



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

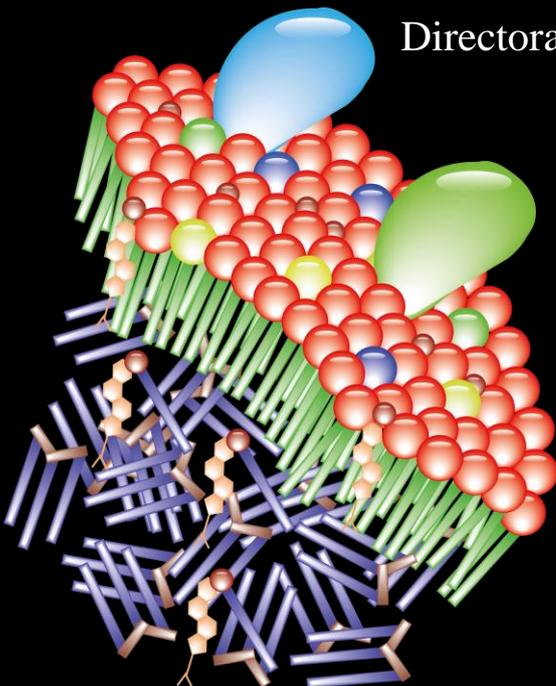
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TRABAJO DE TESIS DOCTORAL

Lípidos nucleares: topología y metabolismo

Lic. Juan Pablo Layerenza

Directora: Prof. Dr. Ana Ves Losada



2013

Agradacecimientos

Al Dr. Horacio Garda y a la Dra. Ma. Josefa Tacconi 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.

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

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

Al Dr. Pedro González, Profesor titular de la Cátedra de Patología B, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP. Por su aporte esencial al estudio de las gotas lipídicas nucleares y por haber resultado en un gran amigo.

A todos los integrantes del INIBIOLP, que en mayor o menor medida han hecho su aporte a la presente tesis.

A mi familia y a mis amigos, por el apoyo incondicional.

Los resultados de la presente tesis fueron premiados en:

Jornadas de Lípidos 2012, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

Los resultados de la presente tesis se encuentran parcialmente publicados en:

Biochimica et Biophysica Acta 1831 (2013) 327–340;

Portales web de CONICET:

- * “Descubren un nuevo componente en células hepáticas” Portal CONICET-La Plata. 19 de Diciembre de 2012. <http://www.laplata-conicet.gov.ar>
- * “Descubren un nuevo componente en células hepáticas” Portal CONICET. 19 de Diciembre de 2012. <http://www.conicet.gov.ar>.

Portal web de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP:

- * “Científicos en La Plata hallan componente celular” Portal Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. Diciembre de 2012. <http://www.exactas.unlp.edu.ar/home>.

Medios masivos de comunicación:

- * “Científicos en La Plata hallan componente celular” Diario Hoy. 20 de Diciembre de 2012. Versiones online e impresa.
- * Diario digital: Rosario3.com: <http://www.rosario3.com/> 21 de diciembre de 2012.

Índice general

| | -página- |
|--|------------|
| 1.Resumen | 1 |
| 2.Introducción | 4 |
| 3.Objetivos e Hipótesis | 25 |
| 4.Resultados | |
| 4.1.Aislamiento de núcleos y fracciones nucleares | |
| de células de hígado de rata | 27 |
| 4.I.Composición y propiedades de los lípidos | |
| nucleares. Contenido proteico | 35 |
| 4.II.Topología de los lípidos neutros nucleares | 47 |
| 4.III.Metabolismo nuclear de ácidos grasos | 81 |
| 5.Conclusiones | 166 |
| 6.Perspectivas | 170 |
| 7.Materiales y métodos | 171 |

Índice de secciones

| | -Página- |
|---|----------|
| 1.Resumen | 1 |
| 2.Introducción | 4 |
| 2.1.El núcleo celular | 4 |
| 2.2.El descubrimiento del núcleo celular | 7 |
| 2.3.¿Cómo se originó el núcleo? | 7 |
| 2.4.¿Cómo es la organización espacio – funcional del núcleo? | 10 |
| 2.5.Composición química nuclear | 12 |
| 2.5.1.Primeras descripciones de lípidos nucleares | 12 |
| 2.5.2.Síntesis de lípidos nucleares y remodelado de ácidos grasos | 13 |
| 2.5.3.Funciones de los lípidos nucleare | 14 |
| 2.5.3.1.Funciones de los FA | 14 |
| 2.5.3.2.Funciones de los LP | 14 |
| 2.5.3.3.Funciones de los LN | 15 |
| 2.6. Proteínas solubles que unen lípidos | 16 |
| 2.7.Metabolismo lipídico nuclear | 17 |
| 2.8.Bibliografía de la sección “2.” | 19 |
| 3.Objetivos e Hipótesis | 25 |
| 4.Resultados | |
| 4.1.Aislamiento de fracciones nucleares | 27 |
| 4.1.1.Aislamiento de núcleos celulares | 27 |
| 4.1.2.Aislamiento de matrices nucleares | 30 |

| | |
|---|----|
| 4.1.3.Aislamiento de membranas nucleares | 31 |
| 4.1.4.Bibliografía de la sección “4.1” | 33 |
| 4.I. Composición y propiedades de los lípidos nucleares. | |
| Contenido proteico | 35 |
| 4.I.1.Composición química nuclear | 36 |
| 4.I.2.Composición de ácidos grasos nucleares | 40 |
| 4.I.3.Propiedades fisicoquímicas del núcleo | 42 |
| 4.I.4.Discusión | 44 |
| 4.I.5.Bibliografía de la sección “4.I” | 46 |
| 4.II. Topología de los lípidos neutros nucleares | 47 |
| 4.II.1.Localización y caracterización de las Gotas Lipídicas Nucleares | 48 |
| 4.II.1.1.Análisis de nLD en Fracciones aisladas | 48 |
| 4.II.1.2.Análisis de nLD en células | 59 |
| 4.II.2.Aislamiento de nLD de núcleos celulares de hígado de rata | 66 |
| 4.II.3.Composición de las nLD | 69 |
| 4.II.4.Discusión | 73 |
| 4.II.5.Bibliografía de la sección “4.II” | 79 |
| 4.III.Metabolismo nuclear de ácidos grasos | 81 |
| 4.III.1.Objetivos 3 | 81 |

| | |
|--|-----|
| 4.III.1.1.Incorporación de ácidos grasos exógenos al núcleo celular | 82 |
| 4.III.1.2.Mecanismos de esterificación de ácidos grasos en los lípidos del núcleo | 84 |
| 4.III.1.3.Incorporación y esterificación de ácidos grasos en las clases lipídicas nucleares | 86 |
| 4.III.1.4.Incorporación y esterificación de ácidos grasos en las membranas nucleares | 100 |
| 4.III.1.5.Mecanismos de internalización nuclear del 20:4n-6 | 104 |
| 4.III.1.6.Incorporación y esterificación de ácidos grasos en los lípidos de las nLD | 108 |
| 4.III.1.7. Incorporación y esterificación de ácidos grasos en nLD aisladas | 111 |
| 4.III.2. Efecto de la L-FABP en la incorporación y esterificación de ácidos grasos al núcleo | 113 |
| 4.III.2.1. Internalización de la L-FABP exógena al núcleo | 114 |
| 4.III.2.2. Efecto de la L-FABP en la incorporación y esterificación de ácidos grasos al núcleo. | 118 |
| 4.III.3. Transporte reverso de ácidos grasos desde el núcleo hacia el citosol | 140 |
| 4.III.3.1.Efecto de L-FABP en la movilización y liberación de ácidos grasos nucleares | 140 |
| 4.III.3.2. Efecto de la L-FABP en la movilización y distribución | |

| | |
|---|------------|
| nuclear de 18:0, 18:1n-9 y 20:4n-6 | 145 |
| 4.III.3.3.Efecto comparativo de la BSA en la movilización | |
| de ácidos grasos | 150 |
| 4.III.3.4.Efecto de la L-FABP en la movilización de ácidos grasos | |
| endonucleares | 154 |
| 4.III.4.Discusión | 158 |
| 4.III.5.Bibliografía de la sección “4.III” | 164 |
| 5.Conclusiones | 166 |
| 6.Perspectivas | 170 |
| 7.Materiales y métodos | |
| 7.1.Muestras biológicas | 171 |
| 7.1.1.Animales | 171 |
| 7.1.2.Cultivo celular | 171 |
| 7.2.Purificación de L-FABP recombinante | 172 |
| 7.2.1.Marcación fluorescente de L-FABP | 173 |
| 7.3.Fraccionamiento celular | 173 |
| 7.3.1.Aislamiento de núcleos | 173 |
| 7.3.2.Fraccionamiento nuclear | 173 |
| 7.3.2.1.Aislamiento de matrices nucleares | 173 |
| 7.3.2.2.Aislamiento de membranas nucleares | 174 |

| | |
|---|-----|
| 7.3.2.3. Aislamiento de gotas lipídicas nucleares | 174 |
| 7.4. Análisis por microscopía | 175 |
| 7.4.1. Microscopía electrónica | 175 |
| 7.4.1.1. Tinción negativa | 175 |
| 7.4.2. Squash de tejido hepático | 175 |
| 7.4.3. Microscopía de campo claro | 176 |
| 7.4.4. Microscopía de fluorescencia confocal | 176 |
| 7.4.5. Microscopía de 2 fotones | 178 |
| 7.5. Marcación de membranas con Laurdan | 178 |
| 7.6. Análisis de imágenes | 179 |
| 7.7. Análisis proteico | 180 |
| 7.7.1. Cuantificación de proteínas | 180 |
| 7.7.1.1. Método de Lowry | 180 |
| 7.7.1.2. Método de Bradford | 180 |
| 7.7.2. SDS-PAGE de fracciones celulares | 180 |
| 7.7.3. Western blot | 181 |
| 7.8. Análisis lipídico | 182 |
| 7.8.1. Extracción de lípidos totales | 182 |
| 7.8.2. Separación de clases lipídicas | 183 |
| 7.8.3. Cuantificación de clases lipídicas | 184 |
| 7.8.3.1. Lípidos Polares | 184 |
| 7.8.3.2. Lípidos Neutros | 184 |
| 7.9. Composición de ácidos grasos (FA) | 184 |

| | |
|---|-----|
| 7.10.Metabolismo de FA nucleares. | 185 |
| 7.10.1.Condiciones de incubación | 185 |
| 7.11.Rol de la L-FABP en el metabolismo de FA nucleares | 186 |
| 7.11.1.Incorporación de FA unidos a L-FABP | 186 |
| 7.11.2.Transporte reverso de FA nucleares | 186 |
| 7.12.Análisis de datos | 187 |
| 7.13.Bibliografía de la sección “7.” | 188 |

1. Resumen

El núcleo es una de las características distintivas que definen a las células eucariotas, permite una compartimentalización que es crítica para procesos que se desarrollan dentro del mismo, como la replicación, transcripción, splicing de pre-mRNA y ensamblado de ribosomas.

Los Lípidos Neutros (LN) nucleares son fuentes alternativas de ácidos grasos (FA) y colesterol para membranas, vías de señalización y ligandos de factores de transcripción.

Los objetivos de la presente tesis fueron:

- 1) Determinar la organización estructural y espacial de los lípidos nucleares.
- 2) Determinar el o los mecanismos de incorporación de los ácidos grasos (FA) exógenos en los lípidos nucleares.

Como modelo experimental se trabajó con núcleos y matrices nucleares aislados de hígado de rata. La pureza de las fracciones aisladas se determinó mediante ensayos morfológicos y bioquímicos y se corroboró la alta pureza e integridad de cada fracción. Mediante análisis bioquímicos tradicionales se determinó la composición lipídica nuclear y se pudo concluir que los lípidos nucleares se ubican en dos localizaciones principales, la doble membrana nuclear compuesta de glicerofosfolípidos, esfingolípidos y colesterol; y dentro del núcleo, los lípidos endonucleares están enriquecidos en triacilglicéridos (TAG) y ésteres de colesterol (CE). En particular, los LN nucleares se organizan en la matriz nuclear como Gotas Lipídicas nucleares (nLD), que serían análogas a las gotas lipídicas citosólicas (cLD). Esta hipótesis fue corroborada al observar nLD en el interior de núcleos y matrices aislados de hígado de rata, en hepatocitos de rata y en células HepG2, mediante microscopía de campo claro y de fluorescencia en muestras tratadas con coloraciones específicas para lípidos.

Las nLD se caracterizan por ser esferas, de número limitado por núcleo y estar separadas espacialmente de los dominios nucleares nucleolo, Speckles y Paraspeckles y lámina nuclear. Poseen además diámetros menores a los de las cLD.

Se elaboró un protocolo para aislar nLD de los demás componentes nucleares y se corroboró la presencia de gotas de lípidos en la fracción aislada por microscopía de campo claro y electrónica con tinciones específicas. Las nLD son estructuras supramoleculares nucleares

compuestas principalmente por CE, C, TAG y proteínas, con una baja proporción de lípidos polares.

Las nLD constituyen un nuevo dominio nuclear donde los LN se almacenan y organizan y seguramente participan en la homeostasis lipídica nuclear. Las nLD podrían actuar como un sistema buffer endonuclear proveyendo o incorporando lípidos y proteínas involucrados en diferentes procesos.

Se determinó que la membrana nuclear corresponde a una zona de fluidez mayor a la de la membrana plasmática y la matriz nuclear es más rígida, utilizando la sonda Laurdan y microscopía de 2 fotones.

Para evaluar el mecanismo de incorporación FA exógenos en los lípidos nucleares se incubaron núcleos con distintos [^{14}C]FA y se analizó la incorporación de la radiactividad en los lípidos. Los FA saturados y polinosaturados exógenos estudiados se incorporan como FA y se esterifican en los lípidos nucleares. Los FA no se esterifican directamente a los pools lipídicos nucleares sino que primero deben ser convertidos en ésteres de CoA. Este proceso es llevado a cabo por acción de acil-CoA sintetasas. Los ácidos 16:0, 18:0, 18:1n-9, 18:2n-6 y 20:4n-6 se esterifican en los lípidos nucleares. Los FA ensayados se incorporan como FA libre tanto en núcleos, membranas nucleares aisladas, matrices nucleares como en las nLD y se esterifican en los lípidos de las mismas (LP y LN en los núcleos, matrices y nLD y LP en las membranas nucleares). Sin embargo, los FA no se esterifican en lípidos de nLD aisladas en las condiciones ensayadas, esto puede deberse a que se necesiten componentes nucleares que se pierden durante el aislamiento o que no haya remodelado de FA dentro de la gota.

La L-FABP participa en la movilización y transporte de FA nucleares. Existe un transporte reverso de FA unidos a L-FABP desde los pools lipídicos nucleares y endonucleares (matrices nucleares) hacia el citosol. La L-FABP moviliza al 20:4n-6, 18:0 y 18:1n-9 fuera del núcleo hacia otros compartimentos celulares. Estimula la movilización y redistribución de los mismos dentro del núcleo entre los diferentes pools lipídicos. En especial, determina un incremento de 20:4n-6 esterificado en PI. El PI de la matriz nuclear forma parte del activo sistema de transducción de señales del núcleo, y la L-FABP estaría favoreciendo la adecuada composición de este fosfolípido. El 20:4n-6 movilizado por la L-FABP de los pools endonucleares, podría ser el ligando de factores de transcripción, en particular del PPAR α , dado que existe colocalización entre PPAR α y L-FABP.

2.Introducción

2.1.El núcleo celular

El núcleo es una de las características distintivas que definen a las células eucariotas.

El núcleo es el principal reservorio del patrimonio genético de la célula eucariota, en su interior se llevan a cabo los procesos de replicación y transcripción entre otros.

