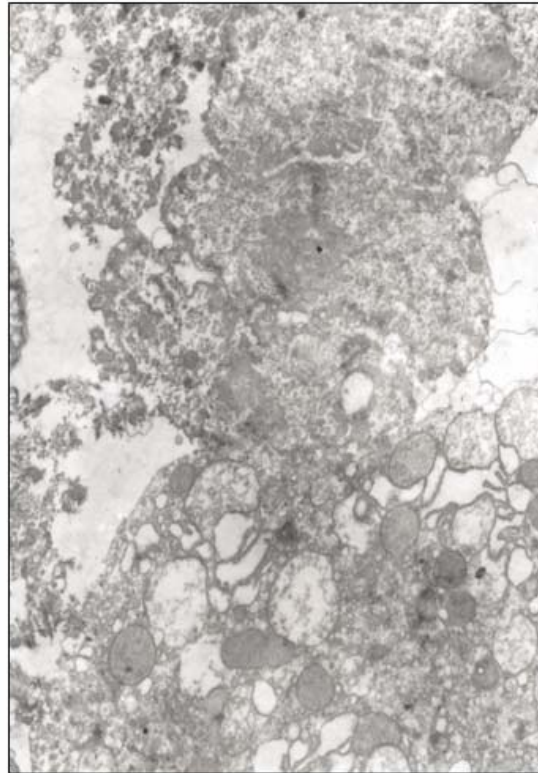


Fig. 5.2. Microfotografía electrónica de N celulares de hígado de rata. Los N celulares se obtuvieron según la Técnica de Spelsberg, Knowler y Moses, como se describió en Métodos.

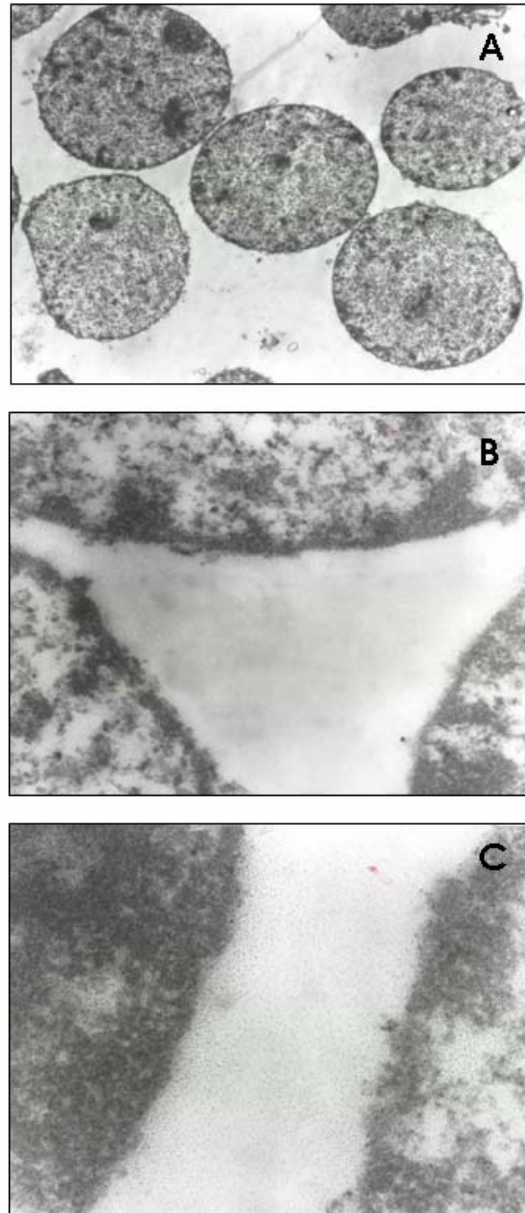


Fig. 5.3. Microfotografías electrónicas de matrices nucleares de hígado de rata. Las Mx se obtuvieron con TX-100 0.04 % (p/v) como se describió en *Métodos*. A: vista general x 4000. B: detalle x 30K. C: detalle x 60K.

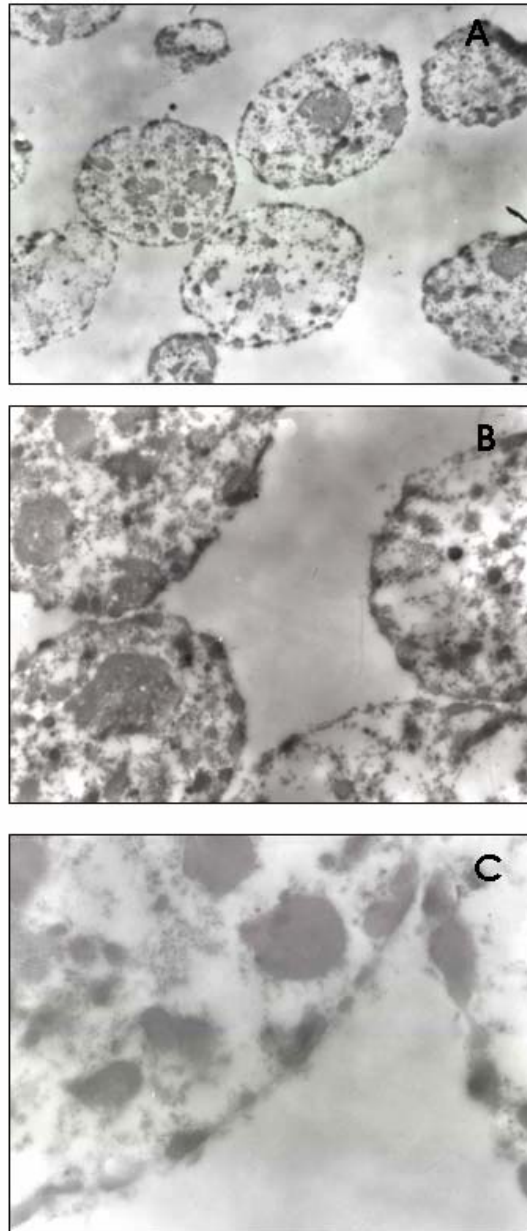


Fig. 5.4. Microfotografías electrónicas de matrices nucleares de hígado de rata. Las Mx se obtuvieron con TX-100 0.08 % /p/v) como se describió en *Métodos*. A: vista general x 4000. B: detalle x 8000. C: detalle x 25K.

5.2. Composición lipídica de núcleos celulares y matrices nucleares de células de hígado de rata

5.2.1. Composición fosfolipídica y proteica de N y Mx de células de hígado de rata

Con el objetivo de estudiar la composición de los lípidos que se encuentran en el interior del N celular se obtuvieron las Mx eliminando la doble membrana nuclear con el detergente TX-100, como se detalla en *Métodos*.

La Tabla 5.1 muestra el contenido de fosfolípidos (FL) y de proteínas así como la proporción relativa de cada especie fosfolipídica en N enteros y Mx aislados de células de hígado de rata.

Tabla 5.1. Composición fosfolipídica y proteica de N y Mx de células de hígado de rata.

Fracción nuclear TX-100 (% p/v)	Núcleo entero		Mx			
	0		0.04		0.08	
		<i>Recuperación (%)</i>		<i>Recuperación (%)</i>		<i>Recuperación (%)</i>
Proteínas (mg/g org.)	1.9 ± 0.14	100	0.5 ± 0.0 *	26.3	0.5 ± 0.1 *	25.8
FL (nmol/mg prot.)	39.2 ± 0.1	100	8.9 ± 0.7 *	22.6	8.5 ± 0.0 *	22.6
Fosfolípidos (%)						
FC	64.8 ± 6.1	100	70.4 ± 6.2	24	42.9 ± 2.2 ***	14
FE	22.0 ± 2.9	100	15.6 ± 1.2	16	20.3 ± 1.6	20
FI	9.5 ± 1.3	100	11.0 ± 1.3	27	8.9 ± 0.6	19
FS	1.7 ± 0.9	100	1.6 ± 0.7	19	7.9 ± 0.1 *	94
SM	2.0 ± 0.2	100	tr	-	9.3 ± 0.1 *	105
LisoFC	tr	100	1.4 ± 0.6	-	10.7 ± 1.1 *	-

Las proteínas y los FL se cuantificaron como se describió en *Métodos*. El término *Recuperación* corresponde al % de proteínas y FL presentes la Mx respecto de los N enteros. Los datos se expresaron como la media ± el ES de $n=10$ determinaciones independientes para los N y las Mx obtenidas con TX-100 0.04 % (p/v) y $n=5$ para las Mx obtenidas con TX-100 0.08 % (p/v). *tr*:

cantidades traza no detectables por el método utilizado. Diferencias significativas respecto de los N enteros: *P < 0.001; y ***P < 0.05.

Las Mx obtenidas con ambas concentraciones de TX-100 retuvieron el 26 y 22 % de proteínas y FL nucleares, respectivamente.

En la Tabla 5.1 se observa que en el núcleo la FC es el constituyente fosfolipídico mayoritario representando el 64.8 % de los FL, seguido por la FE que representa el 22.0 % del total. El FI representa un componente intermedio siendo el 9.5 % de los FL, mientras que la FS y la SM son constituyentes minoritarios representando el 1.7 y 2.0 % del total.

Las Mx obtenidas con TX-100 0.04 % (p/v) presentan un perfil fosfolipídico similar al de los núcleos, siendo la FC el constituyente mayoritario (70.4 %) seguido de FE (15.6%) y FI (11.0 %), mientras que FS y lisoFC son componentes minoritarios representando el 1.6 % y 1.4 % del total respectivamente. Con el método utilizado se determinaron cantidades traza de SM. La recuperación de cada una de las clases fosfolipídicas en particular fue similar a la de los FL (cercana al 21%).

En las Mx obtenidas con TX-100 0.08 % (p/v) se observó una notoria modificación del perfil fosfolipídico, respecto al de los N enteros, caracterizada por una disminución en el contenido de FC y un incremento de FS y de SM. El aumento en la concentración de detergente utilizado determinó una pequeña hidrólisis de FC y que la Mx retenga prácticamente toda la FS y la SM nuclear, como lo evidencian los altísimos porcentajes de recuperación de estos fosfolípidos que son del 100 y 94 % respectivamente, mientras que la recuperación de los FL fue del 22.6 % .

5.2.2. Composición de AG de lípidos totales y de FC

En los resultados presentados anteriormente se observa que la FC es el FL mayoritario en N enteros y en Mx de células de hígado de rata. A partir de estos resultados se decidió continuar con el estudio de la

composición de AG de los lípidos totales (LT) y la FC de los N y las Mx de células de hígado de rata.

5.2.2.1. Composición de AG de lípidos totales y de FC de N y Mx de células de hígado de rata

La Tabla 5.2 muestra la composición de AG de los LT y de la FC de N y Mx, aislados de células de hígado de rata.

Tabla 5.2. Composición de AG de LT y de FC de núcleos y Mx.

Fracción nuclear TX-100(% _{p/v})	Núcleos		Mx			
	0		0.04		0.08	
	LT	FC	LT	FC	LT	FC
12:0	0.6±0.1	0.1±0.0	0.8±0.1	<i>tr</i>	0.1±0.0**	<i>tr</i>
14:0	0.9±0.3	0.2±0.0	0.6±0.0	<i>tr</i>	0.3±0.0	0.5±0.0*
16:0	18.5±1.0	15.4±0.9	17.7±0.9	13.6±1.1	17.7±1.0	19.9±1.2***
16:1	0.3±0.2	0.1±0.0	1.3±0.1**	<i>tr</i>	0.8±0.0	0.6±0.0*
18:0	25.0±0.7	24.2±0.9	23.5±1.1	25.1±1.3	24.4±1.4	25.8±1.3
18:1 n-9	6.0±0.2	8.4±0.3	6.8±0.3***	4.3±0.4*	9.0±0.6*	5.2±0.7*
18:1 n-7	2.2±0.2	4.5±0.3	2.0±0.3	2.1±0.1*	2.9±0.1***	2.6±0.0*
18:2 n-6	16.3±0.6	13.7±0.8	14.9±1.0	17.5±1.1***	16.2±1.1	17.0±1.1***
18:3 n-6	0.5±0.1	0.2±0.1	1.3±0.9	0.6±0.1**	0.7±0.1***	1.0±0.0*
18:3 n-3	0.3±0.6	0.1±0.0	0.4±0.0	0.2±0.0***	0.6±0.0	1.2±0.0*
20:3 n-6	0.8±0.1	0.7±0.0	0.7±0.0	0.8±0.0***	0.9±0.0	0.8±0.0***
20:4 n-6	24.1±0.7	28.1±1.0	24.5±1.5	30.1±2.2	21.0±1.1***	21.5±1.6**
22:5 n-3	0.8±0.1	0.5±0.0	0.8±0.0	0.7±0.0**	0.9±0.0	0.5±0.0
22:6 n-3	3.5±0.3	3.8±0.2	4.4±0.2	4.2±0.3	3.7±0.2	2.7±0.2**
Σ Saturados	45.0±2.1	39.9±1.8	42.6±2.1	38.7±2.4	42.5±2.4	46.2±2.5
Σ 18-20n-6	41.7±0.8	45.2±1.9	41.4±3.4	49.0±3.4	38.8±2.3	40.3±2.8
Σ 18-22n-3	4.6±1.0	4.4±0.3	5.6±0.3	5.1±0.3	5.2±0.3*	4.4±0.3

La composición de AG se determinó por GLC capilar, la FC se separó previamente por TLC, como se describió en *Métodos*. Los AG mayoritarios se presentan en color. Los datos se expresaron como la media del % ± ES de cinco determinaciones independientes. Diferencias significativas respecto de los N enteros (LT o FC): *P < 0.001; **P < 0.01 y ***P < 0.05.

En la Tabla 5.2 se observa que la composición de AG de los LT es similar a la de FC en todas las fracciones nucleares de células de hígado de rata estudiadas. Este hecho se debería a que la FC es el FL mayoritario en los N enteros y en las Mx y, por lo tanto, representa una parte muy significativa del total lipídico (LT).

Las Mx obtenidas con las dos concentraciones de TX-100 ensayadas presentan proporciones similares de AG saturados e insaturados; los últimos, principalmente de la serie n-6, alcanzan más del 40 % de los LT y de la FC. Los AG insaturados más abundantes son: ácido araquidónico (20:4 n-6) > linoleico (18:2 n-6) > oleico (18:1 n-9) > docosahexaenoico (22:6 n-3) > y asclépico (18:1 n-7). Los ácidos grasos saturados mayoritarios son: ácido esteárico (18:0) > y palmítico (16:0).

Un análisis más detallado de la tabla nos permite observar que los cambios más significativos en las Mx obtenidas con TX-100 0.04 % (p/v) son: un incremento de los ácidos 18:2 n-6, γ -linolénico (18:3 n-6), α -linolénico (18:3 n-3), eicosatrienoico (20:3 n-6) y docosapentaenoico (22:5 n-3) y una disminución de los ácidos 18:1 n-9 y 18:1 n-7.

Los lípidos endonucleares estudiados en las Mx obtenidas mediante remoción de la membrana nuclear de N enteros con TX-100 0.08 % (p/v) se caracterizaron por presentar mayores diferencias en su composición de AG respecto de los N control. En particular, en lo concerniente a la FC, se observó un incremento en el contenido del ácido graso saturado mirístico (14:0), del monoinsaturado palmitoleico (16:1 n-7) y del ácido graso polinosaturado 18:3, de las series n-6 y n-3. También se observó una disminución en los porcentajes de los ácidos 18:1, de las series n-9 y n-7. En lo que respecta a los LT endonucleares el cambio más significativo corresponde a un incremento del AG 18:1 n-7, respecto al N.

En conclusión, si bien los N y las Mx de células de hígado de rata presentan una composición fosfolipídica (Tabla 5.1) y de AG de FC (Tabla 5.2) muy similar, con la FC, la FE y los AG saturados palmítico y

esteárico y polinosaturados, principalmente de la serie n-6, como constituyentes mayoritarios, los cambios más evidentes se observan en las Mx obtenidas con la concentración más elevada de detergente utilizada, 0.08 % (p/v).

5.2.2.2. Composición de AG de lípidos totales y de FC de homogenato, microsomas y mitocondrias de hígado de rata

En los resultados presentados previamente se observa que la composición de AG de los LT y la FC de los N y las Mx es muy similar; es así que el siguiente objetivo planteado fue determinar si dicha composición era propia del N o compartida con otros organoides de células de hígado. Con este fin se determinó la composición de AG de LT y FC de homogenato, microsomas y mitocondrias hepáticas. Es importante remarcar que la FC es también el FL mayoritario de estos organoides (225).

La Tabla 5.3 muestra la composición de AG de los LT y de la FC de homogenato, microsomas y mitocondrias aislados de células de hígado de rata.

Tabla 5.3. Composición de AG de LT y de FC de homogenato, microsomas y mitocondrias de hígado de rata.

Fracción Subcelular	Homogenato		Microsomas		Mitocondrias	
	LT	FC	LT	FC	LT	FC
AG (%)						
12:0	0.3±0.2	0.9±0.3	tr	tr	0.3±0.0	0.5±0.0
14:0	0.3±0.0	0.5±0.0	tr	tr	0.4±0.0	0.6±0.0
16:0	16.2±1.0	22.7±1.3	22.6±0.8	22.2±0.7	17.4±0.1	21.8±0.1
16:1	0.1±0.0	0.2±0.1	0.4±0.1	0.6±0.3	1.2±0.0	0.1±0.0
18:0	21.6±0.1	26.3±1.7	23.7±1.1	22.9±0.7	19.7±0.1	19.5±0.1
18:1 n-9	5.9±0.1	5.6±0.8	5.2±0.4	4.8±0.3	6.0±0.2	6.7±0.2
18:1 n-7	2.4±0.1	2.8±0.5	1.4±0.2	1.6±0.2	4.5±0.0	4.8±0.2
18:2 n-6	20.7±0.7	11.8±0.8	13.6±0.6	13.8±0.6	19.1±0.1	18.7±0.3
18:3 n-6	0.4±0.0	0.4±0.0	0.4±0.1	0.4±0.1	tr	tr
18:3 n-3	0.6±0.1	tr	0.2±0.0	tr	tr	tr

20:3 n-6	0.8±0.1	0.4±0.1	0.6±0.2	0.2±0.1	1.8±0.1	1.8±0.0
20:4 n-6	26.0±0.3	23.3±1.2	25.6±0.3	27.8±1.5	20.9±0.3	19.0±0.4
22:5 n-3	0.1±0.0	0.8±0.4	0.6±0.1	0.4±0.1	1.0±0.0	0.2±0.1
22:6 n-3	4.3±0.2	3.0±0.1	4.8±0.8	4.1±0.2	6.8±0.1	4.0±0.1
Σ Saturado	38.5±1.3	50.4±3.4	46.3±1.9	45.1±1.4	37.8±0.3	42.4±0.2
Σ 18-20n-6	47.9±1.1	35.9±2.1	40.3±1.2	42.2±2.3	41.9±0.5	39.5±0.8
Σ 18-22n-3	5.0±0.3	3.8±0.5	5.4±1.0	4.5±0.3	7.8±0.1	4.2±0.2

La composición de AG se determinó por GLC capilar. La FC se separó previamente por TLC, como se describió en *Métodos*. Los AG mayoritarios se presentan en color. Los datos se expresaron como la media ± ES de cinco determinaciones independientes.

En la Tabla 5.3 se observa que las composiciones de AG de los LT y la FC de homogenato, microsomas y mitocondrias de células de hígado de rata son muy similares entre si. Los AG mayoritarios son: 16:0, 18:0, 18:2 n-6 y 20:4 n-6. Se determinaron proporciones similares de AG saturados e insaturados, los últimos, principalmente de la serie n-6, alcanzan el 36-48 % de los LT y de la FC. Los AG insaturados más abundantes son: ácido araquidónico (20:4 n-6) > linoleico (18:2 n-6) > oleico (18:1 n-9) > asclépico (18:1 n-7) > y docosahexaenoico (22:6 n-3). Los ácidos grasos saturados mayoritarios son el ácido esteárico (18:0) > y el palmítico (16:0).

En conclusión, el perfil de AG del homogenato, los microsomas y las mitocondrias de hígado de rata es muy similar entre si y al de los N y las Mx.

5.2.3. Composición de las EM de FC

5.2.3.1. Composición de las EM de FC de núcleos y Mx de hígado de rata

Teniendo en cuenta que la FC es el FL mayoritario en el N y la Mx (Tabla 5.1) y que la misma presenta un alto porcentaje de AG insaturados (Tabla 5.2), el siguiente objetivo fue determinar la composición de las EM de la FC con el fin de analizar la distribución de los AG en esta clase fosfolipídica.

La Figura 5.5 corresponde a un cromatograma típico de las especies moleculares de FC del N celular de hígado de rata, resueltas por RPHPLC-ELSD.

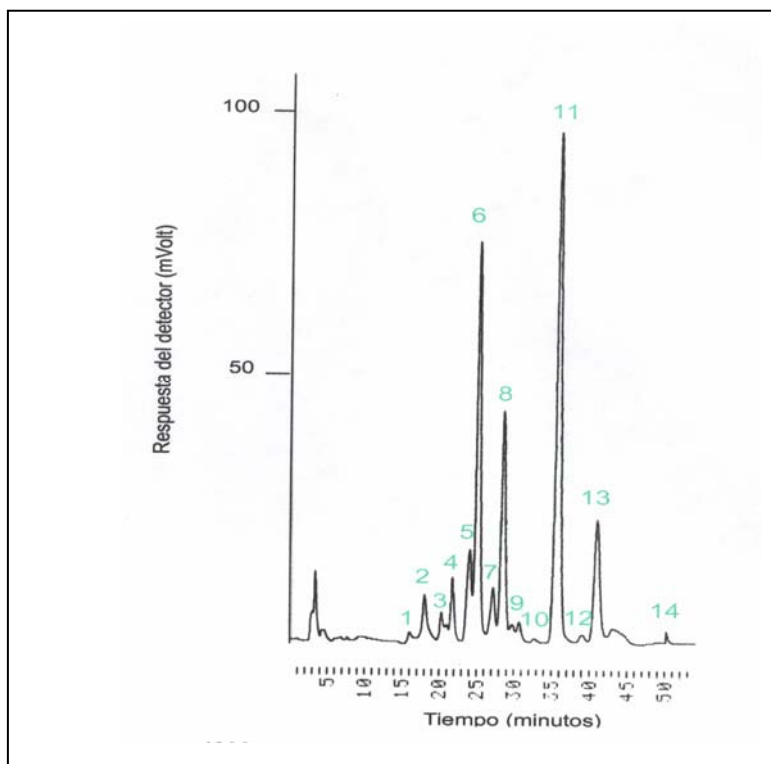


Fig. 5.5. Cromatograma típico de las EM de FC de núcleos celulares de hígado de rata.

Las EM de FC fueron resueltas por RPHPLC-ELSD e identificadas por GLC capilar, según se describió en *Métodos*.

La Tabla 5.4 corresponde a la composición de las EM de FC de N y Mx de células de hígado de rata.

Tabla 5.4. Composición de las EM de FC de núcleos y Mx.

Fracción nuclear		Núcleos	Mx	
TX-100 (% p/v)			0.04	0.08
Pico	EM de FC	0		
1	20:4-20:4	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.0
1	18:2-22:6	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.0
2	18:2-20:4	2.2 ± 0.2	1.9 ± 0.3	1.5 ± 0.4
3	18:2-18:2	2.0 ± 0.1	0.6 ± 0.1 *	0.7 ± 0.0 *
4	16:0-22:6	3.6 ± 1.7	2.8 ± 0.7	2.2 ± 0.5
5	18:1-20:4	4.7 ± 0.6	4.6 ± 1.1	3.7 ± 0.7
6	16:0-20:4	19.8 ± 0.6	18.8 ± 1.5	20.6 ± 1.7

7	18:1-18:2	2.8 ± 0.3	2.6 ± 0.2	4.3 ± 0.5 ***
8	16:0-18:2	13.4 ± 0.6	13.5 ± 0.5	22.6 ± 1.9 *
9	16:0-20:3	0.2 ± 0.0	4.0 ± 1.3 **	2.3 ± 0.8 **
10	18:0-22:6	1.9 ± 0.4	3.6 ± 2.0	2.3 ± 1.1
11	18:0-20:4	36.7 ± 1.9	32.6 ± 0.6	27.8 ± 0.9 **
12	16:0-18:1	1.1 ± 0.2	1.6 ± 0.1***	2.0 ± 0.3 ***
13	18:0-18:2	11.2 ± 0.7	11.0 ± 2.0	9.6 ± 1.1
14	18:0-18:1	tr	0.3 ± 0.3	tr
15	16:0-18:0	tr	1.7 ± 0.0	tr

Las EM de FC se resolvieron por RHPLC-ELSD según se describió en *Métodos*. El número de pico es el correspondiente al del cromatograma de la Figura 5.5. Las especies moleculares de FC mayoritarias se muestran en color. Los datos analizados por duplicado se expresan como $\mu\text{mol } \%$ y corresponden a la media $\pm$ ES de 5 determinaciones independientes para la fracción correspondiente a Mx y de, un mínimo, de 10 determinaciones para la fracción correspondiente a los N enteros. tr: cantidades trazas no detectables mediante el método utilizado. Diferencias significativas respecto de la fracción nuclear: *P < 0.001; **P < 0.01 y ***P < 0.05.

Las diferentes EM de FC se resolvieron por RHPLC y se detectaron por ELSD. Utilizando este procedimiento se resolvieron, identificaron y cuantificaron las siguientes 16 EM de FC en N celulares de hígado de rata: 20:4-20:4; 18:2-22:6; 18:2-20:4; 18:2-18:2; 16:0-22:6; 18:1-20:4; 16:0-20:4; 18:1-18:2; 16:0-18:2; 16:0-20:3; 18:0-22:6; 18:0-20:4; 16:0-18:1; 18:0-18:2; 18:0-18:1 y 16:0-18:0. La especie molecular 20:4-20:4 (pico 1) eluye junto con la especie molecular 18:2-22:6 en cantidades prácticamente iguales.

Las EM de FC mayoritarias en el núcleo celular de hígado de rata son las siguientes: 18:0-20:4n-6 > 16:0-20:4n-6 > 16:0-18:2n-6 > 18:0-18:2n-6. El ácido araquidónico se encuentra esterificado en posición *sn*-2 en las siguientes EM de FC: 18:0-20:4, 16:0-20:4, 18:1-20:4 y 18:2-20:4 y en ambas posiciones, *sn*-1 y *sn*-2, formando la EM 20:4-20:4.

La composición de las EM de FC endonuclear poseen, al igual que los núcleos, una alta proporción de AG insaturados, siendo las EM mayoritarias: 18:0-20:4, 16:0-18:2, 16:0-20:4 y 18:0-18:2 mientras que las EM que contienen ácido araquidónico en posición *sn*-2 son 18:0-20:4, 16:0-

20:4, 18:1-20:4 y 18:2-20:4 y, en ambas posiciones *sn*-1 y *sn*-2, la EM 20:4-20:4.

En particular, en las Mx obtenidas con TX-100 0.04 % (p/v) se observaron pequeños cambios en las proporciones de las EM de FC, respecto de los núcleos: una disminución de la EM 18:2-18:2 y un incremento de 16:0-20:3 y 16:0-18:1. Estos resultados se correlacionan con el incremento de los ácidos grasos 16:0 y 20:3 observados en la FC endonuclear, respecto del control (Tabla 5.2).

En las Mx obtenidas con TX-100 0.08 % (p/v) se observaron modificaciones más evidentes en la composición de EM de FC, respecto de los núcleos. El porcentaje de los pooles de FC endonucleares que poseen 20:4 disminuyó desde 63.3 % hasta 54.1 %. Esto se debe principalmente a la disminución de la EM de FC 18:0-20:4.

La recuperación de las EM de FC endonuclear que poseen el ácido 20:4 n-6 fue de 23.5 y 11.2 % cuando se utilizó TX-100 0.04 % y 0.08 % (p/v), respectivamente. Como se observa en la Tabla 5.1 este rendimiento es similar al encontrado en el pool total de FC endonuclear, que es de 24 % y 14 % cuando se utilizó TX-100 0.04 % (p/v) y 0.08 % (p/v), respectivamente. Estos resultados se correlacionan con la disminución del ácido 20:4n-6 observado en la FC endonuclear de la Mx obtenida con TX-100 0.08 % (p/v) (Tabla 5.2).

Las EM mayoritarias de la FC endonuclear que poseen 18:2 n-6 en la molécula representan, al igual que lo observado en los núcleos, entre un 30 y 40 % del total. Se encontraron diferencias selectivas en algunas EM como por ejemplo un incremento en las EM 18:1-18:2 y 16:0-18:2 en las Mx obtenidas con TX-100 0.08 % (p/v) respecto de los núcleos, siendo la recuperación cercana al 23 %. Estos resultados se correlacionan con el incremento observado en los AG 16:0 y 18:2 n-6 de la FC endonuclear (Tabla 5.2). Sin embargo, a pesar del incremento descrito en el porcentaje del ácido graso 18:2 n-6 en el pool total de FC endonuclear, el porcentaje de la EM de FC 18:2-18:2 decrece significativamente en

las Mx respecto de los núcleos control, debido a una selectiva y baja recuperación del 5 % encontrada en la EM 18:2-18:2.

Resumiendo, las EM de FC mayoritarias del N celular y de la Mx son 18:0-20:4n-6, 16:0-20:4n-6, 16:0-18:2n-6 y 18:0-18:2n-6 mientras que el ácido araquidónico se encuentra esterificado en posición *sn*-2 en las EM 18:2-20:4, 16:0-20:4, 18:0-20:4, 18:2-20:4 y 18:1-20:4 y, en ambas posiciones *sn*-1 y *sn*-2, formando la EM de FC 20:4-20:4.

5.2.3.2. Composición de las EM de FC de homogenato, microsomas y mitocondrias de hígado de rata

En los resultados presentados previamente se observa que la composición de las EM de FC de los N y las Mx es muy similar; es así que el siguiente objetivo planteado fue determinar si dicha composición era propia del N o compartida con otros organoides de células de hígado. Con este objetivo fue que se analizó la composición de las EM de FC de homogenato, microsomas y mitocondrias hepáticas.

La Tabla 5.5 corresponde a la composición de las EM de FC de homogenato, microsomas y mitocondrias de células de hígado de rata.

Tabla 5.5. Composición de las EM de FC de homogenato, microsomas y mitocondrias de hígado de rata.