El núcleo es el organoide más grande de las células eucariotas y presenta una geometría de tipo esferoidal con un diámetro aproximado de 10 μm . Está delimitado por la envoltura nuclear (EN), la cual se compone de una red de filamentos intermedios (lámina nuclear), y dos membranas, la membrana nuclear interna (MNI) y la externa (MNE), respectivamente. La MNI interacciona con la lámina a través de proteínas de unión (por ejemplo la LAP2 β) y la MNE presenta continuidad con el retículo endoplásmico (RE) rugoso; el espacio entre ambas membranas presenta continuidad con el lumen del RE [1,2].

La comunicación y transporte de moléculas entre el núcleo y el citosol es continua, bidireccional y selectiva, y se realiza principalmente a través del complejo del poro nuclear (CPN). En la superficie del núcleo de una célula de mamífero pueden hallarse entre 3000 y 4000 CPN y cada uno está formado por más de 30 proteínas diferentes (nucleoporinas) [3]. El CPN consta de uno o más canales acuosos de 9 nm de diámetro y 15 nm de longitud, a través de los cuales moléculas pequeñas como por ejemplo proteínas de menos de 40kDa pueden difundir en forma pasiva. Para las moléculas de mayor tamaño existe un sistema de transporte activo mediado por señales de localización nuclear (específicas para la importación y la exportación, respectivamente) [4].

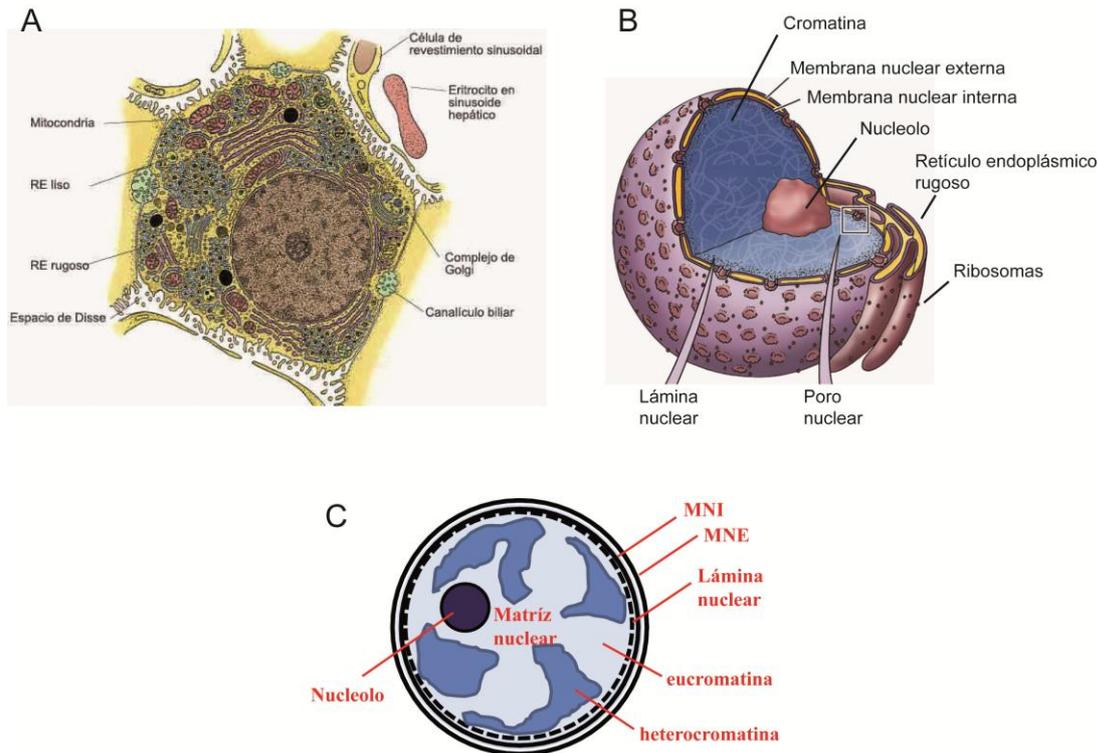


Figura 1. Esquema del núcleo celular. A) Representación de tejido hepático en la que se observa un hepatocito con el núcleo en la zona inferior derecha del mismo (Adaptada de: *Cell Fine Structure: An Atlas of Drawings of Whole-Cell Structure*. Saunders WB, 1971). B) Representación 3D de un núcleo aislado con sus principales componentes y la relación de continuidad con el retículo endoplásmico rugoso (Adaptada de: *Life: The Science of Biology, 7th edition*, Sinaguer Associates and Freeman WH & Co., 2004). C) Representación esquemática de los principales componentes del núcleo a utilizar en el análisis de los datos de la presente tesis.

En algunas condiciones, la envoltura nuclear presenta invaginaciones hacia el interior nuclear constituidas por la MNI (Tipo I) o por ambas membranas MNI y MNE (Tipo II); el conjunto de las invaginaciones da lugar al retículo nucleoplásmico (RN), **Figura 2** [5]. Una diferencia importante entre ambos tipos de invaginaciones es que sólo las Tipo II poseen poros nucleares [6]. El RN se encuentra presente en una gran variedad de células animales [7] y vegetales [8]; y se encuentra particularmente desarrollado en condiciones patológicas [9].

La dinámica del RN es variada. Las invaginaciones pueden generarse luego de la mitosis si la sincronía entre la descondensación de los cromosomas y la fusión de los fragmentos de membrana es imperfecta y en consecuencia la cromatina unida a cisternas de EN/RE queda atrapada en espacios intersticiales, como se observa en la células de

tabaco [10]. Existen ejemplos en los que las invaginaciones se forman *de novo* sin necesidad de que ocurra mitosis, perduran durante la interfase e incluso presentan patrones de herencia [6].

Si bien en la actualidad la existencia de invaginaciones está perfectamente probada, se desconoce su función precisa. En este sentido se propone que las invaginaciones extienden las funciones de la EN hacia el interior del núcleo, permitiendo una mejor eficiencia de los procesos nucleares al acercar los componentes citoplasmáticos a los del interior nuclear. En el RN se localizarían los componentes de los mecanismos de la señalización mediada por calcio [11,12] y algunos de los componentes del transporte y del metabolismo lipídico nuclear.

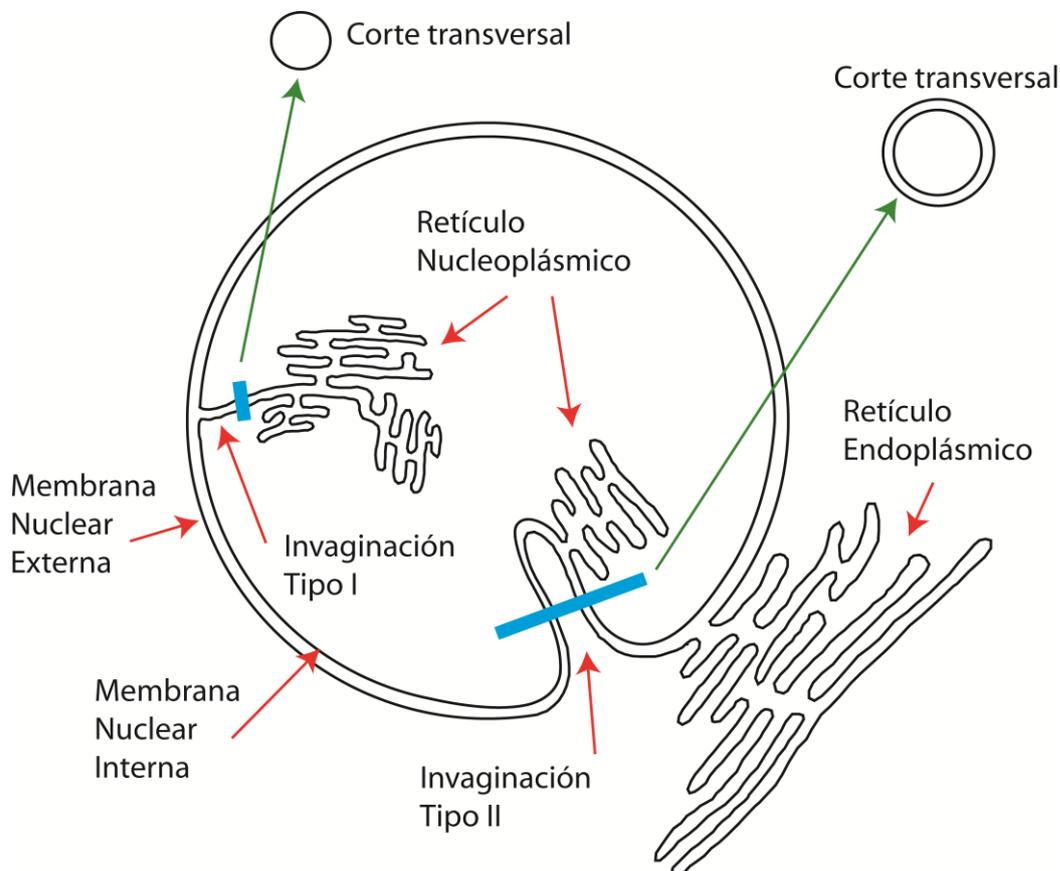


Figura 2. Retículo nucleoplásmico. En la representación se pueden apreciar las membranas nucleares (externa e interna), los dos tipos de invaginaciones que pueden observarse (Tipo I y II) y los puntos posibles de generación de los retículos nucleoplásmico y endoplásmico.

2.2.El descubrimiento del núcleo celular

El núcleo fue el primer organoide celular en ser descubierto. La representación más antigua que se conserva corresponde al microscopista holandés Anton van Leeuwenhoek (**Figura 2**). Este investigador observó y dibujó un hueco en el interior de eritrocitos de salmón, que correspondía al núcleo celular, [13]. Cabe destacar que a diferencia de los eritrocitos de mamífero, los del salmón, al igual que los del resto de los vertebrados, son células nucleadas.

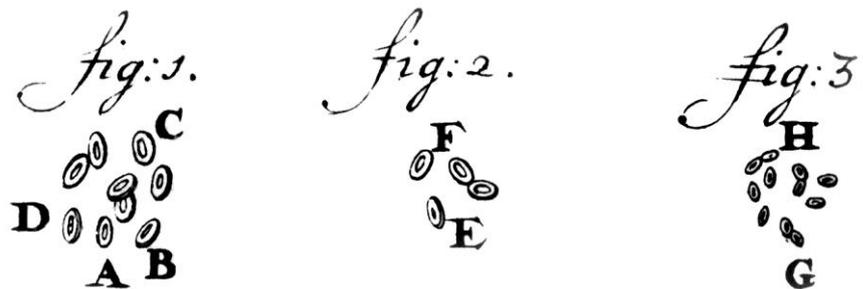


Figura 3. Representación más antigua del núcleo celular. Dibujos realizados por Anton van Leeuwenhoek (1632-1723). En la representación de eritrocitos de salmón, se observan espacios huecos que posteriormente se identificaron como los núcleos celulares.

2.3.¿Cómo se originó el núcleo?

Se han propuesto diferentes modelos para explicar el origen del núcleo en las células eucariotas ancestrales. Martin et al proponen los siguientes modelos como los principales: (**Figura 4**) [14]:

- A) El núcleo y el resto de los componentes del Sistema de Endomembranas, se habrían originado a partir de invaginaciones de la membrana plasmática de la célula procariota ancestral.
- B) El núcleo y el resto de los componentes del Sistema de Endomembranas, se habrían originado a partir de una modificación en el proceso de formación de endosporas de eubacterias Gram-positivas.
- C) Se propone un origen endosimbiótico para el núcleo, y en dicho proceso una

eubacteria habría actuado como hospedadora de una arqueobacteria endosimbiótica, que se habría transformado en el núcleo de la hospedadora.

- D) El origen viral del núcleo fue sugerido involucrando poxvirus, la base de esta teoría se fundamenta en que dos poxvirus (vaccinia y variola) presentan DNA polimerasas similares a las DNA polimerasas alfa eucariotas [15]. Una variante de este modelo utiliza el contexto del consorcio sintrófico¹ con metanógenos. El núcleo habría evolucionado a partir de DNA-virus. Se propone que los virus establecieron una presencia estable en el citosol de micoplasmas metanogénicos, y fueron incorporando genes esenciales del genoma del micoplasma hasta llegar a controlar toda la célula. Muchas características del núcleo derivan de los ancestros virales, por ejemplo, el capping del ARNm, los cromosomas lineales y la separación entre transcripción y traducción. En este modelo los fenómenos de fagocitosis y otros procesos basados en fusión de membranas derivan de los procesos de fusión de las membranas virales [16].

¹ Sintrofía: en el contexto del metabolismo microbiano, se refiere a la colaboración de varias especies para realizar una reacción química que, de otra forma, sería energéticamente desfavorable.

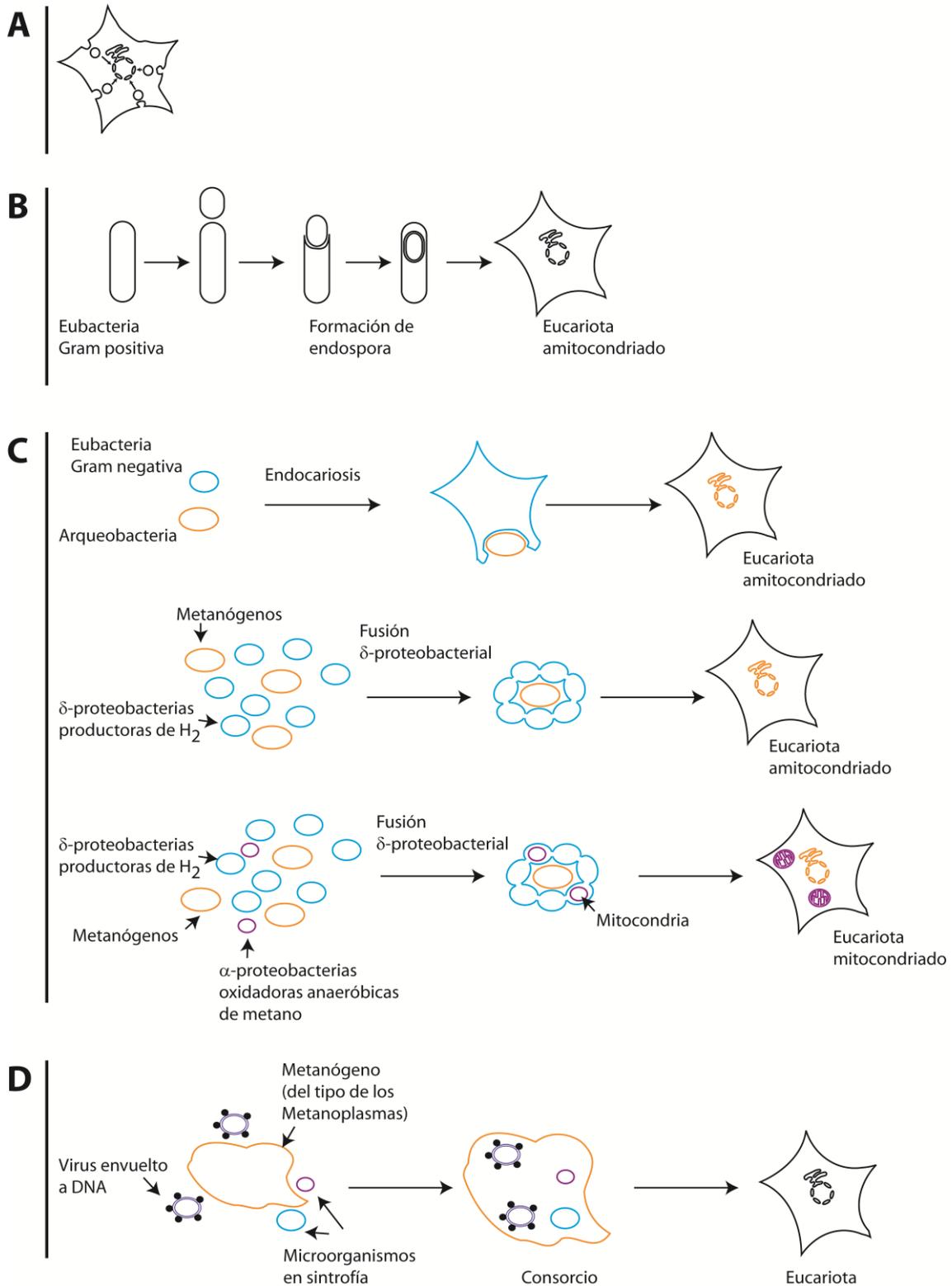


Figura 4. Hipótesis sobre el origen del núcleo. A) Generación a partir de invaginaciones de la membrana plasmática. B) Por modificación en el proceso de formación de endosporas. C) Origen endosimbiótico: diferentes variantes. D) Origen viral del núcleo. Adaptada de [14].