Fracción subcelular		Homogenato	Mitocondrias	Microsomas
Pico	EM de FC			

1	20:4-20:4	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.1	tr
1	18:2-22:6	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.1	tr
2	18:2-20:4	1.6 ± 0.1	1.5 ± 1.3	1.2 ± 1.3
3	18:2-18:2	0.7 ± 0.0	2.0 ± 0.8	tr
4	16:0-22:6	2.9 ± 0.2	6.1 ± 0.8	4.1 ± 0.3
5	18:1-20:4	2.8 ± 0.2	5.0 ± 1.7	1.2 ± 0.3
6	16:0-20:4	21.9 ± 1.2	18.0 ± 1.1	22.0 ± 1.5
7	18:1-18:2	1.6 ± 0.1	3.4 ± 0.3	0.7 ± 0.2
8	16:0-18:2	15.5 ± 1.3	16.0 ± 0.9	16.1 ± 1.0
9	16:0-20:3	1.9 ± 0.2	3.6 ± 0.8	tr
10	18:0-22:6	1.5 ± 0.1	1.5 ± 0.9	2.7 ± 0.7
11	18:0-20:4	37.9 ± 2.1	22.6 ± 1.0	40.0 ± 1.8
12	16:0-18:1	tr	5.1 ± 0.6	4.5 ± 1.4
13	18:0-18:2	9.9 ± 1.1	11.1 ± 1.1	7.5 ± 0.6
14	18:0-18:1	0.8 ± 0.0	3.1 ± 1.5	tr
15	16:0-18:0	tr	tr	tr

Las EM de FC se resolvieron por RPHPLC-ELSD según se describió en *Métodos*. El número de pico es el correspondiente al del cromatograma de RPHPLC. Las especies moleculares de FC mayoritarias se muestran en color. Los datos analizados por duplicado se expresan como $\mu\text{mol } \%$ y corresponden a la media $\pm$ ES de 10 determinaciones independientes para cada fracción subcelular. tr: cantidades trazas no detectables mediante el método utilizado.

En la Tabla 5.5 se observa que se resolvieron, identificaron y cuantificaron las siguientes 16 EM de FC en las fracciones subcelulares de hígado de rata analizadas: 20:4-20:4; 18:2-22:6; 18:2-20:4; 18:2-18:2; 16:0-22:6; 18:1-20:4; 16:0-20:4; 18:1-18:2; 16:0-18:2; 16:0-20:3; 18:0-22:6; 18:0-20:4; 16:0-18:1; 18:0-18:2; 18:0-18:1 y 16:0-18:0.

Las EM de FC mayoritarias son 18:0-20:4n-6 > 16:0-20:4n-6 > 16:0-18:2n-6 > 18:0-18:2n-6 y el ácido araquidónico se encuentra esterificado en posición *sn*-2 en las siguientes EM de FC: 18:2-20:4, 16:0-20:4, 18:0-20:4, 18:2-20:4 y 18:1-20:4 y en ambas posiciones, *sn*-1 y *sn*-2, formando la EM 20:4-20:4.

En conclusión, la distribución de EM de FC de homogenato, microsomas y mitocondrias de células de hígado de rata muestra un perfil general muy similar al de los núcleos y las Mx que se caracteriza por presentar una alta proporción de ácidos grasos insaturados.

5.3. Incorporación de ácidos grasos saturados y nosaturados en los lípidos nucleares de células de hígado de rata

5.3.1. Incorporación de los AG [1-¹⁴C]18:0 (esteárico), [1-¹⁴C]18:2 n-6 (linoleico) y [1-¹⁴C]20:4n-6 (araquidónico) en los lípidos nucleares

Con el fin de determinar el mecanismo por el cual los AG citosólicos llegan al N celular se diseñó el siguiente modelo experimental.

Se incubaron *in vitro* núcleos aislados de células de hígado de rata en un medio de incubación que contenía el ácido [1-¹⁴C] graso o el [1-¹⁴C] acil-CoA en estudio. Se trabajó con una concentración de 2 μ M ya que el rango de concentración fisiológico de AGL en el citoplasma celular es de 5-10 μ M. Se eligió trabajar con los AG 18:0, 18:2n-6 y 20:4n-6 ya que son los más abundantes en el núcleo celular de hígado de rata (Tabla 5.2).

Se consideró la posibilidad de que el AG se esterifique en los lípidos nucleares y ya que en el hígado estos procesos requieren del AG activado como acil-CoA (226), se adicionó al medio de incubación ATP y CoA. Estos cofactores son necesarios para la activación de los AG a los correspondientes acil-CoAs por actividad de la *acil-CoA sintetasa* (ACS) nuclear.

En algunos casos el medio de incubación se suplementó con citosol. Una de las razones por las que se agregó citosol al MI fue para determinar si las proteínas y demás componentes de dicha fracción son necesarias para los procesos estudiados teniendo en cuenta que en la célula eucariótica, a diferencia de lo que ocurre en un ensayo *in vitro*, el núcleo se encuentra rodeado por el citosol. El citosol aportaría, entre otras proteínas, FABP al MI, que transporta a los AG ya que debido su

baja solubilidad en agua los mismos se desplazan por el espacio intracelular unidos a esta proteína transportadora.

5.3.1.1. Incorporación de AG saturados e insaturados en los LT nucleares

La Figura 5.6 muestra la distribución de la radiactividad incorporada en las fracciones correspondientes al N y al MI, luego de la extracción con Folch. La distribución de la radiactividad incorporada en las fases metanólica-acuosa y clorofórmica de cada fracción se expresa como porcentaje, siendo el 100 % la cantidad de $[1-^{14}\text{C}]$ AG inicial agregada a tiempo 0.

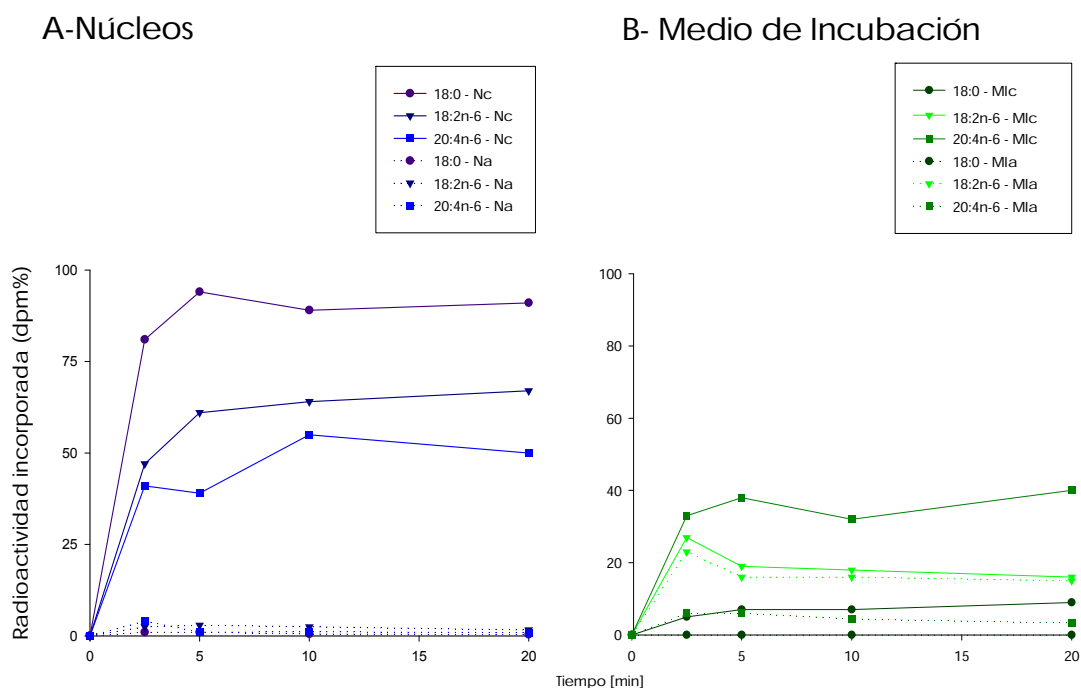


Fig. 5.6. Incorporación de la radiactividad en los lípidos nucleares, en función del tiempo. (A) fracción nuclear y (B) medio de incubación. Se incubaron *in vitro* N celulares de hígado de rata en presencia de los ácidos $[1-^{14}\text{C}]18:0$, $[1-^{14}\text{C}]18:2n-6$ y $[1-^{14}\text{C}]20:4n-6$, durante diferentes tiempos. Finalizada la incubación los N se separaron del MI por centrifugación, los lípidos de cada fracción (N y MI) se extrajeron por la Técnica de Folch y la radiactividad de las fases clorofórmica (Nc y Mlc) y metanólica-acuosa (Na y Mla) se cuantificó como se describió en *Métodos*. Los resultados representan la media $\pm$ ES de 5 experimentos independientes.

En la Figura 5.6 (A) se observa que en los núcleos la mayor proporción de radiactividad se incorporó en los lípidos (fracción Nc) mientras que sólo el 5 % del total se incorporó en los componentes solubles en medio acuoso (fracción Na). Este hecho se observó con los 3 ácidos grasos ensayados y a todos los tiempos testeados, independientemente del agregado o no de proteína citosólica al medio de incubación (resultados no presentados a fin de simplificar la interpretación de la Figura).

La incorporación de los tres ácidos grasos ensayados en los lípidos nucleares fue rápida al principio y, con el transcurso del tiempo de incubación, el proceso se saturó. El ácido graso 18:0 se incorporó prácticamente en su totalidad (90 %) en los lípidos nucleares, mientras que la incorporación de los ácidos grasos insaturados testeados (18:2n-6 y 20:4n-6) fue menor alcanzando 67 y 50 % respectivamente al final de la incubación.

En la Figura 5.6 (B) se presenta lo ocurrido con los AG marcados radiactivamente que no se incorporaron en los lípidos nucleares y permanecieron en el medio de incubación.

Cuando los núcleos se incubaron con $[1-^{14}\text{C}]20:4n-6$ y $[1-^{14}\text{C}]18:2n-6$, el 93 % y el 53 % de la radiactividad, respectivamente, permaneció en la fracción Mlc y el resto como componentes solubles en medio acuoso. En el caso particular del AG 18:0 la cantidad de radiactividad que permaneció como AGL (Mlc) en el medio de incubación fue mínima

(menos del 10 %) debido a que la mayor proporción se incorporó en los lípidos nucleares (Nc).

5.3.1.2. Incorporación de los AG $[1-^{14}\text{C}]18:0$, $[1-^{14}\text{C}]18:2n-6$ y $[1-^{14}\text{C}]20:4n-6$ en las clases lipídicas nucleares, en función del tiempo de incubación

En la Figura 5.7 se muestra la incorporación y esterificación de los AG $[1-^{14}\text{C}]18:0$, $[1-^{14}\text{C}]18:2n-6$ y $[1-^{14}\text{C}]20:4n-6$ en las diferentes clases de lípidos nucleares en función del tiempo de incubación, en presencia de citosol, ATP y CoA.

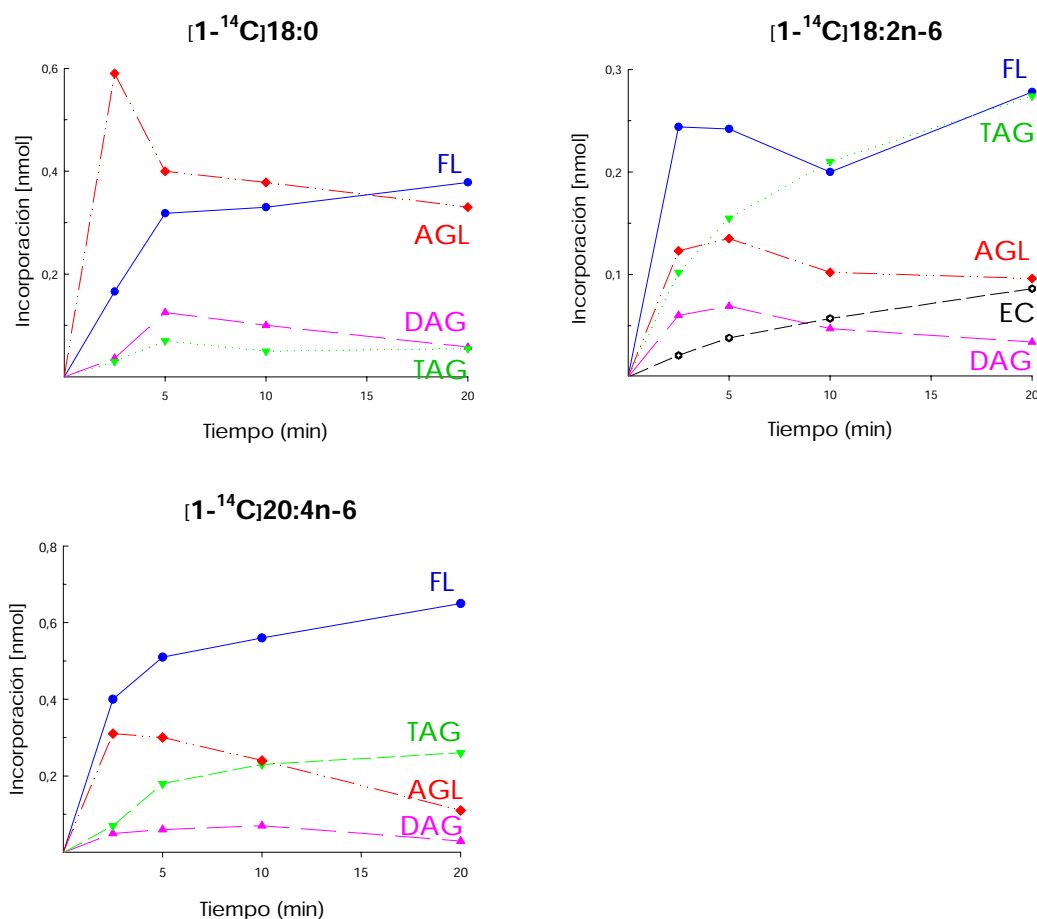


Fig. 5.7. Incorporación de los ácidos grasos [1-¹⁴C]18:0, [1-¹⁴C]18:2n-6 y [1-¹⁴C]20:4n-6 en las diferentes clases de lípidos nucleares, en función del tiempo. Se incubaron N celulares de hígado de rata con los ácidos [1-¹⁴C]18:0, [1-¹⁴C]18:2n-6 y [1-¹⁴C]20:4n-6, ATP y CoA, con o sin citosol. Finalizada la incubación los N se separaron del MI por centrifugación, los lípidos se extrajeron por el método de Folch, las diferentes clases de lípidos se separaron por TLC y la radiactividad incorporada (nmol) en cada clase lipídica se determinó como se describió en *Métodos*. Los resultados corresponden a la media $\pm$ ES de cinco experimentos independientes.

La presencia de citosol en el MI no determinó ninguna modificación en los perfiles de incorporación y esterificación de los AG testeados en los lípidos nucleares (resultados no presentados a fin de facilitar la interpretación de la Figura).

Se encontró radiactividad esterificada en FL, TAG, DAG y EC e incorporada directamente como AGL. En un principio, el AG [1-¹⁴C]18:0 se incorporó en los lípidos nucleares en mayor proporción como AGL (78 %), mientras que el [1-¹⁴C]20:4n-6 no solo se incorporó como AGL (37 %) sino que también se esterificó en los FL (46 %). Con el transcurso del tiempo de incubación los AG 18:0 y 20:4n-6, incorporados inicialmente como AGL, se fueron esterificando en los lípidos nucleares. Esto se evidencia por la disminución de la radiactividad en el pool de AGL y el aumento de la misma en los FL, principalmente, y en los TAG. Por otro lado, la incorporación inicial del ácido [1-¹⁴C]18:2n-6 como AGL en los lípidos nucleares fue escasa y se saturó desde el comienzo del proceso.

Los tres ácidos grasos estudiados se esterificaron en forma rápida y, mayoritariamente, en los FL nucleares. La esterificación de [1-¹⁴C]18:2n-6 y [1-¹⁴C]20:4n-6 en los TAG nucleares fue más lenta que en los FL y se fue incrementando durante toda la incubación. La esterificación del ácido [1-¹⁴C]18:0 en los TAG se saturó luego de 5 min de incubación lo que indicaría una muy baja selectividad por este AG. Esta saturación no se debe a una cantidad insuficiente de sustrato en el sistema ya que la cantidad de los ácidos 18:2n-6 y 20:4n-6 incorporada en TAG fue alta y se incrementó durante todo el intervalo de tiempo estudiado. La cantidad de radiactividad esterificada en DAG sólo fue

cuantitativamente importante en el caso del ácido graso $[1-^{14}\text{C}]18:0$. De los tres ácidos grasos estudiados en las condiciones experimentales elegidas, sólo el ácido $[1-^{14}\text{C}]18:2n-6$ se esterificó en EC.

5.3.1.3. Efecto del ATP y CoA en la incorporación de AG saturados e insaturados en las fracciones Nc y Mlc

Los resultados presentados previamente se realizaron en un medio de incubación que contenía ATP y CoA.

Con el fin de determinar si la esterificación de los AG $[1-^{14}\text{C}]18:0$, $[1-^{14}\text{C}]18:2n-6$ y $[1-^{14}\text{C}]20:4n-6$ en los lípidos nucleares es un mecanismo acil-CoA dependiente se repitieron las incubaciones en las condiciones antes descritas, pero sin el agregado de ATP y CoA al MI. El hecho de que el mecanismo sea dependiente de ATP y CoA implica que los AG, previo a su esterificación, deban ser activados a los correspondientes acil-CoAs por la ACS de cadena larga nuclear (227).

En la Tabla 5.6 se muestra el efecto del ATP y CoA en la incorporación de AG en los lípidos nucleares. Los resultados representan el porcentaje de radiactividad incorporada como AGL en la fase clorofórmica del Folch que se realizó a los N una vez finalizada la incubación con los AG radiactivos.

Tabla 5.6. Efecto del ATP y CoA en la incorporación de $[1-^{14}\text{C}]18:0$, $[1-^{14}\text{C}]18:2n-6$ y $[1-^{14}\text{C}]20:4n-6$ en los lípidos nucleares.

$[1-^{14}\text{C}]$ AG	Radiactividad incorporada como AGL (%)		
	18:0	18:2n-6	20:4n-6
Con ATP y CoA	40	12	10
Sin ATP y CoA	100	100	100

Se incubaron núcleos celulares de hígado de rata con $[1-^{14}\text{C}]18:0$, $[1-^{14}\text{C}]18:2n-6$ o $[1-^{14}\text{C}]20:4n-6$, con y sin ATP y CoA, durante 20 min. Los resultados se presentan como el porcentaje de la radiactividad total incorporada como AGL en los lípidos nucleares (Nc: fase clorofórmica).

En la Tabla 5.6 se observa que en ausencia de ATP y CoA los tres ácidos grasos testeados se incorporaron en los N celulares exclusivamente como AGL (100%) y no se esterificaron en ninguna clase lipídica; este hecho se debería a que no fueron activados a los respectivos acil-CoAs. Por el contrario, en presencia de ATP y CoA, el porcentaje de esterificación de los AG testeados en cada clase lipídica nuclear depende del AG en particular; es así que cuando se incubaron los N en presencia del AG 18:0, ATP y CoA, el 40% de la radiactividad incorporada se encontró como AGL mientras que el resto se esterificó en los FL, DAG y TAG, como se detalla en la Figura 5.7; cuando se incubaron los N en presencia del AG 18:2n-6, ATP y CoA, la radiactividad incorporada se encontró en un 12 % como AGL mientras que el resto del sustrato marcado se esterificó en los FL, TAG, EC y DAG mientras que cuando se utilizó 20:4n-6 como sustrato exógeno marcado, ATP y CoA, la radiactividad se encontró en un 10 % como AGL y el resto se esterificó en los FL, TAG y DAG.

En conclusión, estos resultados indican que la esterificación de los ácidos grasos 18:0, 18:2n-6 y 20:4n-6 en los FL, TAG, DAG y EC (sólo el 18:2n-6) nucleares es un proceso acil-CoA dependiente. El AG se debe activar a acil-CoA (por acción de la *acil-CoA sintetasa* de cadena larga) para esterificarse en las diferentes clases lipídicas nucleares, además de permanecer como AGL.

5.3.1.4. Incorporación del [1-¹⁴C]20:4n-6-CoA en las clases lipídicas nucleares

Considerando que los AG exógenos se esterifican en los pools lipídicos nucleares exclusivamente por un mecanismo acil-CoA dependiente (Tabla 5.6), el siguiente objetivo fue determinar si los acil-CoA exógenos podían esterificarse en los lípidos nucleares.

Se eligió trabajar con 20:4n-6-CoA ya que el 20:4n-6 es el AG polinosaturado más abundante en el N celular de hígado de rata (Tabla 5.2), es precursor para la síntesis de eicosanoides e interviene en la regulación de la expresión génica, entre otras funciones celulares.

En la Figura 5.8 se muestra el porcentaje de incorporación y esterificación del $[1-^{14}\text{C}]20:4\text{n-6-CoA}$ en las diferentes clases de lípidos nucleares, en función de la concentración de sustrato marcado.

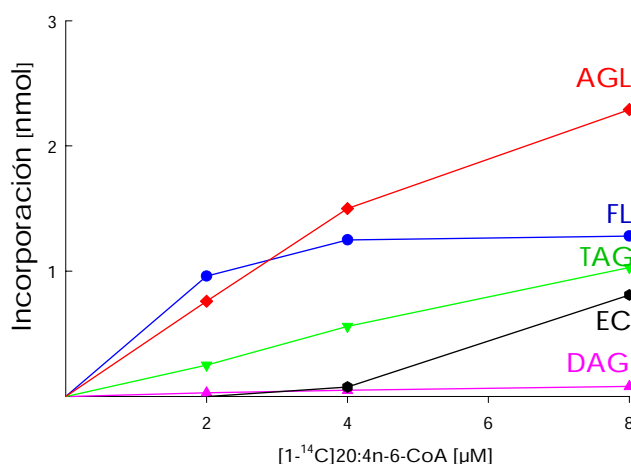


Fig. 5.8. Incorporación del ácido $[1-^{14}\text{C}]20:4\text{n-6-CoA}$ en las diferentes clases de lípidos nucleares. Se incubaron núcleos celulares de hígado de rata con diferentes concentraciones de $[1-^{14}\text{C}]20:4\text{n-6-CoA}$ durante 10 min. Finalizada la incubación los N se separaron del MI por centrifugación. Los lípidos se extrajeron por el método de Folch. Las diferentes clases de lípidos se resolvieron por TLC y la radiactividad incorporada en cada clase lipídica se determinó como se describió en *Métodos*. Los resultados corresponden a la media $\pm$ ES de cinco experimentos independientes.

En la Figura 5.8 se observa que el $[1-^{14}\text{C}]20:4\text{n-6-CoA}$ se incorporó como AGL y se esterificó en los pools lipídicos nucleares principalmente en los FL y en TAG y, en menor proporción, en DAG y EC. La esterificación en los FL se saturó inclusive con la menor concentración de $[1-^{14}\text{C}]20:4\text{n-6-CoA}$ utilizada (2 μM). En los TAG y AGL se observó un incremento lineal de la marca radiactiva con la concentración de sustrato radiactivo agregado. El $[1-^{14}\text{C}]20:4\text{n-6-CoA}$ se esterificó en los EC exclusivamente cuando se agregó en una concentración de 4 μM . La presencia de radiactividad en el pool de AGL implica que parte del

[1- ^{14}C]20:4n-6-CoA exógeno se hidrolizó a AGL por acción de la acil-CoA hidrolasa nuclear (228).

En conclusión, el [1- ^{14}C]20:4n-6-CoA exógeno se esterifica en los lípidos nucleares principalmente en los FL seguido por los TAG, los EC y, en la mínima proporción, en los DAG mientras que la incorporación como AGL se incrementa linealmente con la concentración del sustrato marcado.

5.3.1.5. Esterificación del [1- ^{14}C]20:4n-6 en los fosfolípidos nucleares

Habiendo determinado que el [1- ^{14}C]20:4n-6-CoA se esterifica en los lípidos nucleares, mayoritariamente en los FL, el siguiente objetivo fue estudiar la esterificación en cada clase fosfolipídica del N celular.

En la Figura 5.9 se muestra el porcentaje de esterificación del [1- ^{14}C]20:4n-6 en los fosfolípidos nucleares.

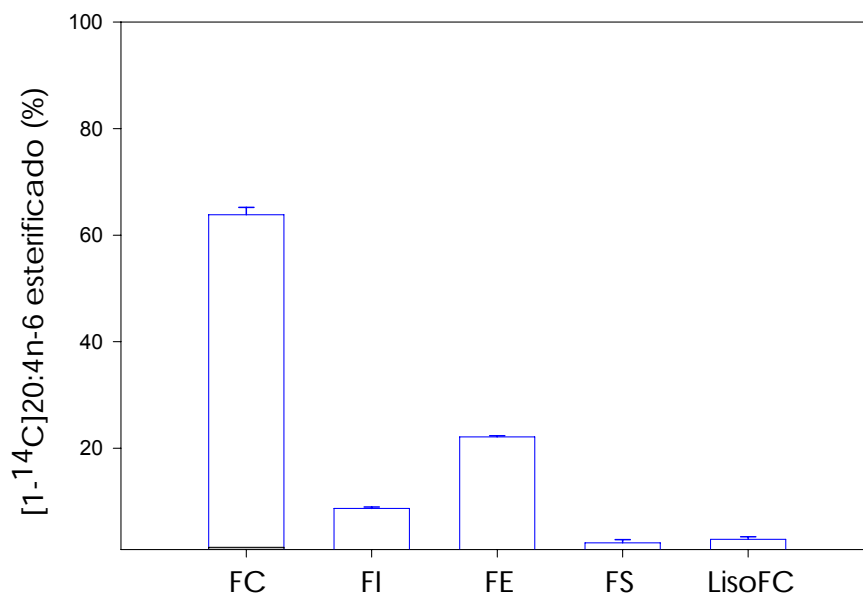


Fig. 5.9. Esterificación del $[1-^{14}\text{C}]20:4\text{n-6-CoA}$ en los fosfolípidos nucleares. Se incubaron núcleos celulares de hígado de rata con $[1-^{14}\text{C}]20:4\text{n-6-CoA}$ 2 μM , durante 10 min. Finalizada la incubación los N se separaron del MI por centrifugación. Los lípidos se extrajeron por el método de Folch. Los fosfolípidos se resolvieron por TLC y la radiactividad incorporada en cada clase fosfolipídica se determinó como se describió en *Métodos*. Los resultados corresponden a la media $\pm$ ES de cinco experimentos independientes.

En la Figura 5.9 se observa que el $[1-^{14}\text{C}]20:4\text{n-6-CoA}$ exógeno se esterifica en todos los FL nucleares, a excepción de la SM.

La ausencia de radiactividad en este FL no resultó sorprendente ya que la SM posee principalmente ácidos grasos saturados y monoinsaturados (229). De acuerdo con estos resultados, D'Antuono y colaboradores (230) demostraron que la EM de membrana nuclear de células de papila renal de ratas adultas posee un alto porcentaje de AG saturados.

Al analizar la distribución de la radiactividad esterificada en los FL nucleares se observa que el ácido araquidónico se esterificó principalmente en FC (62.4 %) y, en mucha menor proporción, en FE (22. %), en FI (8.7 %), en lisoFC (2.9 %) y en FS (2.2 %).

5.3.1.6. Esterificación de $[1-^{14}\text{C}]20:4\text{n-6-CoA}$ en las EM de FC nuclear de células de hígado de rata

Considerando que la FC constituye el pool nuclear de 20:4n-6 mayoritario en masa y que el $[1-^{14}\text{C}]20:4\text{n-6-CoA}$ exógeno se esterifica en mayor proporción en esta clase fosfolipídica (Figura 5.9), el siguiente objetivo fue determinar el patrón de esterificación del $[1-^{14}\text{C}]20:4\text{n-6-CoA}$ en las EM de FC nuclear. Con este fin se incubaron *in vitro* N celulares de hígado de rata en presencia de $[1-^{14}\text{C}]20:4\text{n-6-CoA}$ 8 μM , durante 10 minutos, y se determinó la radiactividad incorporada en las EM de FC nuclear.

La Figura 5.10 corresponde a un cromatograma típico de las especies moleculares de FC del N celular de hígado de rata, resueltas por RPHPLC-ELSD.

A

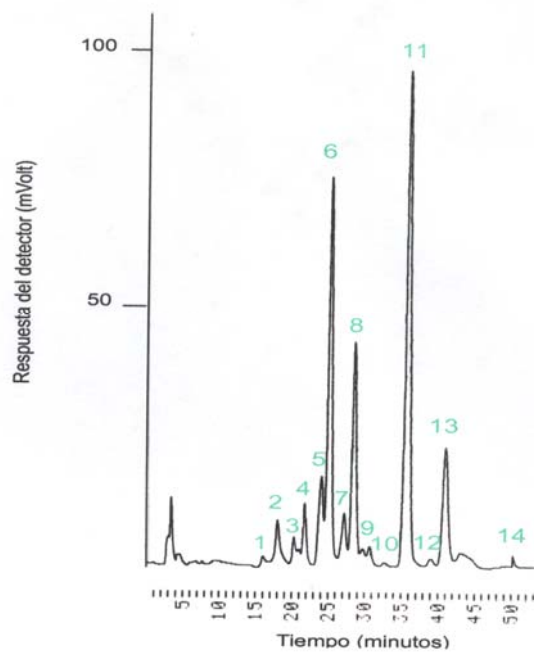
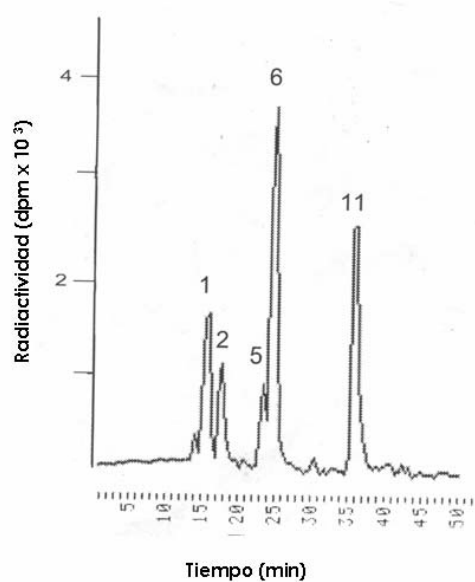
**B**

Fig. 5.10. Cromatograma de las EM de FC de núcleos celulares de hígado de rata. Las EM de FC se resolvieron por RHPLC-ELSD y se identificaron por GLC capilar, según se describió en *Métodos*. **A-** Cromatograma típico de la distribución de masas de las EM de FC. **B-** Esterificación del $[1-^{14}\text{C}]20:4\text{n-6-CoA}$ en las EM de FC. Los núcleos se incubaron en presencia de $[1-^{14}\text{C}]20:4\text{n-6-CoA}$ $8\text{ }\mu\text{M}$ durante 10 min. La radiactividad incorporada en cada EM se determinó como se describió en *Métodos*.

La Figura 5.11 muestra el porcentaje de esterificación de $[1-^{14}\text{C}]20:4\text{n-6-CoA}$ en las EM de FC nuclear de células de hígado de rata.