Si bien los distintos modelos reciben apoyo desde distintas áreas del conocimiento (genética aplicada al origen de determinadas proteínas de la EN, complejo del poro, RE,

etc.), no existe aún consenso sobre una teoría única que describa el origen del núcleo en todo el Dominio Eukarya.

Como dice W. Martin [14]: “Un problema común a cualquier modelo es que debe ser tan plausible como para haber ocurrido, y a la vez tan poco probable, para que sólo haya ocurrido una vez hace 4 billones de años”.

2.4.¿Cómo es la organización espacio-funcional del núcleo?

El núcleo es un organoide muy dinámico cuyo interior, la matriz nuclear, está compartimentalizada espacial y funcionalmente. La matriz está circunscripta por la envoltura nuclear (EN) y alberga además de la cromatina, una gran cantidad de estructuras supramoleculares llamadas cuerpos nucleares (CN: Nuclear Bodies). En la actualidad hay identificados y descritos aproximadamente doce CN. En los CN se llevan a cabo funciones específicas, como la síntesis y procesamiento del RNA preribosomal (*nucléolo*), el almacenamiento y ensamblado de los componentes del splicing (*speckles*), o el almacenamiento de moléculas de RNA (*paraspeckles*), entre otros. Los CN están constituidos por un conjunto de proteínas específicas y no se encuentran delimitados por una membrana como en el caso de los organoides citoplasmáticos; la cohesión estructural se debería a interacciones proteína-proteína y proteína-RNA. En cuanto a su morfología, si bien muchos CN son esféricos, existen otras formas características. El tamaño y el número de los CN es variado, el *nucléolo* es el que posee el mayor tamaño (2-3 μm de diámetro) y puede haber hasta tres copias por núcleo, mientras que los *corpúsculos de Cajal* poseen un diámetro menor a 1,5 μm y hay alrededor de 10 por núcleo [17].

Es difícil encontrar características comunes a todos los CN ya que cada uno de ellos posee características propias y específicas respecto a composición química, morfología, número, génesis y dinámica a lo largo del ciclo celular.

Hay CN que se desplazan dentro del núcleo y dicho movimiento es inversamente proporcional al tamaño del CN, como por ejemplo los *Corpúsculos de Cajal* y los *PML nuclear bodies*, mientras que los CN más pequeños, presentan una gran movilidad en determinadas condiciones [18-21]; estos mismos CN presentan además fenómenos de fusión y fisión bajo determinadas condiciones.

El mantenimiento de la estructura de cada CN es la resultante de un flujo continuo y bidireccional de las moléculas que los constituyen hacia y desde el mismo, mientras que el tamaño y la forma dependen de las velocidades relativas de estos procesos [22].

Los CN pueden clasificarse en *actividad-dependientes* o *actividad-independientes*, los primeros incluyen aquellos CN que se forman en sitios donde ocurren procesos específicos, ejemplos de estos son el *nucléolo* (síntesis y procesamiento del RNA preribosomal, ARN de transferencia, etc.), los *histone locus Bodies* (*transcripción de los genes de las histonas*), los *nuclear stress bodies* (*se forman en sitios de repeticiones satélite III en respuesta a heat shock proteins*) y las *Speckles* (el almacenamiento y ensamblado de los componentes del splicing). Los segundos son los CN que parecen formarse sin la necesidad de una actividad particular, podemos citar como ejemplo a los *PML bodies* y a los *corpúsculos de Cajal*.

La génesis de los CN implica un reclutamiento y posterior ensamblado de componentes en un sitio en particular de la matriz nuclear. Para explicar este proceso se propone un modelo con dos mecanismos posibles: uno secuencial-organizado y otro estocástico (al azar) [17]. Hay evidencias que indican que en el caso de los *corpúsculos de Cajal* el mecanismo de génesis sería estocástico [23].

Cada CN posee características particulares a lo largo del ciclo celular. Podemos citar varios ejemplos. Las *speckles nucleares* se desensamblan al principio de la mitosis y se reensamblan en telofase [24,25]; las *paraspeckles* permanecen ensambladas desde G1 hasta anafase [26]; los *histone locus bodies* se desintegran entre metafase y telofase [27,28]; los *corpúsculos de Cajal* alcanzan un número máximo entre G1 y S, durante toda la mitosis se desintegran y una vez que se forma la envoltura nuclear de cada célula hija se vuelven a ensamblar [29,30]; los *PML nuclear bodies* se van desintegrando durante la mitosis y una vez rearmada la envoltura nuclear, los componentes reingresan al núcleo y estos CN se rearmen en fase G1 [21].

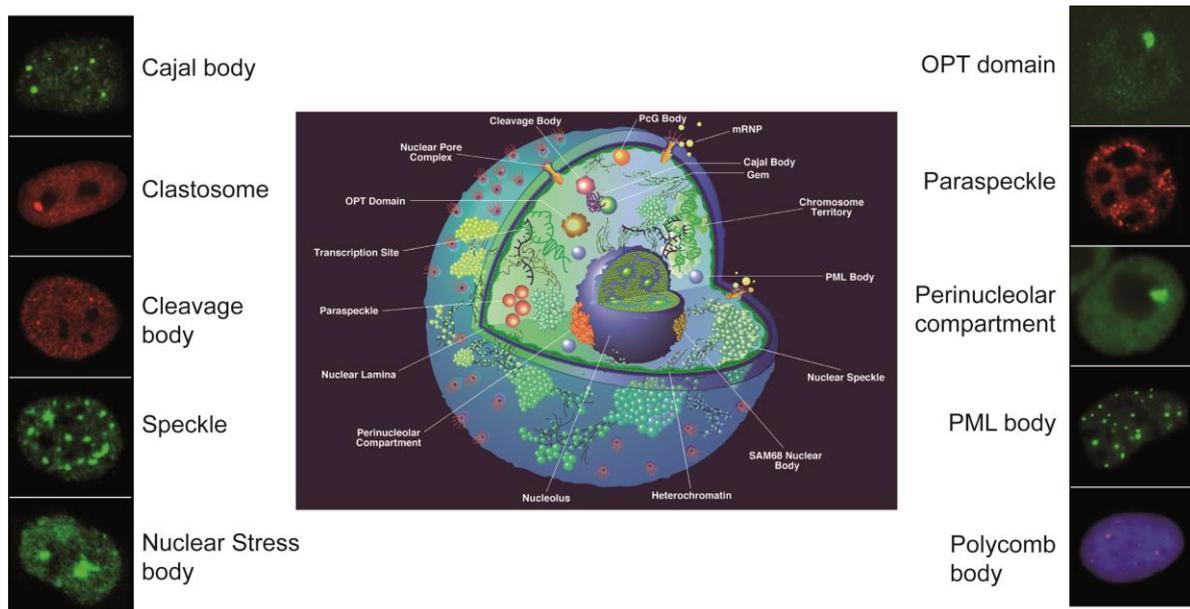


Figura 5. Cuerpos nucleares. En el centro de la figura se observa una representación de un núcleo aislado y los diversos cuerpos nucleares en su interior. En los laterales pueden apreciarse imágenes de microscopía de fluorescencia de núcleos en los que se observan los diferentes CN utilizando las proteínas marcadoras de cada CN (Adaptado de [31]).

2.5. Composición química nuclear

2.5.1. Primeras descripciones de lípidos nucleares

La primera demostración de la existencia de lípidos, [32] y los primeros reportes sobre lípidos neutros (LN) en el núcleo se remontan hacia fines de los años 60 y principios de los 70; dichas investigaciones se realizaron junto con el desarrollo de los primeros protocolos para el aislamiento de núcleos. En esos años investigaciones independientes de Kashnig [33], Kleining [34], Keenan [35] y Khandwala [36] en núcleos y membranas nucleares aislados de hígado de rata, cerdo y vaca, demostraron que en el núcleo había lípidos polares (LP) y neutros (LN: colesterol (C), ésteres de colesterol (CE) y triacilglicéridos (TAG)). Posteriormente surgieron evidencias indirectas de la existencia de LN en el núcleo cuando se realizaron estudios de incorporación de FA exógenos radiactivos [37] *in vitro* y se encontró marcación radiactiva en LP y TAG. En los años siguientes las investigaciones se centraron en los LP y en el C nuclear [38-41].

2.5.2. Síntesis de lípidos nucleares y remodelado de ácidos grasos

El metabolismo de los lípidos polares nucleares es muy activo y en la actualidad existe mucha bibliografía al respecto.

Los lípidos celulares se sintetizan en forma mayoritaria en el citosol y en el RE, sin embargo está muy bien documentado que en el núcleo celular existe síntesis de algunos de los lípidos que constituyen el núcleo.

La PC es el glicerofosfolípido (GPL) nuclear mayoritario y la síntesis del mismo puede ser llevada a cabo por tres vías: 1) “la vía de Kennedy”, la primera enzima de la vía (colina kinasa) ha sido medida su actividad en núcleo [42], en cambio las siguientes enzimas de la vía (CTP: fosfocolina citidililtransferasa α (CCT α) y CDP colina: diacilglicerol fosfocolina transferasa) han sido descritas en núcleo [43,44]; el complejo de intercambio de base, donde la síntesis de PC se realiza a partir de PS [45]; y mediante la SMSintasa reversa, se sintetiza PC a partir de SM y DAG [46].

En el núcleo se han descrito varias enzimas involucradas en el catabolismo de PC: dos isoformas de la PC-PLD (una localizada en la membrana nuclear y otra intranuclear) [47,48]; una PC-PLC [49] y una PC:ceramida fosfocolintransferasa asociadas a cromatina [50].

En el caso de PE, existe poca información acerca de su metabolismo y funciones nucleares. Se ha demostrado que en hepatocitos tratados con insulina se produce un incremento de los niveles de PE y SM en la cromatina transcripcionalmente activa [51].

En general, la síntesis de PS, se produce por intercambio de base a partir de PC o PE en el RE. En el núcleo está descrita la isoforma I de la PS sintasa (PSS I) [52,53].

No se ha demostrado síntesis nuclear de PI Pero están descritas numerosas enzimas relacionadas con las vías de señalización de PI, por ejemplo, diversas isoformas de PI-PLC [54] y de PI kinasas [55] de localización en la MN y en la matriz [56].

Recientemente el grupo de Pascuaret et al [57], ha demostrado que el núcleo posee un activo metabolismo del ácido fosfatídico (PA), que incluye la existencia de las siguientes enzimas: LPP (fosfolípido fosfatasa), PLA, ácido lisofosfatídico (LPA) fosfohidrolasa, LPA fosfatidasa, DAG lipasa y MAG lipasa. El PA al igual que el DAG son importantes segundos mensajeros y actuarían además como precursores de la síntesis de glicerolípidos.

La SM es un componente nuclear minoritario pero muy importante que está involucrado en procesos de señalización celular. Con respecto al metabolismo de

esfingolípidos en el núcleo se ha demostrado la presencia de varias enzimas como la esfingomielinasa (SMasa), SM sintasa, SM sintasa reversa, ceramidasa y esfingosina kinasa [47,58-60]. No existiría síntesis *de novo* de la SM en el núcleo, pero sí la generación de segundos mensajeros como las ceramidas y sus derivados a partir de este esfingolípidos.

Los FA de los lípidos nucleares se remodelan mediante un mecanismo acil-CoA dependiente [40,61], que sería equivalente al ciclo de deacilación-reacilación o ciclo de Lands [62] citosólico; y en este proceso participa la acil-CoA sintetasa (ACS) de cadena larga nuclear, descrita en el laboratorio [63]. Se ha demostrado además que en animales hibernates se produce una redistribución de la localización de la ACS nuclear durante el proceso de hibernación [64].

2.5.3.Funciones de los lípidos nucleares

2.5.3.1.Funciones de los FA

Se ha propuesto que el núcleo sería un sitio clave en el control celular del ácido 20:4n-6 [58,65,66]. El 20:4n-6 nuclear no es sólo un componente estructural de la membrana nuclear sino que además es sustrato en la síntesis nuclear de eicosanoides[67], posee propiedades antineoplásicas [66], está involucrado en el proceso de apoptosis [68] y en la regulación de la expresión génica [69]. Los eicosanoides son un grupo de mediadores derivados de la actividad de la ciclooxigenasa (COX) sobre el 20:4n-6. En estudios con células de endotelio se encontró que la isoforma COX-1 se localiza en la región perinuclear en asociación a la EN y al RE, y también dentro del núcleo en la matriz nuclear. La COX-2 se localiza principalmente dentro del núcleo en las zonas de pericromatina indicando en forma indirecta que esta isoforma podría unirse a sitios de síntesis y procesamiento de RNA; es interesante señalar que no se observó localización de la COX-2 en CN [70].

2.5.3.2.Funciones de los LP

En el núcleo se han descrito las cascadas de señalización de distintos LP. Los componentes de la cascada de señalización de PI no sólo se localizan en la EN sino también en la matriz [71].

El DAG nuclear como segundo mensajero está directamente ligado a la proliferación celular y puede provenir PI y / o de PC. La PC endonuclear podría ser fuente de DAG y también participar en el reciclado del mismo LP a través de la resíntesis de PC [61,72].

Al igual que el DAG, el PA está involucrado en la proliferación celular, éste ha sido descrito en núcleo y se produce por acción de PLD sobre GPL. Los trabajos de Pasquaret et al. han demostrado la existencia de numerosas enzimas de la vía de señalización de PA en núcleos provenientes de células del sistema nervioso central y del hígado [57,73].

La SM se concentra en el interior nuclear [74] y se localiza en zonas de pericromatina. Más aún, se ha descrito que la SM se concentra en zonas del nucleolo vinculada a la síntesis de pre-ARNr y por lo tanto de genes activos. Por otro lado la SM contribuye al mantenimiento de la estructura nuclear, puesto que la misma se pierde cuando la SM es degradada [75].

2.5.3.3. Funciones de los LN

Hasta el momento existía muy poca información de la función de los Ln nucleares ya que las investigaciones se habían centrado en los LP del núcleo.

Albi y col. estudiaron el rol del C nuclear y su relación con la SM [76]. Encontraron una relación entre los niveles de C y el estado del ciclo celular y un estrecho vínculo entre la SM y el C [77]. Estos autores proponen que el C nuclear se localiza en la EN, en la Matriz nuclear y en asociación a la cromatina (C libre o ligado a SM y proteínas).

Los pooles C localizados en la membrana nuclear interna funcionarían como plataformas para los procesos de transcripción [78,79]; los pooles asociados a la cromatina tendría un rol regulatorio en la transición de las fases G0/G1 y en la iniciación de la fase S, mientras que el pool localizado en la matriz habilitaría un sitio de anclaje del ADN durante la replicación. [47].

Con respecto a los TAG y CE nucleares no existían datos concretos respecto a su localización nuclear ni hipótesis respecto a las funciones celulares de los mismos.

2.6. Proteínas solubles que unen lípidos

Entre las proteínas que son capaces de unir lípidos se encuentra la familia de las FABP (fatty acid binding protein: proteína de unión de FA), en particular, la isoforma de hígado (L-FABP) une FA de cadena larga, acil-CoAs, MAG, lisofosfolípidos, sales biliares y grupo hemo [80]. Presentan una estructura tridimensional conservada, que consiste de 10 cadenas β antiparalelas que se ubican en dos hojas enfrentadas delimitando una cavidad central en la cual reside un pequeño núcleo hidrofóbico, además presenta dos hélices α cortas en lo que se denomina zona portal, a través de la cual se produciría la entrada de los lípidos [81]. En el hígado la isoforma mayoritaria es la L-FABP y se caracteriza por presentar 2 sitios activos para FA uno de baja y otro de alta afinidad.

Se ha demostrado la existencia de una L-FABP y una ACBP (acil-CoA binding protein: proteína de unión de acil-CoAs) en el núcleo [82,83].

2.7. Metabolismo lipídico nuclear

Por otro lado en nuestro laboratorio se viene estudiando desde hace tiempo el metabolismo nuclear de los ácidos grasos (FA). Una de las principales funciones de los FA en el núcleo es la de participar en la regulación de la expresión génica; el proceso general implica la unión del FA (ligando) a factores de transcripción que activan o inhiben genes específicos. En este sentido se ha propuesto que los FA, en un proceso que implica la unión a PPAR (peroxisomal proliferator activator receptor) y por formación de heterodímeros son receptores del ácido 9-cis retinoico (RXR) [84], regulan la expresión de genes del metabolismo lipídico, del de la glucosa, del proceso de adipogénesis y de la diferenciación celular. Otro factor de transcripción, el HNF-4 α (hepatocyte nuclear factor- 4 α) se activa por la unión de acil- CoAs de cadena larga (18:3n-3, 20:5n-3 y 22:5n-3) como ligando y se inhibe por unión de acil-CoA de FA saturados (14:0 y 16:0). El HNF-4 α controla la expresión de genes involucrados en el metabolismo de lipoproteínas, del hierro, de hidratos de carbono y en la síntesis de ácidos biliares [85].

Estudios previos del laboratorio han demostrado que en núcleos aislados de células de hígado de rata los acil-CoAs, los FA saturados y los PUFA exógenos se incorporan como FA libre y esterifican en los lípidos nucleares principalmente en los LP y en menor proporción en los TAG por un mecanismo acil-CoA dependiente [39]. También se demostró que el ácido 20:4n-6 sintetizado en el núcleo por desaturación del 20:3n-6, se esterifica rápidamente en los lípidos nucleares [38]. Por otro lado los FA esterificados a la PC nuclear se remodelan mediante un proceso acil-CoA dependiente, en el que intervienen proteínas citosólicas [40].

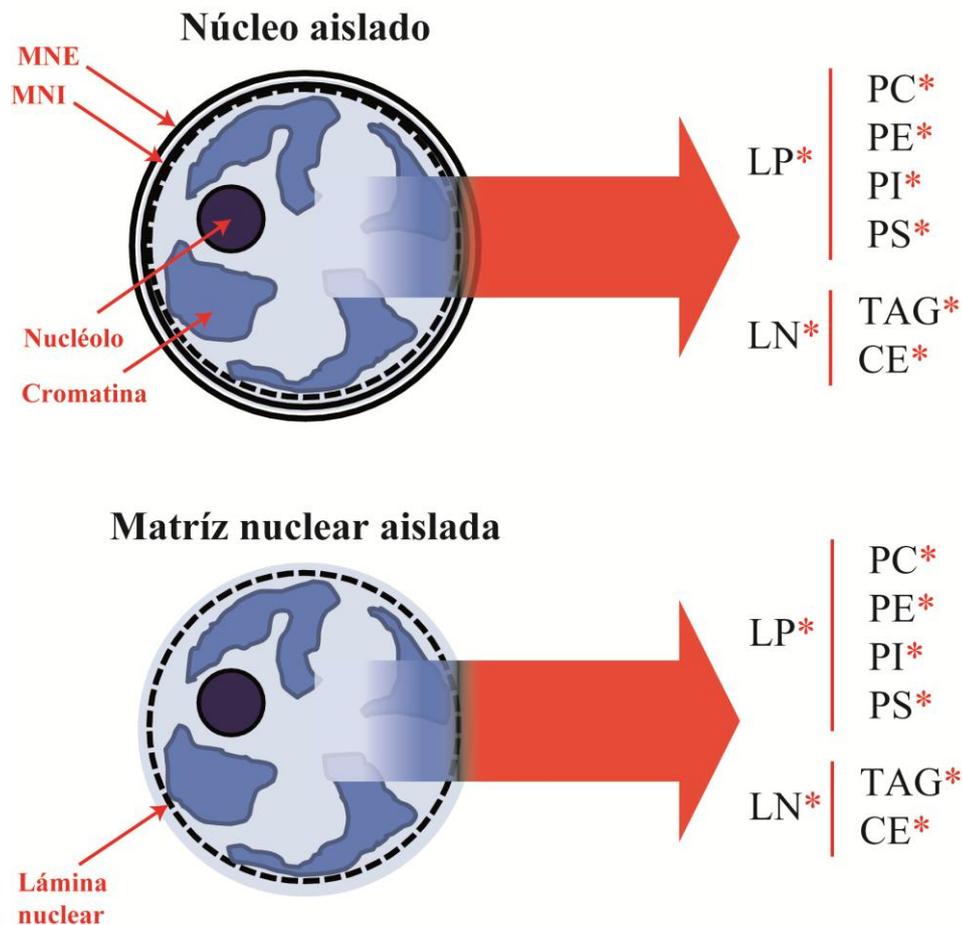


Figura 6. Metabolismo nuclear de ácidos grasos (FA). Estudios de incorporación de FA exógenos radiactivos al núcleo. Al incubar núcleos o matrices nucleares aislados con $[1-^{14}\text{C}]$ FA se encuentra marca radiactiva (*) en las diferentes clases lipídicas nucleares.

Dado que se ha demostrado la existencia de una L-FABP y una ACBP en el núcleo y que los FA unidos a L-FABP activan al PPAR α [86,87] se estudió el efecto de incubar *in vitro* núcleos y matrices nucleares de células hepáticas de rata con los ácidos $[1-^{14}\text{C}]18:0$ y $[1-^{14}\text{C}]20:4n-6$ libres o ligados a L-FABP. Ambos FA se incorporan en los pools lipídicos nucleares y endonucleares por un proceso acil-CoA dependiente (FA > LP >> TAG). Se observó así mismo, que la L-FABP estimula la esterificación de FA en los pools endonucleares en forma selectiva respecto del ácido y de la fracción lipídica, ya que el 20:4n-6:FABP se incorpora con mayor actividad específica en PI endonuclear [41].

2.8. Bibliografía de la sección “2.”

- [1] B Alberts, *Molecular Biology of the Cell: Reference Edition*, Taylor & Francis, 2008.
- [2] M W Hetzer, The nuclear envelope, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2 (2010) p.a000539.
- [3] S R Solmaz, R. Chauhan, G. Blobel, I. Melcak, Molecular architecture of the transport channel of the nuclear pore complex, *Cell* 147 (2011) pp. 590-602.
- [4] S Bilokapic and T.U. Schwartz, 3D ultrastructure of the nuclear pore complex, *Curr. Opin. Cell Biol.* 24 (2012) pp. 86-91.
- [5] A Malhas, C. Goulbourne, D.J. Vaux, The nucleoplasmic reticulum: form and function, *Trends Cell Biol.* 21 (2011) pp. 362-373.
- [6] M Fricker, M. Hollinshead, N. White, D. Vaux, Interphase nuclei of many mammalian cell types contain deep, dynamic, tubular membrane-bound invaginations of the nuclear envelope, *J. Cell Biol.* 136 (1997) pp. 531-544.
- [7] N Johnson, M. Krebs, R. Boudreau, G. Giorgi, M. LeGros, C. Larabell, Actin-filled nuclear invaginations indicate degree of cell de-differentiation, *Differentiation* 71 (2003) pp. 414-424.
- [8] D A Collings, C.N. Carter, J.C. Rink, A.C. Scott, S.E. Wyatt, N.S. Allen, Plant Nuclei Can Contain Extensive Grooves and Invaginations, *The Plant Cell Online* 12 (2000) pp. 2425-2439.
- [9] S Karasaki, An electron microscope study of intranuclear canaliculi in Novikoff hepatoma cells, *Cancer Res.* 30 (1970) pp. 1736-1742.
- [10] S L Gupton, D.A. Collings, N.S. Allen, Endoplasmic reticulum targeted GFP reveals ER organization in tobacco NT-1 cells during cell division, *Plant Physiol Biochem.* 44 (2006) pp. 95-105.
- [11] P P Lui, S.K. Kong, T.T. Kwok, C.Y. Lee, The nucleus of HeLa cell contains tubular structures for Ca²⁺ signalling, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247 (1998) pp. 88-93.
- [12] M D Bootman, C. Fearnley, I. Smyrnias, F. MacDonald, H.L. Roderick, An update on nuclear calcium signalling, *J. Cell Sci.* 122 (2009) pp. 2337-2350.
- [13] A van Leeuwenhoek, *Opera Omnia, Seu Arcana Naturae Ope Exactissimorum Microscopiorum Detecta, Experimentis Variis Comprobata*, 1722.
- [14] W Martin, Archaeobacteria (Archaea) and the origin of the eukaryotic nucleus, *Curr. Opin. Microbiol.* 8 (2005) pp. 630-637.
- [15] M Takemura, Poxviruses and the origin of the eukaryotic nucleus, *J. Mol. Evol.* 52 (2001) pp. 419-425.

- [16] P J Bell, Viral eukaryogenesis: was the ancestor of the nucleus a complex DNA virus?, *J. Mol. Evol.* 53 (2001) pp. 251-256.
- [17] M Dundr and T. Misteli, Biogenesis of nuclear bodies, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2 (2010) p.a000711.
- [18] M Platani, I. Goldberg, A.I. Lamond, J.R. Swedlow, Cajal body dynamics and association with chromatin are ATP-dependent, *Nat. Cell Biol.* 4 (2002) pp. 502-508.
- [19] G Dellaire, C.H. Eskiw, H. Dehghani, R.W. Ching, D.P. Bazett-Jones, Mitotic accumulations of PML protein contribute to the re-establishment of PML nuclear bodies in G1, *J. Cell Sci.* 119 (2006) pp. 1034-1042.
- [20] M Dundr, J.K. Ospina, M.H. Sung, S. John, M. Upender, T. Ried, G.L. Hager, A.G. Matera, Actin-dependent intranuclear repositioning of an active gene locus in vivo, *J. Cell Biol.* 179 (2007) pp. 1095-1103.
- [21] Y C Chen, C. Kappel, J. Beaudouin, R. Eils, D.L. Spector, Live cell dynamics of promyelocytic leukemia nuclear bodies upon entry into and exit from mitosis, *Mol. Biol. Cell* 19 (2008) pp. 3147-3162.
- [22] T Misteli and D.L. Spector, Protein phosphorylation and the nuclear organization of pre-mRNA splicing, *Trends Cell Biol.* 7 (1997) pp. 135-138.
- [23] T E Kaiser, R.V. Intine, M. Dundr, De novo formation of a subnuclear body, *Science* 322 (2008) pp. 1713-1717.
- [24] K V Prasanth, P.A. Sacco-Bubulya, S.G. Prasanth, D.L. Spector, Sequential entry of components of the gene expression machinery into daughter nuclei, *Mol. Biol. Cell* 14 (2003) pp. 1043-1057.
- [25] P A Bubulya, K.V. Prasanth, T.J. Deerinck, D. Gerlich, J. Beaudouin, M.H. Ellisman, J. Ellenberg, D.L. Spector, Hypophosphorylated SR splicing factors transiently localize around active nucleolar organizing regions in telophase daughter nuclei, *J. Cell Biol.* 167 (2004) pp. 51-63.
- [26] A H Fox, C.S. Bond, A.I. Lamond, P54nrb forms a heterodimer with PSP1 that localizes to paraspeckles in an RNA-dependent manner, *Mol. Biol. Cell* 16 (2005) pp. 5304-5315.
- [27] L Bongiorno-Borbone, C.A. De, P. Vernole, L. Finos, D. Barcaroli, R.A. Knight, G. Melino, L. De, V, FLASH and NPAT positive but not Coilin positive Cajal Bodies correlate with cell ploidy, *Cell Cycle* 7 (2008) pp. 2357-2367.
- [28] J Zhao, B.K. Kennedy, B.D. Lawrence, D.A. Barbie, A.G. Matera, J.A. Fletcher, E. Harlow, NPAT links cyclin E-Cdk2 to the regulation of replication-dependent histone gene transcription, *Genes Dev.* 14 (2000) pp. 2283-2297.

- [29] M Carmo-Fonseca, J. Ferreira, A.I. Lamond, Assembly of snRNP-containing coiled bodies is regulated in interphase and mitosis--evidence that the coiled body is a kinetic nuclear structure, *J. Cell Biol.* 120 (1993) pp. 841-852.
- [30] J A Ferreira, M. Carmo-Fonseca, A.I. Lamond, Differential interaction of splicing snRNPs with coiled bodies and interchromatin granules during mitosis and assembly of daughter cell nuclei, *J. Cell Biol.* 126 (1994) pp. 11-23.
- [31] D L Spector, SnapShot: Cellular bodies, *Cell* 127 (2006) p.1071.
- [32] J Chayen and P.B. Gahan, Lipid components in nucleohistone, *Biochemical Journal* 69 (1957) p.49.
- [33] D M Kashnig and C.B. Kasper, Isolation, morphology, and composition of the nuclear membrane from rat liver, *J. Biol. Chem.* 244 (1969) pp. 3786-3792.
- [34] H Kleinig, Nuclear membranes from mammalian liver. II. Lipid composition, *J. Cell Biol.* 46 (1970) pp. 396-402.
- [35] T W Keenan, R. Berezney, L.K. Funk, F.L. Crane, Lipid composition of nuclear membranes isolated from bovine liver, *Biochim. Biophys. Acta* 203 (1970) pp. 547-554.
- [36] A S Khandwala and C.B. Kasper, The fatty acid composition of individual phospholipids from rat liver nuclear membrane and nuclei, *J. Biol. Chem.* 246 (1971) pp. 6242-6246.
- [37] H Fukuda, H. Tatsumi, N. Iritani, A. Katsurada, C. Kinoshita, H. Fujita, T. Tanaka, Lipogenic enzyme induction and incorporation of exogenous fatty acid into liver and liver nuclei, *Biochim. Biophys. Acta* 960 (1988) pp. 19-25.
- [38] A Ves-Losada and R.R. Brenner, Fatty acid delta 5 desaturation in rat liver cell nuclei, *Mol. Cell Biochem.* 142 (1995) pp. 163-170.
- [39] A Ves-Losada and R.R. Brenner, 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 (1998) pp. 39-47.
- [40] S M Mate, R.R. Brenner, A. Ves-Losada, Phosphatidyl choline fatty acid remodeling in the hepatic cell nuclei, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 70 (2004) pp. 49-57.
- [41] S M Mate, J.P. Layerenza, A. Ves-Losada, Incorporation of arachidonic and stearic acids bound to L-FABP into nuclear and endonuclear lipids from rat liver cells, *Lipids* 42 (2007) pp. 589-602.
- [42] P Antony, J.N. Kanfer, L. Freysz, Phosphatidylcholine metabolism in nuclei of phorbol ester-activated LA-N-1 neuroblastoma cells, *Neurochem. Res.* 25 (2000) pp. 1073-1082.