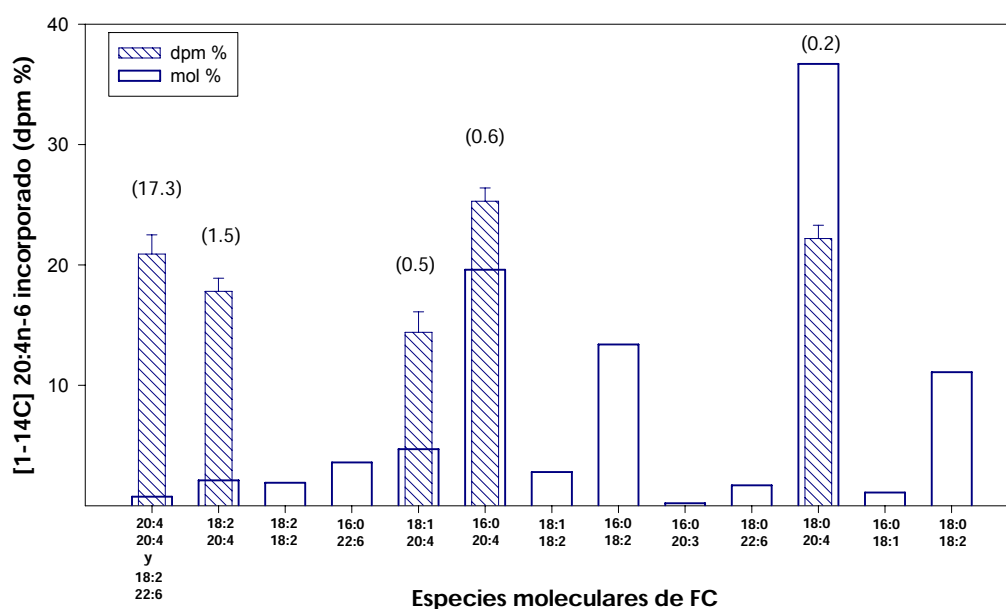


Fig. 5.11. Esterificación de $[1-^{14}\text{C}]20:4\text{n-6}$ en las EM de FC de núcleos celulares de hígado de rata. Los núcleos se incubaron en presencia de $[1-^{14}\text{C}]20:4\text{n-6-CoA}$ durante 10 min. Las EM de FC se resolvieron por RHPLC-ELSD y la incorporación de la radiactividad en cada una se estudió como se describió en la sección *Métodos*. La radiactividad específica (dpm/mol) incorporada en las 5 EM de FC que poseen 20:4n-6 se expresa en la parte superior de cada columna, entre paréntesis. Los resultados representan la media $\pm$ ES de 5 experimentos.

En la Figura 5.11 se observa que se marcaron radiactivamente las 5 EM de FC nuclear que poseen 20:4n-6 en su molécula, estas son: 18:0-20:4, 16:0-20:4, 18:1-20:4, 18:2-20:4 y 20:4-20:4.

La EM de FC que presentó el mayor porcentaje de radiactividad esterificada fue 16:0-20:4 (25.3%) seguida por 18:0-20:4 (22.2%), 20:4-20:4 (20.9 %), 18:2-20:4 (17.8 %) y 18:1-20:4 (14.4 %).

La EM de FC nuclear 20:4-20:4 fue la que presentó la mayor actividad específica (AE) de esterificación. En los núcleos hepáticos esta EM es cuantitativamente minoritaria ya que, como se muestra en la Tabla 5.4, representa el 0.25 % (expresado en $\mu\text{mol}\%$) del total de FC. Por otro lado, las EM mayoritarias de FC nuclear 18:0-20:4 y 16:0-20:4 fueron las que presentaron la menor AE de esterificación de 20:4n-6.

En conclusión, estos resultados demuestran que el 20:4n-6-CoA exógeno se esterifica en todas las EM de FC nuclear que poseen 20:4n-6 en su molécula; la mayor AE la presentaron las EM que poseen un AG insaturado en posición *sn*-1 (20:4n-6 > 18:2n-6 > 18:1) y el AA en posición *sn*-2.

5.4. Remodelado de ácidos grasos en los lípidos nucleares de células hepáticas

5.4.1. Remodelado de AG en los fosfolípidos nucleares de células de hígado de rata.

En los resultados presentados en el capítulo anterior se observa que el AA se esterifica en los pools lipídicos del N celular de hígado de rata, más específicamente en FL > TAG > EC > DAG. Entre los FL, el mayor porcentaje de esterificación se encontró en el pool correspondiente a FC y, en particular, la mayor AE la presentaron las EM que poseen un AG insaturado en posición *sn*-1 (20:4 > 18:2 > 18:1) que constituyen componentes minoritarios en masa. A partir de estos resultados se propuso la siguiente hipótesis de trabajo:

- en la posición *sn*-1 de las EM de FC que poseen 20:4n-6 inicialmente se esterifica un AG insaturado que luego, por un proceso de remodelado es reemplazado por un AG saturado, reestableciéndose de esta manera el perfil característico de EM de FC nuclear.

Con el objetivo de determinar si en el N celular existen los mecanismos de remodelado de AG de FC se procedió a:

- en una primera etapa, se marcaron radiactivamente los pools nucleares de 20:4n-6 incubando N celulares de hígado de rata en presencia de [1-¹⁴C]20:4n-6-CoA 8 μM durante 10 minutos.

- en una segunda etapa los núcleos marcados radiactivamente se separaron del MI y se reincubaron bajo diferentes condiciones experimentales.

La primera condición de reincubación ensayada se realizó con un medio de incubación frío (sin [1-¹⁴C]20:4n-6-CoA), durante diferentes tiempos, con o sin el agregado de ATP 1.3 mM y CoA (sal sódica) 60 μM.

En la Figura 5.12 se observa la redistribución de la radiactividad esterificada en los FL nucleares luego de la reincubación de los N celulares durante 80 min, con o sin el agregado de ATP y CoA al MI.

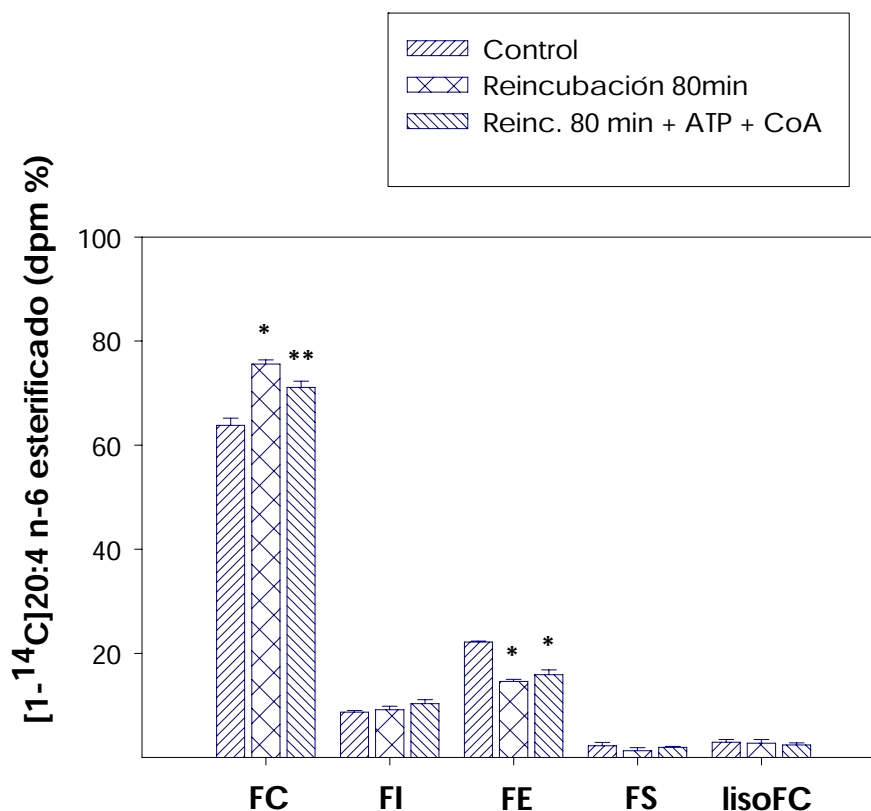


Fig. 5.12. Redistribución del $[1-^{14}\text{C}]20:4\text{n-6-CoA}$ en los FL nucleares. Los pools fosfolipídicos nucleares de 20:4n-6 se marcaron radiactivamente incubando N celulares de hígado de rata en presencia de $[1-^{14}\text{C}]20:4\text{n-6-CoA}$ durante 10 min (control). Los núcleos se separaron del MI por centrifugación y, posteriormente, se reincubaron en un MI sin $[1-^{14}\text{C}]20:4\text{n-6-CoA}$ durante 80 min con, o sin, la adición de ATP y CoA al MI. Finalizada la incubación los N se separaron del MI por centrifugación, los lípidos se extrajeron por el método de Folch, las diferentes clases de FL se separaron por TLC y la radiactividad incorporada en cada una se determinó como se detalló en *Métodos*. Los resultados se expresan como porcentaje de la radiactividad total y representan la media $\pm$ ES de 5 experimentos. Diferencias significativas respecto del control: * $P < 0.001$; ** $P < 0.01$.

La primera barra de cada conjunto de datos -clase de FL- corresponde a la distribución de la radiactividad en los pools

fosfolipídicos que poseen AA luego de la incubación de los N en presencia de $[1-^{14}\text{C}]20:4n-6\text{-CoA}$ durante 10 minutos, condiciones control. Estos resultados fueron analizados en el capítulo anterior de *Resultados* (Figura 5.9). Cada una de las demás barras en cada clase de FL corresponde a las condiciones de reincubación.

En la Figura 5.12 se observa que cuando se reincubaron los N durante 80 min, sin $[1-^{14}\text{C}]20:4n-6\text{-CoA}$ en el MI, la radiactividad incorporada en FC aumentó mientras que en FE disminuyó, con o sin el agregado de ATP y CoA al MI. Esto se debería a que se hidrolizó el 20:4n-6 esterificado en el pool de FE nuclear mientras que se incrementó el esterificado en el pool de FC. En las demás clases de FL no se observaron cambios significativos en las condiciones de reincubación ensayadas.

La siguiente etapa fue estudiar la redistribución de la radiactividad en las EM de FC nuclear que poseen 20:4n-6, expresado como actividad específica (Figura 5.13).

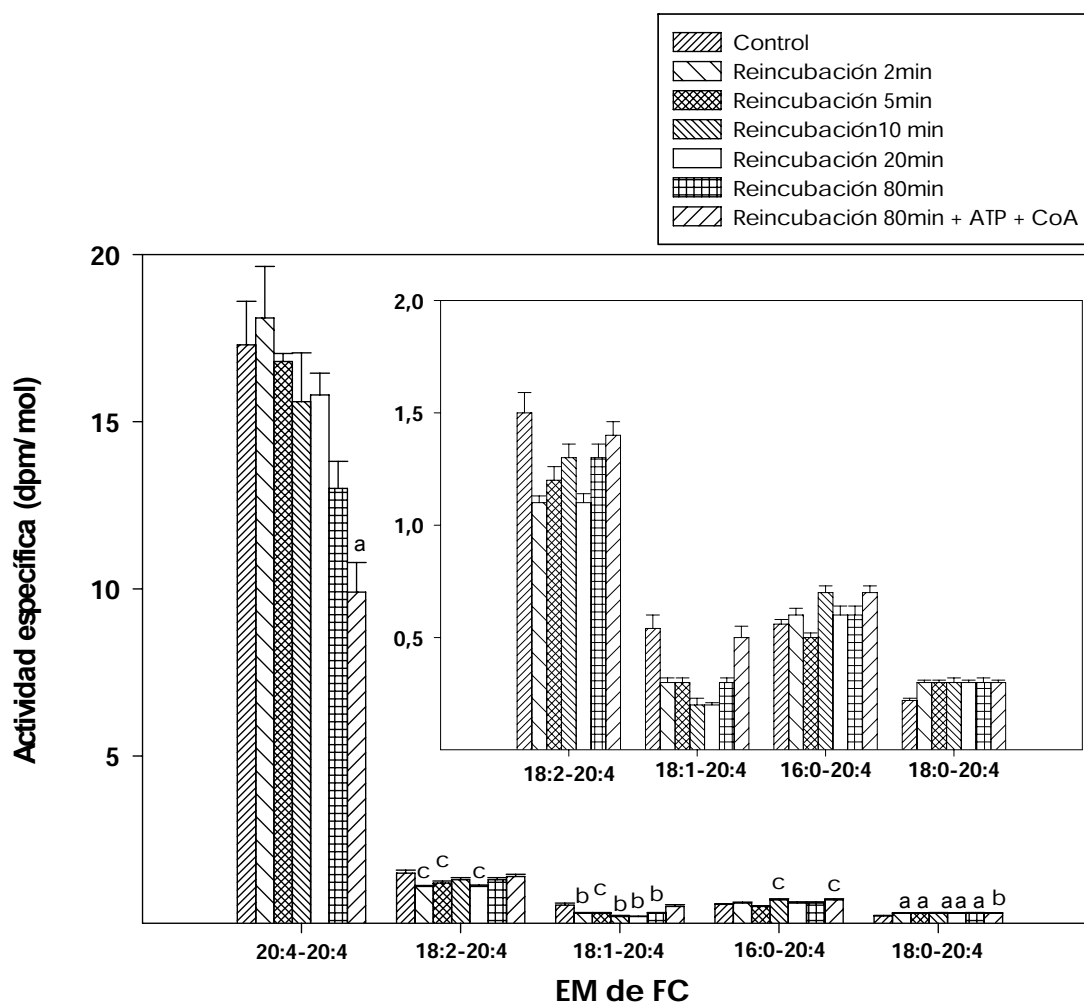


Fig. 5.13. Redistribución del $[1-^{14}\text{C}]20:4n-6\text{-CoA}$ en las EM de FC de núcleos celulares de hígado de rata. Las EM de FC nuclear que poseen 20:4n-6 se marcaron radiativamente incubando los N en presencia de $[1-^{14}\text{C}]20:4n-6\text{-CoA}$ durante 10 min, seguido de una reincubación en un medio sin $[1-^{14}\text{C}]20:4n-6\text{-CoA}$, con o sin ATP y CoA, en función del tiempo. Finalizada la incubación los N se separaron del MI por centrifugación, los lípidos se extrajeron por el método de Folch, las EM de FC se resolvieron por RHPLC-ELSD y la radiactividad incorporada en cada una se determinó como se detalló en *Métodos*. En la figura solo se representan las EM de FC que poseen 20:4n-6 en su molécula. El inserto en la figura muestra los datos obtenidos para las EM minoritarias 18:2-20:4, 18:1-20:4, 16:0-20:4 y 18:0-20:4 en una escala expandida. Los resultados representan la media $\pm$ ES de 5

La primera barra de cada conjunto de datos -EM de FC- corresponde a la distribución de la radiactividad en las EM de FC que poseen 20:4n-6 luego de la incubación de los N en presencia de [1-¹⁴C]20:4n-6-CoA durante 10 minutos, condiciones control. Estos resultados fueron analizados en el capítulo anterior de *Resultados* (Figura 5.11). Cada una de las demás barras en cada EM de FC corresponde a las condiciones de reincubación.

En la Figura 5.13 se observa que la mayor AE de esterificación del [1-¹⁴C]20:4n-6-CoA se encontró en la EM de FC nuclear minoritaria en masa, 20:4-20:4. Esta AE de esterificación solo disminuyó cuando los N se reincubaron en presencia de ATP y CoA en el MI. Estos cofactores son necesarios para la activación de los AG por actividad de la ACS a los correspondientes acil-CoAs que serán luego metabolizados.

Cuando se reincubaron los N sin ATP y CoA la radiactividad incorporada en las EM de FC 18:2-20:4 y 18:1-20:4 disminuyó. Estos datos sugieren que los AG 18:2 y 18:1 en la posición *sn*-1 de estas EM de FC se habrían hidrolizado para ser rápidamente reemplazados por otros AG fríos ya que dicha disminución no se evidencia por un incremento en el pool de lisoFC.

La radiactividad incorporada en la EM de FC 18:0-20:4, mayoritaria en masa, se incrementó en todas las condiciones testeadas mientras que el aumento de la radiactividad en la EM 16:0-20:4 no siempre fue significativo. Estos datos indicarían que se utiliza 18:0 y 16:0 fríos del pool de AG nuclear para la reesterificación de la posición *sn*-1 del pool marcado de 2-araquidonil-lisoFC, el cual se generaría por hidrólisis de las EM de FC diinsaturadas 20:4-20:4, 18:2-20:4 y 18:1-20:4, que son las que presentaron una disminución en la radiactividad. Es importante considerar que los AG fríos palmítico y esteárico constituyen los AG saturados mayoritarios del pool de AGL nuclear siendo el 18.5 % y 25.0 % respectivamente (Tabla 5.2).

En conclusión, al reincubar N celulares que poseen las EM de FC marcadas radiactivamente con [1-¹⁴C]20:4n-6-CoA en un MI frío sin ATP

y CoA se observa que la radiactividad disminuye en las EM que poseen un AG insaturado en posición *sn*-1 (18:2 y 18:1) y aumenta en las EM que poseen un AG saturado en esa misma posición, principalmente en la EM 18:0-20:4. Cuando la reincubación de los N marcados se realiza en un MI con ATP y CoA la radiactividad solo disminuye en la EM 20:4-20:4 y se incrementa en las EM de FC 18:0-20:4 y 16:0-20:4.

Estos resultados demuestran que en un principio se marcarían las EM de FC que poseen 20:4n-6 con un patrón de distribución de la radiactividad que no se corresponde con el fisiológico. Posteriormente, existiría un proceso de remodelado de los AG de las EM de FC mediante el que se reemplazaría al AG insaturado de la posición *sn*-1 por un AG saturado.

A partir de estos resultados la siguiente hipótesis de trabajo planteada fue:

- para que se complete el remodelado de los AG en los lípidos nucleares se necesitan mas factores que, en condiciones fisiológicas, serían aportadas por el citosol que rodea al N celular.

La siguiente condición de reincubación ensayada se realizó en presencia de medio de incubación frío, durante 80 min, con proteínas citosólicas y con o sin el agregado de ATP y CoA.

Se eligió trabajar con un tiempo de reincubación de 80 min ya que solo a ese tiempo disminuyó la marca radiactiva en la EM de FC nuclear 20:4-20:4, que es la que posee la mayor AE de esterificación del [1-¹⁴C]20:4n-6-CoA (Figura 5.13).

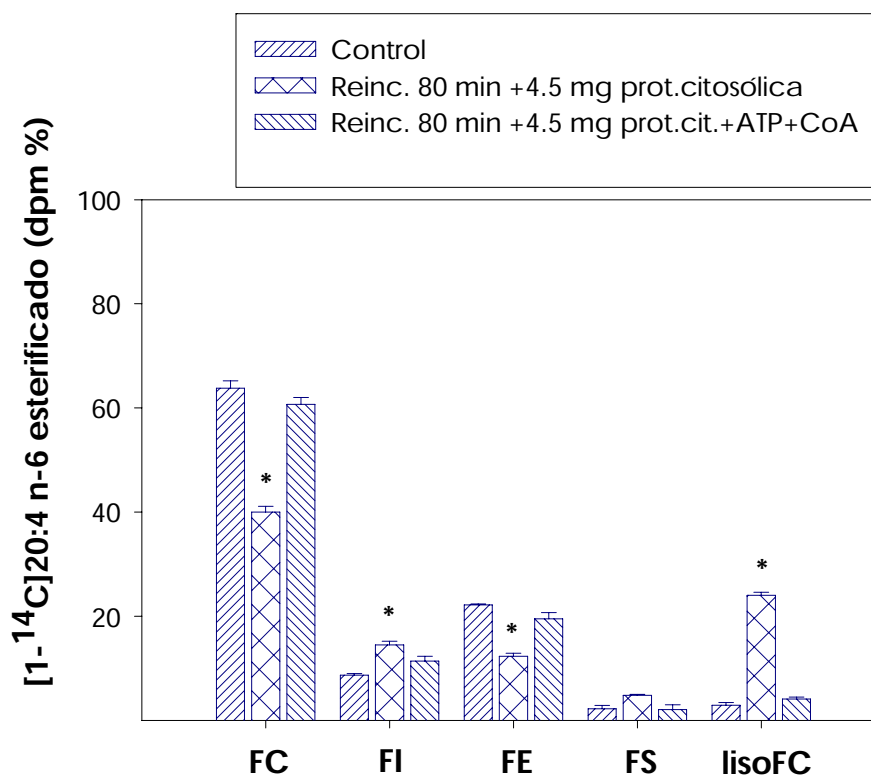


Fig. 5.14. Redistribución del $[1-^{14}\text{C}]20:4n-6\text{-CoA}$ en los FL nucleares. Los pools fosfolipídicos nucleares de 20:4n-6 se marcaron radiactivamente incubando N celulares de hígado de rata en presencia de $[1-^{14}\text{C}]20:4n-6\text{-CoA}$ durante 10 min (control). Los núcleos se separaron del MI por centrifugación y, posteriormente, se reincubaron durante 80 min en un MI con citosol, sin $[1-^{14}\text{C}]20:4n-6\text{-CoA}$ y con, o sin, ATP y CoA. Finalizada la incubación los N se separaron del MI por centrifugación, los lípidos se extrajeron por el método de Folch, las diferentes clases de FL se separaron por TLC y la radiactividad incorporada en cada una se determinó como se detalló en *Métodos*. Los resultados se expresan como porcentaje de la radiactividad total y representan la media $\pm$ ES de 5 experimentos. Diferencias significativas respecto del control: * $P < 0.001$.

En la Figura 5.14 se observa la distribución de la radiactividad esterificada en los FL nucleares luego de la reincubación de los N celulares durante 80 min, en presencia de citosol y con o sin el agregado de ATP y CoA al MI.

La primera barra de cada conjunto de datos -clase de FL- corresponde a la distribución de la radiactividad en los pools

fosfolipídicos que poseen AA luego de la incubación de los N en presencia de $[1-^{14}\text{C}]20:4\text{n-6-CoA}$ durante 10 minutos, condiciones control. Estos resultados fueron analizados en el capítulo anterior de *Resultados* (Figura 5.9). Cada una de las demás barras en cada clase de FL corresponde a las condiciones de reincubación.

Cuando los N se reincubaron 80 min con el agregado de citosol al MI se observó una disminución de la radiactividad incorporada en FC y un aumento de la misma en lisoFC. Estos resultados nos indican que se hidrolizó FC por acción de las enzimas *fosfolipasa A₁* (*PLA₁*) y/o *A₂* (*PLA₂*) aportadas por el citosol, así como los factores necesarios para dicha actividad enzimática. En estas condiciones experimentales también se observó una disminución de la marca en FE; este hecho podría deberse a que la FE se haya hidrolizado a lisoFE, pero la última en este sistema no se puede cuantificar.

Con el agregado simultaneo de ATP, CoA -cofactores necesarios para la actividad de la enzima ACS- y citosol al MI no se observaron cambios significativos en la radiactividad incorporada respecto del control, en ninguna clase de FL nuclear. La presencia de los factores antes mencionados en el MI permitiría la activación de los AGL por acción de la *Acil-CoA sintetasa* a los correspondientes acil-CoAs, que se esterificarían luego en los FL por acción de *aciltransferasas*, reestableciéndose de esta manera los niveles de incorporación del $20:4\text{n-6-CoA}$ en la FC y la FE observados en el control.

En conclusión, estos resultados demuestran que el núcleo aislado de células hepáticas carece de la actividad y/o la presencia de ciertas enzimas (como *PLA₁* y *PLA₂*, *aciltransferasas*, etc), factores solubles, ATP y CoA necesarios para el remodelado de AG en los FL.

La siguiente etapa fue estudiar la redistribución de la radiactividad en las EM de FC nuclear.

En la Figura 5.15 se observa la incorporación y redistribución de la radiactividad en las EM de FC que poseen $20:4\text{n-6}$, luego de reincubar

los N celulares durante 80 min con 2 concentraciones de citosol y con o sin ATP y CoA.

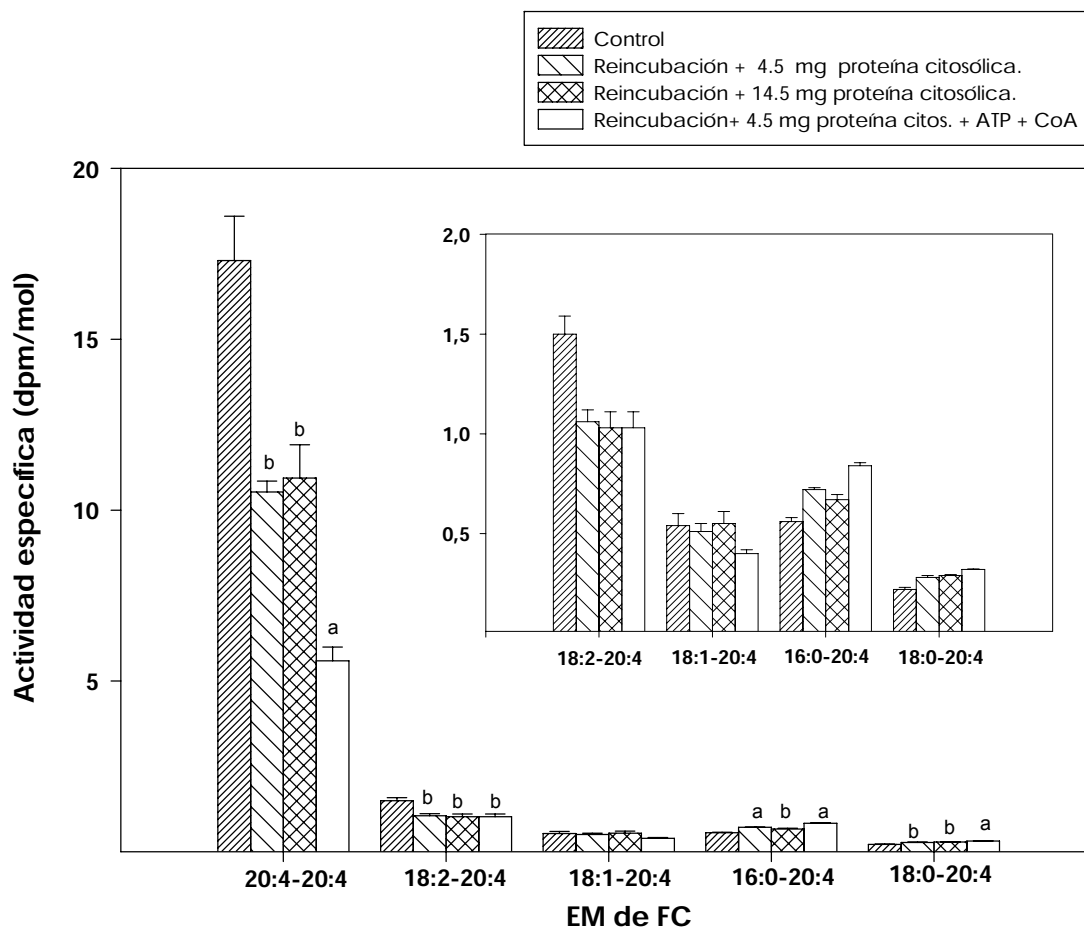


Fig. 5.15. Redistribución del [1-¹⁴C]20:4n-6-CoA en las EM de FC de núcleos celulares de hígado de rata. Las EM de FC nuclear que poseen 20:4n-6 se marcaron radiactivamente incubando los N en presencia de [1-¹⁴C]20:4n-6-CoA durante 10 min, seguido de una reincubación en un medio sin [1-¹⁴C]20:4n-6-CoA durante 80 min con citosol y con o sin ATP y CoA. Finalizada la incubación los N se separaron del MI por centrifugación, los lípidos se extrajeron por el método de Folch, las EM de FC se resolvieron por RHPLC-ELSD y la radiactividad incorporada en cada una se determinó como se detalló en *Métodos*. En la figura solo se representan las EM de FC que poseen 20:4n-6 en su molécula. El inserto en la figura muestra los datos obtenidos para las EM minoritarias 18:2-20:4, 18:1-20:4, 16:0-20:4 y 18:0-20:4 en una escala expandida. Los resultados representan la media $\pm$ ES de 5 experimentos. Diferencias significativas respecto del control: ^aP < 0.001; ^bP < 0.01.

La primera barra de cada conjunto de datos -EM de FC- corresponde a la distribución de la radiactividad en las EM de FC que poseen 20:4n-6 luego de la incubación de los N en presencia de [1-¹⁴C]20:4n-6-CoA durante 10 minutos, condiciones control. Estos resultados fueron analizados en el capítulo anterior de *Resultados* (Figura 5.11). Cada una de las demás barras en cada EM de FC corresponde a las condiciones de reincubación.

En la Figura 5.15 se observa que la AE de esterificación del [1-¹⁴C]20:4n-6-CoA en las EM de FC 20:4-20:4 y 18:2-20:4 disminuyó en las tres condiciones de reincubación ensayadas, esto es con el agregado de dos concentraciones de citosol en el MI, con o sin ATP y CoA. En estas condiciones de reincubación se observó también un incremento de la AE de esterificación en las EM 16:0-20:4 y 18:0-20:4; en la EM de FC minoritaria en masa 18:1-20:4 no se observó ningún cambio en la radiactividad esterificada.

Estos resultados indicarían que en presencia de citosol se utiliza 18:0 y 16:0 fríos del pool de AG nuclear y/o citosólico para la reesterificación de la posición *sn*-1 del pool marcado de 2-araquidonil-lisoFC, el cual se generaría por hidrólisis de las EM de FC diinsaturadas 20:4-20:4 y 18:2-20:4. Cabe mencionar que los AG palmítico y esteárico son los AG saturados mayoritarios tanto del pool de AGL nuclear (Tabla

5.2) como citosólico. El agregado de ATP y CoA al MI determina que las observaciones recién mencionadas sean aún mas significativas.

Los resultados presentados en este capítulo implicarían que el [1-¹⁴C]20:4n-6-CoA exógeno en un principio se esterifica en las EM de FC que poseen un AG insaturado en posición *sn*-1 (20:4 n-6, 18:2n-6 y 18:1) y el AA en posición *sn*-2. Este perfil de distribución de la radiactividad no sería fisiológico. Posteriormente, el perfil típico de EM de FC nuclear hepática, caracterizado por una distribución asimétrica de los AG (esto es un AG saturado en posición *sn*-1 de la molécula y un AG insaturado en posición *sn*-2) se reestablecería por un proceso de remodelado dependiente de factores citosólicos, ATP y CoA. Mediante este proceso los AG insaturados de posición *sn*-1 se reemplazan por los AG saturados 16:0 y 18:0, provistos por el pool de AGL nuclear y/o citosólico.

5.5. Rol de la L-FABP en la incorporación de ácidos grasos saturados e insaturados en los pools lipídicos nucleares y endonucleares de células de hígado de rata

En los resultados presentados previamente se demostró que los acil-CoAs y los AG exógenos saturados e insaturados, se esterifican y remodelan en los pools lipídicos nucleares mediante un mecanismo acil-CoA dependiente.