- [43] N O Favale, M.C. Fernandez-Tome, L.G. Pescio, N.B. Sterin-Speziale, The rate-limiting enzyme in phosphatidylcholine synthesis is associated with nuclear speckles under stress conditions, *Biochim. Biophys. Acta* 1801 (2010) pp. 1184-1194.
- [44] Y Wang, T.D. Sweitzer, P.A. Weinhold, C. Kent, Nuclear localization of soluble CTP:phosphocholine cytidyltransferase, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) pp. 5899-5904.
- [45] K S Bjerve, The Ca(2+) stimulated incorporation of choline into microsomal lecithin subspecies in vitro, *FEBS Lett.* 17 (1971) pp. 14-16.
- [46] M W Spence, J.T. Clarke, H.W. Cook, Pathways of sphingomyelin metabolism in cultured fibroblasts from normal and sphingomyelin lipidosis subjects, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) pp. 8595-8600.
- [47] E Albi and M.P. Viola Magni, The role of intranuclear lipids, *Biol. Cell* 96 (2004) pp. 657-667.
- [48] J J Baldassare, M.B. Jarpe, L. Alferes, D.M. Raben, Nuclear translocation of RhoA mediates the mitogen-induced activation of phospholipase D involved in nuclear envelope signal transduction, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) pp. 4911-4914.
- [49] E Albi and M.M. Viola, Phosphatidylcholine-dependent phospholipase C in rat liver chromatin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 265 (1999) pp. 640-643.
- [50] M Micheli, E. Albi, C. Leray, M.V. Magni, Nuclear sphingomyelin protects RNA from RNase action, *FEBS Lett.* 431 (1998) pp. 443-447.
- [51] E S Gevorkian, L.O. Demirkhanian, K.S. Matinian, S.A. Gonian, [Effects of hydrocortisone and insulin on the electrokinetic potential of hepatocyte nuclei], *Biofizika* 46 (2001) pp. 146-147.
- [52] E Albi and M.P. Viola-Magni, Choline base exchange activity in rat hepatocyte nuclei and nuclear membranes, *Cell Biol. Int.* 21 (1997) pp. 217-221.
- [53] S J Stone and J.E. Vance, Cloning and expression of murine liver phosphatidylserine synthase (PSS)-2: differential regulation of phospholipid metabolism by PSS1 and PSS2, *Biochem. J.* 342 (Pt 1) (1999) pp. 57-64.
- [54] A M Martelli, L. Manzoli, L. Cocco, Nuclear inositides: facts and perspectives, *Pharmacol. Ther.* 101 (2004) pp. 47-64.
- [55] R F Irvine, Nuclear lipid signalling, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4 (2003) pp. 349-360.
- [56] T Balla, Phosphoinositides: tiny lipids with giant impact on cell regulation, *Physiol Rev.* 93 (2013) pp. 1019-1137.
- [57] V L Gaveglione, S.J. Pasquare, N.M. Giusto, Phosphatidic acid metabolism in rat liver cell nuclei, *FEBS Lett.* 587 (2013) pp. 950-956.

- [58] A A Farooqui and L.A. Horrocks, Signaling and interplay mediated by phospholipases A2, C, and D in LA-N-1 cell nuclei, *Reprod. Nutr. Dev.* 45 (2005) pp. 613-631.
- [59] R W Ledeen and G. Wu, Nuclear lipids: key signaling effectors in the nervous system and other tissues, *J. Lipid Res.* 45 (2004) pp. 1-8.
- [60] R W Ledeen and G. Wu, Nuclear sphingolipids: metabolism and signaling, *J. Lipid Res.* 49 (2008) pp. 1176-1186.
- [61] A N Hunt, G.T. Clark, G.S. Attard, A.D. Postle, Highly saturated endonuclear phosphatidylcholine is synthesized in situ and colocated with CDP-choline pathway enzymes, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) pp. 8492-8499.
- [62] L K Dircks, J. Ke, H.S. Sul, A conserved seven amino acid stretch important for murine mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase activity. Significance of arginine 318 in catalysis, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) pp. 34728-34734.
- [63] A Ves-Losada and R.R. Brenner, Long-chain fatty Acyl-CoA synthetase enzymatic activity in rat liver cell nuclei, *Mol. Cell Biochem.* 159 (1996) pp. 1-6.
- [64] A Suozzi, M. Malatesta, C. Zancanaro, Subcellular distribution of key enzymes of lipid metabolism during the euthermia-hibernation-arousal cycle, *J. Anat.* 214 (2009) pp. 956-962.
- [65] A M Capriotti, E.E. Furth, M.E. Arrasmith, M. Laposata, Arachidonate released upon agonist stimulation preferentially originates from arachidonate most recently incorporated into nuclear membrane phospholipids, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) pp. 10029-10034.
- [66] A M Monjazez, C.E. Clay, K.P. High, F.H. Chilton, Antineoplastic properties of arachidonic acid and its metabolites, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 66 (2002) pp. 5-12.
- [67] C D Funk, Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology, *Science* 294 (2001) pp. 1871-1875.
- [68] H A Leaver, M.T. Rizzo, I.R. Whittle, Antitumour actions of highly unsaturated fatty acids: cell signalling and apoptosis, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 66 (2002) pp. 1-3.
- [69] A Chawla, J.J. Repa, R.M. Evans, D.J. Mangelsdorf, Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files, *Science* 294 (2001) pp. 1866-1870.
- [70] H Parfenova, V.N. Parfenov, B.V. Shlopov, V. Levine, S. Falkos, M. Pourcyrous, C.W. Leffler, Dynamics of nuclear localization sites for COX-2 in vascular endothelial cells, *Am. J. Physiol Cell Physiol* 281 (2001) p.C166-C178.

- [71] R Fiume, W.J. Keune, I. Faenza, Y. Bultsma, G. Ramazzotti, D.R. Jones, A.M. Martelli, L. Somner, M.Y. Follo, N. Divecha, L. Cocco, Nuclear phosphoinositides: location, regulation and function, *Subcell. Biochem.* 59 (2012) pp. 335-361.
- [72] A N Hunt, Completing the cycles; the dynamics of endonuclear lipidomics, *Biochim. Biophys. Acta* 1761 (2006) pp. 577-587.
- [73] V L Gaveglione, S.J. Pasquare, N.M. Giusto, Metabolic pathways for the degradation of phosphatidic acid in isolated nuclei from cerebellar cells, *Arch. Biochem. Biophys.* 507 (2011) pp. 271-280.
- [74] S M Mate, R.R. Brenner, A. Ves-Losada, Endonuclear lipids in liver cells, *Can. J. Physiol Pharmacol.* 84 (2006) pp. 459-468.
- [75] C Scassellati, E. Albi, D. Cmarko, C. Tiberi, J. Cmarkova, C. Bouchet-Marquis, P.J. Verschure, R. Driel, M.V. Magni, S. Fakan, Intranuclear sphingomyelin is associated with transcriptionally active chromatin and plays a role in nuclear integrity, *Biol. Cell* 102 (2010) pp. 361-375.
- [76] E Albi, I. Peloso, M.V. Magni, Nuclear membrane sphingomyelin-cholesterol changes in rat liver after hepatectomy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 262 (1999) pp. 692-695.
- [77] E Albi and M.V. Magni, The presence and the role of chromatin cholesterol in rat liver regeneration, *J. Hepatol.* 36 (2002) pp. 395-400.
- [78] G Cascianelli, M. Villani, M. Tosti, F. Marini, E. Bartoccini, M.V. Magni, E. Albi, Lipid microdomains in cell nucleus, *Mol. Biol. Cell* 19 (2008) pp. 5289-5295.
- [79] E Albi and M. Villani, Nuclear lipid microdomains regulate cell function, *Commun. Integr. Biol.* 2 (2009) pp. 23-24.
- [80] J Storch and B. Corsico, The emerging functions and mechanisms of mammalian fatty acid-binding proteins, *Annu. Rev. Nutr.* 28 (2008) pp. 73-95.
- [81] B Corsico, H.L. Liou, J. Storch, The alpha-helical domain of liver fatty acid binding protein is responsible for the diffusion-mediated transfer of fatty acids to phospholipid membranes, *Biochemistry* 43 (2004) pp. 3600-3607.
- [82] U Bordewick, M. Heese, T. Borchers, H. Robenek, F. Spener, Compartmentation of hepatic fatty-acid-binding protein in liver cells and its effect on microsomal phosphatidic acid biosynthesis, *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 370 (1989) pp. 229-238.
- [83] M Elholm, A. Garras, S. Neve, D. Tornehave, T.B. Lund, J. Skorve, T. Flatmark, K. Kristiansen, R.K. Berge, Long-chain acyl-CoA esters and acyl-CoA binding protein are present in the nucleus of rat liver cells, *J. Lipid Res.* 41 (2000) pp. 538-545.

- [84] P Escher and W. Wahli, Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions, *Mutat. Res.* 448 (2000) pp. 121-138.
- [85] J P Pegorier, M.C. Le, J. Girard, Control of gene expression by fatty acids, *J. Nutr.* 134 (2004) pp. 2444S-2449S.
- [86] H Huang, O. Starodub, A. McIntosh, B.P. Atshaves, G. Woldegiorgis, A.B. Kier, F. Schroeder, Liver fatty acid-binding protein colocalizes with peroxisome proliferator activated receptor alpha and enhances ligand distribution to nuclei of living cells, *Biochemistry* 43 (2004) pp. 2484-2500.
- [87] C Wolfrum, C.M. Borrmann, T. Borchers, F. Spener, 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 (2001) pp. 2323-2328.

3. Objetivos e hipótesis

Objetivos Generales

El objetivo general de la presente tesis es determinar el metabolismo y funciones de los lípidos nucleares, el lipidoma y la topología los lípidos nucleares. Determinar además, las transformaciones de los lípidos nucleares y los procesos celulares en los que están involucrados, que conducen entre otros a la regulación de la expresión génica y sus efectos.

La información generada permitirá un mejor diagnóstico, pronóstico y/o tratamiento de patologías donde la homeostasis lipídica esté alterada. Entender el metabolismo de los lípidos nucleares, permitirá establecer si éstos se relacionan y/o regulan como los citosólicos en condiciones normales y patológicas, e incorporarlos como blancos alternativos para los tratamientos de obesidad, diabetes, dislipemias, aterosclerosis y procesos neurodegenerativos.

Para optimizar protocolos de ingeniería y terapia génica, dirigidas a enfermedades congénitas, es crucial el conocimiento de los procesos bioquímicos y moleculares de todos los constituyentes del núcleo, siendo estos, las proteínas, los ácidos nucleicos, y también los lípidos.

Objetivos específicos e hipótesis de trabajo

1. Determinar la composición, topología y propiedades físicoquímicas de los pools de LN y LP del núcleo.
2. Proponer un modelo de organización espacial de los lípidos nucleares.
3. Determinar el proceso mediante el cual los FA citosólicos se internalizan, interaccionan y redistribuyen en los pools lipídicos del núcleo en condiciones fisiológicas.
4. Elucidar el rol de la L-FABP en estos procesos.

Hipótesis

- 1) *En el núcleo los LP y el C se encuentran mayoritariamente en la EN, mientras que en el interior nuclear se concentran los LN (C, CE y TAG).*
- 2) *Los LN nucleares se organizan en gotas lipídicas nucleares (nLD) similares a las citosólicas, formadas por un core hidrofóbico y rodeados por una monocapa lipoproteica.*
- 3) *Los FA exógenos llegan al núcleo, se incorporan y esterifican en los diferentes pools lipídicos nucleares. Dentro del núcleo se movilizan e interaccionan con los dominios*

nucleares y salen al exterior nuclear. En el hígado, la esterificación nuclear de FA es acil-CoA dependiente. Dentro del núcleo los FA se desplazan entre los diferentes pools lipídicos, sitios activos de enzimas, factores de transcripción, receptores nucleares, etc, como FA.

- 4) *La L-FABP favorece la movilización de FA nucleares. Los FA libres o unidos a L-FABP llegan al núcleo, se incorporan y esterifican en los diferentes pools lipídicos nucleares y son movilizados hacia el exterior nuclear. En el hígado, la esterificación nuclear de FA es acil-CoA dependiente. Dentro del núcleo los FA se desplazan entre los diferentes pools lipídicos, sitios activos de enzimas, factores de transcripción, receptores nucleares, etc, como FA y / o FA:L-FABP.*

4.1. Aislamiento de núcleos y fracciones nucleares de células de hígado de rata

4.1.1. Aislamiento de núcleos celulares

Se ensayó la técnica de Blobel y Potter [1] modificada por Kasper [2] y luego adaptada en nuestro laboratorio [3] para la obtención de los Núcleos celulares. Se partió del homogenado total de hígado y se sometió a centrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa. El 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 en la parte inferior del tubo y sedimentan. Una vez optimizada la técnica se estudió la pureza e integridad morfológica y estructural de los núcleos mediante técnicas de microscopía, actividad enzimática y proteínas marcadoras.

En la **figura 7** podemos observar imágenes de núcleo y de matriz nuclear obtenidas mediante diferentes técnicas de microscopía. En la **figura 7A** podemos observar en primer lugar la imagen correspondiente al análisis inmediato de núcleos aislados sin tinción por microscopía de campo claro (MO), donde los núcleos están enteros y redondeados con un granulado interno. El análisis mediato se realizó por microscopía electrónica de transmisión (MET), y se observa que los núcleos están enteros y con todos los componentes estructurales que los caracterizan como la doble membrana nuclear (DMN), las zonas de hetero (hc) y eucromatina (ec) y el nucleolo (Nu). En las imágenes con mayor aumento se observan ribosomas (r) asociados a la MNE, la MNI y el espacio intermembrana. No se observan contaminantes citoplasmáticos como mitocondrias, RE, restos de membranas o citosol en el espacio que rodea a los núcleos.

Se realizó un análisis complementario utilizando microscopía de 2 fotones (M2F) y la sonda fluorescente Laurdan. Esta sonda se intercala mayoritariamente entre lípidos de membrana (LP y C). Mediante esta técnica (**Figura 7A**) se puede apreciar en la periferia de los núcleos una intensa señal de fluorescencia proveniente de la DMN y que contrasta con la baja

fluorescencia del interior (matriz nuclear), este hecho se debe a la poca cantidad de lípidos polares que hay en matriz nuclear como ya fuera documentado en trabajos previos del laboratorio [4].