Estos resultados fueron obtenidos incubando *in vitro* núcleos aislados de células de hígado de rata y, en algunos casos, suplementando el medio de incubación con citosol. En particular, el remodelado de AG de la FC nuclear se completa en presencia de citosol, además de ATP y CoA. Esto podría deberse a que el citosol aporta, además de enzimas y cofactores, las FABPs al MI; se sabe que, en condiciones fisiológicas, los AG se desplazan por la célula principalmente unidos a las FABPs. Este mecanismo involucraría a los AG citosólicos y a los nucleares ya que la L-FABP se ha descrito tanto en el citosol como en el interior del N celular.

El siguiente objetivo planteado fue estudiar el rol L-FABP en los procesos de incorporación de los ácidos grasos saturados e insaturados en los pools lipídicos nucleares.

Como modelo experimental se eligió trabajar con núcleos y matrices nucleares aislados de células de hígado de rata, incubándolos *in vitro* con los AG [1-¹⁴C]18:0 y [1-¹⁴C]20:4 n-6, libres o unidos a la L-FABP, con ATP y CoA en el MI.

Se eligieron los AG esteárico y araquidónico por ser los AG saturado e insaturado mayoritarios de los pools lipídicos nucleares y endonucleares (Tabla 5.2) de células de hígado de rata. Se trabajó con una concentración de AG y de L-FABP de 2 μ M de modo de tener el

sitio de unión de alta afinidad de la L-FABP saturado con el AG, como se explicó en *Métodos*.

5.5.1. Incorporación del ácido [1-¹⁴C]18:0 unido a L-FABP (18:0:L-FABP) en las diferentes clases de lípidos nucleares

5.5.1.1. Incorporación de 18:0:L-FABP en las clases lipídicas nucleares

Se estudió la incorporación y esterificación del ácido [1-¹⁴C]18:0 unido a L-FABP en los pools lipídicos nucleares incubando "*in vitro*" núcleos aislados de células de hígado de rata en presencia de [1-¹⁴C]18:0 o [1-¹⁴C]18:0:L-FABP, ATP y CoA.

En la Figura 5.16 se muestra la distribución de la radiactividad incorporada en los lípidos nucleares, en función del tiempo de incubación.

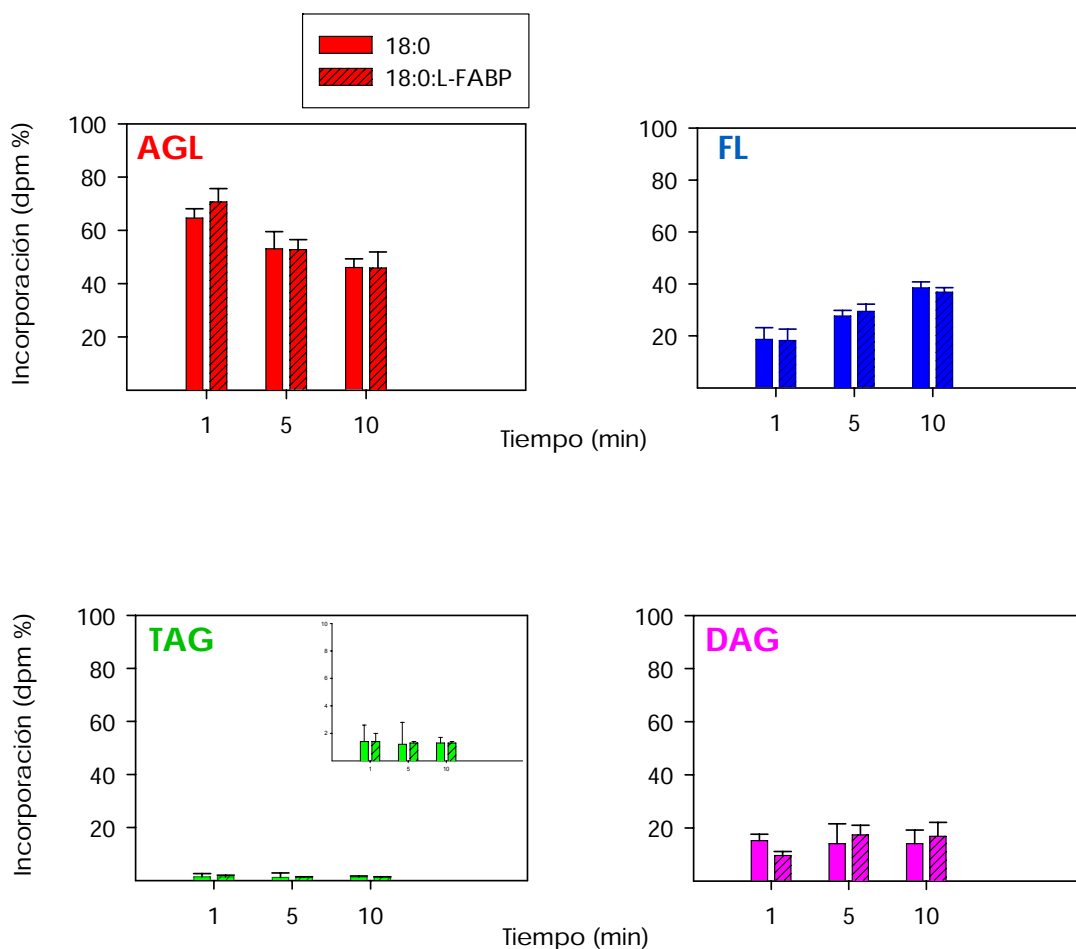


Fig. 5.16. Distribución del ácido $[1-^{14}\text{C}]18:0\text{:L-FABP}$ en las diferentes clases de lípidos nucleares. Los núcleos celulares de hígado de rata se incubaron en presencia de ácido $[1-^{14}\text{C}]18:0$, libre o unido a L-FABP, ATP y CoA durante diferentes tiempos. Los núcleos se separaron del MI por centrifugación. Los LT se extrajeron, las diferentes clases lipídicas se separaron por TLC y la radiactividad incorporada en las mismas se determinó como se describió en *Métodos*. Los resultados se expresan como porcentaje de la radiactividad total incorporada y

En la Figura 5.16 se observa que inicialmente el ácido $[1-^{14}\text{C}]18:0\text{:L-FABP}$ se esterificó en los FL (18%) y en los DAG (12%) y se incorporó mayoritariamente como AGL (68%) en los N celulares de hígado de rata.

Luego de 10 minutos de incubación la radioactividad incorporada como AGL disminuyó (45%) ya que el sustrato radiactivo continuó esterificándose en los FL (37%).

La esterificación en los DAG se saturó desde el inicio de la incubación y la esterificación en los TAG fue muy baja durante todo el tiempo de incubación (1%).

En conclusión, el ácido [1-¹⁴C]18:0:L-FABP se incorpora y esterifica en los pools lipídicos nucleares con el mismo patrón que el [1-¹⁴C]18:0, ya que no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos.

En los resultados presentados previamente se demostró que la esterificación de los AG 18:0n-6, 20:4n-6 y 18:2 en los lípidos nucleares se realiza a través de un mecanismo acil-CoA dependiente (Tabla 5.6). Por lo tanto, con el objetivo de determinar si la esterificación de los AG unidos a L-FABP es también dependiente de ATP y CoA, se procedió a incubar "*in vitro*" núcleos aislados de células de hígado sin ATP y CoA en el MI.

Tabla 5.7. Efecto del ATP y CoA en la incorporación de [1-¹⁴C]18:0 y [1-¹⁴C]20:4n-6, libres o unidos a L-FABP, en los lípidos nucleares y endonucleares.

Fracción nuclear	Radiactividad incorporada como AGL (dpm %)							
	Núcleos				Matriz nuclear			
	[1- ¹⁴ C]AG		[1- ¹⁴ C]AG		[1- ¹⁴ C]AG		[1- ¹⁴ C]AG	
	AGL	AG:L-FABP	AGL	AG:L-FABP	AGL	AG:L-FABP	AGL	AG:L-FABP
Con ATP y CoA	46	46	30	27	32	28	70	65
Sin ATP y CoA	100	100	100	100	100	100	100	100

Los N celulares y las Mx de hígado de rata se incubaron con [1-¹⁴C]18:0, [1-¹⁴C]18:0:L-FABP, [1-¹⁴C]20:4n-6 o [1-¹⁴C]20:4n-6:L-FABP, con o sin ATP y CoA durante 10 min. Los resultados se presentan como el porcentaje de la radiactividad total incorporada como AGL en los lípidos nucleares y endonucleares (Nc).

En la Tabla 5.7 se observa que cuando las incubaciones se realizaron sin el agregado de ATP y CoA en el MI el [1-¹⁴C]18:0:L-FABP se

incorporó exclusivamente como AGL (100%) y no se esterificó en ningún pool lipídico nuclear.

El resto de los resultados presentados en esta Tabla se analizará mas adelante, en el item correspondiente.

5.5.1.2. Esterificación de 18:0:L-FABP en los FL nucleares

En la Figura 5.17 se muestra la distribución de la radiactividad esterificada en los FL nucleares en presencia de ATP y CoA, en función del tiempo de incubación.

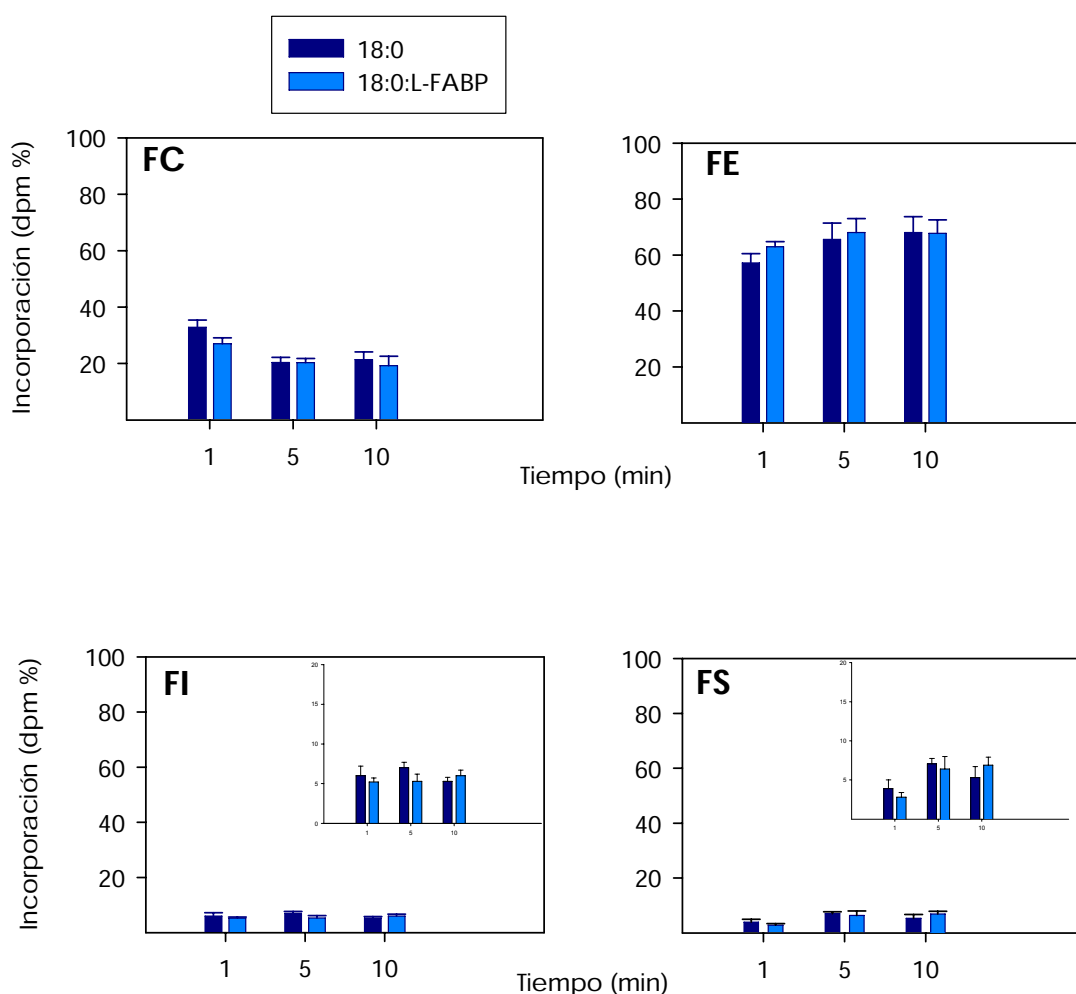


Fig. 5.17. Esterificación del ácido $[1-^{14}\text{C}]18:0\text{:L-FABP}$ en los FL nucleares. Los N celulares de hígado de rata se incubaron en presencia de ácido $[1-^{14}\text{C}]18:0$, libre o unido a L-FABP, ATP y CoA durante diferentes tiempos. Los núcleos se separaron del MI por centrifugación. Los LT se extrajeron, las diferentes clases fosfolipídicas se separaron por TLC y la radiactividad incorporada en las mismas se determinó como se describió en *Métodos*. Los resultados se expresan como porcentaje de la radiactividad total incorporada en los FL y representan la media $\pm$ ES de 5 experimentos independientes.

En la Figura 5.17 se observa que el $[1-^{14}\text{C}]18:0\text{:L-FABP}$ se esterificó mayoritariamente en la FE (60 – 70%), seguida por la FC (20 – 30%) y, en muy baja proporción, en el pool de FI (6%) y de PS (5%). Estos porcentajes de esterificación del $[1-^{14}\text{C}]18:0\text{:L-FABP}$ en cada FL nuclear no se correspondieron con las masas relativas de cada uno de ellos ya

que, por ejemplo, la FE fue el FL en el que el 18:0 se esterificó en mayor proporción, si bien este no es el FL nuclear mayoritario.

En la Tabla 5.8 se muestra la actividad específica de esterificación del $[1-^{14}\text{C}]18:0$ libre o unido a L-FABP, en los FL nucleares y endonucleares en presencia de ATP y CoA.

Para calcular los datos de la Tabla se consideró que el N celular de hígado de rata se caracteriza por poseer 39.2 ± 0.1 nmol FL.mg prot.⁻¹ y la siguiente composición fosfolipídica: FC (64%), FE (22%), FI (10%), SM (1.9%) y FS (1.6%) (Tabla 5.1).

Por otro lado, las Mx de células de hígado de rata poseen 8.5 ± 0.01 nmol FL.mg prot.⁻¹, y la siguiente composición fosfolipídica: FC (43%), FE (20%), FI (9%), SM (9%), FS (8%) y lisoFC (11%) (estos resultados se analizan más adelante, en los ítems correspondientes a Mx).

Tabla 5.8. Actividad específica de esterificación del [1-¹⁴C]18:0, libre o unido a L-FABP, en los FL nucleares y endonucleares.

Núcleos enteros (N)								
Clase de FL	FC		FE		FI		FS	
	AGL	AG: L-FABP	AGL	AG: L-FABP	AGL	AG: L-FABP	AGL	AG: L-FABP
[1- ¹⁴ C]18:0								
Tiempo (min)	<i>pmol incorp.nmol c/FL⁻¹</i>							
1	1.09±0.34	0.89±0.28	5.56±1.66	6.09±1.61	1.35±0.60	1.17±0.39	4.90±2.56	3.50±1.57
5	0.96±0.16	1.01±0.17	9.09±1.49	9.97±1.65	2.25±0.40	1.80±0.47	12.62±2.21	12.13±4.14
10	1.38±0.26	1.22±0.27	12.93±1.86	12.69±1.48	2.34±0.36	2.60±0.42	13.03±4.22	16.68±3.19
Matriz nuclear (Mx)								
Clase de FL	FC		FE		FI		FS	
	AGL	AG: L-FABP	AGL	AG: L-FABP	AGL	AG: L-FABP	AGL	AG: L-FABP
[1- ¹⁴ C]18:0								
Tiempo (min)	<i>pmol incorp.nmol c/FL⁻¹</i>							
1	10.19±2.93	6.44±2.40	70.79±15.24	51.97±15.58	32.57±11.37	21.63±6.98	25.23±3.80	15.00±3.35
5	12.76±1.18	8.32±1.73	106.09±8.43	81.26±16.78	24.05±2.92	24.51±5.45	17.66±2.18	14.09±5.56
10	9.27±1.60	8.47±1.64	87.09±12.24	118.89±12.17	16.08±5.22	18.77±2.95	18.71±5.59	17.20±2.21

Los N y las Mx de hígado de rata se incubaron en presencia de ácido [1-¹⁴C] 18:0, libre o unido a L-FABP, ATP y CoA durante diferentes tiempos. Los resultados se expresan como *pmol incorporado. nmol c/FL⁻¹* y representan la media ± ES de 5 experimentos independientes.

En la Tabla 5.8 se observa que la AE de esterificación del AG 18:0 unido a L-FABP en los FL nucleares no presentó diferencias significativas respecto del libre. La mayor AE de esterificación la presentaron los pools nucleares de FE y FS, seguidos por FI y FC. Este resultado significaría que el AG 18:0 se esterifica selectivamente en la FE y FS nuclear.

En las condiciones experimentales elegidas el [1-¹⁴C]18:0:L-FABP no se esterificó en el pool nuclear de SM. Este resultado es difícil de explicar ya que las especies moleculares de SM se caracterizan por tener esterificado un ácido graso saturado o monoinsaturado. Además, el ácido 18:0 se esterificó en la FS que es un FL que se encuentra en el mismo porcentaje que la SM en el núcleo, con lo que se podría descartar que la no esterificación del 18:0 en la SM se deba al bajo % de este FL en el N celular.

5.5.2. Incorporación del ácido [1-¹⁴C]20:4n-6 unido a L-FABP (20:4:L-FABP) en las diferentes clases de lípidos nucleares

5.5.2.1. Incorporación de 20:4:L-FABP en las clases lipídicas nucleares

Se estudió la incorporación y esterificación del ácido [1-¹⁴C]20:4n-6 unido a L-FABP en los pools lipídicos nucleares incubando *in vitro* núcleos aislados de células de hígado de rata en presencia de [1-¹⁴C]20:4n-6 o [1-¹⁴C]20:4n-6:L-FABP, ATP y CoA.

En la Figura 5.18 se muestra la distribución de la radiactividad incorporada en los lípidos nucleares, en función del tiempo de incubación.

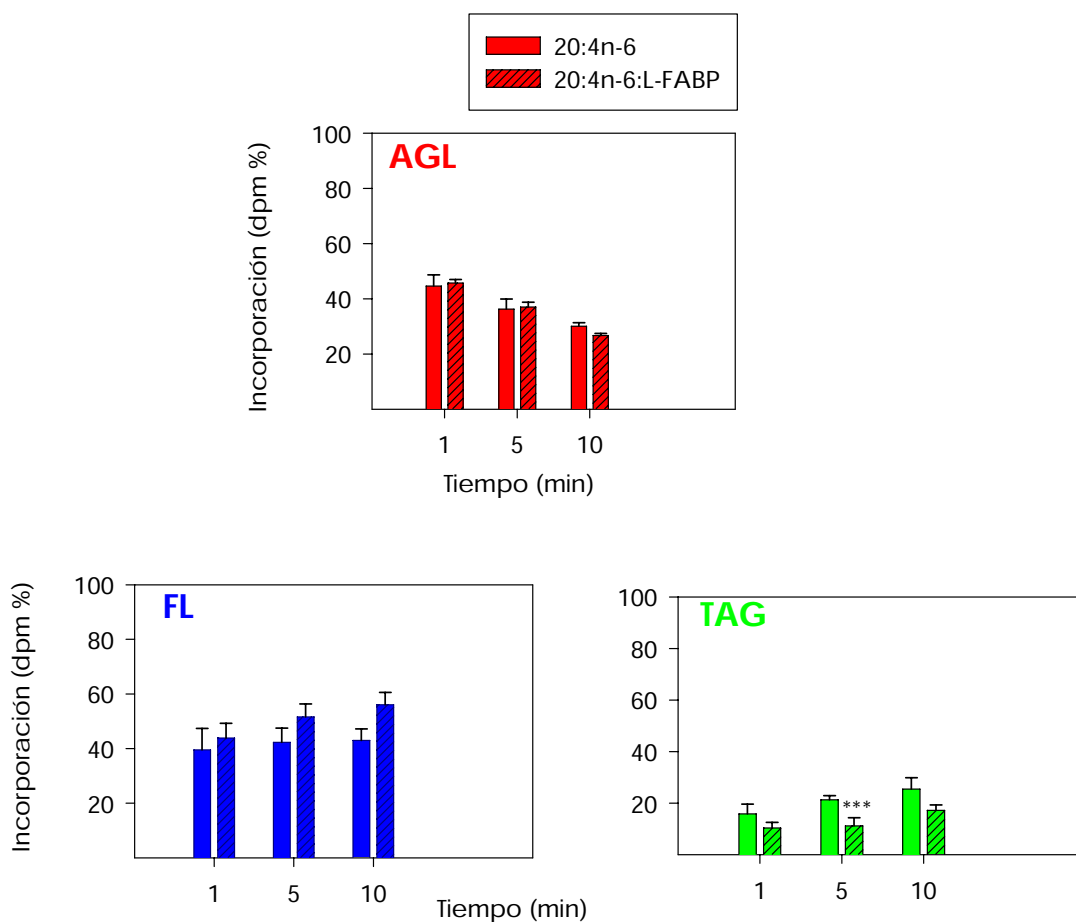


Fig. 5.18. Distribución del ácido $[1-^{14}\text{C}]$ 20:4n-6:L-FABP en las diferentes clases de lípidos nucleares. Los N celulares de hígado de rata se incubaron en presencia de ácido $[1-^{14}\text{C}]$ 20:4 n-6, libre y unido a L-FABP, ATP y CoA durante diferentes tiempos. Los núcleos se separaron del MI por centrifugación. Los LT se extrajeron, las diferentes clases lipídicas se separaron por TLC y la radiactividad incorporada en las mismas se determinó como se describió en *Métodos*. Los resultados se expresan como porcentaje de la radiactividad total incorporada y representan la media $\pm$ ES de 5 experimentos. Los datos fueron analizados con el test *t* de Student. Diferencias significativas entre el 20:4 n-6 libre y unido a L-FABP: ***P < 0.05.

En la Figura 5.18 se observa que inicialmente el ácido $[1-^{14}\text{C}]$ 20:4n-6:L-FABP se esterificó mayoritariamente en los FL (40%), seguido por los TAG (15%) y se incorporó directamente como AGL (45%). No se observó radiactividad incorporada en el pool de DAG nuclear.

A los 5 minutos de incubación, el ácido [1-¹⁴C]20:4n-6:L-FABP se esterificó en menor proporción en los TAG nucleares respecto del ácido libre. Este resultado no se observó al final del tiempo de incubación.

Luego de 10 minutos de incubación la radiactividad incorporada en el pool de AGL disminuyó (30%) a medida que el ácido [1-¹⁴C]20:4n-6 continuó esterificándose en los FL (50 %) y en los TAG (20%).

Cuando las incubaciones se realizaron sin el agregado de ATP y CoA en el MI el [1-¹⁴C]20:4:L-FABP se incorporó exclusivamente como AGL (100%) y no se esterificó en ningún pool lipídico nuclear (Tabla 5.7).

5.5.2.2. Esterificación de 20:4:L-FABP en los FL nucleares

En la Figura 5.19 se muestra la distribución de la radiactividad esterificada en los FL nucleares en presencia de ATP y CoA, en función del tiempo de incubación.

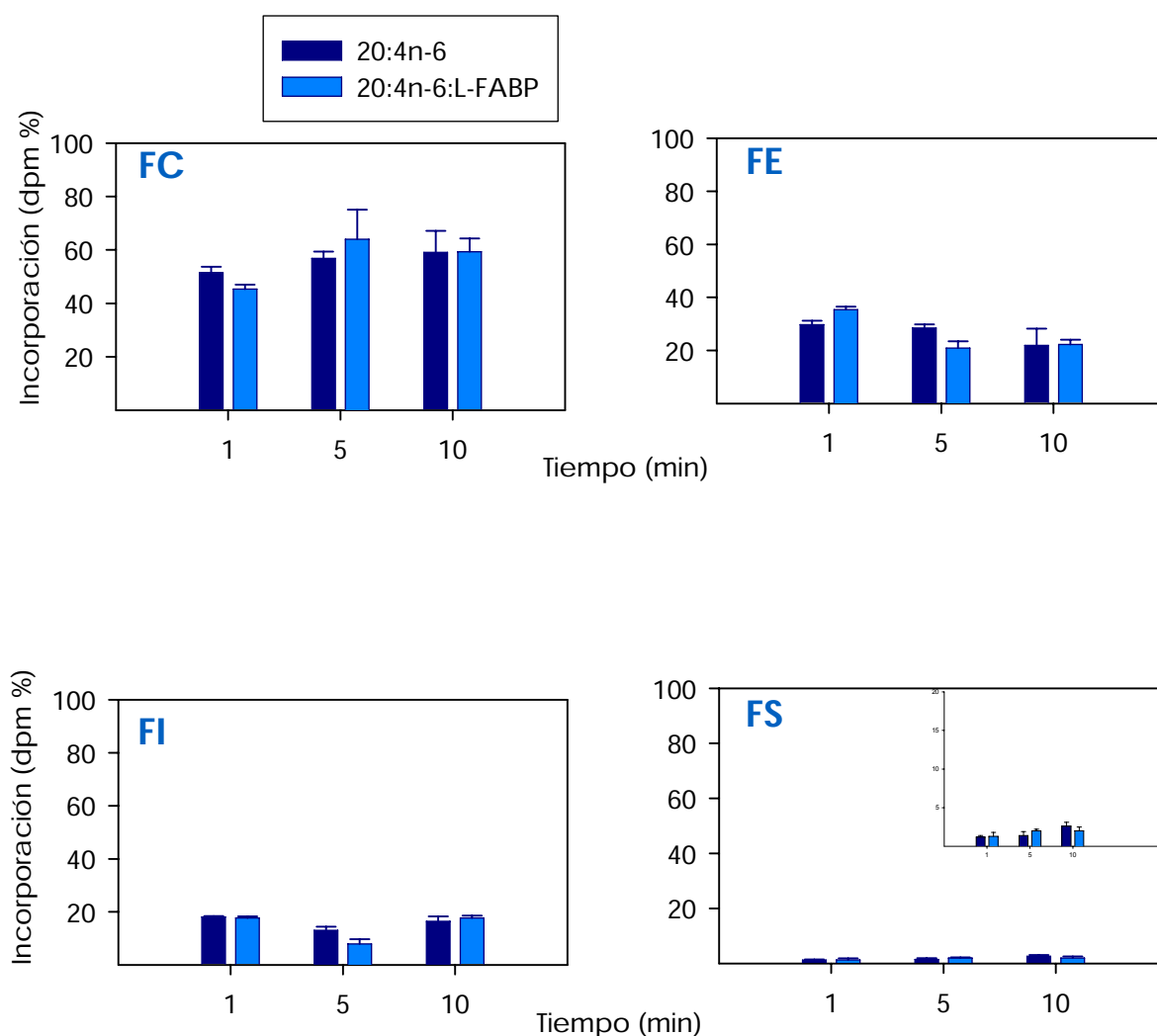


Fig. 5.19. Esterificación del ácido $[1-^{14}\text{C}]20:4n-6:L\text{-FABP}$ en los FL nucleares. Los Nucleos de hígado de rata se incubaron en presencia de ácido $[1-^{14}\text{C}] 20:4 n-6$, libre y unido a L-FABP, con ATP y CoA, durante diferentes tiempos. Los núcleos se separaron del MI por centrifugación. Los LT se extrajeron, las diferentes clases fosfolipídicas se separaron por TLC y la radiactividad incorporada en las mismas se determinó como se describió en *Métodos*. Los resultados se expresan como porcentaje de la radiactividad total incorporada en los FL y representan la media $\pm$ ES de 5 experimentos.

En la Figura 5.19 se observa que el $[1-^{14}\text{C}]20:4n-6:L\text{-FABP}$ se esterificó con la siguiente distribución de la radiactividad: FC (50-60%), FE (20-30%), FI (aproximadamente 15%) y FS (1-2%). No se observaron

diferencias significativas cuando el 20:4 n-6 se encontraba libre o unido a L-FABP en ninguna clase de FL nuclear.

En las condiciones de incubación ensayadas el ácido [1-¹⁴C]20:4n-6:L-FABP no se esterificó en el pool nuclear de SM. Esto se debería a que el perfil de especies moleculares de SM presenta, de manera característica, AG saturados o monoinsaturados en su molécula, pero no polinosaturados.

En la Tabla 5.9 se muestra la actividad específica de esterificación del [1-¹⁴C]20:4n-6 libre o unido a L-FABP, en los FL nucleares y endonucleares en presencia de ATP y CoA.

Tabla 5.9. Actividad específica de esterificación de [1-¹⁴C]20:4 n-6, libre o unido a L-FABP, en los FL nucleares y endonucleares.

Núcleos enteros (N)								
Clase de FL	FC		FE		FI		FS	
[1- ¹⁴ C]20:4	AGL	AG: L-FABP	AGL	AG: L-FABP	AGL	AG: L-FABP	AGL	AG: L-FABP
Tiempo (min)	pmol incorp. nmol c/FL ⁻¹							
1	2.83±0.69	2.59±0.41	4.81±1.13	5.96±0.92	6.77±1.50	6.91±1.08	2.51±0.92	2.83±1.44
5	3.65±0.62	4.56±1.22	5.40±0.93	4.39±0.95	5.76±1.28	3.85±1.24	3.43±1.65	5.43±1.05
10	4.00±0.93	4.33±0.71	4.37±1.68	4.80±0.77	7.59±1.62	8.83±1.16	6.71±1.95	5.56±1.84
Matriz nuclear (Mx)								
Clase de FL	FC		FE		FI			
[1- ¹⁴ C]20:4	AGL	AG: L-FABP	AGL	AG: L-FABP	AGL	AG: L-FABP		
Tiempo (min)	pmol incorp. nmol c/FL ⁻¹							
1	7.89±1.44	8.74±1.58	8.22±1.80	12.47±2.99	11.29±3.70	14.23±3.08		
5	14.93±2.14	12.03±0.92	16.81±2.45	12.15±2.55	24.45±4.26	30.13±3.85		
10	12.27±2.14	12.87±0.85	10.96±2.10	16.57±1.64	16.48±2.94	28.28±3.09***		

Los N y las Mx de hígado de rata se incubaron en presencia de ácido $[1-^{14}\text{C}]20:4\text{n-6}$, libre o unido a L-FABP, ATP y CoA durante diferentes tiempos. Los resultados se expresan como *pmol incorporado. nmol c/FL⁻¹* y representan la media $\pm$ ES de 5 experimentos independientes.

La AE de esterificación del [1-¹⁴C]20:4n-6 libre o unido a L-FABP en el FI nuclear prácticamente duplica las AE observadas en la FC y la FE, luego de 10 min de incubación.

Es interesante observar que la AE de esterificación del 20:4 respecto del 18:0 en los FL nucleares son muy contrastantes. Es así que el AA se esterifica con mayor AE en el FI, seguido de la FS y, con menor AE, en la FE y la FC (Tabla 5.9) mientras que, para el AG 18:0, la mayor AE corresponde a la FS, seguida de FE, FI y FC (Tabla 5.8).

5.5.3. Incorporación del ácido [1-¹⁴C]18:0 libre o unido a L-FABP (18:0:L-FABP) en las diferentes clases de lípidos endonucleares

5.5.3.1. Incorporación de 18:0 y 18:0:L-FABP en las clases lipídicas endonucleares

Se estudió la incorporación y esterificación del ácido [1-¹⁴C]18:0 libre y unido a L-FABP en los pools lipídicos endonucleares, incubando *in vitro* Mx en presencia de [1-¹⁴C]18:0 o [1-¹⁴C]18:0:L-FABP, ATP y CoA.

Las matrices nucleares se aislaron eliminando la doble membrana nuclear con TX-100 0.08 % (p/v), como se indicara previamente.

En la Figura 5.21 se muestra la distribución de la radiactividad incorporada en los lípidos endonucleares, en función del tiempo de incubación.

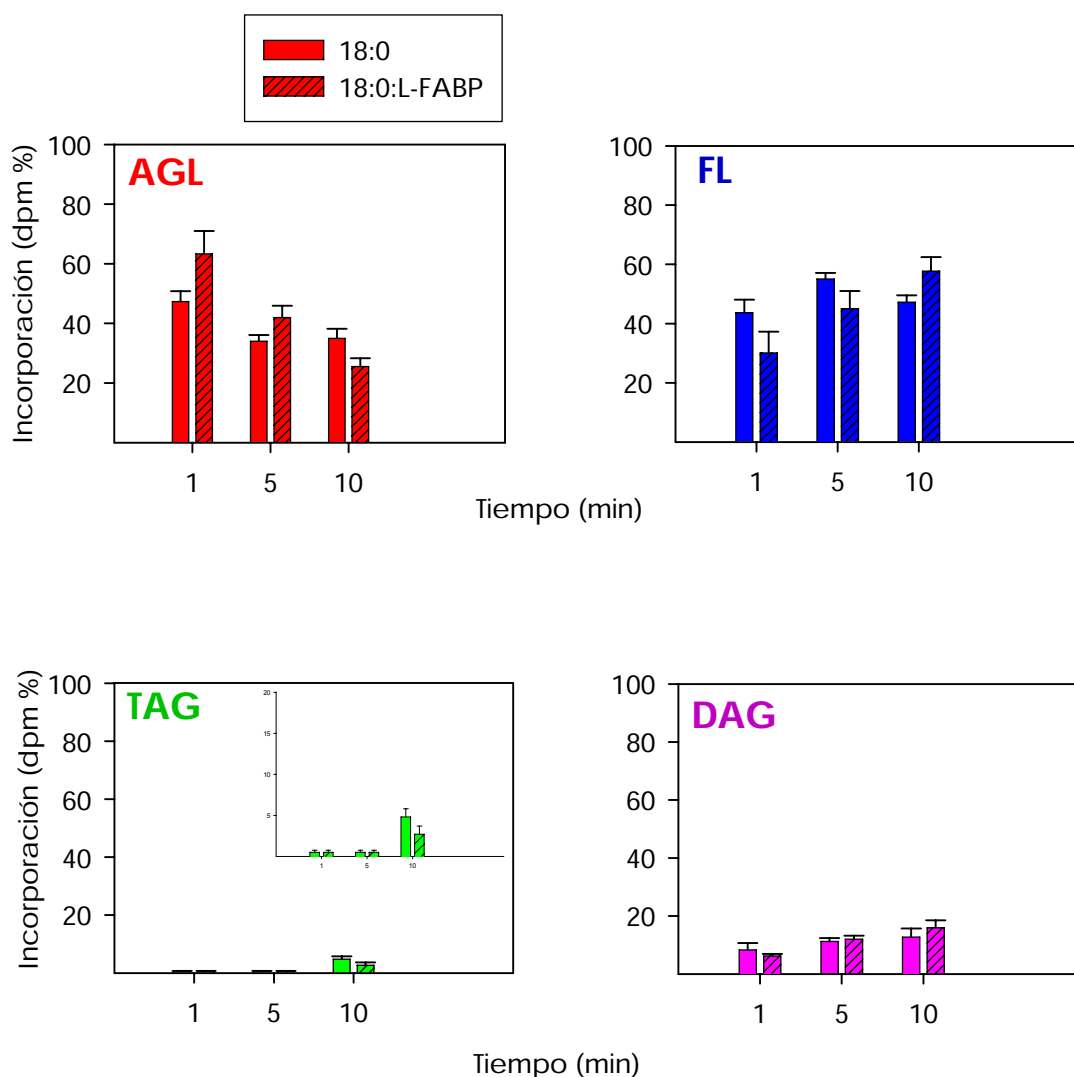


Fig. 5.21. Distribución del ácido $[1-^{14}\text{C}]18:0$ y $[1-^{14}\text{C}]18:0\text{:L-FABP}$ en las diferentes clases de lípidos endonucleares. Las Mx de hígado de rata se incubaron en presencia de ácido $[1-^{14}\text{C}]18:0$, libre o unido a L-FABP, ATP y CoA durante diferentes tiempos. Las Mx se separaron del MI por centrifugación. Los LT se extrajeron, las diferentes clases lipídicas se separaron por TLC y la radiactividad incorporada en las mismas se determinó como se describió en *Métodos*. Los resultados se expresan como porcentaje de la radiactividad total incorporada y representan la media $\pm$ ES de 5 experimentos.

En la figura 5.21 se observa que inicialmente el ácido 18:0 libre o ligado a L-FABP se esterificó mayoritariamente en los FL (30 - 40%), en

baja proporción en los DAG (7%) y el resto se incorporó directamente como AGL (50 –60%).

Luego de 10 minutos de incubación, la radioactividad incorporada como AGL disminuyó ya que el sustrato radiactivo continuó esterificándose en los FL (50 - 60%), en los DAG (15%) y en los TAG (3 – 5%).

El hecho de que el ácido 18:0 estuviera libre o unido a la L-FABP no modificó el patrón general de incorporación y esterificación del AG en los pools lipídicos endonucleares. En las incubaciones con [1-¹⁴C]18:0:L-FABP se observó, sin embargo, una menor dispersión en los datos en función del tiempo de incubación, respecto al ácido libre.

Para poder analizar en forma comparativa los resultados obtenidos en las Mx respecto a los N enteros se expresaron los datos como *nmol incorporado. mgLT⁻¹* teniendo en cuenta que los N enteros contienen 0.205 ± 0.01 mgLT.mg prot⁻¹ mientras que las Mx poseen 0.032 ± 0.01 mgLT.mg prot⁻¹ (datos no presentados).

En la Tabla 5.10 se muestra la incorporación y esterificación del [1-¹⁴C]18:0 libre o unido a L-FABP (expresada como nmol incorporados. mgLT⁻¹), en los lípidos nucleares y endonucleares, en función del tiempo de incubación.

Tabla 5.10. Incorporación y esterificación del [1-¹⁴C]18:0 y [1-¹⁴C]18:0:L-FABP en los lípidos nucleares y endonucleares.

Núcleos enteros (N)								
Clase lipídica	FL		TAG		DAG		AGL	
	AGL	AG: L-FABP	AGL	AG: L-FABP	AGL	AG: L-FABP	AGL	AG: L-FABP
[1- ¹⁴ C]18:0								
Tiempo (min)	<i>nmol incorporado. mgLT⁻¹</i>							
1	0.41±0.10	0.41±0.10	0.03±0.03	0.03±0.01	0.33±0.05	0.21±0.03	1.41±0.08	1.57±0.11
5	0.58±0.04	0.62±0.06	0.03±0.03	0.03±0.02	0.30±0.16	0.36±0.08	1.12±0.13	1.10±0.08
10	0.80±0.05	0.79±0.04	0.03±0.01	0.03±0.02	0.29±0.11	0.36±0.11	0.96±0.07	0.98±0.13
Matriz nuclear (Mx)								
Clase lipídica	FL		TAG		DAG		AGL	
	AGL	AG: L-FABP	AGL	AG: L-FABP	AGL	AG: L-FABP	AGL	AG: L-FABP
[1- ¹⁴ C]18:0								
Tiempo (min)	<i>nmol incorporado. mgLT⁻¹</i>							
1	6.26±0.65	4.22±1.01	0.07±0.04	0.07±0.04	1.19±0.34	0.87±0.10	6.79±0.50	8.88±1.08
5	6.72±0.30	6.38±0.85	0.07±0.04	0.07±0.04	1.59±0.17	1.70±0.17	4.84±0.30	5.94±0.57
10	6.50±0.32	8.15±0.68	0.66±0.14	0.38±0.14	1.75±0.41	2.24±0.37	4.82±0.44	3.60±0.40

Los N y las Mx de hígado de rata se incubaron en presencia de ácido [1-¹⁴C]18:0, libre y unido a L-FABP, ATP y CoA durante diferentes tiempos. Los resultados se expresan como *nmol incorporado. mgLT⁻¹* y representan la media ± ES de 5 experimentos independientes.

En la Tabla 5.10 se observa que la esterificación del ácido [1-¹⁴C]18:0, libre o unido a L-FABP en los FL, DAG y TAG, y la incorporación como AGL fueron mayores en las Mx, respecto del N entero, a todos los tiempos de incubación estudiados.

Cuando las incubaciones se realizaron sin el agregado de ATP y CoA en el MI los AG [1-¹⁴C]18:0 y [1-¹⁴C]18:0:L-FABP se incorporaron exclusivamente como AGL (100%) y no se esterificaron en ningún pool lipídico endonuclear (Tabla 5.7).

En conclusión, el AG 18:0 libre o unido a L-FABP se incorpora y esterifica en las diferentes clases lipídicas endonucleares por un mecanismo acil-CoA dependiente. Estos procesos serían independientes de la presencia de membrana nuclear lo que implica que en el interior del N celular habría actividad de las enzimas intervinientes en dichos procesos de incorporación y esterificación (*ACS*, *aciltransferasas*, etc).

5.5.3.2. Esterificación de 18:0 y 18:0:L-FABP en los FL endonucleares

En la Figura 5.22 se muestra la distribución de la radiactividad esterificada en los FL endonucleares en presencia de ATP y CoA, en función del tiempo de incubación.

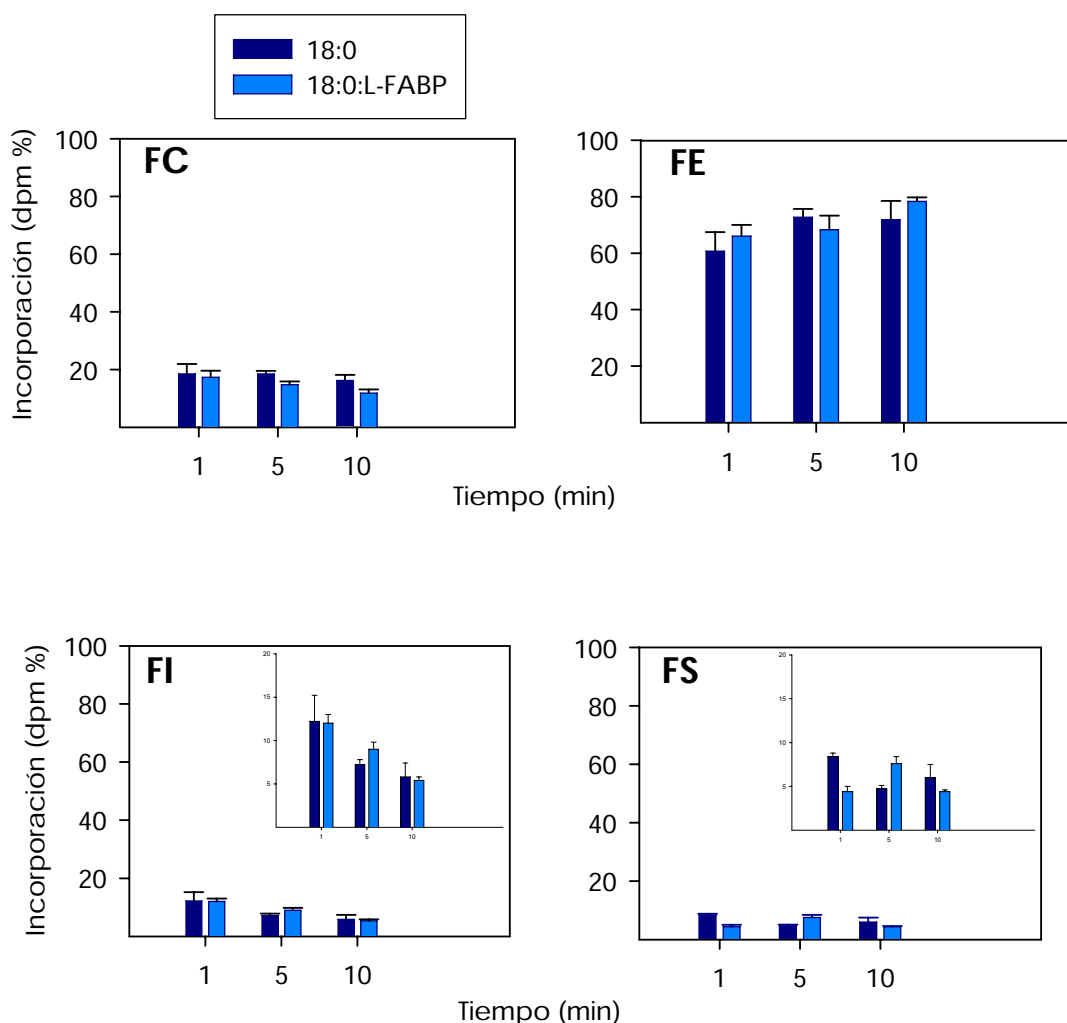


Fig. 5.22. Esterificación del ácido $[1-^{14}\text{C}]18:0$ y $[1-^{14}\text{C}]18:0\text{:L-FABP}$ en los FL endonucleares. Las Mx se incubaron en presencia del ácido $[1-^{14}\text{C}]18:0$, libre o unido a L-FABP, ATP y CoA durante diferentes tiempos. Las Mx se separaron del MI por centrifugación. Los LT se extrajeron, los FL se separaron por TLC y la radiactividad incorporada se determinó como se describió en *Métodos*. Los resultados se expresan como porcentaje de la radiactividad total incorporada en los FL y representan la media $\pm$ ES de 5 experimentos independientes.

En la Figura 5.22 se observa, al igual que en los pools nucleares, que los porcentajes de esterificación del $[1-^{14}\text{C}]18:0$, libre o unido a L-FABP, en cada FL endonuclear no se correspondieron con las masas relativas de cada uno de ellos siendo la distribución de la radiactividad esterificada la siguiente: FE (63%) > FC (18%) > FI (12%) > FS (4-8%).

El 18:0 libre o unido a L-FABP no se esterificó en la SM endonuclear a pesar de que las Mx se encuentran enriquecidas en este FL ya que poseen un 9% de SM, mientras que el N entero posee un 1.9% (Tabla 5.1). Este hecho podría ser consecuencia de una selectividad respecto del ácido graso y no de la cantidad de SM ya que, si bien los porcentajes del FI y la FS endonucleares son del orden del de la SM (9% y 8% respectivamente), el 18:0 sí se esterifica en estos FL. Este resultado es difícil de explicar ya que, como se dijo previamente, las especies moleculares de SM se caracterizan por tener esterificado un ácido graso saturado o monoinsaturado.

En las condiciones experimentales ensayadas no se observaron diferencias significativas en la esterificación del ácido [1-¹⁴C]18:0 ligado a L-FABP, respecto del control con el ácido libre.

En la Tabla 5.8 se muestra la AE de esterificación del ácido [1-¹⁴C]18:0, libre o unido a L-FABP, en los FL endonucleares, en presencia de ATP y CoA. Se observa que la AE de esterificación del [1-¹⁴C]18:0 libre o ligado a L-FABP en los FL endonucleares es diferente a la observada en los N enteros ya que el 18:0 se esterifica con mayor AE en la FE seguida de FI, FS y, por último, FC mientras que en los N enteros FS > FE > FI > FC.

Es importante observar que las AE de esterificación del 18:0 en todas las clases fosfolipídicas endonucleares son mucho mayores que las correspondientes a los FL nucleares, a excepción de la FS que presenta AE similares en N y Mx.

5.5.4. Incorporación del ácido [1-¹⁴C]20:4 libre o unido a L-FABP (20:4:L-FABP) en las diferentes clases de lípidos endonucleares

5.5.4.1. Incorporación de 20:4 y 20:4:L-FABP en las clases lipídicas endonucleares

Se estudió la incorporación y esterificación del ácido $[1-^{14}\text{C}]20:4\text{n-6}$ libre y unido a L-FABP en los pools lipídicos endonucleares, incubando *in vitro* Mx en presencia de $[1-^{14}\text{C}]20:4\text{n-6}$ o $[1-^{14}\text{C}]20:4\text{n-6:L-FABP}$, ATP y CoA.

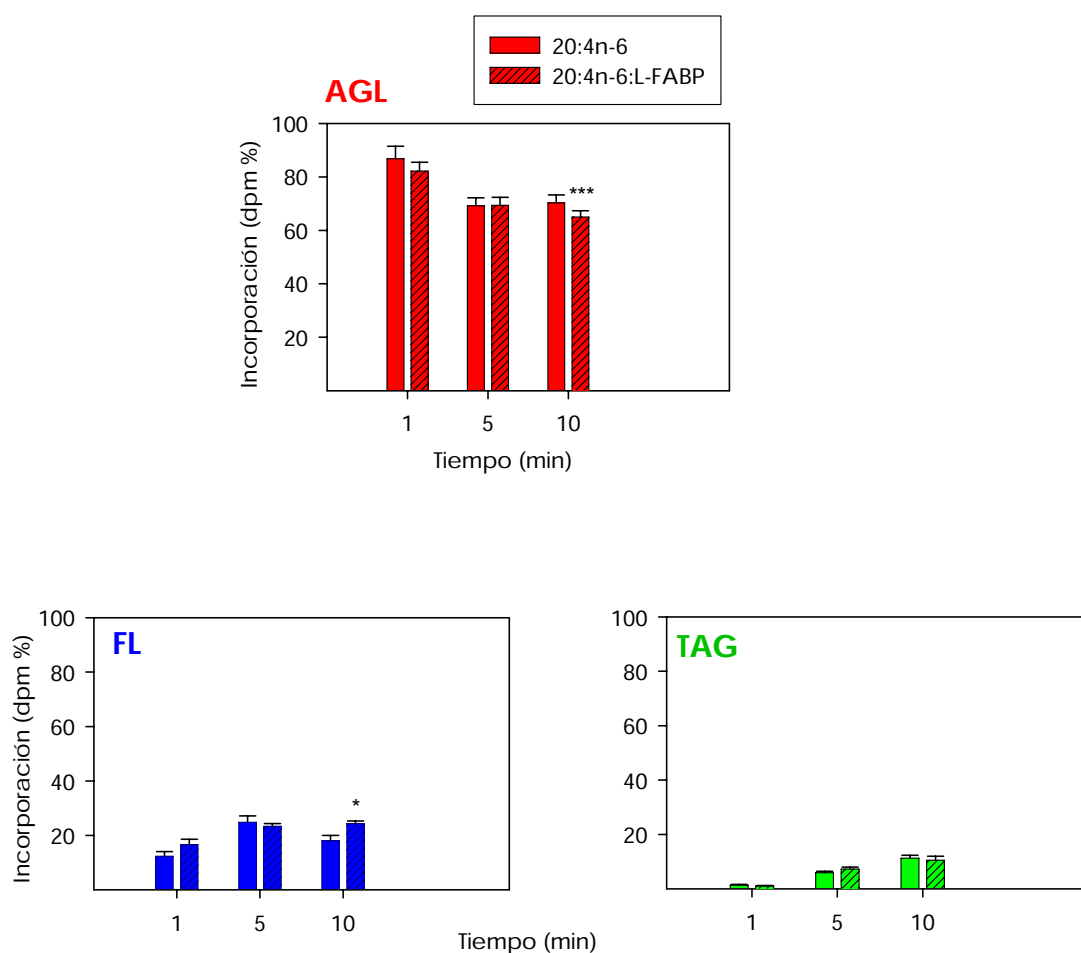


Fig. 5.24. Distribución del ácido $[1-^{14}\text{C}]20:4\text{n-6}$ y $[1-^{14}\text{C}]20:4\text{n-6:L-FABP}$ en las diferentes clases de lípidos endonucleares. Las Mx se incubaron en presencia de ácido $[1-^{14}\text{C}]20:4\text{n-6}$, libre o unido a L-FABP, ATP y CoA durante diferentes tiempos. Las Mx se separaron del MI por centrifugación. Los LT se extrajeron, las diferentes clases lipídicas se separaron por TLC y la radiactividad incorporada en las mismas se determinó como se describió en *Métodos*. Los resultados se expresan como porcentaje de la radiactividad total incorporada y representan la media $\pm$ ES de 5 experimentos independientes. Diferencias significativas entre el $[1-^{14}\text{C}]20:4\text{n-6}$ libre

En la Figura 5.24 se observa que inicialmente el ácido [1- ^{14}C]20:4n-6 se incorporó en los pools lipídicos endonucleares en forma mayoritaria como AGL (85%) mientras que el 15% se esterificó en los FL.

Luego de 10 minutos de incubación el AGL incorporado continuó esterificándose en los FL (20 %) y, en menor proporción, en los TAG (11%). Al igual que lo observado en el N entero, cuando se incubó ácido [1- ^{14}C]20:4n-6 con Mx no se observó [^{14}C] en el pool de DAG. El porcentaje de 20:4 esterificado en los TAG aumentó con el tiempo de incubación tanto cuando el ácido estuvo libre o unido a L-FABP.

El 20:4:L-FABP, luego de 10 minutos de incubación, se esterificó en mayor proporción en los FL a expensas del pool de AGL, respecto del 20:4 libre. Es interesante señalar que en el N entero estas variaciones no fueron significativas (Figura 5.18).

Nuevamente, para poder analizar en forma comparativa los resultados obtenidos en las Mx respecto a los N enteros se expresaron los datos como *nmol incorporado. mgLT⁻¹* teniendo en cuenta que los N enteros contienen 0.205 ± 0.01 mgLT.mg prot⁻¹ mientras que las Mx poseen 0.032 ± 0.01 mgLT.mg prot⁻¹ (datos no presentados).

En la Tabla 5.11 se muestra la incorporación y esterificación del [1- ^{14}C]20:4n-6 libre o unido a L-FABP (expresada como nmol incorporados. mgLT⁻¹), en los lípidos nucleares y endonucleares, en función del tiempo de incubación.

Tabla 5.11. Incorporación y esterificación del [1-¹⁴C]20:4n-6, libre y unido a L-FABP, en las diferentes clases de lípidos nucleares y endonucleares.

Núcleos enteros (N)						
Clase lipídica	FL		TAG		AGL	
[1- ¹⁴ C]20:4	AGL	AG: L-FABP	AGL	AG: L-FABP	AGL	AG: L-FABP
Tiempo (min)	<i>nmol incorp. mg LT⁻¹</i>					
1	0.68±0.136	0.71±0.087	0.27±0.07	0.17±0.020	0.77±0.07	0.74±0.021
5	0.80±0.098	0.88±0.082	0.40±0.03	0.19±0.053**	0.68±0.07	0.63±0.029
10	0.84±0.082	0.90±0.073	0.50±0.08	0.28±0.018*	0.59±0.02	0.43±0.012*
Matriz nuclear (Mx)						
Clase lipídica	FL		TAG		AGL	
[1- ¹⁴ C]20:4	AGL	AG: L-FABP	AGL	AG: L-FABP	AGL	AG: L-FABP
Tiempo(min)	<i>nmol incorp. mg LT⁻¹</i>					
1	1.60±0.23	2.00±0.24	0.17±0.04	0.12±0.02	11.31±0.61	9.89±0.40
5	3.17±0.31	2.73±0.12	0.76±0.06	0.85±0.08	8.86±0.38	8.12±0.35
10	2.37±0.36	3.01±0.12	1.49±0.13	1.31±0.19	9.26±0.40	8.06±0.29***

Los N y las Mx de hígado de rata se incubaron en presencia de ácido [1-¹⁴C]18:0, libre o unido a L-FABP, ATP y CoA durante diferentes tiempos.

Los resultados se expresan como *nmol incorporado. mgLT⁻¹* y representan la media ± ES de 5 experimentos independientes.

En la Tabla 5.11 se observa que la incorporación (AGL) y esterificación (FL y TAG) del 20:4n-6 exógeno, libre o ligado a L-FABP fue mayor en los lípidos endonucleares, respecto de los nucleares.

En los pools lipídicos endonucleares, la esterificación del 20:4n-6 respecto del 18:0, es menor en los FL y mayor en los TAG (Tablas 5.10 y 5.11).

Cuando las incubaciones se realizaron sin el agregado de ATP y CoA en el MI el AG [1-¹⁴C]20:4n-6 libre o unido a L-FABP se incorporó exclusivamente como AGL (100%) y no se esterificó en ningún pool lipídico endonuclear (Tabla 5.7).

En conclusión, los resultados presentados demostrarían que en el interior del N celular, esto es en los N sin membrana, se encuentran las enzimas necesarias para la incorporación de AG saturados e insaturados exógenos por un mecanismo acil-CoA dependiente.

5.5.4.2. Incorporación de 20:4 y 20:4:L-FABP en los FL endonucleares

En la Figura 5.24 se muestra la distribución de la radiactividad esterificada en los FL endonucleares en presencia de ATP y CoA, en función del tiempo de incubación.

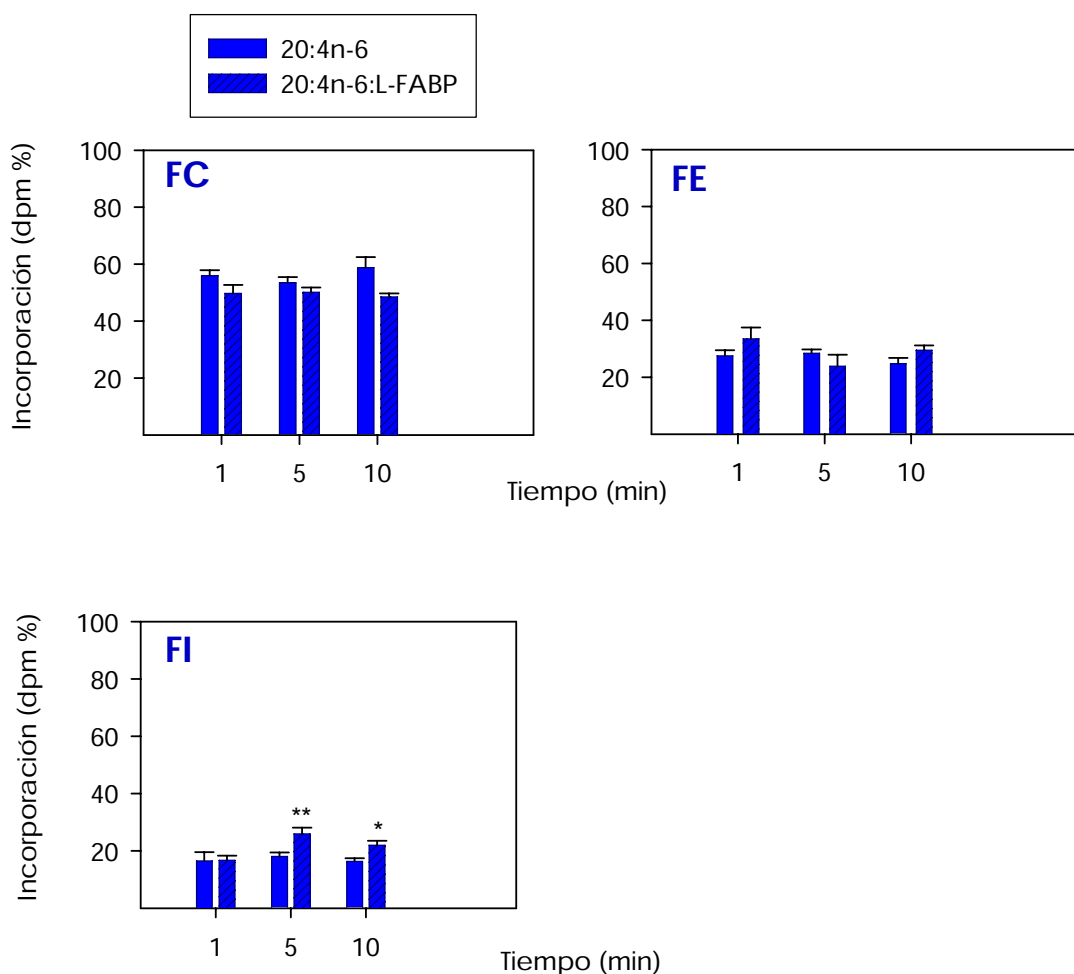


Fig. 5.24. Esterificación del ácido $[1-^{14}\text{C}]20:4n-6$ y $[1-^{14}\text{C}]20:4n-6:L\text{-FABP}$ en los FL endonucleares. Las Mx de hígado de rata se incubaron en presencia del ácido $[1-^{14}\text{C}]20:4$, libre o unido a L-FABP, ATP y CoA durante diferentes tiempos. Las Mx se separaron del MI por centrifugación. Los LT se extrajeron, los FL se separaron por TLC y la radiactividad incorporada se determinó como se describió en *Métodos*. Los resultados se expresan como porcentaje de la radiactividad total incorporada en los FL y representan la media $\pm$ ES de 5 experimentos independientes. Los datos fueron analizados con el test t de Student. Diferencias significativas entre el $[1-^{14}\text{C}]20:4$ n-6 libre y unido a L-FABP: * $P < 0.001$ y ** $P < 0.01$.

En la Figura 5.24 se observa que el ácido $[1-^{14}\text{C}]20:4$ n-6, libre o unido a L-FABP se esterifica en forma selectiva en los siguientes FL endonucleares: FC (~55%), FE (25-30%) y FI (15-25%). No se observó radiactividad esterificada en la FS y la SM endonuclear.

EL 20:4n-6 unido a L-FABP se esterificó en el FI endonuclear en mayor proporción respecto del ácido libre. Este resultado se observa a partir de los 5 minutos de incubación y se acentúa al final de la misma.

Es importante señalar que en ninguna de las condiciones experimentales ensayadas se observó esterificación de los AG 18:0 y 20:4, libres o ligados a L-FABP, en la SM nuclear ni endonuclear.