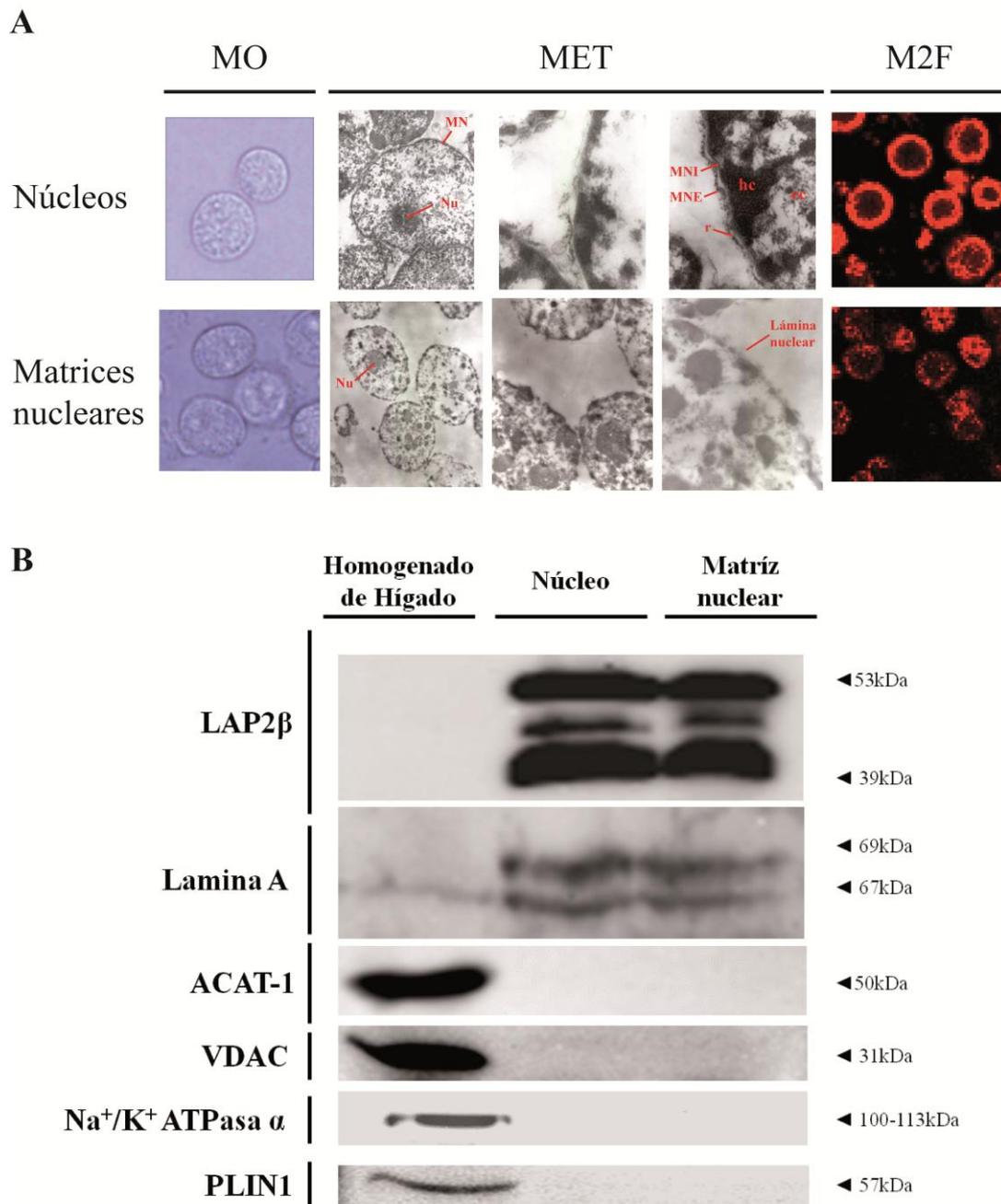


Figura 7. Caracterización morfológica y bioquímica de núcleos y matrices nucleares aislados. **A**) Imágenes de microscopía: MO (Microscopía de campo claro) detalle a 1.000 x; MET (Microscopía electrónica de transmisión) de izquierda a derecha detalles a 5.000, 50.000 y 350.000 x para núcleos y 4.000, 8.000 y 25.000 x para matrices nucleares; M2F (Microscopía de 2 fotones) se utilizó la sonda Laurdan, detalle a 600 x. **B**) Análisis de la pureza de las fracciones por western blot. Los mismos se revelaron para ACAT-1 (marcador de RE), VDAC (marcador de mitocondria), Na⁺/K⁺ ATPasa α (marcador de membrana plasmática) y PLIN1 (marcador de citosol y de cLD). Se utilizaron LAP2 β y Lamina A como controles de Núcleo. MN: membrana nuclear; Nu: nucleolo; MNI: MN interna; MNE: MN externa; hc: heterocromatina; ec: eucromatina; r: ribosomas.

El análisis bioquímico de proteínas y enzimas marcadoras se realizó por western blot. Para descartar posibles contaminaciones celulares durante el proceso de aislamiento de los núcleos, se eligieron las proteínas ACAT-1 [5], VDAC [6], Perilipina o PLIN1 [7] y Na^+/K^+ -ATPasa α [8] como marcadoras de RE, mitocondria, citosol y membrana plasmática, respectivamente. En el control positivo de homogenado de hígado se observaron bandas inmunoreactivas de los cuatro marcadores elegidos, pero en las muestras de núcleo no se observaron dichas bandas y por lo tanto podemos considerar que la fracción nuclear no está contaminada con estas fracciones celulares (**Figura 7B**). En el control de carga en la calle de núcleo se usaron anticuerpos contra dos proteínas marcadoras ubicadas en la zona de la lámina nuclear (Lamina A y LAP2 β) [9,10].

Por lo tanto a partir de estos resultados morfológicos y bioquímicos consideramos que los núcleos aislados mediante el protocolo experimental desarrollado conservan su morfología, propiedades estructurales y bioquímicas características.

4.1.2. Aislamiento de matrices nucleares

Las matrices nucleares están constituidas por núcleos desprovistos de la DMN que conservan la morfología redondeada del núcleo, el nucléolo y la lámina nuclear [4].

Para la obtención de las Matrices nucleares se eligió la técnica de Vann y col., [11] con adaptaciones hechas en el laboratorio [4]. Esta técnica se caracteriza por desorganizar la doble membrana nuclear utilizando concentraciones bajas del detergente no iónico Tritón X-100 en frío y luego aislar las matrices mediante gradiente de sacarosa. Al igual que con la fracción nuclear, se analizó la pureza, integridad morfológica y estructural por microscopía y proteínas marcadoras.

En la **figura 7A** podemos observar en primer lugar la imagen correspondiente al análisis inmediato de matrices nucleares aisladas sin tinción, y se observa que las matrices están enteras y redondeadas con un granulado interno. Así mismo, el análisis mediato se realizó por microscopía electrónica de transmisión (MET), y se observa que el tratamiento con el detergente no iónico TX-100 remueve completamente las dos membranas nucleares mientras que se conserva la lámina, el nucleolo y las zonas de hetero y eucromatina, y según datos bibliográficos se debería conservar el complejo del poro nuclear [12]. Estos resultados se confirman en los preparados analizados por M2F en donde se observa claramente que las matrices nucleares carecen de fluorescencia en su periferia, como se observa en el núcleo (propia de la DMN), y presentan un patrón de fluorescencia interno de tipo reticulado con zonas puntuales de mayor fluorescencia.

Se realizaron ensayos de western blot para descartar al igual que en núcleo posibles contaminaciones celulares. Como era de esperar, en la **figura 7B** se observa que no se detectaron contaminantes de RE, mitocondria, citosol ni membrana plasmática.

A partir de estos resultados morfológicos y bioquímicos consideramos que las matrices nucleares aisladas por el protocolo experimental desarrollado, carecen de la DMN, conservan su morfología, propiedades estructurales y bioquímicas características.

En conclusión, con los ensayos morfológicos y bioquímicos realizados se corroboró la alta pureza, homogeneidad e integridad de los núcleos y matrices nucleares aisladas en las condiciones experimentales descritas.

4.1.3. Aislamiento de membranas nucleares

El núcleo posee dos membranas que conforman la EN, la MNI y la MNE. Los protocolos de aislamiento de ambas membranas utilizan agentes quelantes de iones bivalentes (citrato de sodio) que desorganizan la DMN. En una primera etapa se desorganiza la MNE del

nucleoplasto (núcleos rodeados sólo de la MNI) y se la aísla. La MNI se obtiene luego de tratar a los nucleoplastos con DNasa, que hidroliza los ácidos nucleicos y así se promueve la desorganización del nucleoplasto y este proceso facilita el aislamiento de la MNI (**Figura 8**).

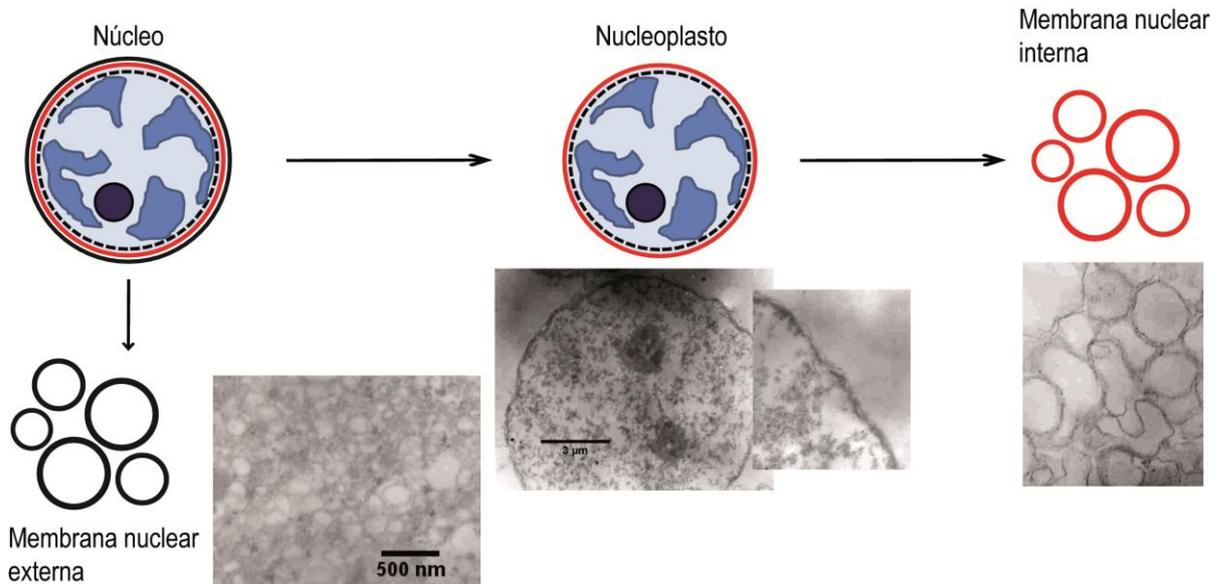


Figura 8. Protocolo de aislamiento de membranas nucleares. En la figura se observa el esquema del aislamiento y las correspondientes microscopías electrónicas de transmisión de cada fracción aislada.

Como puede observarse en las microscopías electrónicas, en las fracciones de MNE y de MNI corresponde a membranas organizadas en vesículas pequeñas. La formación de vesículas puede ser atribuida a los procesos de homogenización utilizados para resuspender las muestras, en líneas generales estos resultados concuerdan con los de bibliografía [9].

El presente protocolo de aislamiento es el más utilizado en la bibliografía, no obstante con este procedimiento sólo se obtienen fracciones crudas. La dificultad de aislar dos fracciones completamente puras una de la otra se debería a que ambas membranas presentan continuidad a nivel del complejo del poro nuclear [13].

4.1.4. Bibliografía de la sección “4.1”

- [1] G Blobel and V.R. Potter, Nuclei from rat liver: isolation method that combines purity with high yield, *Science* 154 (1966) pp. 1662-1665.
- [2] C B Kasper, Isolation and properties of the nuclear envelope, *Methods Enzymol.* 31 (1974) pp. 279-292.
- [3] J P Layerenza, P. Gonzalez, M.M. Garcia de Bravo, M.P. Polo, M.S. Sisti, A. Ves-Losada, Nuclear lipid droplets: A novel nuclear domain, *Biochim. Biophys. Acta* 1831 (2013) pp. 327-340.
- [4] S M Mate, R.R. Brenner, A. Ves-Losada, Endonuclear lipids in liver cells, *Can. J. Physiol Pharmacol.* 84 (2006) pp. 459-468.
- [5] L Kuerschner, C. Moessinger, C. Thiele, Imaging of lipid biosynthesis: how a neutral lipid enters lipid droplets, *Traffic.* 9 (2008) pp. 338-352.
- [6] M V Yusenko, T. Ruppert, G. Kovacs, Analysis of differentially expressed mitochondrial proteins in chromophobe renal cell carcinomas and renal oncocytomas by 2-D gel electrophoresis, *Int. J. Biol. Sci.* 6 (2010) pp. 213-224.
- [7] X Tao, Y. Jihong, G. Li, F. Bin, Z. Yi, C. Xiaodong, Z. Peichao, Z. Yang, Cloning, chromosome mapping and expression pattern of porcine PLIN and M6PRBP1 genes, *Genet. Sel Evol.* 40 (2008) pp. 215-226.
- [8] I Sabolic, C.M. Herak-Kramberger, S. Breton, D. Brown, Na/K-ATPase in intercalated cells along the rat nephron revealed by antigen retrieval, *J. Am. Soc. Nephrol.* 10 (1999) pp. 913-922.
- [9] J P Humbert, N. Matter, J.C. Artault, P. Koppler, A.N. Malviya, Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is located to the inner nuclear membrane vindicating regulation of nuclear calcium signaling by inositol 1,4,5-trisphosphate. Discrete distribution of inositol phosphate receptors to inner and outer nuclear membranes, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) pp. 478-485.
- [10] K Furukawa, N. Pante, U. Aebi, L. Gerace, Cloning of a cDNA for lamina-associated polypeptide 2 (LAP2) and identification of regions that specify targeting to the nuclear envelope, *EMBO J.* 14 (1995) pp. 1626-1636.
- [11] L R Vann, F.B. Wooding, R.F. Irvine, N. Divecha, Metabolism and possible compartmentalization of inositol lipids in isolated rat-liver nuclei, *Biochem. J.* 327 (Pt 2) (1997) pp. 569-576.
- [12] N Dwyer and G. Blobel, A modified procedure for the isolation of a pore complex-lamina fraction from rat liver nuclei, *J. Cell Biol.* 70 (1976) pp. 581-591.

- [13] E Grossman, O. Medalia, M. Zwerger, Functional architecture of the nuclear pore complex, *Annu. Rev. Biophys.* 41 (2012) pp. 557-584.

4.I.Composición y propiedades de los lípidos nucleares. Contenido proteico

Objetivo 1:

Determinar la composición, topología y propiedades fisicoquímicas de los pools de LN y LP del núcleo.

Hipótesis 1:

En el núcleo los LP y el C se encuentran mayoritariamente en la EN, mientras que en el interior nuclear se concentran los LN (C, CE y TAG).

4.I.1. Composición química nuclear

Uno de los objetivos de esta tesis fue elucidar la organización de los LN nucleares y por lo tanto el primer paso fue determinar la composición lipídica nuclear que se muestra en la [tabla 1](#).