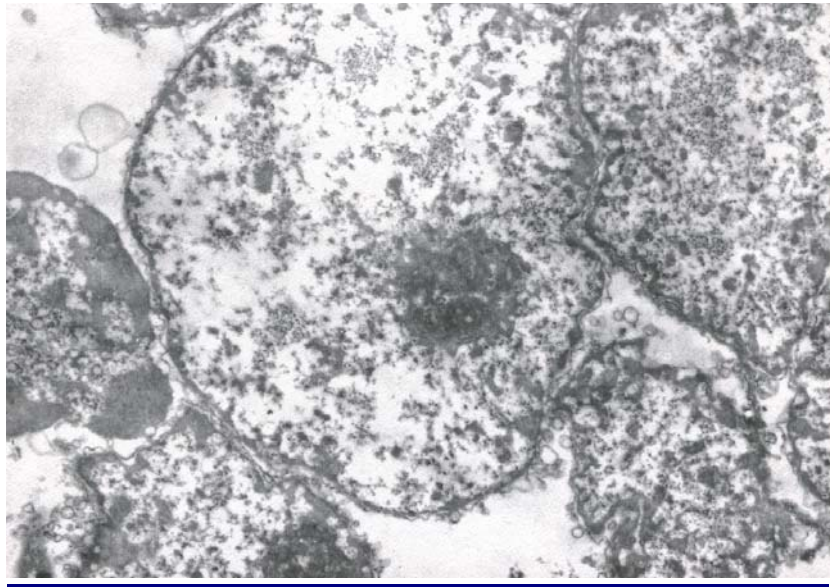
En la Tabla 5.9 se observa la actividad específica de esterificación del ácido [1-¹⁴C]20:4 n-6 en los FL endonucleares. El AG 20:4n-6, libre o unido a L-FABP se esterifica con mayor AE en FI, seguido de FE y FC, tanto en los lípidos endonucleares como en los nucleares.

En particular, el 20:4n-6 unido a L-FABP se esterifica con mayor AE en el FI endonuclear, respecto del libre, luego de 10 min de incubación. Existiría, entonces, una selectividad del 20:4 por el FI que se ve aumentada cuando este AG esta unido a L-FABP.

Las AE de esterificación del 20:4n-6 en todas las clases fosfolipídicas endonucleares son mayores que las correspondientes a los FL nucleares.

En conclusión, en las condiciones experimentales elegidas el AG 18:0, libre o unido a L-FABP, se incorpora y esterifica en los lípidos endonucleares con el mismo patrón. Por el contrario, el AG 20:4n-6 unido a L-FABP se esterifica en los FL endonucleares, específicamente en el pool de FI, con mayor AE respecto del 20:4n-6 libre.

DISCUSIÓN



6.1. Composición lipídica de núcleos celulares de hígado de rata

El núcleo celular es la adquisición evolutiva que define a las células eucariotas.

Los lípidos del núcleo celular se encuentran formando parte de la envoltura nuclear e, inclusive, en su interior, asociados a la cromatina (231); estudios preliminares indican que los lípidos del interior nuclear se encontrarían, también, asociados a la matriz nuclear (Mx) (106) (132).

Los componentes fundamentales de los lípidos celulares son los ácidos grasos. Los AG y los acil-CoAs, además de las funciones tradicionalmente reconocidas intervendrían, directa o indirectamente, en la regulación de la expresión genética, evento que tiene lugar en el interior del N celular. Los AG se sintetizan en el citosol por lo que los AG que se encuentran en el N celular e intervienen en la regulación de numerosas funciones nucleares tendrían dos orígenes posibles: provendrían de la hidrólisis de los pools lipídicos nucleares o, directamente, del citosol.

El primer objetivo específico propuesto en este trabajo fue, entonces:

1- Determinar la constitución y la localización de los principales pools lipídicos nucleares de células de hígado de rata normal.

Con este fin se propuso la siguiente hipótesis:

- Los pools lipídicos nucleares y endonucleares están constituidos mayoritariamente por fosfolípidos y por un alto porcentaje de AG polinosaturados.

Para evaluar esta hipótesis primeramente se examinó la composición lipídica de núcleos celulares -pools lipídicos nucleares- y

de matrices nucleares -pooles lipídicos endonucleares- de hígado de rata.

Se ha demostrado que la matriz nuclear constituye una estructura o esqueleto intranuclear al que se encontrarían asociados espacialmente los diferentes dominios nucleares y sus moléculas constituyentes. Más aún, las observaciones de las matrices nucleares al microscopio electrónico revelan que los dominios nucleares permanecen sin colapsar y en su localización original aún después de los tratamientos mediante los cuales se remueve la membrana nuclear (28;232).

Las Mx aisladas por nosotros retienen aproximadamente el 26 % y 22 % de las proteínas totales y los FL, respectivamente, presentes en el N entero, control (Tabla 5. 1). Estos resultados nos permiten concluir que:

- aproximadamente el 78 % de los FL presentes en el núcleo celular se encuentra formando parte de la membrana nuclear mientras que el resto se encontraría en el interior del mismo.

Al respecto, Albi y colaboradores (77) demostraron que alrededor del 10 % de los FL totales nucleares de células de hígado de rata se encuentran asociados a la cromatina, por lo que del 22 % de los FL nucleares que constituyen los pooles endonucleares restaría todavía localizar un 12 %.

No se determinó aun con precisión la organización estructural de estos pooles lipídicos endonucleares. En este sentido se han propuesto las siguientes alternativas, a saber: Albi y colaboradores (77) demostraron que parte de los mismos se encuentran asociados a la cromatina; Irvine (106), así como también Maraldi y colaboradores (233) propusieron que los mismos se encontrarían formando parte de complejos de proteolípidos mientras que Hunt y colaboradores (234) sugirieron que estas biomoléculas formarían agregados en estado de fase líquido cristalina. Es probable que estas tres alternativas no sean

excluyentes sino complementarias y, dependiendo de las condiciones fisiológicas y del dominio nuclear en particular, pueda prevalecer alguna de ellas.

Los FL de la fracción endonuclear están constituidos principalmente por FC, seguida por FE, FI, FS y SM. Es interesante resaltar que los pools endonucleares están enriquecidos en SM y FS mientras que el contenido de FC disminuyó, respecto de los N enteros. Albi y colaboradores (85) también encontraron en Mx hepática un enriquecimiento en FS y EM, así como una disminución en FC. Además, Jaffrezou y colaboradores (235) demostraron que determinadas células tumorales son ricas en SM nuclear asociada a cromatina. Es importante remarcar el rol de estos pools endonucleares de SM ya que serían el sustrato del ciclo nuclear de señalización de ceramidas involucrado en la regulación de importantes funciones celulares como el crecimiento, la proliferación celular y la apoptosis.

Los resultados obtenidos nos permiten concluir que:

- los lípidos endonucleares representan aproximadamente el 20 % de los lípidos nucleares totales y presentan un perfil fosfolipídico similar al encontrado en los N enteros siendo, claramente, FC el FL mayoritario seguido de FE, FI, SM y FS.

La composición de AG de los pools lipídicos nucleares y endonucleares así como la de la FC, el FL mayoritario en ambos casos (Tablas 5.2 y 5.3), evidencia que:

- se encuentran constituidos por proporciones similares (alrededor del 40%) de AG saturados (principalmente palmítico y esteárico) y polinosaturados, en particular los de la serie n-6. Los ácidos 20:4n-6 y 18:2n-6 son, claramente, los componentes mayoritarios alcanzando más del 20 y 15 % del total, respectivamente.

En particular, la FC nuclear y endonuclear esta organizado en 16 EM siendo las mayoritarias: 16:0-20:4n-6, 16:0-18:2n-6, 18:0-20:4n-6 y 18:0-18:2n-6. El AA se encuentra esterificado en la posición *sn*-2 de la molécula formando las EM 18:2-20:4, 18:1-20:4, 16:0-20:4 y 18:0-20:4. Determinamos además que:

- la composición de las EM de FC nuclear y endonuclear no sólo es similar entre sí, sino también al de las fracciones subcelulares de hígado de rata -homogenato, microsomas y mitocondrias- lo que podría implicar la existencia en las células hepáticas de un patrón general de órgano que determina dicha composición. El mismo sería altamente dependiente de la dieta y la regulación hormonal. Este patrón de EM de FC se caracteriza por poseer un alto contenido de AG insaturados, siendo el AA el más abundante.

La FC endonuclear constituye, junto con el FI, uno de los principales precursores de los pools endonucleares de DAG, moléculas mensajeras en las vías de transducción de señales nuclear (236). Por lo tanto, la composición de la FC nuclear y endonuclear serían muy importantes ya que determinan la composición de las especies moleculares de uno de los principales pools de DAG nuclear.

Hunt y colaboradores describieron que la FC endonuclear de células de neuroblastoma humano presenta una composición de EM altamente disaturada (237). En particular, en la célula entera el contenido de EM de FC disaturadas es 16.8 % mientras que en la fracción endonuclear este alcanza el 60.3 %.

Las diferencias en los resultados recién mencionados respecto de los nuestros no se deberían al protocolo utilizado para la obtención de las Mx ya que es el mismo en ambos casos, sino a que estos autores trabajaron con células en cultivo. En este sentido, Marra y

colaboradores demostraron que células neoplásicas presentan contenidos característicamente bajos de AG esenciales y altas proporciones de ácido oleico (238), que se deben a una muy alta actividad $\Delta 9$ desaturasa (239). Incluso los hepatocitos de cultivo primario muestran una declinación de la actividad $\Delta 6$ y $\Delta 5$ desaturasa, enzimas reguladoras de la biosíntesis de AG polinosaturados. Por lo tanto, la alta proporción de EM de FC disaturada que Hunt y col. observaron en los pools endonucleares sería una característica de las propias células tumorales y no, como los autores proponen, de una localización selectiva nuclear.

6.2. Incorporación de ácidos grasos saturados y nosaturados en los lípidos nucleares y endonucleares de células de hígado de rata

En los resultados presentados hasta el momento se determinó que la FC es el FL mayoritario del N celular y de las Mx aislados de hígado de rata y que la misma presenta una alta proporción de AG polinsaturados.

Como se dijo previamente, los ácidos grasos y los acil-CoA del núcleo celular proceden, en primera instancia, del citosol. Es posible que los AG citosólicos en su tránsito hacia el núcleo celular, en una primera etapa, se esterifiquen a los lípidos de los pools nucleares para, más tarde, ser hidrolizados a AGL. Es así, como AGL, que quedarían disponibles dentro del núcleo celular para unirse a la FABP nuclear, interaccionar con receptores nucleares, activarse a acil-CoAs o esterificarse a otros lípidos, entre otros posibles destinos metabólicos.

El siguiente objetivo planteado fue, entonces:

2- Determinar el mecanismo por el cual los ácidos grasos procedentes del citosol se internalizan, interaccionan y redistribuyen en los pools lipídicos del núcleo celular.

Con el objetivo recién mencionado se propuso la siguiente hipótesis:

- Los AG llegan al N celular como AGL o como acil-CoAs e interaccionan con los pools lipídicos nucleares y endonucleares esterificándose por un mecanismo acil-CoA dependiente.

Para evaluar esta hipótesis se incubaron *in vitro* núcleos y Mx aislados de células de hígado de rata en presencia de los ácidos grasos [$1\text{-}^{14}\text{C}$] más abundantes en el núcleo celular -esteárico (18:0), linoleico (18:2 n-6) y araquidónico (20:4 n-6)- y de la Mx - esteárico (18:0) y araquidónico (20:4 n-6)-.

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que:

- *los AG saturados y polinosaturados exógenos testeados se incorporan como AGL y se esterifican rápidamente a los lípidos nucleares y endonucleares;*

- *los AG no se esterifican directamente a los pools lipídicos nucleares y endonucleares sino que primero deben ser convertidos en ésteres de CoA por acción de la enzima acil-CoA sintetasa (ACS) de cadena larga nuclear (227);*

- *el patrón de incorporación y esterificación de los AG testeados en los lípidos nucleares y endonucleares se caracterizó por presentar especificidad respecto del AG; es así que el ácido 20:4n-6 se esterificó principalmente en los FL nucleares y endonucleares, seguido de los TAG*

mientras que el AG 18:0 se esterificó en los FL y los DAG y, en mucha menor proporción, en los TAG nucleares y endonucleares.

- de los AG ensayados el 20:4n-6 es el que se esterifica en mayor proporción a los fosfolípidos nucleares y el 18:0 a los endonucleares;

- los N celulares serían autónomos e independientes del citosol en los procesos recién mencionados ya que la presencia de proteínas citosólicas no es necesaria para la incorporación, distribución y esterificación de los AG en los lípidos nucleares.

- las Mx poseen las enzimas necesarias para esterificar AG exógenos en sus pools lipídicos por lo que, al menos en este aspecto del metabolismo lipídico, las Mx serían autónomas e independientes de la membrana nuclear.

Estos resultados son congruentes con trabajos realizados previamente en nuestro laboratorio en los que se demostró que el 20:4n-6 sintetizado en forma endógena en el N celular a partir de 20:3n-6 por la $\Delta 5$ desaturasa nuclear se esterifica en forma mayoritaria en los FL y, en menor proporción, en los TAG y DAG nucleares (240).

La existencia de actividad *acil-CoA sintetasa* no se restringe a las células hepáticas ya que también se la describió en núcleos celulares aislados de corteza cerebral (241); sin embargo, los núcleos de células inflamatorias carecerían de ACS nuclear y/o algún otro factor ya que, *in vitro*, el AA exógeno se esterifica en los FL nucleares solo cuando se agrega citosol al MI (242).

El tipo de lípido al que se esterifica el AG dependería del tejido en particular ya que, a diferencia de lo que hemos encontrado en núcleos de células de hígado de rata, en los núcleos aislados de corteza cerebral de conejo los AG 18:1 y 20:4n-6 se esterifican en mayor

proporción en los TAG respecto de FL mientras que, en los microsomas de las mismas células, el AA se esterifica principalmente en los FL respecto de los TAG (243) (244).

Se ha propuesto que el núcleo celular es un compartimiento que posee un rol importante en el control de determinados procesos en los que interviene el AA ya que cuando este AG se incorpora a una célula eucariótica, primeramente se esterifica en los glicerolípidos nucleares y, posteriormente, se desplaza a otro compartimiento celular (245) (246). Se demostró también que en el N celular se sintetizan prostaglandinas y leucotrienos, lo que se debería a que tanto *PLA*₂ como las enzimas que sintetizan dichos metabolitos translocan a la membrana nuclear (247) (248) (249) (250).

Considerando que el AG que se esterifica en mayor proporción en los FL nucleares es el AA y que este mecanismo es acil-CoA dependiente el siguiente objetivo planteado fue determinar si el araquidonil-CoA exógeno se esterifica en los lípidos nucleares.

Con ese fin se incubaron *in vitro* N celulares de hígado de rata en presencia [1-¹⁴C]20:4n-6-CoA. Se encontró que el [1-¹⁴C]20:4n-6-CoA se esterifica principalmente en FC (Figura 5.9), hecho que corrobora los resultados anteriores.

Se observó además que el AA se incorpora en todas las EM que poseen 20:4n-6 en su molécula (Figura 5.11). Las EM de FC nuclear mayoritarias en masa 18:0-20:4 y 16:0-20:4 incorporaron AA en mayor proporción; sin embargo, la mayor AE de esterificación (dpm.mol⁻¹) se observó en las EM de FC que poseen un AG insaturado en posición *sn*-1 y 20:4n-6 en *sn*-2.

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que:

- *el núcleo celular de hígado de rata posee las enzimas necesarias para la esterificación del 20:4n-6-CoA exógeno en los pools*

mayoritarios de AA nucleares y para la hidrólisis del mismo a AGL y su posterior incorporación como tal;

- la mayor AE de esterificación se observó en las EM de FC que poseen AG insaturados en ambas posiciones sn-1 y sn-2 de la molécula.

La alta AE de esterificación observada en las EM de FC diinsaturadas nos plantea el interrogante de si las mismas poseen funciones fisiológicas *per se* o son meros intermediarios en los procesos de síntesis *de novo* y/o de remodelado de los lípidos. Al respecto, por ejemplo, se ha demostrado que el AA esterificado en posición *sn*-1 de los FL es el sustrato para la síntesis de anandamide (N-araquidoniletanolamina), ligando de los receptores canabinóideos en los tejidos de mamíferos (251).

6.3. Remodelado de ácidos grasos en los lípidos nucleares de células hepáticas

En los resultados recién presentados se determinó que la mayor AE de esterificación del [1-¹⁴C]20:4n-6-CoA la poseen las EM de FC con un AG insaturado en la posición *sn*-1 de la molécula y 20:4n-6 en *sn*-2. Las EM que poseen un AG saturado en posición *sn*-1 (16:0 y 18:0) y 20:4n-6 en *sn*-2 mostraron la menor AE. Esta distribución de AG no es la fisiológica ya que el perfil de EM de la FC nuclear se caracteriza por poseer una distribución asimétrica de AG, con un AG saturado esterificado en la posición *sn*-1 de la molécula y un AG insaturado en la posición *sn*-2 (Tabla 5.4).

A partir de estos resultados el siguiente objetivo propuesto fue estudiar si en el N celular de hígado de rata se reestablece el perfil de EM fisiológico característico de la FC, por remodelado de AG. Con este

fin, N celulares con los pooles de 20:4n-6 marcados radiactivamente se reincubaron bajo diferentes condiciones experimentales, esto es: durante diferentes tiempos, con o sin el agregado de proteína citosólica, ATP y CoA al MI.

En estos experimentos se determinó que la distribución poco frecuente de AG en las EM de FC nuclear se corrige al reincubar los núcleos celulares en un MI adicionado con proteína citosólica, ATP y CoA. En estas condiciones decrece la actividad específica en las EM que poseen un AG insaturado en ambas posiciones de la molécula y se incrementa en las EM de FC que poseen un AG saturado en posición *sn*-1 de la molécula y un AG insaturado en *sn*-2, reestableciéndose la distribución fisiológica de AG de la FC nuclear.

Estos resultados son congruentes con los observados por Schmidt y colaboradores (252) (253); estos autores determinaron que al incubar *in vitro* hepatocitos aislados con AG exógenos, los AG linoleico, araquidónico y docosahexaenoico inicialmente se incorporan por síntesis *de novo* en las EM de FC y de FE que poseen el AG exógeno esterificado en ambas posiciones *sn*-1 y *sn*-2 de la molécula. Posteriormente, una vez que las EM diinsaturadas han sido sintetizadas, el ácido 20:4 de la posición *sn*-1 es remodelado por el ciclo de Lands y, de esta forma, se sintetizan las EM mayoritarias que posee la célula (18:0-20:4 y 16:0-20:4 FC) reestableciéndose el perfil de EM de FC característico de la misma.

En el núcleo celular de neuronas de conejo también se describió la existencia de un proceso de remodelado que estaría involucrado en el metabolismo del factor activador de plaquetas (PAF) (254). Se ha propuesto que el proceso de remodelado del AA en los FL de células cancerígenas es muy importante ya que, cuando se interrumpe, se produce un incremento del AA libre que desencadena la detención del crecimiento celular y la apoptosis (255).

Para que el proceso de remodelado se lleve a cabo es necesaria la presencia de *fosfolipasas* (PLA_1 y PLA_2), *aciltransferasas* y/o *transacilasas*, además de los sustratos y cofactores correspondientes. En el N celular, hasta el momento, se ha descrito sólo a la PLA_2 (256) (98).

Los resultados presentados hasta el momento nos permiten concluir que:

- en los núcleos celulares de hígado de rata se lleva a cabo el remodelado de AG de FC, en presencia de proteínas citosólicas, ATP y CoA

Durante mucho tiempo se consideró que la asimetría en la distribución de los AG de los FL se debía a los siguientes procesos: primeramente, los AG saturados, mono y dienoicos se introducen en posición *sn*-1 y *sn*-2 de los glicerolípidos por síntesis *de novo*, proceso determinado por la especificidad de sustrato de las enzimas *glicerol-3-fosfatoaciltransferasa* (GPAT) y la *1-acilglicerol-3-fosfatoaciltransferasa* (AGPAT) y, posteriormente, los ácidos grasos polinosaturados se esterifican en posición *sn*-2 de la FC únicamente mediante el ciclo de deacilación-reacilación o vía de Lands (proceso de remodelado) (257). Estos conceptos han sido reconsiderados puesto que se describió que las enzimas AGPAT de diferentes organismos pueden utilizar araquidonil-CoA como sustrato, lo que determina que los ácidos grasos polinosaturados también puedan ser esterificados en posición *sn*-1 de los glicerolípidos por síntesis *de novo* (30).

Sugerimos, en base a estos resultados, que el N celular de hígado de rata esterifica AG exógenos en la FC por un mecanismo que no sería determinante del perfil fisiológico de AG sino que dependería de la disponibilidad de sustrato; posteriormente, por un proceso de remodelado se determinaría la característica distribución asimétrica de AG en las EM de FC.

Resumiendo, y en función de los resultados hasta ahora presentados, proponemos que:

- el núcleo celular y las matrices nucleares de hígado de rata esterifican, en forma autónoma, AG saturados y polinsaturados en los lípidos nucleares y endonucleares a través de un mecanismo dependiente de acil-CoA, con especificidad respecto del AG.

- el núcleo celular de hígado de rata también posee las enzimas necesarias para la incorporación y esterificación del ácido 20:4n-6-CoA exógeno en los pools mayoritarios del ácido en el núcleo, pero con una distribución al azar de los AG.

- en una primera etapa se sintetizan EM de FC con AG insaturados en ambas posiciones sn-1 y sn-2 de la molécula y, en una segunda etapa, mediante un proceso de remodelado dependiente de acil-CoA en el que estarían involucradas proteínas citosólicas se reestablece la distribución asimétrica de AG de la FC nuclear que se caracteriza por poseer un AG saturado esterificado en posición sn-1 y un AG insaturado en sn-2.

6.4. Rol de L-FABP en la incorporación de ácidos grasos saturados e insaturados en los pools lipídicos nucleares y endonucleares de células de hígado de rata

Los AG del N celular podrían proceder, entonces, de la hidrólisis de los lípidos de la membrana nuclear y/o de los pools lipídicos

endonucleares o; alternatively, del exterior nuclear, esto es, del citoplasma. Estos AG constituirían posibles ligandos de receptores nucleares como PPAR, HNF 4- α y LXR, además de ser sustratos de enzimas del metabolismo lipídico nuclear y regular la actividad de otras enzimas presentes en el interior nuclear, entre otros posibles roles.

Si bien aún se desconoce el mecanismo a través del cual los AG citosólicos llegan al N celular se postula que las FABPs serían las proteínas que participarían en el transporte núcleo-citoplasmático de AG.

En el hígado la FABP mayoritaria es la L-FABP; la misma se encuentra tanto en el citoplasma como en el N de los hepatocitos donde el PPAR α constituye el isotipo predominante de PPARs (258). Recientemente, Huang y colaboradores estimaron que las concentraciones nucleares de L-FABP serían aproximadamente 50 μ M (259). Teniendo en cuenta que Wolfrum y colaboradores (260) determinaron que existe co-localización nuclear entre L-FABP y PPAR α (también con PPAR γ , pero no con PPAR β y LXR), podemos suponer que la L-FABP desempeñaría un rol directo en la regulación de la expresión genética al transportar los AG hacia el N celular, donde interaccionarían con dichos receptores. Las microfotografías de fluorescencia indican que los complejos L-FABP y PPAR α presentarían una localización preferencialmente cercana a la envoltura nuclear y al nucléolo (261).

La L-FABP nativa aislada de hígado de rata contiene una variada composición de AG unidos, que poseen entre 16 y 22 átomos de carbono (262); en particular, los AG polinosaturados constituyen el 44 % del total, de los cuales el 96 % pertenece a la serie n-6 mientras que el 4 % restante lo constituyen AG de la serie n-3.

Considerando los resultados obtenidos y los antecedentes bibliográficos recién mencionados se propuso como último objetivo de este trabajo de Tesis:

3- Determinar el rol de la L-FABP en el transporte de AG hacia los lípidos nucleares y endonucleares.

Con este fin se propuso la siguiente hipótesis:

- La L-FABP favorece de manera específica la interacción de los AG con los pools lipídicos nucleares y endonucleares.

Para evaluar esta hipótesis se incubaron *in vitro* núcleos y matrices nucleares de hígado de rata en presencia de los AG más abundantes del núcleo celular, los ácidos $[1-^{14}\text{C}]18:0$ y $20:4\text{ n-6}$, unidos a L-FABP, ATP y CoA.

En los experimentos realizados con los N celulares se observó que el $[1-^{14}\text{C}]20:4\text{n-6}$ unido a L-FABP se incorpora como AGL y se esterifica en los FL en igual proporción respecto del libre mientras que se esterifica en los TAG en mayor proporción cuando esta libre que cuando esta unido a L-FABP (Figura 5.18). Este hecho podría deberse a que la L-FABP compite por dicho ligando constituyendo de esta manera un reservorio específico de AGL nucleares que tendrán un destino metabólico diferente. En este sentido, se ha demostrado que los AG regulan la actividad de determinadas enzimas de localización nuclear como la *ADN nucleotidasa*, la *ARN polimerasa dependiente de ADN*, las *ADN polimerasas* y la *topoisomerasa II*, entre otras (263) (264) (265).

El $[1-^{14}\text{C}]20:4\text{n-6}$ unido a L-FABP se esterificó en los diferentes FL nucleares con el mismo patrón que cuando esta libre. El AA se esterificó en mayor proporción en la FC (Figura 5.19), que es el FL nuclear mayoritario en masa (Tabla 5.1). Sin embargo, fue en FI donde el AA se esterificó con la mayor actividad específica (nmol incorporado. pmol c/FL⁻¹), seguido de FS, FE y FC. Este resultado es congruente con el hecho de que el FI es el fosfolípido que presenta la mayor afinidad para esterificar al AA (266).

El 18:0 unido a L-FABP se incorporó y esterificó en los pools lipídicos nucleares con el mismo patrón que el ácido libre. A diferencia del AA, este AG se esterificó en los DAG nucleares, además de esterificarse en los FL y los TAG.

Es importante señalar que el 18:0 libre o unido a L-FABP se esterificó en los FL nucleares con la mayor AE en FS y FE, seguidos por FI y FC. Estos resultados sugieren que la FE y FS nucleares presentan un metabolismo muy activo de este AG en particular; restaría determinar las causas e implicancias biológicas del mismo.

Huang y colaboradores observaron en células que sobreexpresan L-FABP un incremento en la captación nuclear de AG fluorescentes de cadena media y larga, saturados e insaturados, respecto de células control que no sobreexpresan dicha proteína (267). En particular, el incremento de la fluorescencia lo observaron principalmente hacia la cara interna de la membrana nuclear, y no asociado al interior nuclear. Cabe aclarar que los AG utilizados por estos autores son no metabolizables por lo que los mismos no se esterifican en los pools lipídicos nucleares como sí lo hacen los AG metabolizables ensayados en nuestros experimentos.

En conclusión, en las condiciones experimentales ensayadas no hemos observado que la L-FABP favorezca de manera específica la interacción de los AG con los pools lipídicos nucleares.

Nuestro trabajo aporta resultados experimentales realizados *in vitro* intentando recrear de alguna manera el ambiente que rodea al N celular en condiciones fisiológicas, esto es el citosol. Sin embargo, resulta imposible reproducir en su totalidad estas condiciones ya que nuestro modelo carece de la intrincada red de fibras del citoesqueleto (aproximadamente 2 m² de filamentos. ml citoplasma hepático⁻¹) así como los sistemas de endomembranas (aproximadamente 1 m² de membranas. ml citoplasma hepático⁻¹) que se encuentran en el citoplasma celular (268). Por lo tanto, en el citoplasma, resulta más

probable que la difusión de los AGL sea mucho más lenta que el transporte de los mismos mediado por proteínas específicas en un medio acuoso. Por otro lado, si bien está descrito que las concentraciones citosólicas de FABPs en células de hígado son de 0.2 a 1 mM (269) (270) (271), sólo el 2 % del total se encontraría unida a un ligando (272) (273). Si bien en nuestros experimentos se trabajó con una concentración de L-FABP de 2 μ M, no se puede descartar que la misma corresponda a la concentración fisiológica de microambientes que, *in vivo*, rodean al N celular.

Los experimentos realizados con Mx se realizaron con el objetivo de determinar si los AG unidos a L-FABP que llegan o se encuentran en el interior del N celular, independientemente del mecanismo por el cual atraviezan la membrana nuclear, se pueden esterificar y redistribuir en los lípidos endonucleares. Al respecto es importante señalar que el tamaño de la L-FABP, con o sin ligando, le permitiría ingresar al N celular a través del complejo del poro nuclear (260) por difusión simple ya que el transporte activo y regulado se realiza para moléculas mayores a 60 kDa.

Recientemente, Lawrence y colaboradores (263), estudiaron el rol de L-FABP en el transporte del AG 18:1 hacia la matriz nuclear. Determinaron que la L-FABP interacciona directamente con una proteína de la Mx de 33 kDa. Estos autores concluyen sobre el mecanismo de interacción de los AG citosólicos unidos a L-FABP con los N celulares sin considerar que su sistema carece de membrana nuclear ya que los N fueron tratados con TX-100). A pesar de esto los autores extrapolan sus conclusiones a N entero. Por otro lado, estos autores no agregaron ATP y CoA al MI y, como hemos demostrado, en estas condiciones los AG exógenos no se pueden esterificar. Por otro lado, el 18:1 que utilizaron como AG exógeno constituye un componente

minoritario en masa del pool de AG nuclear y endonuclear (Tabla 5.2) de células de hígado de rata.

El patron de incorporación y esterificación del ácido 18:0 libre en los lípidos endonucleares no presentó diferencias significativas con el de dicho AG unido a L-FABP. Al igual que lo observado en N entero, en la Mx, el 18:0 no solo se esterificó en FL y TAG, como el AA, sino que, además, se esterificó en DAG.

El 18:0 libre o unido a L-FABP se esterificó con mayor AE en la FE endonuclear, seguida de FI, FS y, por último, FC.

Se observó que tanto el 18:0 como el 20:4n-6, libres o unidos a L-FABP, se incorporaron y esterificaron en los lípidos endonucleares con mayores AE que en los de los N enteros. Estos resultados evidenciarían que el metabolismo lipídico en la Mx es mucho más activo que en los N enteros.

Cuando el 20:4n-6 esta unido a L-FABP se esterifica en los FL endonucleares en mayor proporción que el libre; esto ocurre a expensas del pool de AGL, que disminuye (Figura 5.24). Estos resultados no se observaron en N enteros.

El mayor porcentaje de esterificación del AA unido a L-FABP en las diferentes clases fosfolipídicas endonucleares se observó en FC, seguida por FE y FI. Este resultado no es sorprendente ya que FC es el FL mayoritario en masa de las Mx (Tabla 5.1). Se observó también que cuando el AA esta unido a L-FABP se esterifica en mayor proporción en el pool endonuclear de FI, respecto del ácido libre. Este hecho podría significar que la L-FABP direccionaría este AG hacia las enzimas responsables de la esterificación del mismo en este fosfolípido en particular, empezando por la ACS que activa al AA previo a su esterificación en FI. Más aún, es importante tener presente que las enzimas que intervienen en el ciclo del FI nuclear se encuentran asociadas preferencialmente al interior nuclear (274) (275) (276).