Tabla 1. Composición lipídica y contenido proteico del Homogenado, Núcleo y Matriz nuclear de hígado de rata

| Fracción hepática | Homogenado | | Núcleo | | | Matriz nuclear | | | |
|-------------------|------------------------|-------------|------------------------|-------------|------|------------------------|-------------|-------|-------|
| | | | Recuperación (%) | | | Recuperación (%) | | | |
| Composición | %* | | %* | H | | %* | H | N | |
| | $\mu\text{g/g hígado}$ | | $\mu\text{g/g hígado}$ | | | $\mu\text{g/g hígado}$ | | | |
| Proteínas | 190800 ± 33200 (7) | 91.0 | 1900 ± 100 (10) | 96.8 | 1.00 | 500 ± 100 (5) | 98.9 | 0.26 | 26.3 |
| Lípidos § | 18909 ± 1287 | 9.0 | 62.8 ± 0.9 | 3.2 | 0.33 | 5.6 ± 0.3 | 1.1 | 0.03 | 8.9 |
| Clases lipídicas | nmol/g hígado | | nmol/g hígado | | | nmol/g hígado | | | |
| Lípidos polares | | | | | | | | | |
| GP + SP | 19668 ± 1064 (28) | 7.5 | 74.5 ± 0.4 (10) | 3.0 | 0.38 | 4.25 ± 0.01 (5) | 0.67 | 0.022 | 5.7 |
| Lípidos neutros | | | | | | | | | |
| TAG | 1977 ± 299 (4) | 0.8 | 1.4 ± 0.2 (10) | 0.06 | 0.07 | 1.7 ± 0.2 (14) | 0.28 | 0.08 | 116.7 |
| C | 2403 ± 300 (4) | 0.4 | 3.3 ± 0.6 (12) | 0.07 | 0.14 | 0.52 ± 0.04 (7) | 0.04 | 0.02 | 15.4 |
| CE | 945 ± 102 (5) | 0.3 | 1.6 ± 0.3 (12) | 0.05 | 0.17 | 0.9 ± 0.2 (7) | 0.12 | 0.10 | 60.0 |

Sólo los lípidos y proteínas fueron considerados para los cálculos. *% calculados a partir de los datos en $\mu\text{g.g hígado}^{-1}$, usando los siguientes pesos moleculares: LP: 796; TAG: 864; C: 387 and CE: 641. H: Homogenado, N: Núcleo. Los resultados presentados son la media de al menos cuatro determinaciones independientes ± SEM; el número de determinaciones se expresa entre paréntesis. GP: glicerofosfolípidos; SP: esfingolípidos; TAG: triacilgliceridos; C: colesterol; y CE: ésteres de colesterol. § Lípidos = Lípidos polares + Lípidos neutros.

En la **tabla 1** para poder analizar en forma comparativa el contenido de proteínas con el de lípidos, los datos se expresan como [$\mu\text{g. g hígado}^{-1}$] mientras que cuando las comparaciones se establecen entre clases de lípidos los datos se analizan como [$\text{nmol.g hígado}^{-1}$].

Los ácidos nucleicos se excluyeron de los cálculos ya que se consideró que permanecían constantes, y por lo tanto sólo se tuvieron en cuenta los lípidos y las proteínas (100 % de los componentes nucleares).

Los lípidos y proteínas nucleares representan sólo una pequeña proporción de los componentes celulares, ya que los valores de recuperación respecto de homogenado (100% de los componentes celulares de hígado) son de 0,3 y 1 %, respectivamente, como se observa en la **tabla 1**. Los lípidos nucleares corresponden a una pequeña fracción de los componentes nucleares (3%) mientras que las proteínas son las mayoritarias 97% ($\mu\text{g. g hígado}^{-1}$).

Los lípidos nucleares están compuestos principalmente por lípidos polares (LP) (92%), y los LN corresponden al 8% restante. Los LP nucleares tanto del núcleo como de la matriz se caracterizan por estar constituidos por GPL y por esfingolípidos (SL) [1]. Los LN nucleares están compuestos por TAG, C y CE en las siguientes proporciones 22, 53 y 25%, respectivamente.

Los lípidos de la matriz nuclear, considerados como endonucleares (ya que la matriz carece de membranas nucleares), representan sólo el 0,03% de los lípidos totales de la célula de hígado (presentes en el homogenado). En la matriz, los lípidos se encuentran en menor proporción respecto de las proteínas, aún más que en el núcleo, ya que sólo representan el 1% de los componentes de la matriz. Esto se debe a que al tratar a los núcleos con Tritón X-100 sólo el 6% de los lípidos nucleares persiste en la matriz y el resto es desorganizado y removido como todos los componentes de la membrana nuclear. Los lípidos endonucleares están compuestos en un 60% por LP y en un 40% por LN. Estos últimos están compuestos por TAG, C y CE en la siguiente proporción: 54, 17 y 29 %, respectivamente.

Es interesante observar que la matriz está constituida por una alta proporción de CE (60%) en comparación con una baja proporción del C (16%) respecto del núcleo, este hecho se debe a que el C al ser un componente de la DMN es removido durante la obtención de las matrices; mientras que el CE es altamente hidrofóbico y por lo tanto es excluido de las membranas y debe alojarse en dominios nucleares internos y resistentes al Tritón X-100.

Siguiendo el mismo razonamiento y dada la mayor hidrofobicidad de los TAG es lógico esperar un comportamiento análogo al de los CE y de hecho la totalidad de los TAG nucleares se concentran en la matriz (117%). Es interesante resaltar, lo minoritario que son los TAG nucleares respecto a los de la célula hepática ya que sólo representan el 0,07% de los TAG totales (homogenado).

En conclusión, los lípidos nucleares se encuentran en dos localizaciones principales, en la envoltura nuclear compuesta de GPL, SL y C; y dentro del núcleo, en la matriz nuclear, enriquecida en LN (TAG y CE).

4.I.2. Composición de ácidos grasos nucleares

En la **figura 9** se representa la proporción de FA que existe en cada clase de lípidos nucleares y endonucleares. Estos datos se calcularon a partir de la composición lípidica del núcleo y de la matriz nuclear [1] y considerando que los GPL, SL, TAG y CE poseen 2, 1, 3 y 1 FA esterificado, respectivamente.

En el núcleo el principal pool de FA lo constituyen los LP (GPL): PC, PE y PI en orden decreciente, que son los principales componentes de la EN (compuesta por LP y C) y como ya se presentara en la **tabla 2**; representan el 96 % de los lípidos nucleares; y en menor proporción PS y SM y los LN: TAG y C.

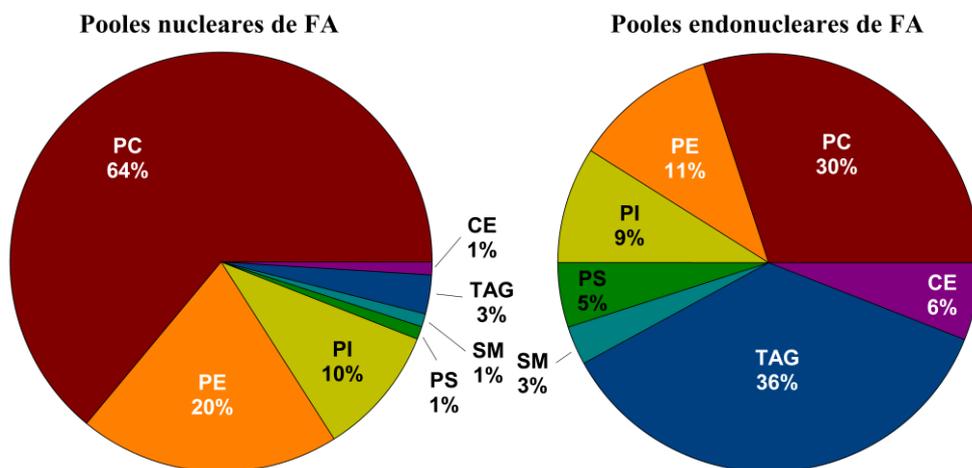


Figura 9. Pooles nucleares y endonucleares de FA. Teniendo en cuenta la composición lípidica del núcleo y de la matriz nuclear, se cálculo la proporción relativa de FA en cada clase lipídica, considerando que los LP, TAG y CE poseen 2,3 y 1 FA esterificado, respectivamente.

En el interior nuclear los principales pooles de FA están constituidos mayoritariamente por TAG y PC y en mucha menor proporción por el resto de los LP (PE, PI, PS y SM) y los CE.

En el núcleo los lípidos se encuentran en dos pooles contrastantes, la EN constituida mayoritariamente por LP y C y PUFA, y en la matriz nuclear por LN (TAG y CE) enriquecidos en saturados y FA monoénicos (MUFA). Como se observa en la **tabla 2**, los principales FA esterificados en LP son 20:4n-6 y 18:0; por otro lado entre los LN (TAG y CE) los principales FA son 16:0, 16:1n-7, 18:2n-6 y 18:1n-9. En este

último grupo podemos encontrar características distintivas entre los TAG y los CE, ya que los TAG poseen mayor proporción de 18:1n-9 y los CE de 16:1n-7 y 18:2n-6.

Tabla 2. Composición de FA de los principales pools lipídicos nucleares.

| FA (%) | LP | TAG | CE |
|--------------------|------------|-------------|-------------|
| 12:0 | 0,2 ± 0,1 | 1,1 ± 0,4 | 1,0 ± 0,1 |
| 14:0 | 0,3 ± 0,0 | 3,9 ± 1,8 | 6,2 ± 5,7 |
| 16:0 | 15,0 ± 1,5 | 25,1 ± 5,8 | 21,6 ± 7,8 |
| 16:1n-7 | 0,4 ± 0,0 | 6,6 ± 4,8 | 18,9 ± 2,3 |
| 17:0 | 0,7 ± 0,3 | 0,5 ± 0,1 | 0,8 ± 1,1 |
| 18:0 | 25,4 ± 1,0 | 12,4 ± 7,2 | 14,6 ± 5,5 |
| 18:1n-9 | 5,0 ± 0,5 | 18,7 ± 0,3 | 14,4 ± 0,3 |
| 18:1n-7 | 2,2 ± 0,2 | 1,1 ± 0,8 | 1,0 ± 0,7 |
| 18:2n-6 | 16,1 ± 0,2 | 23,0 ± 5,9 | 9,7 ± 0,7 |
| 18:3n-6 | 0,4 ± 0,1 | 1,6 ± 0,8 | 2,7 ± 0,9 |
| 18:3n-3 | 0,2 ± 0,0 | 1,2 ± 0,0 | 2,5 ± 1,8 |
| 20:3n-6 | 0,8 ± 0,1 | 0,4 ± 0,1 | 0,1 ± 0,1 |
| 20:4n-6 | 27,5 ± 2,2 | 2,4 ± 0,6 | 4,5 ± 2,6 |
| 22:5n-3 | 1,1 ± 0,0 | 0,3 ± 0,4 | 1,2 ± 1,0 |
| 22:6n-3 | 4,5 ± 0,2 | 2,8 ± 2,5 | 1,9 ± 2,7 |
| Σ Saturados | 41,6 ± 2,9 | 43,0 ± 15,2 | 44,2 ± 19,1 |
| Σ MUFA | 7,6 ± 0,7 | 26,4 ± 5,9 | 34,3 ± 3,3 |
| Σ n-7 | 2,6 ± 0,2 | 7,7 ± 5,6 | 19,9 ± 3,0 |
| Σ n-9 | 5,0 ± 0,5 | 18,7 ± 0,3 | 14,4 ± 0,3 |
| Σ PUFA | 50,6 ± 2,8 | 31,7 ± 10,3 | 22,6 ± 9,8 |
| Σ n-3 | 5,8 ± 0,2 | 4,3 ± 2,9 | 5,6 ± 5,5 |
| Σ n-6 | 44,8 ± 2,6 | 27,4 ± 7,4 | 17,0 ± 4,3 |

MUFA: FA monoenoicos; PUFA: FA polinosaturados.

En conclusión, los LP nucleares se caracterizan por contener mayoritariamente

20:4n-6 y 18:0 y éstos se localizan en la DMN, mientras que los LN poseen más 16:0,

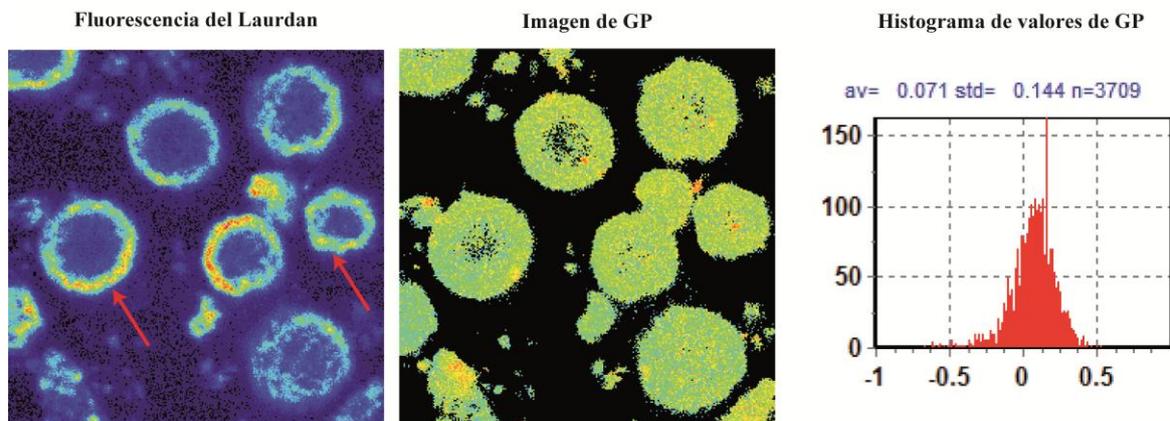
16:1n-7, 18:2n-6 y 18:1n-9 y se localizan en el interior nuclear.

4.I.3. Propiedades fisicoquímicas del núcleo

Con el objetivo de determinar las propiedades fisicoquímicas de los núcleos derivadas de los lípidos que los constituyen, se eligió como estrategia metodológica el estudio de la fluidez de los mismos utilizando la sonda Laurdan.

El Laurdan particiona en las membranas fosfolipídicas y presenta un corrimiento en su máximo de emisión dependiendo de la fluidez del entorno en que se encuentra [2]; se cuantificó este corrimiento mediante el parámetro Polarización Generalizada (GP) utilizando un Microscopio de 2 Fotones.

A. Núcleos aislados



B. Matrices nucleares aisladas

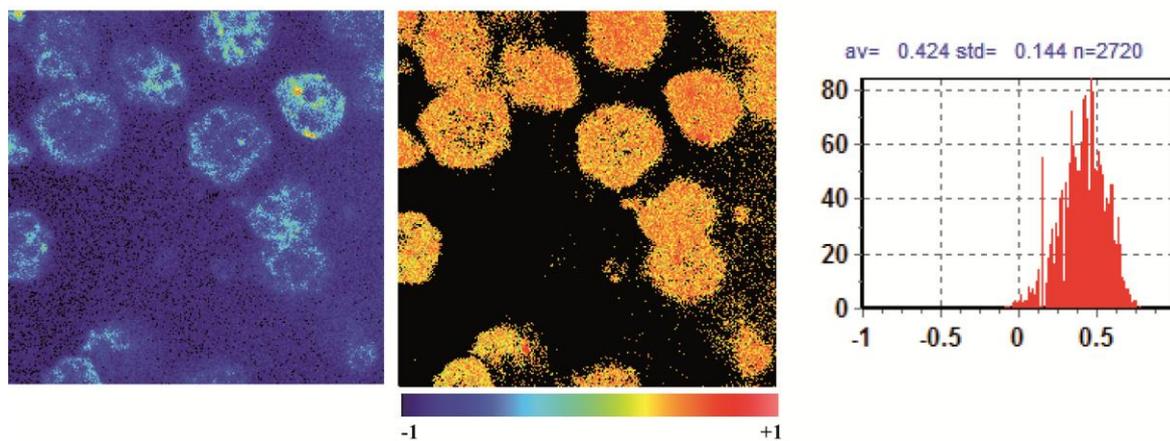


Figura 10. Microscopía de 2 fotones de A) núcleos y B) matrices nucleares aislados. Ambas muestras se tiñeron con Laurdan. De izquierda a derecha se aprecian las imágenes de intensidad de fluorescencia, de GP del Laurdan (-1, azul - +1, rojo) y los histogramas de distribución de valores de GP. Las flechas rojas indican la zona de la envoltura nuclear.

En la **figura 10** podemos observar que en los núcleos la fluorescencia del Laurdan se concentra en la zona de la periferia que corresponde a la envoltura nuclear; en cambio en las matrices nucleares que carecen de doble membrana nuclear, esta fluorescencia de la periferia está ausente y solo se observa fluorescencia en el interior siguiendo un patrón reticulado. Al analizar las imágenes de GP, las coloraciones más próximas al azul (-1) indican mayor fluidez respecto de las coloraciones próximas al rojo (+1, mayor rigidez). La envoltura nuclear posee mayor fluidez que la matriz nuclear ya que los valores de GP están en la zona del verde (0,093) y del naranja (0,423), respectivamente.