En conclusión, la esterificación de los AG 18:0 y 20:4n-6 unidos a L-FABP en los pools lipídicos endonucleares es un proceso dependiente de ATP y CoA, al igual que cuando estos AG se encuentran libres. Los patrones de esterificación de dichos AG unidos a L-FABP en los pools lipídicos endonucleares son los mismos que cuando están libres, a excepción del AA que cuando está unido a L-FABP se esterifica preferencialmente en el FI endonuclear, respecto del ácido libre.

En función de los resultados obtenidos proponemos que un posible mecanismo de incorporación de AG en el N celular sería el siguiente:

- los AG procedentes del citosol llegan al N celular libres o unidos a la L-FABP;
 - estos AG, unidos a L-FABP, se internalizan a través del CPN o
 - se incorporan como AGL y/o se esterifican en los pools lipídicos nucleares, por un mecanismo dependiente de ATP y CoA.
- Posteriormente, los AG de estos pools lipídicos pueden ser:

- hidrolizados
- activados por la *acil-CoA sintetasa* de cadena larga nuclear para ser reesterificados en otros pools lipídicos de la membrana o del interior nuclear
- cumplir funciones estructurales
- desaturados, remodelados, etc.
- constituir los sustratos de numerosas vías nucleares de transducción de señales que intervendrán en una gran diversidad de funciones celulares
- intervenir en la regulación de la expresión genética tanto por un efecto directo de los AG o acil-CoAs o a través de la interacción con factores de transcripción como los PPAR

- intervenir en la regulación de la actividad de enzimas (como las topoisomerasas y la ADN polimerasas), de proteínas de canales iónicos y proteínas de membrana
- intervenir en la estabilización y organización de la estructura de la cromatina; entre otros.

1. Dundr,M. and Misteli,T. (2001) Functional architecture in the cell nucleus, *Biochem. J.* 356, 297-310.
2. Alberts,B., Johnson,A., Lewis,J., Raff,M., Roberts,K., and Walter,P. Molecular Biology of the Cell. 2002.

Ref Type: Generic

3. Frederiks,W.M., James,J., Arnouts,C., Broekhoven,S., and Morreau,J. (1978) The influence of Triton X-100 on the nuclear envelope of the isolated liver cell nuclei, *Cytobiologie.* 18, 254-271.
4. Fricker,M., Hollinshead,M., White,N., and Vaux,D. (1997) Interphase nuclei of many mammalian cell types contain deep, dynamic, tubular membrane-bound invaginations of the nuclear envelope, *J. Cell Biol.* 136, 531-544.
5. Viola-Magni,M.P., Gahan,P.B., and Pacy,J. (1985) Phospholipids in plant and animal chromatin, *Cell Biochem. Funct.* 3, 71-78.
6. Albi,E., Mersel,M., Leray,C., Tomassoni,M.L., and Viola-Magni,M.P. (1994) Rat liver chromatin phospholipids, *Lipids* 29, 715-719.
7. Cremer,T. and Cremer,C. (2001) Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells, *Nat. Rev. Genet.* 2, 292-301.

8. Cremer,T., Kurz,A., Zirbel,R., Dietzel,S., Rinke,B., Schrock,E., Speicher,M.R., Mathieu,U., Jauch,A., Emmerich,P., Scherthan,H., Ried,T., Cremer,C., and Lichter,P. (1993) Role of chromosome territories in the functional compartmentalization of the cell nucleus, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 58, 777-792.
9. Cremer,T., Kupper,K., Dietzel,S., and Fakan,S. (2004) Higher order chromatin architecture in the cell nucleus: on the way from structure to function, *Biol. Cell* 96, 555-567.
10. Cmarko,D., Verschure,P.J., Otte,A.P., van Driel,R., and Fakan,S. (2003) Polycomb group gene silencing proteins are concentrated in the perichromatin compartment of the mammalian nucleus, *J. Cell Sci.* 116, 335-343.
11. Misteli,T. (2000) Cell biology of transcription and pre-mRNA splicing: nuclear architecture meets nuclear function, *J. Cell Sci.* 113 (Pt 11), 1841-1849.
12. Tabellini,G., Bortul,R., Santi,S., Riccio,M., Baldini,G., Cappellini,A., Billi,A.M., Berezney,R., Ruggeri,A., Cocco,L., and Martelli,A.M. (2003) Diacylglycerol kinase-theta is localized in the speckle domains of the nucleus, *Exp. Cell Res.* 287, 143-154.
13. Misteli,T., Caceres,J.F., and Spector,D.L. (1997) The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells, *Nature* 387, 523-527.

14. Gall, J.G. (2000) Cajal bodies: the first 100 years, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 273-300.
15. Frey, M.R., Bailey, A.D., Weiner, A.M., and Matera, A.G. (1999) Association of snRNA genes with coiled bodies is mediated by nascent snRNA transcripts, *Curr. Biol.* 9, 126-135.
16. Gall, J.G., Bellini, M., Wu, Z., and Murphy, C. (1999) Assembly of the nuclear transcription and processing machinery: Cajal bodies (coiled bodies) and transcriptosomes, *Mol. Biol. Cell* 10, 4385-4402.
17. Maul, G.G., Negorev, D., Bell, P., and Ishov, A.M. (2000) Review: properties and assembly mechanisms of ND10, PML bodies, or PODs, *J. Struct. Biol.* 129, 278-287.
18. Spector, D.L. (2001) Nuclear domains, *J. Cell Sci.* 114, 2891-2893.
19. Huang, S. (2000) Review: perinucleolar structures, *J. Struct. Biol.* 129, 233-240.
20. Saurin, A.J., Shiels, C., Williamson, J., Satijn, D.P., Otte, A.P., Sheer, D., and Freemont, P.S. (1998) The human polycomb group complex associates with pericentromeric heterochromatin to form a novel nuclear domain, *J. Cell Biol.* 142, 887-898.
21. Matera, A.G. (1999) Nuclear bodies: multifaceted subdomains of the interchromatin space, *Trends Cell Biol.* 9, 302-309.

22. Schul,W., Groenhout,B., Koberna,K., Takagaki,Y., Jenny,A., Manders,E.M., Raska,I., van Driel,R., and de Jong,L. (1996) The RNA 3' cleavage factors CstF 64 kDa and CPSF 100 kDa are concentrated in nuclear domains closely associated with coiled bodies and newly synthesized RNA, *EMBO J.* 15, 2883-2892.
23. Pederson,T. (2000) Half a century of "the nuclear matrix", *Mol. Biol. Cell* 11, 799-805.
24. Berezney,R. and Coffey,D.S. (1974) Identification of a nuclear protein matrix, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 60, 1410-1417.
25. Fawcett,D.W. An Atlas of Fine Structure: The Cell, Its Organelles and Inclusions. Philadelphia: W.B. Saunders Co. 1966.

Ref Type: Generic

26. Smetana,K., Daskal,Y., Gyorkey,F., Gyorkey,P., Lehane,D.E., Rudolph,A.H., and Busch,H. (1977) Nuclear and nucleolar ultrastructure of Sezary cells, *Cancer Res.* 37, 2036-2042.
27. Neitcheva,T. and Peeva,D. (1995) Phospholipid composition, phospholipase A2 and sphingomyelinase activities in rat liver nuclear membrane and matrix, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 27, 995-1001.
28. Nickerson,J.A. Experimental observations of a nuclear matrix. 2002.

Ref Type: Generic

29. Bode,J., Kohwi,Y., Dickinson,L., Joh,T., Klehr,D., Mielke,C., and Kohwi-Shigematsu,T. (1992) Biological significance of unwinding capability of nuclear matrix-associating DNAs, *Science* 255, 195-197.
30. Pardoll,D.M., Vogelstein,B., and Coffey,D.S. (1980) A fixed site of DNA replication in eucaryotic cells, *Cell* 19, 527-536.
31. Cook,P.R. (1999) The organization of replication and transcription, *Science* 284, 1790-1795.
32. Hendzel,M.J., Sun,J.M., Chen,H.Y., Rattner,J.B., and Davie,J.R. (1994) Histone acetyltransferase is associated with the nuclear matrix, *J. Biol. Chem.* 269, 22894-22901.
33. Reyes,J.C., Muchardt,C., and Yaniv,M. (1997) Components of the human SWI/SNF complex are enriched in active chromatin and are associated with the nuclear matrix, *J. Cell Biol.* 137, 263-274.
34. Sun,J.M., Chen,H.Y., Moniwa,M., Samuel,S., and Davie,J.R. (1999) Purification and characterization of chicken erythrocyte histone deacetylase 1, *Biochemistry* 38, 5939-5947.
35. Mattern,K.A., Humbel,B.M., Muijsers,A.O., de Jong,L., and van Driel,R. (1996) hnRNP proteins and B23 are the major proteins of the internal nuclear matrix of HeLa S3 cells, *J. Cell Biochem.* 62, 275-289.

36. Nickerson, J.A., Krockmalnic, G., Wan, K.M., and Penman, S. (1997) The nuclear matrix revealed by eluting chromatin from a cross-linked nucleus, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 4446-4450.
37. Rando, O.J., Zhao, K., and Crabtree, G.R. (2000) Searching for a function for nuclear actin, *Trends Cell Biol.* 10, 92-97.
38. Capco, D.G., Wan, K.M., and Penman, S. (1982) The nuclear matrix: three-dimensional architecture and protein composition, *Cell* 29, 847-858.
39. Tan, J.H., Wooley, J.C., and LeStourgeon, W.M. (2000) Nuclear matrix-like filaments and fibrogranular complexes form through the rearrangement of specific nuclear ribonucleoproteins, *Mol. Biol. Cell* 11, 1547-1554.
40. He, D.C., Martin, T., and Penman, S. (1991) Localization of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein in the interphase nuclear matrix core filaments and on perichromosomal filaments at mitosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 7469-7473.
41. Burke, B. and Ellenberg, J. (2002) Remodelling the walls of the nucleus, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 487-497.
42. Iborra, F.J., Jackson, D.A., and Cook, P.R. (2001) Coupled transcription and translation within nuclei of mammalian cells, *Science* 293, 1139-1142.

43. Kaufmann,S.H., Gibson,W., and Shaper,J. Characterization of the Major Polypeptides of the Rat Liver Nuclear Envelope. 1983.

Ref Type: Generic

44. Khandwala,A.S. and Kasper,C.B. (1971) The fatty acid composition of individual phospholipids from rat liver nuclear membrane and nuclei, *J. Biol. Chem.* 246, 6242-6246.
45. Hutchison,C.J. (2002) Lamins: building blocks or regulators of gene expression?, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 848-858.
46. Stuurman,N., Heins,S., and Aepli,U. (1998) Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions, *J. Struct. Biol.* 122, 42-66.
47. Gruenbaum,Y., Wilson,K.L., Harel,A., Goldberg,M., and Cohen,M. (2000) Review: nuclear lamins--structural proteins with fundamental functions, *J. Struct. Biol.* 129, 313-323.
48. Frangioni,J.V. and Neel,B.G. (1993) Use of a general purpose mammalian expression vector for studying intracellular protein targeting: identification of critical residues in the nuclear lamin A/C nuclear localization signal, *J. Cell Sci.* 105 (Pt 2), 481-488.
49. Holt,I., Clements,L., Manilal,S., Brown,S.C., and Morris,G.E. (2001) The R482Q lamin A/C mutation that causes lipodystrophy does not prevent nuclear targeting of lamin A in adipocytes or its interaction with emerin, *Eur. J. Hum. Genet.* 9, 204-208.

50. Krohne,G., Waizenegger,I., and Hoger,T.H. (1989) The conserved carboxy-terminal cysteine of nuclear lamins is essential for lamin association with the nuclear envelope, *J. Cell Biol.* 109, 2003-2011.
51. Vorburger,K., Kitten,G.T., and Nigg,E.A. (1989) Modification of nuclear lamin proteins by a mevalonic acid derivative occurs in reticulocyte lysates and requires the cysteine residue of the C-terminal CXXM motif, *EMBO J.* 8, 4007-4013.
52. Ledeen,R.W. and Wu,G. (2004) Nuclear lipids: key signaling effectors in the nervous system and other tissues, *J. Lipid Res.* 45, 1-8.
53. Fried,H. and Kutay,U. (2003) Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory, *Cell Mol. Life Sci.* 60, 1659-1688.
54. Schneider,R., Hitomi,M., Ivessa,A.S., Fasch,E.V., Kohlwein,S.D., and Tartakoff,A.M. (1996) A yeast acetyl coenzyme A carboxylase mutant links very-long-chain fatty acid synthesis to the structure and function of the nuclear membrane-pore complex, *Mol. Cell Biol.* 16, 7161-7172.
55. Bourgeois,C.A., Hemon,D., and Bouteille,M. (1979) Structural relationship between the nucleolus and the nuclear envelope, *J. Ultrastruct. Res.* 68, 328-340.

56. Lui,P.P., Chan,F.L., Suen,Y.K., Kwok,T.T., and Kong,S.K. (2003) The nucleus of HeLa cells contains tubular structures for Ca²⁺ signaling with the involvement of mitochondria, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308, 826-833.
57. Collings,D.A., Carter,C.N., Rink,J.C., Scott,A.C., Wyatt,S.E., and Allen,N.S. (2000) Plant nuclei can contain extensive grooves and invaginations, *Plant Cell* 12, 2425-2440.
58. Echevarria,W., Leite,M.F., Guerra,M.T., Zipfel,W.R., and Nathanson,M.H. (2003) Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum, *Nat. Cell Biol.* 5, 440-446.
59. Dickinson,H.G. and Bell,P.R. (1972) Structures resembling nuclear pores at the orifice of nuclear invaginations in developing microspores of *Pinus banksiana*, *Dev. Biol.* 27, 425-429.
60. Hochstrasser,M. and Sedat,J.W. (1987) Three-dimensional organization of *Drosophila melanogaster* interphase nuclei. II. Chromosome spatial organization and gene regulation, *J. Cell Biol.* 104, 1471-1483.
61. Park,P.C. and De Boni,U. (1992) Nuclear membrane modifications in polytene nuclei of *Drosophila melanogaster*: serial reconstruction and cytochemistry, *Anat. Rec.* 234, 15-26.

62. Stevens,J.K. and Trogadis,J. (1986) Reconstructive three-dimensional electron microscopy. A routine biologic tool, *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 8, 102-107.
63. Fricker,M., Hollinshead,M., White,N., and Vaux,D. (1997) Interphase nuclei of many mammalian cell types contain deep, dynamic, tubular membrane-bound invaginations of the nuclear envelope, *J. Cell Biol.* 136, 531-544.
64. Lui,P.P., Lee,C.Y., Tsang,D., and Kong,S.K. (1998) Ca²⁺ is released from the nuclear tubular structure into nucleoplasm in C6 glioma cells after stimulation with phorbol ester, *FEBS Lett.* 432, 82-87.
65. Chayen,J. and Gahan,P.B. Lipid components in nucleohistone. *Biochem. J.* 69, 49. 1957.

Ref Type: Generic

66. Song,M. and Rebel,G. (1987) Rat liver nuclear lipids. Composition and biosynthesis, *Basic Appl. Histochem.* 31, 377-387.
67. Spangler,M., Coetzee,M.L., Katyal,S.L., Morris,H.P., and Ove,P. (1975) Some biochemical characteristics of rat liver and Morris hepatoma nuclei and nuclear membranes, *Cancer Res.* 35, 3131-3135.

68. Upreti,G.C., deAntueno,R.J., and Wood,R. (1983) Membrane lipids of hepatic tissue. II. Phospholipids from subcellular fractions of liver and hepatoma 7288CTC, *J. Natl. Cancer Inst.* 70, 567-573.

69. Idelman,S. Existence d'un complexe lipides-nucléoprotéines á groupements sulfhydrisés au niveau du chromosome. Comptes. Rend. Acad. Sci. 244, 1827-1829. 1957.

Ref Type: Generic

70. La Cour,L.F., Chayen,J., and Gahan,P.B. Evidence for lipid material in chromosomes. Exp. Cell Res. 14, 469-474. 1958.

Ref Type: Generic

71. Cave,C.F. and Gahan,P.B. A cytochemical and autoradiographic investigation of nucleolar phospholipids. Caryologia 23, 303-312. 1971.

Ref Type: Generic

72. Viola Magni,M.P., Gahan,P.B., Albi,E., Iapocce,R., and Gentilucci,P.F. (1985) Chromatin phospholipids and DNA synthesis in hepatic cells, *Basic Appl. Histochem.* 29, 253-259.

73. Frascini,A., Albi,E., Gahan,P.B., and Viola-Magni,M.P. (1992) TEM cytochemical study of the localization of phospholipids in interphase chromatin in rat hepatocytes, *Histochemistry* 97, 225-235.

74. Maraldi,N.M., Zini,N., Squarzone,S., Del Coco,R., Sabatelli,P., and Manzoli,F.A. (1992) Intranuclear localization of phospholipids by ultrastructural cytochemistry, *J. Histochem. Cytochem.* 40, 1383-1392.
75. Divecha,N., Banfic,H., and Irvine,R.F. (1993) Inositides and the nucleus and inositides in the nucleus, *Cell* 74, 405-407.
76. Mazzotti,G., Zini,N., Rizzi,E., Rizzoli,R., Galanzi,A., Ognibene,A., Santi,S., Matteucci,A., Martelli,A.M., and Maraldi,N.M. (1995) Immunocytochemical detection of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate localization sites within the nucleus, *J. Histochem. Cytochem.* 43, 181-191.
77. Albi,E., Mersel,M., Leray,C., Tomassoni,M.L., and Viola-Magni,M.P. (1994) Rat liver chromatin phospholipids, *Lipids* 29, 715-719.
78. James,J.L., Clawson,G.A., Chan,C.H., and Smuckler,E.A. (1981) Analysis of the phospholipid of the nuclear envelope and endoplasmic reticulum of liver cells by high pressure liquid chromatography, *Lipids* 16, 541-545.
79. Divecha,N. and Irvine,R.F. (1995) Phospholipid signaling, *Cell* 80, 269-278.

80. Martelli,A.M., Tabellini,G., Borgatti,P., Bortul,R., Capitani,S., and Neri,L.M. (2003) Nuclear lipids: new functions for old molecules?, *J. Cell Biochem.* 88, 455-461.
81. Payrastre,B., Missy,K., Giuriato,S., Bodin,S., Plantavid,M., and Gratacap,M. (2001) Phosphoinositides: key players in cell signalling, in time and space, *Cell Signal.* 13, 377-387.
82. Divecha,N. and Irvine,R.F. (1995) Phospholipid signaling, *Cell* 80, 269-278.
83. Liscovitch,M. and Cantley,L.C. (1994) Lipid second messengers, *Cell* 77, 329-334.
84. Tamiya-Koizumi,K. (2002) Nuclear lipid metabolism and signaling, *J. Biochem. (Tokyo)* 132, 13-22.
85. Albi,E. and Viola-Magni,M.P. (2003) Chromatin-associated sphingomyelin: metabolism in relation to cell function, *Cell Biochem. Funct.* 21, 211-215.
86. Albi,E. and Viola-Magni,M.P. (1997) Choline base exchange activity in rat hepatocyte nuclei and nuclear membranes, *Cell Biol. Int.* 21, 217-221.
87. Albi,E. and Viola,M.M. (1999) Phosphatidylcholine-dependent phospholipase C in rat liver chromatin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 265, 640-643.

88. Albi,E., Lazzarini,R., and Magni,M.V. (2003) Reverse sphingomyelin-synthase in rat liver chromatin, *FEBS Lett.* 549, 152-156.
89. Hunt,A.N., Clark,G.T., Attard,G.S., and Postle,A.D. (2001) Highly saturated endonuclear phosphatidylcholine is synthesized in situ and colocated with CDP-choline pathway enzymes, *J. Biol. Chem.* 276, 8492-8499.
90. Antony,P., Kanfer,J.N., and Freysz,L. (2000) Phosphatidylcholine metabolism in nuclei of phorbol ester-activated LA-N-1 neuroblastoma cells, *Neurochem. Res.* 25, 1073-1082.
91. Bjerve,K.S. (1971) The Ca(2+) stimulated incorporation of choline into microsomal lecithin subspecies in vitro, *FEBS Lett.* 17, 14-16.
92. Spence,M.W., Clarke,J.T., and Cook,H.W. (1983) Pathways of sphingomyelin metabolism in cultured fibroblasts from normal and sphingomyelin lipidosis subjects, *J. Biol. Chem.* 258, 8595-8600.
93. Baldassare,J.J., Jarpe,M.B., Alferes,L., and Raben,D.M. (1997) Nuclear translocation of RhoA mediates the mitogen-induced activation of phospholipase D involved in nuclear envelope signal transduction, *J. Biol. Chem.* 272, 4911-4914.
94. Albi,E. and Viola Magni,M.P. (2004) The role of intranuclear lipids, *Biol. Cell* 96, 657-667.

95. Ohanian,J. and Ohanian,V. (2001) Lipid second messenger regulation: the role of diacylglycerol kinases and their relevance to hypertension, *J. Hum. Hypertens.* 15, 93-98.
96. Boronenkov,I.V., Loijens,J.C., Umeda,M., and Anderson,R.A. (1998) Phosphoinositide signaling pathways in nuclei are associated with nuclear speckles containing pre-mRNA processing factors, *Mol. Biol. Cell* 9, 3547-3560.
97. Micheli,M., Albi,E., Leray,C., and Magni,M.V. (1998) Nuclear sphingomyelin protects RNA from RNase action, *FEBS Lett.* 431, 443-447.
98. Tamiya-Koizumi,K., Umekawa,H., Yoshida,S., Ishihara,H., and Kojima,K. (1989) A novel phospholipase A2 associated with nuclear matrix: stimulation of the activity and modulation of the Ca²⁺ dependency by polyphosphoinositides, *Biochim. Biophys. Acta* 1002, 182-188.
99. Sierra-Honigmann,M.R., Bradley,J.R., and Pober,J.S. (1996) "Cytosolic" phospholipase A2 is in the nucleus of subconfluent endothelial cells but confined to the cytoplasm of confluent endothelial cells and redistributes to the nuclear envelope and cell junctions upon histamine stimulation, *Lab Invest* 74, 684-695.

100. Antony,P., Freysz,L., Horrocks,L.A., and Farooqui,A.A. (2001) Effect of retinoic acid on the Ca²⁺-independent phospholipase A2 in nuclei of LA-N-1 neuroblastoma cells, *Neurochem. Res.* 26, 83-88.
101. Antony,P., Freysz,L., Horrocks,L.A., and Farooqui,A.A. (2003) Ca²⁺-independent phospholipases A2 and production of arachidonic acid in nuclei of LA-N-1 cell cultures: a specific receptor activation mediated with retinoic acid, *Brain Res. Mol. Brain Res.* 115, 187-195.
102. Fayard,J.M., Tessier,C., Pageaux,J.F., Lagarde,M., and Laugier,C. (1998) Nuclear location of PLA2-I in proliferative cells, *J. Cell Sci.* 111 (Pt 7), 985-994.
103. Martelli,A.M., Fala,F., Faenza,I., Billi,A.M., Cappellini,A., Manzoli,L., and Cocco,L. (2004) Metabolism and signaling activities of nuclear lipids, *Cell Mol. Life Sci.* 61, 1143-1156.
104. Ishihara,H., Tamiya-Koizumi,K., Kuriki,H., Yoshida,S., and Kojima,K. (1991) Growth-associated changes in fatty acid compositions of nuclear phospholipids of liver cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1084, 53-59.
105. de Vries,K.J., Westerman,J., Bastiaens,P.I., Jovin,T.M., Wirtz,K.W., and Snoek,G.T. (1996) Fluorescently labeled phosphatidylinositol transfer protein isoforms (alpha and beta), microinjected into fetal bovine heart endothelial cells, are targeted to distinct intracellular sites, *Exp. Cell Res.* 227, 33-39.

106. Irvine,R.F. (2003) Nuclear lipid signalling, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 349-360.
107. Gevorkian,E.S., Demirkhanian,D.O., Iavroian,Z., Artsruni,I.G., and Akopian,N.R. (2001) [Effect of insulin on the composition of chromatin phospholipid in rat liver cells], *Ukr. Biokhim. Zh.* 73, 51-54.
108. Alessenko,A.V. and Burlakova,E.B. (2002) Functional role of phospholipids in the nuclear events, *Bioelectrochemistry.* 58, 13-21.
109. Osborne,S.L., Thomas,C.L., Gschmeissner,S., and Schiavo,G. (2001) Nuclear PtdIns(4,5)P₂ assembles in a mitotically regulated particle involved in pre-mRNA splicing, *J. Cell Sci.* 114, 2501-2511.
110. Zhao,K., Wang,W., Rando,O.J., Xue,Y., Swiderek,K., Kuo,A., and Crabtree,G.R. (1998) Rapid and phosphoinositol-dependent binding of the SWI/SNF-like BAF complex to chromatin after T lymphocyte receptor signaling, *Cell* 95, 625-636.
111. Yu,H., Fukami,K., Watanabe,Y., Ozaki,C., and Takenawa,T. (1998) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate reverses the inhibition of RNA transcription caused by histone H1, *Eur. J. Biochem.* 251, 281-287.
112. Martelli,A.M., Manzoli,L., and Cocco,L. (2004) Nuclear inositides: facts and perspectives, *Pharmacol. Ther.* 101, 47-64.

113. Alessenko,A. and Chatterjee,S. (1995) Neutral sphingomyelinase: localization in rat liver nuclei and involvement in regeneration/proliferation, *Mol. Cell Biochem.* 143, 169-174.
114. Tamiya-Koizumi,K., Umekawa,H., Yoshida,S., and Kojima,K. (1989) Existence of Mg²⁺-dependent, neutral sphingomyelinase in nuclei of rat ascites hepatoma cells, *J. Biochem. (Tokyo)* 106, 593-598.
115. Albi,E. and Magni,M.P. (1997) Chromatin neutral sphingomyelinase and its role in hepatic regeneration, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236, 29-33.
116. Tsugane,K., Tamiya-Koizumi,K., Nagino,M., Nimura,Y., and Yoshida,S. (1999) A possible role of nuclear ceramide and sphingosine in hepatocyte apoptosis in rat liver, *J. Hepatol.* 31, 8-17.
117. Kleuser,B., Maceyka,M., Milstien,S., and Spiegel,S. (2001) Stimulation of nuclear sphingosine kinase activity by platelet-derived growth factor, *FEBS Lett.* 503, 85-90.
118. Albi,E. and Magni,M.V. (1999) Sphingomyelin synthase in rat liver nuclear membrane and chromatin, *FEBS Lett.* 460, 369-372.
119. Huwiler,A., Kolter,T., Pfeilschifter,J., and Sandhoff,K. (2000) Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling, *Biochim. Biophys. Acta* 1485, 63-99.

120. Albi,E., Pieroni,S., Viola Magni,M.P., and Sartori,C. (2003) Chromatin sphingomyelin changes in cell proliferation and/or apoptosis induced by ciprofibrate, *J. Cell Physiol* 196, 354-361.
121. Gruppuso,P.A. and Boylan,J.M. (1995) Developmental changes in the activity and cellular localization of hepatic casein kinase II in the rat, *J. Cell Biochem.* 58, 65-72.
122. Andrieu-Abadie,N. and Levade,T. (2002) Sphingomyelin hydrolysis during apoptosis, *Biochim. Biophys. Acta* 1585, 126-134.
123. Cuvillier,O. (2002) Sphingosine in apoptosis signaling, *Biochim. Biophys. Acta* 1585, 153-162.
124. Municio,M.M., Lozano,J., Sanchez,P., Moscat,J., and Diaz-Meco,M.T. (1995) Identification of heterogeneous ribonucleoprotein A1 as a novel substrate for protein kinase C zeta, *J. Biol. Chem.* 270, 15884-15891.
125. Nicotera,P., Zhivotovsky,B., and Orrenius,S. (1994) Nuclear calcium transport and the role of calcium in apoptosis, *Cell Calcium* 16, 279-288.
126. Dygas,A., Przybylek,K., Meljon,A., and Baranska,J. (2000) Serine base-exchange in rat liver nuclei, *FEBS Lett.* 482, 205-208.
127. Stone,S.J. and Vance,J.E. (1999) Cloning and expression of murine liver phosphatidylserine synthase (PSS)-2: differential regulation of

- phospholipid metabolism by PSS1 and PSS2, *Biochem. J.* 342 (Pt 1), 57-64.
128. Manzoli,F.A., Capitani,S., Mazzotti,G., Barnabei,O., and Maraldi,N.M. (1982) Role of chromatin phospholipids on template availability and ultrastructure of isolated nuclei, *Adv. Enzyme Regul.* 20, 247-262.
129. Nishizuka,Y. (1995) Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses, *FASEB J.* 9, 484-496.
130. Alroy,J., Merk,F.B., Goyal,V., and Ucci,A. (1981) Heterogeneous distribution of filipin-sterol complexes in nuclear membranes, *Biochim. Biophys. Acta* 649, 239-243.
131. Albi,E. and Magni,M.V. (2002) The presence and the role of chromatin cholesterol in rat liver regeneration, *J. Hepatol.* 36, 395-400.
132. Albi,E., Cataldi,S., Rossi,G., and Magni,M.V. (2003) A possible role of cholesterol-sphingomyelin/phosphatidylcholine in nuclear matrix during rat liver regeneration, *J. Hepatol.* 38, 623-628.
133. Keenan,T.W., Morre,D.J., and Huang,C.M. (1972) Distribution of gangliosides among subcellular fractions from rat liver and bovine mammary gland, *FEBS Lett.* 24, 204-208.

134. Ves-Losada,A. and Brenner,R.R. (1995) Fatty acid delta 5 desaturation in rat liver cell nuclei, *Mol. Cell Biochem.* 142, 163-170.
135. Tomlinson,J.E., Nakayama,R., and Holten,D. (1988) Repression of pentose phosphate pathway dehydrogenase synthesis and mRNA by dietary fat in rats, *J. Nutr.* 118, 408-415.
136. Clarke,S.D., Armstrong,M.K., and Jump,D.B. (1990) Dietary polyunsaturated fats uniquely suppress rat liver fatty acid synthase and S14 mRNA content, *J. Nutr.* 120, 225-231.
137. Blake,W.L. and Clarke,S.D. (1990) Suppression of rat hepatic fatty acid synthase and S14 gene transcription by dietary polyunsaturated fat, *J. Nutr.* 120, 1727-1729.
138. Ellinghaus,P., Wolfrum,C., Assmann,G., Spener,F., and Seedorf,U. (1999) Phytanic acid activates the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in sterol carrier protein 2-/sterol carrier protein x-deficient mice, *J. Biol. Chem.* 274, 2766-2772.
139. Duplus,E. and Forest,C. (2002) Is there a single mechanism for fatty acid regulation of gene transcription?, *Biochem. Pharmacol.* 64, 893-901.
140. Bordewick,U., Heese,M., Borchers,T., Robenek,H., and Spener,F. (1989) Compartmentation of hepatic fatty-acid-binding protein in

- liver cells and its effect on microsomal phosphatidic acid biosynthesis, *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 370, 229-238.
141. Funk,C.D. (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology, *Science* 294, 1871-1875.
142. Brock,T.G., Paine,R., III, and Peters-Golden,M. (1994) Localization of 5-lipoxygenase to the nucleus of unstimulated rat basophilic leukemia cells, *J. Biol. Chem.* 269, 22059-22066.
143. Reiber,D.C. and Murphy,R.C. (2000) Covalent binding of LTA(4) to nucleosides and nucleotides, *Arch. Biochem. Biophys.* 379, 119-126.
144. Devchand,P.R., Keller,H., Peters,J.M., Vazquez,M., Gonzalez,F.J., and Wahli,W. (1996) The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control, *Nature* 384, 39-43.
145. Smith,W.L., Dewitt,D.L., and Garavito,R.M. (2000) Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology, *Annu. Rev. Biochem.* 69, 145-182.
146. Spencer,A.G., Woods,J.W., Arakawa,T., Singer,I.I., and Smith,W.L. (1998) Subcellular localization of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by immunoelectron microscopy, *J. Biol. Chem.* 273, 9886-9893.
147. Parfenova,H., Parfenov,V.N., Shlopov,B.V., Levine,V., Falkos,S., Pourcyrus,M., and Leffler,C.W. (2001) Dynamics of nuclear

- localization sites for COX-2 in vascular endothelial cells, *Am. J. Physiol Cell Physiol* 281, C166-C178.
148. Kliewer, S.A., Lenhard, J.M., Willson, T.M., Patel, I., Morris, D.C., and Lehmann, J.M. (1995) A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation, *Cell* 83, 813-819.
149. Zimmerman, A.W. and Veerkamp, J.H. (2002) New insights into the structure and function of fatty acid-binding proteins, *Cell Mol. Life Sci.* 59, 1096-1116.
150. Veerkamp, J.H., van Kuppevelt, T.H., Maatman, R.G., and Prinsen, C.F. (1993) Structural and functional aspects of cytosolic fatty acid-binding proteins, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 49, 887-906.
151. Maatman, R.G., van Moerkerk, H.T., Nooren, I.M., van Zoelen, E.J., and Veerkamp, J.H. (1994) Expression of human liver fatty acid-binding protein in *Escherichia coli* and comparative analysis of its binding characteristics with muscle fatty acid-binding protein, *Biochim. Biophys. Acta* 1214, 1-10.
152. Thumser, A.E., Voysey, J., and Wilton, D.C. (1996) Mutations of recombinant rat liver fatty acid-binding protein at residues 102 and 122 alter its structural integrity and affinity for physiological ligands, *Biochem. J.* 314 (Pt 3), 943-949.

153. Zimmerman,A.W., van Moerkerk,H.T., and Veerkamp,J.H. (2001) Ligand specificity and conformational stability of human fatty acid-binding proteins, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33, 865-876.
154. Hsu,K.T. and Storch,J. (1996) Fatty acid transfer from liver and intestinal fatty acid-binding proteins to membranes occurs by different mechanisms, *J. Biol. Chem.* 271, 13317-13323.
155. Xu,Z., Bernlohr,D.A., and Banaszak,L.J. (1992) Crystal structure of recombinant murine adipocyte lipid-binding protein, *Biochemistry* 31, 3484-3492.
156. Hohoff,C., Borchers,T., Rustow,B., Spener,F., and van Tilbeurgh,H. (1999) Expression, purification, and crystal structure determination of recombinant human epidermal-type fatty acid binding protein, *Biochemistry* 38, 12229-12239.
157. Sacchettini,J.C., Gordon,J.I., and Banaszak,L.J. (1989) Crystal structure of rat intestinal fatty-acid-binding protein. Refinement and analysis of the Escherichia coli-derived protein with bound palmitate, *J. Mol. Biol.* 208, 327-339.
158. Zanotti,G., Scapin,G., Spadon,P., Veerkamp,J.H., and Sacchettini,J.C. (1992) Three-dimensional structure of recombinant human muscle fatty acid-binding protein, *J. Biol. Chem.* 267, 18541-18550.

159. Cowan,S.W., Newcomer,M.E., and Jones,T.A. (1993)
Crystallographic studies on a family of cellular lipophilic transport proteins. Refinement of P2 myelin protein and the structure determination and refinement of cellular retinol-binding protein in complex with all-trans-retinol, *J. Mol. Biol.* 230, 1225-1246.
160. Thompson,J., Winter,N., Terwey,D., Bratt,J., and Banaszak,L. (1997)
The crystal structure of the liver fatty acid-binding protein. A complex with two bound oleates, *J. Biol. Chem.* 272, 7140-7150.
161. Bass,N.M. (1988) The cellular fatty acid binding proteins: aspects of structure, regulation, and function, *Int. Rev. Cytol.* 111, 143-184.
162. Weisiger,R.A. (1996) When is a carrier not a membrane carrier? The cytoplasmic transport of amphipathic molecules, *Hepatology* 24, 1288-1295.
163. Storch,J. and Thumser,A.E. (2000) The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins, *Biochim. Biophys. Acta* 1486, 28-44.
164. Zucker,S.D. (2001) Kinetic model of protein-mediated ligand transport: influence of soluble binding proteins on the intermembrane diffusion of a fluorescent fatty acid, *Biochemistry* 40, 977-986.
165. Elholm,M., Garras,A., Neve,S., Tornehave,D., Lund,T.B., Skorve,J., Flatmark,T., Kristiansen,K., and Berge,R.K. (2000) Long-chain acyl-

- CoA esters and acyl-CoA binding protein are present in the nucleus of rat liver cells, *J. Lipid Res.* 41, 538-545.
166. Faergeman, N.J., Sigurskjold, B.W., Kragelund, B.B., Andersen, K.V., and Knudsen, J. (1996) Thermodynamics of ligand binding to acyl-coenzyme A binding protein studied by titration calorimetry, *Biochemistry* 35, 14118-14126.
167. Rasmussen, J.T., Faergeman, N.J., Kristiansen, K., and Knudsen, J. (1994) Acyl-CoA-binding protein (ACBP) can mediate intermembrane acyl-CoA transport and donate acyl-CoA for beta-oxidation and glycerolipid synthesis, *Biochem. J.* 299 (Pt 1), 165-170.
168. Pegorier, J.P., Le May, C., and Girard, J. (2004) Control of gene expression by fatty acids, *J. Nutr.* 134, 2444S-2449S.
169. Xu, H.E., Lambert, M.H., Montana, V.G., Parks, D.J., Blanchard, S.G., Brown, P.J., Sternbach, D.D., Lehmann, J.M., Wisely, G.B., Willson, T.M., Kliewer, S.A., and Milburn, M.V. (1999) Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors, *Mol. Cell* 3, 397-403.
170. Issemann, I. and Green, S. (1990) Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators, *Nature* 347, 645-650.

171. Escher,P. and Wahli,W. (2000) Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions, *Mutat. Res.* 448, 121-138.
172. Rosen,E.D. and Spiegelman,B.M. (2001) PPARgamma : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth, *J. Biol. Chem.* 276, 37731-37734.
173. Willson,T.M. and Wahli,W. (1997) Peroxisome proliferator-activated receptor agonists, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1, 235-241.
174. Auboeuf,D., Rieusset,J., Fajas,L., Vallier,P., Frering,V., Riou,J.P., Staels,B., Auwerx,J., Laville,M., and Vidal,H. (1997) Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients, *Diabetes* 46, 1319-1327.
175. Mukherjee,R., Jow,L., Croston,G.E., and Paterniti,J.R., Jr. (1997) Identification, characterization, and tissue distribution of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) isoforms PPARgamma2 versus PPARgamma1 and activation with retinoid X receptor agonists and antagonists, *J. Biol. Chem.* 272, 8071-8076.
176. Hihi,A.K., Michalik,L., and Wahli,W. (2002) PPARs: transcriptional effectors of fatty acids and their derivatives, *Cell Mol. Life Sci.* 59, 790-798.

177. Braissant,O. and Wahli,W. (1998) Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha, -beta, and -gamma during rat embryonic development, *Endocrinology* 139, 2748-2754.
178. Barak,Y., Liao,D., He,W., Ong,E.S., Nelson,M.C., Olefsky,J.M., Boland,R., and Evans,R.M. (2002) Effects of peroxisome proliferator-activated receptor delta on placentation, adiposity, and colorectal cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 303-308.
179. Peters,J.M., Lee,S.S., Li,W., Ward,J.M., Gavrilova,O., Everett,C., Reitman,M.L., Hudson,L.D., and Gonzalez,F.J. (2000) Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor beta(delta), *Mol. Cell Biol.* 20, 5119-5128.
180. Schmidt,A., Vogel,R.L., Witherup,K.M., Rutledge,S.J., Pitzenberger,S.M., Adam,M., and Rodan,G.A. (1996) Identification of fatty acid methyl ester as naturally occurring transcriptional regulators of the members of the peroxisome proliferator-activated receptor family, *Lipids* 31, 1115-1124.
181. Dreyer,C., Krey,G., Keller,H., Givel,F., Helftenbein,G., and Wahli,W. (1992) Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors, *Cell* 68, 879-887.

182. Tontonoz,P., Hu,E., and Spiegelman,B.M. (1994) Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor, *Cell* 79, 1147-1156.
183. Sears,I.B., MacGinnitie,M.A., Kovacs,L.G., and Graves,R.A. (1996) Differentiation-dependent expression of the brown adipocyte uncoupling protein gene: regulation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma, *Mol. Cell Biol.* 16, 3410-3419.
184. Chawla,A., Schwarz,E.J., Dimaculangan,D.D., and Lazar,M.A. (1994) Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation, *Endocrinology* 135, 798-800.
185. Ricote,M., Li,A.C., Willson,T.M., Kelly,C.J., and Glass,C.K. (1998) The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation, *Nature* 391, 79-82.
186. Zhang,B., Berger,J., Hu,E., Szalkowski,D., White-Carrington,S., Spiegelman,B.M., and Moller,D.E. (1996) Negative regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene expression contributes to the antiadipogenic effects of tumor necrosis factor-alpha, *Mol. Endocrinol.* 10, 1457-1466.
187. Ou,J., Tu,H., Shan,B., Luk,A., DeBose-Boyd,R.A., Bashmakov,Y., Goldstein,J.L., and Brown,M.S. (2001) Unsaturated fatty acids inhibit transcription of the sterol regulatory element-binding protein-1c

(SREBP-1c) gene by antagonizing ligand-dependent activation of the LXR, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 6027-6032.

188. Lu,T.T., Repa,J.J., and Mangelsdorf,D.J. (2001) Orphan nuclear receptors as eLiXiRs and FiXeRs of sterol metabolism, *J. Biol. Chem.* 276, 37735-37738.

189. Lodish,H., Berk,A., Zipursky,L.S., Matsudaira,P., Baltimore,D., and Darnell,J. Molecular Cell Biology. 5° ed. 2005.

Ref Type: Generic

190. Hertz,R., Magenheimer,J., Berman,I., and Bar-Tana,J. (1998) Fatty acyl-CoA thioesters are ligands of hepatic nuclear factor-4alpha, *Nature* 392, 512-516.

191. Wisely,G.B., Miller,A.B., Davis,R.G., Thornquest,A.D., Jr., Johnson,R., Spitzer,T., Sefler,A., Shearer,B., Moore,J.T., Miller,A.B., Willson,T.M., and Williams,S.P. (2002) Hepatocyte nuclear factor 4 is a transcription factor that constitutively binds fatty acids, *Structure. (Camb.)* 10, 1225-1234.

192. Dhe-Paganon,S., Duda,K., Iwamoto,M., Chi,Y.I., and Shoelson,S.E. (2002) Crystal structure of the HNF4 alpha ligand binding domain in complex with endogenous fatty acid ligand, *J. Biol. Chem.* 277, 37973-37976.

193. Jump,D.B. (2002) Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription, *Curr. Opin. Lipidol.* 13, 155-164.
194. Jump,D.B. and Clarke,S.D. (1999) Regulation of gene expression by dietary fat, *Annu. Rev. Nutr.* 19, 63-90.
195. Hertz,R., Seckbach,M., Zakin,M.M., and Bar-Tana,J. (1996) Transcriptional suppression of the transferrin gene by hypolipidemic peroxisome proliferators, *J. Biol. Chem.* 271, 218-224.
196. Pan,D.A., Mater,M.K., Thelen,A.P., Peters,J.M., Gonzalez,F.J., and Jump,D.B. (2000) Evidence against the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) as the mediator for polyunsaturated fatty acid suppression of hepatic L-pyruvate kinase gene transcription, *J. Lipid Res.* 41, 742-751.
197. Rajas,F., Gautier,A., Bady,I., Montano,S., and Mithieux,G. (2002) Polyunsaturated fatty acyl coenzyme A suppress the glucose-6-phosphatase promoter activity by modulating the DNA binding of hepatocyte nuclear factor 4 alpha, *J. Biol. Chem.* 277, 15736-15744.
198. Hayhurst,G.P., Lee,Y.H., Lambert,G., Ward,J.M., and Gonzalez,F.J. (2001) Hepatocyte nuclear factor 4alpha (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis, *Mol. Cell Biol.* 21, 1393-1403.

199. Eberle,D., Hegarty,B., Bossard,P., Ferre,P., and Foufelle,F. (2004)
SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis,
Biochimie 86, 839-848.

200. Osborne,T.F. (2000) Sterol regulatory element-binding proteins
(SREBPs): key regulators of nutritional homeostasis and insulin
action, *J. Biol. Chem.* 275, 32379-32382.

201. Horton,J.D., Goldstein,J.L., and Brown,M.S. (2002) SREBPs: activators
of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in
the liver, *J. Clin. Invest* 109, 1125-1131.

202. Worgall,T.S., Johnson,R.A., Seo,T., Gierens,H., and Deckelbaum,R.J.
(2002) Unsaturated fatty acid-mediated decreases in sterol
regulatory element-mediated gene transcription are linked to
cellular sphingolipid metabolism, *J. Biol. Chem.* 277, 3878-3885.

203. Schultz,J.R., Tu,H., Luk,A., Repa,J.J., Medina,J.C., Li,L.,
Schwendner,S., Wang,S., Thoolen,M., Mangelsdorf,D.J., Lustig,K.D.,
and Shan,B. (2000) Role of LXRs in control of lipogenesis, *Genes*
Dev. 14, 2831-2838.

204. DeBose-Boyd,R.A., Ou,J., Goldstein,J.L., and Brown,M.S. (2001)
Expression of sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP-
1c) mRNA in rat hepatoma cells requires endogenous LXR ligands,
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 98, 1477-1482.

205. Foufelle,F. and Ferre,P. (2002) New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c, *Biochem. J.* 366, 377-391.
206. Eberle,D., Hegarty,B., Bossard,P., Ferre,P., and Foufelle,F. (2004) SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis, *Biochimie* 86, 839-848.
207. Blobel,G. and Potter,V.R. (1966) Nuclei from rat liver: isolation method that combines purity with high yield, *Science* 154, 1662-1665.
208. Kasper,C.B. (1974) Isolation and properties of the nuclear envelope, *Methods Enzymol.* 31, 279-292.
209. Spelsberg,T.C., Knowler,J.T., and Moses,H.L. (1974) Specific methods for the isolation of nuclei from chick oviduct, *Methods Enzymol.* 31, 263-279.
210. Vann,L.R., Wooding,F.B., Irvine,R.F., and Divecha,N. (1997) Metabolism and possible compartmentalization of inositol lipids in isolated rat-liver nuclei, *Biochem. J.* 327 (Pt 2), 569-576.
211. Hogeboom,G.H. *Methods Enzymol.* 1, 16. 1955.

Ref Type: Generic

212. Lowry,O.H., ROSEBROUGH,N.J., FARR,A.L., and RANDALL,R.J. (1951)
Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*
193, 265-275.
213. Folch,J., LEES,M., and SLOANE STANLEY,G.H. (1957) A simple
method for the isolation and purification of total lipides from
animal tissues, *J. Biol. Chem.* *226*, 497-509.
214. Ves,L.A. and Brenner,R.R. (1998) Incorporation of delta 5
desaturase substrate (dihomogammalinolenic acid, 20:3 n-6) and
product (arachidonic acid 20:4 n-6) into rat liver cell nuclei,
Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids *59*, 39-47.
215. Haeffner,E.W., Hoffman,C.J.K., Stoehr,M., and Scherf,H. Cancer
Res. *44*, 2668-2676. 1984.

Ref Type: Generic

216. Morrison,W.R. and Smith,L.M. *J. Lipid Res.* *5*, 600-608. 1964.

Ref Type: Generic

217. Holub,B.J. and Skeaff,C.M. (1987) Nutritional regulation of cellular
phosphatidylinositol, *Methods Enzymol.* *141*, 234-244.
218. Letter,W.S. A rapid Method for Phospholipid Class Separation by
HPLC Using an Evaporative Light-Scattering Detector. *J. Liq.*
Chromatogr. *15*, 253-266. 1992.

Ref Type: Generic

219. Brenner,R.R., Bernasconi,A.M., and Garda,H.A. (2000) Effect of experimental diabetes on the fatty acid composition, molecular species of phosphatidyl-choline and physical properties of hepatic microsomal membranes, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 63, 167-176.

220. Brenner,R.R., Bernasconi,A.M., and Garda,H.A. (2000) Effect of experimental diabetes on the fatty acid composition, molecular species of phosphatidyl-choline and physical properties of hepatic microsomal membranes, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 63, 167-176.

221. Chen,P.S., Toribarra,T., and Huber,W. Anal. Chem. 28, 1756. 1956.

Ref Type: Generic

222. Fiske,C.H. and Subbarow,Y.P. J. Biol. Chem. 66, 375. 1925.

Ref Type: Generic

223. Richieri,G.V., Ogata,R.T., and Kleinfeld,A.M. (1994) Equilibrium constants for the binding of fatty acids with fatty acid-binding proteins from adipocyte, intestine, heart, and liver measured with the fluorescent probe ADIFAB, *J. Biol. Chem.* 269, 23918-23930.

224. Norris,A.W. and Spector,A.A. (2002) Very long chain n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids bind strongly to liver fatty acid-binding protein, *J. Lipid Res.* 43, 646-653.

225. Ves, L.A. and Peluffo, R.O. (1987) Effect of cold environment on hepatic microsomal delta 6 and delta 9 desaturase activity of male rats, *Lipids* 22, 583-588.
226. Waku, K. (1992) Origins and fates of fatty acyl-CoA esters, *Biochim. Biophys. Acta* 1124, 101-111.
227. Ves-Losada, A. and Brenner, R.R. (1996) Long-chain fatty Acyl-CoA synthetase enzymatic activity in rat liver cell nuclei, *Mol. Cell Biochem.* 159, 1-6.
228. Waku, K. (1992) Origins and fates of fatty acyl-CoA esters, *Biochim. Biophys. Acta* 1124, 101-111.
229. Masserini, M. and Ravasi, D. (2001) Role of sphingolipids in the biogenesis of membrane domains, *Biochim. Biophys. Acta* 1532, 149-161.
230. D'Antuono, C., Fernandez-Tome, M.C., Sterin-Speziale, N., and Bernik, D.L. (2000) Lipid-protein interactions in rat renal subcellular membranes: a biophysical and biochemical study, *Arch. Biochem. Biophys.* 382, 39-47.
231. Viola Magni, M.P., Gahan, P.B., Albi, E., Iapoce, R., and Gentilucci, P.F. (1985) Chromatin phospholipids and DNA synthesis in hepatic cells, *Basic Appl. Histochem.* 29, 253-259.

232. Fawcett, D.W. An Atlas of Fine Structure: The Cell, Its Organelles and Inclusions. Philadelphia: W.B. Saunders Co. 1966.

Ref Type: Generic

233. Maraldi, N.M., Zini, N., Santi, S., and Manzoli, F.A. (1999) Topology of inositol lipid signal transduction in the nucleus, *J. Cell Physiol* 181, 203-217.
234. Hunt, A.N., Clark, G.T., Attard, G.S., and Postle, A.D. (2001) Highly saturated endonuclear phosphatidylcholine is synthesized in situ and collocated with CDP-choline pathway enzymes, *J. Biol. Chem.* 276, 8492-8499.
235. Jaffrezou, J.P., Bruno, A.P., Moisand, A., Levade, T., and Laurent, G. (2001) Activation of a nuclear sphingomyelinase in radiation-induced apoptosis, *FASEB J.* 15, 123-133.
236. Martelli, A.M., Bortul, R., Tabellini, G., Bareggi, R., Manzoli, L., Narducci, P., and Cocco, L. (2002) Diacylglycerol kinases in nuclear lipid-dependent signal transduction pathways, *Cell Mol. Life Sci.* 59, 1129-1137.
237. Hunt, A.N., Clark, G.T., Attard, G.S., and Postle, A.D. (2001) Highly saturated endonuclear phosphatidylcholine is synthesized in situ and collocated with CDP-choline pathway enzymes, *J. Biol. Chem.* 276, 8492-8499.

238. Marra,C.A. and de Alaniz,M.J. (1992) Incorporation and metabolic conversion of saturated and unsaturated fatty acids in SK-Hep1 human hepatoma cells in culture, *Mol. Cell Biochem.* 117, 107-118.
239. Albino,L., Polo,M.P., de Bravo,M.G., and de Alaniz,M.J. (2001) Uptake and metabolic conversion of saturated and unsaturated fatty acids in Hep2 human larynx tumor cells, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 65, 295-300.
240. Ves,L.A. and Brenner,R.R. (1998) Incorporation of delta 5 desaturase substrate (dihomogammalinolenic acid, 20:3 n-6) and product (arachidonic acid 20:4 n-6) into rat liver cell nuclei, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 59, 39-47.
241. Baker,R.R. and Chang,H.Y. The Rapid Incorporation of Radioactive Fatty Acid into Triacylglycerols During the *in vitro* Acylation of Native Lipids of Neuronal Nuclei. *Biochim. Biophys. Acta* 752, 1-9. 1983.

Ref Type: Generic

242. Surette,M.E. and Chilton,F.H. (1998) The distribution and metabolism of arachidonate-containing phospholipids in cellular nuclei, *Biochem. J.* 330 (Pt 2), 915-921.
243. Baker,R.R. and Chang,H.Y. (1987) The incorporation of fatty acids into triacylglycerols of isolated neuronal nuclear envelopes: the

- influence of thiol reducing reagents and chromatin, *Biochim. Biophys. Acta* 920, 285-292.
244. Baker,R.R. and Chang,H.Y. (1983) The rapid incorporation of radioactive fatty acid into triacylglycerols during the in vitro acylation of native lipids of neuronal nuclei, *Biochim. Biophys. Acta* 752, 1-9.
245. Schievella,A.R., Regier,M.K., Smith,W.L., and Lin,L.L. (1995) Calcium-mediated translocation of cytosolic phospholipase A2 to the nuclear envelope and endoplasmic reticulum, *J. Biol. Chem.* 270, 30749-30754.
246. Armstrong,M.K., Blake,W.L., and Clarke,S.D. (1991) Arachidonic acid suppression of fatty acid synthase gene expression in cultured rat hepatocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177, 1056-1061.
247. Schievella,A.R., Regier,M.K., Smith,W.L., and Lin,L.L. (1995) Calcium-mediated translocation of cytosolic phospholipase A2 to the nuclear envelope and endoplasmic reticulum, *J. Biol. Chem.* 270, 30749-30754.
248. Regier,M.K., Otto,J.C., DeWitt,D.L., and Smith,W.L. (1995) Localization of prostaglandin endoperoxide synthase-1 to the endoplasmic reticulum and nuclear envelope is independent of its C-terminal tetrapeptide-PTEL, *Arch. Biochem. Biophys.* 317, 457-463.

249. Woods,J.W., Evans,J.F., Ethier,D., Scott,S., Vickers,P.J., Hearn,L., Heibei,n,J.A., Charleson,S., and Singer,I.I. (1993) 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase-activating protein are localized in the nuclear envelope of activated human leukocytes, *J. Exp. Med.* 178, 1935-1946.
250. Morita,I., Schindler,M., Regier,M.K., Otto,J.C., Hori,T., DeWitt,D.L., and Smith,W.L. (1995) Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2, *J. Biol. Chem.* 270, 10902-10908.
251. Sugimoto,H. and Yamashita,S. (1999) Characterization of the transacylase activity of rat liver 60-kDa lysophospholipase-transacylase. Acyl transfer from the sn-2 to the sn-1 position, *Biochim. Biophys. Acta* 1438, 264-272.
252. Schmid,P.C., Spimrova,I., and Schmid,H.H. (1997) Generation and remodeling of highly polyunsaturated molecular species of rat hepatocyte phospholipids, *Lipids* 32, 1181-1187.
253. Schmid,P.C., Spimrova,I., and Schmid,H.H. (1995) Incorporation of exogenous fatty acids into molecular species of rat hepatocyte phosphatidylcholine, *Arch. Biochem. Biophys.* 322, 306-312.
254. Baker,R.R. and Chang,H.Y. (1983) The rapid incorporation of radioactive fatty acid into triacylglycerols during the in vitro

- acylation of native lipids of neuronal nuclei, *Biochim. Biophys. Acta* 752, 1-9.
255. Monjazebe, A.M., Clay, C.E., High, K.P., and Chilton, F.H. (2002) Antineoplastic properties of arachidonic acid and its metabolites, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 66, 5-12.
256. Schievella, A.R., Regier, M.K., Smith, W.L., and Lin, L.L. (1995) Calcium-mediated translocation of cytosolic phospholipase A2 to the nuclear envelope and endoplasmic reticulum, *J. Biol. Chem.* 270, 30749-30754.
257. Dircks, L. and Sul, H.S. (1999) Acyltransferases of de novo glycerophospholipid biosynthesis, *Prog. Lipid Res.* 38, 461-479.
258. Bordewick, U., Heese, M., Borchers, T., Robenek, H., and Spener, F. (1989) Compartmentation of hepatic fatty-acid-binding protein in liver cells and its effect on microsomal phosphatidic acid biosynthesis, *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 370, 229-238.
259. Huang, H., Starodub, O., McIntosh, A., Atshaves, B.P., Woldegiorgis, G., Kier, A.B., and Schroeder, F. (2004) Liver fatty acid-binding protein colocalizes with peroxisome proliferator activated receptor alpha and enhances ligand distribution to nuclei of living cells, *Biochemistry* 43, 2484-2500.

260. Wolfrum,C., Borrmann,C.M., Borchers,T., and Spener,F. (2001) Fatty acids and hypolipidemic drugs regulate peroxisome proliferator-activated receptors alpha - and gamma-mediated gene expression via liver fatty acid binding protein: a signaling path to the nucleus, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 2323-2328.

261. Huang,H., Starodub,O., McIntosh,A., Atshaves,B.P., Woldegiorgis,G., Kier,A.B., and Schroeder,F. (2004) Liver fatty acid-binding protein colocalizes with peroxisome proliferator activated receptor alpha and enhances ligand distribution to nuclei of living cells, *Biochemistry* 43, 2484-2500.

262. Murphy,E.J., Edmondson,R.D., Russell,D.H., Colles,S., and Schroeder,F. (1999) Isolation and characterization of two distinct forms of liver fatty acid binding protein from the rat, *Biochim. Biophys. Acta* 1436, 413-425.

263. Lawrence,J.W., Kroll,D.J., and Eacho,P.I. (2000) Ligand-dependent interaction of hepatic fatty acid-binding protein with the nucleus, *J. Lipid Res.* 41, 1390-1401.

264. Mizushina,Y., Sagisaka,M., Sakaib,H., Abeb,M., and Sakaguchi,K. (2000) Mode analysis of binding of fatty acids to mammalian DNA polymerases, *Biochim. Biophys. Acta* 1486, 211-218.

265. Mizushina,Y., Sugawara,F., Iida,A., and Sakaguchi,K. (2000) Structural homology between DNA binding sites of DNA

- polymerase beta and DNA topoisomerase II, *J. Mol. Biol.* 304, 385-395.
266. Holub, B.J. and Kuksis, A. (1971) Differential distribution of orthophosphate- ^{32}P and glycerol- ^{14}C among molecular species of phosphatidylinositols of rat liver in vivo, *J. Lipid Res.* 12, 699-705.
267. Huang, H., Starodub, O., McIntosh, A., Kier, A.B., and Schroeder, F. (2002) Liver fatty acid-binding protein targets fatty acids to the nucleus. Real time confocal and multiphoton fluorescence imaging in living cells, *J. Biol. Chem.* 277, 29139-29151.
268. McArthur, M.J., Atshaves, B.P., Frolov, A., Foxworth, W.D., Kier, A.B., and Schroeder, F. (1999) Cellular uptake and intracellular trafficking of long chain fatty acids, *J. Lipid Res.* 40, 1371-1383.
269. McArthur, M.J., Atshaves, B.P., Frolov, A., Foxworth, W.D., Kier, A.B., and Schroeder, F. (1999) Cellular uptake and intracellular trafficking of long chain fatty acids, *J. Lipid Res.* 40, 1371-1383.
270. Tipping, E. and Ketterer, B. (1981) The influence of soluble binding proteins on lipophile transport and metabolism in hepatocytes, *Biochem. J.* 195, 441-452.

271. Glatz,J.F., Borchers,T., Spener,F., and van der Vusse,G.J. (1995)
Fatty acids in cell signalling: modulation by lipid binding proteins,
Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids 52, 121-127.
272. Tipping,E. and Ketterer,B. (1981) The influence of soluble binding
proteins on lipophile transport and metabolism in hepatocytes,
Biochem. J. 195, 441-452.
273. Glatz,J.F., Vork,M.M., Cistola,D.P., and van der Vusse,G.J. (1993)
Cytoplasmic fatty acid binding protein: significance for
intracellular transport of fatty acids and putative role on signal
transduction pathways, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*
48, 33-41.
274. D'Santos,C.S., Clarke,J.H., and Divecha,N. (1998) Phospholipid
signalling in the nucleus. Een DAG uit het leven van de inositide
signalering in de nucleus, *Biochim. Biophys. Acta* 1436, 201-232.
275. Payrastre,B., Nievers,M., Boonstra,J., Breton,M., Verkleij,A.J., and
van Bergen en Henegouwen PM (1992) A differential location of
phosphoinositide kinases, diacylglycerol kinase, and
phospholipase C in the nuclear matrix, *J. Biol. Chem.* 267, 5078-
5084.
276. Martelli,A.M., Gilmour,R.S., Bertagnolo,V., Neri,L.M., Manzoli,L., and
Cocco,L. (1992) Nuclear localization and signalling activity of
phosphoinositidase C beta in Swiss 3T3 cells, *Nature* 358, 242-245.