Para evaluar en forma comparativa la propiedades fisicoquímicas de la EN con respecto a la membrana plasmática, se repitió el estudio marcando con Laurdan células HepG2 en cultivo y las respectivas imágenes obtenidas en el microscopio de 2 fotones se presentan en la **figura 11**. En las células HepG2 tratadas con Laurdan se observa que su periferia, que corresponde a la zona de la membrana plasmática, presenta valores de GP en naranja y por lo tanto esta zona es más rígida que la envoltura nuclear, que como se observa en la **figura 11** poseen valores de GP en verde. Como era de esperar, los núcleos aislados poseen el mismo comportamiento frente al Laurdan cuando están aislados (**Figura 10**) que cuando se los estudia dentro de una célula en cultivo (**Figura 11**).

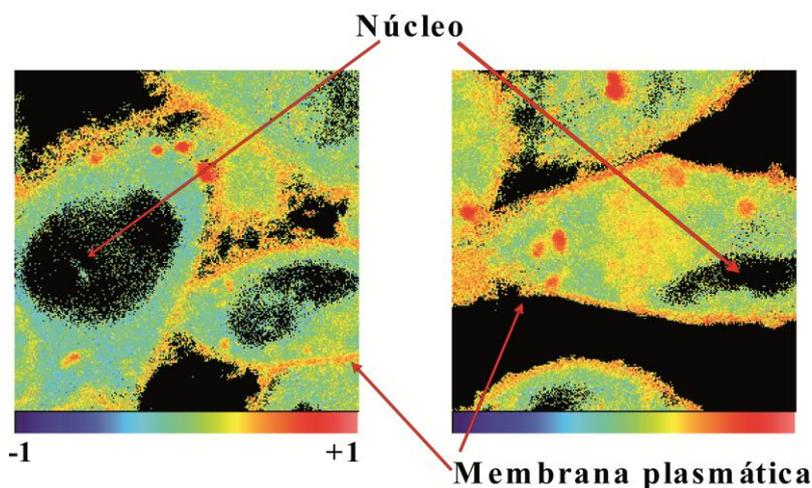


Figura 11. Microscopía de 2 fotones de células HepG2 en cultivo. Las células se tiñeron con Laurdan. En las imágenes los pixeles corresponden al valor de GP de Laurdan (-1, azul - +1, rojo).

En conclusión, la envoltura nuclear es más fluida que el interior nuclear y que la membrana plasmática.

4.I.4.Discusión

Hipótesis 1

En el núcleo los LP y el C se encuentran mayoritariamente en la EN, mientras que en el interior nuclear se concentran los LN (C, CE y TAG).

El núcleo está constituido por los LP (GPL y SL), y los LN (C, CE, DAG, TAG y FA) [3-6], siendo los lípidos polares los mayoritarios del núcleo.

Hasta ahora no se había realizado un estudio sistemático y riguroso de la composición y la ubicación de los lípidos en el núcleo, en particular en el interior nuclear. Se había propuesto que en la matriz nuclear los LP se encontraban asociados al RNA en zonas de cromatina descondensada y/o como complejos lipoproteicos [7,8]. Con respecto a los LN nucleares, los datos eran muy preliminares sin que existan determinaciones rigurosas. Esto se debía en parte, a que la sensibilidad de las determinaciones no era suficiente dada la baja concentración de los lípidos presentes en la matriz nuclear y la limitación metodológica de obtener fracciones subnucleares puras.

La hipótesis planteada fue corroborada luego de estudiar la composición lipídica de núcleos aislados de hígado de rata, y hacer un estudio comparativo con la composición de matrices nucleares aisladas. A partir del mismo podemos concluir que los LP se concentran mayoritariamente (94%) en la EN, y en el interior se concentran los LN (TAG y CE), en estructuras o dominios resistentes al tratamiento con detergente no iónico Tritón X-100.

Los lípidos de la EN (ricos en LP y C) le otorgan a la misma mayor fluidez respecto de la matriz nuclear, la menor fluidez podría ser consecuencia de los lípidos que la constituyen y/o de las características fisicoquímicas que le confieren las proteínas y los ácidos nucleicos que se localizan en el interior nuclear.

En particular, la EN es más fluida que la membrana plasmática. La membrana plasmática posee un mayor contenido de PS y SM que la EN, y éstos LP que tienden a formar estructuras más rígidas, podrían ser los responsables de la menor fluidez de la membrana plasmáticas respecto que la EN [9]. La diferente fluidez de las membranas seguramente tiene consecuencias en las funciones biológicas de las mismas; en particular, la mayor rigidez de la membrana plasmática le confiere a la misma mayor resistencia al stress mecánico. Por otro lado, está documentado que una mayor fluidez en el RE favorece la síntesis, inserción y transporte de lípidos y de proteínas en esas membranas, y dada la continuidad espacial de la MNE con el RE podemos especular que el mismo fenómeno ocurra en el núcleo.

4.I.4. Bibliografía de la sección “4.I”

- [1] S M Mate, R.R. Brenner, A. Ves-Losada, Endonuclear lipids in liver cells, *Can. J. Physiol Pharmacol.* 84 (2006) pp. 459-468.
- [2] T Parasassi, E. Krasnowska, L. Bagatolli, E. Gratton, Laurdan and Prodan as Polarity-Sensitive Fluorescent Membrane Probes, *Journal of Fluorescence* 8 (1998) pp. 365-373.
- [3] D M Kashnig and C.B. Kasper, Isolation, morphology, and composition of the nuclear membrane from rat liver, *J. Biol. Chem.* 244 (1969) pp. 3786-3792.
- [4] H Kleinig, Nuclear membranes from mammalian liver. II. Lipid composition, *J. Cell Biol.* 46 (1970) pp. 396-402.
- [5] T W Keenan, R. Berezney, L.K. Funk, F.L. Crane, Lipid composition of nuclear membranes isolated from bovine liver, *Biochim. Biophys. Acta* 203 (1970) pp. 547-554.
- [6] A S Khandwala and C.B. Kasper, The fatty acid composition of individual phospholipids from rat liver nuclear membrane and nuclei, *J. Biol. Chem.* 246 (1971) pp. 6242-6246.
- [7] E Albi, M. Mersel, C. Leray, M.L. Tomassoni, M.P. Viola-Magni, Rat liver chromatin phospholipids, *Lipids* 29 (1994) pp. 715-719.
- [8] E Albi, I. Peloso, M.V. Magni, Nuclear membrane sphingomyelin-cholesterol changes in rat liver after hepatectomy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 262 (1999) pp. 692-695.
- [9] G van Meer, D.R. Voelker, G.W. Feigenson, Membrane lipids: where they are and how they behave, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (2008) pp. 112-124.

4.II. Topología de los lípidos neutros nucleares

Objetivo 2:

Proponer un modelo de organización espacial de los lípidos nucleares.

Hipótesis 2:

Los lípidos neutros (LN) nucleares se organizan en la matriz nuclear en dominios análogos a las gotas lipídicas citosólicas

4.II.1.Localización y caracterización de las Gotas Lipídicas Nucleares (nLD)

4.II.1.1.Análisis de nLD en fracciones aisladas

Para evaluar la hipótesis de trabajo la primera estrategia utilizada fue intentar visualizar las gotas lipídicas en núcleos aislados de hígado de rata. Con este fin las muestras se trataron con diversos colorantes específicos para LN y se observaron mediante microscopía.

En una primera instancia se realizaron tinciones con Rojo Sudán y Tetróxido de Osmio en muestras de núcleos y matrices nucleares. El colorante Rojo Sudán o Sudan III (S) es un lisocromo (sustancia soluble en lípidos) diazoderivado. El OsO_4 (O) además de ser un buen colorante de lípidos, es un fijador y en microscopía electrónica se lo utiliza como coloración de contraste. Las tinciones con estos colorantes se realizaron sobre muestras previamente fijadas (Formol (F) o el mismo O) o sobre muestras sin fijar (sólo S). Los preparados se observaron en un microscopio óptico de campo claro y se tomaron imágenes con un aumento final de 1000x.

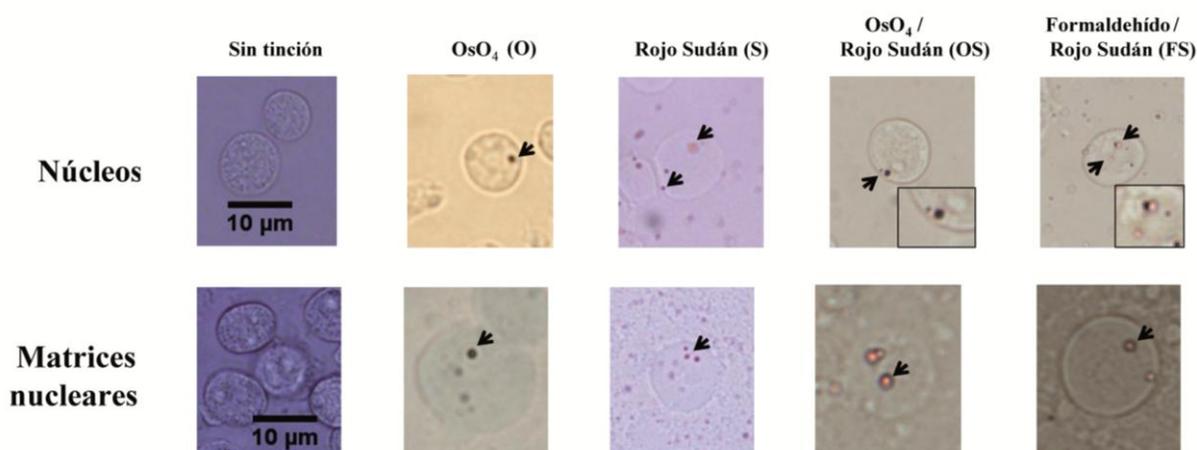


Figura 12. Visualización de gotas lipídicas en núcleos y matrices aisladas. Microfotografías tomadas con microscopía de campo claro. Las flechas indican gotas lipídicas. Todas las imágenes fueron tomadas con una magnificación de 1000x.

Como se presenta en la **figura 12** sólo en las muestras teñidas se observan estructuras esféricas coloreadas en el interior de los núcleos y matrices.

A esas esferas coloreadas las denominamos *Gotas Lipídicas Nucleares (nLD)*.

Estos resultados implican además, que las nLD son resistentes al Triton X-100 utilizado durante el aislamiento de las matrices nucleares.

En el caso de la tinción con S sin fijación previa, los núcleos y las matrices pierden su forma esférica característica, se deforman y/o se destruyen. En cambio, si se realiza una fijación previa (O o F) las gotas se observan dentro de los núcleos o matrices como estructuras esféricas rojizas o negras (S u O, respectivamente).

En promedio considerando todas las coloraciones empleadas, se encuentran unas tres nLD por núcleo o matriz. Sin embargo, con algunos protocolos, en particular cuando las matrices sin fijar son teñidas con S se observan alrededor de 9 gotas. Estos resultados son concordantes con datos de literatura donde se describe que el Rojo Sudán modifica el número y tamaño de las gotas lipídicas citosólicas (cLD) en preparados de células, en particular cuando se tiñen cLD de células CHO en cultivo, se observa un menor número de LD y que además poseen un mayor tamaño [1].

Con el fin de caracterizar la población nuclear de nLD, se estimó el tamaño de las mismas midiendo el diámetro de las nLD en cada condición, como así también los diámetros de los núcleos y las matrices.

Como era esperable, los núcleos y las matrices sin teñir (control) poseen un diámetro similar (8,2 – 9,2 μm), **tabla 3**. Un efecto de “swelling” (agrandamiento) se observó en las muestras de matriz pero no en las de núcleo dado que la EN prevendría este efecto. El tamaño preciso de las nLD no es fácil de establecer puesto que para visualizarlas, se requiere someter la muestra a un proceso de coloración y el tamaño varía cuando se las tiñe. A pesar de este efecto, podemos considerar que el diámetro de las nLD se encuentra en un rango de 0,53 a 0,80 μm (mediana). Con estos datos de diámetros y ajustando la morfología de las nLD, núcleos y matrices a una esfera se estimó que el porcentaje de volumen del núcleo y de la matriz que ocupan las nLD es muy bajo, entre 0,09 y 0,19%.

Por otro lado el tamaño de las poblaciones de nLD visualizadas con los diferentes protocolos, presenta siempre una distribución con sesgo positivo (**Figura 13**), caracterizada por una mayor proporción de gotas por debajo de la media. Esto determina que haya que utilizar métodos no paramétricos para realizar los correspondientes análisis estadísticos. Estos resultados implican que en el núcleo y en la matriz las nLD están constituidas por una población heterogénea con diferentes tamaños y con una alta proporción de gotas que poseen un tamaño menor al de la media.

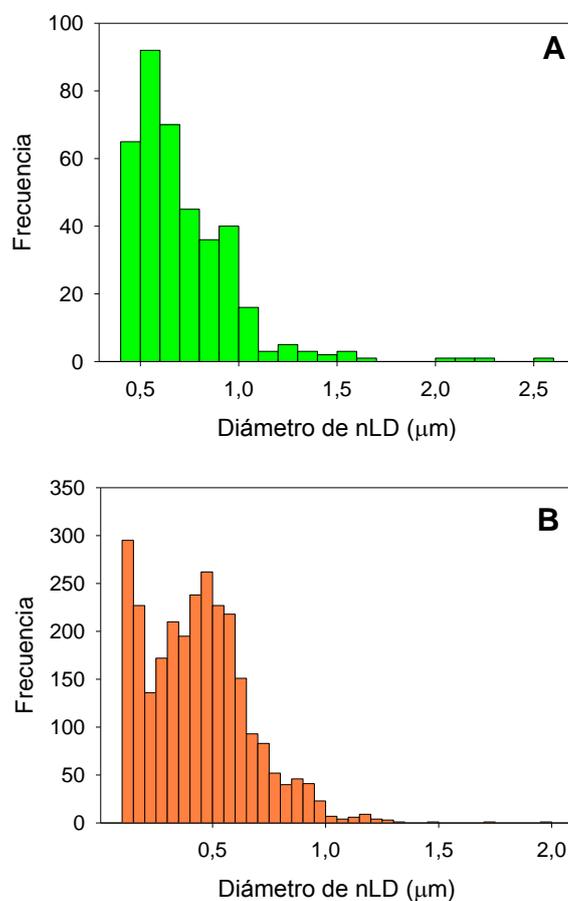


Figura 13. Distribución de tamaños de nLD. Histogramas representativos de los diámetros de nLD medidos en **A)** Núcleos (n = 385) y **B)** Matrices nucleares (n = 920).

Tabla 3. Caracterización morfológica de nLD en núcleos y matrices nucleares aislados.

| | Núcleos enteros | | | | |
|------------------------------|------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| | Sin tinción | OsO ₄ (O) | Rojo Sudán (S) | OsO ₄ / Rojo Sudán (OS) | Formaldehído / Rojo Sudán (FS) |
| Núcleo | | | | | |
| Diámetro | 9,2 ^b ± 0,2 | 9,5 ^b ± 0,5 ^{a,b} | 9,3 ^b ± 0,2 ^a | 7,5 ^a ± 0,2 ^c | 7,6 ^a ± 0,4 ^c |
| Volumen | 407,7 | 449,7 | 414,7 | 217 | 232,8 |
| nLD por núcleo | | 2 ± 0,2 ^e | 4 ± 0,3 ^f | 3 ± 0,4 ^{e,f} | 3 ± 0,3 ^{e,f} |
| nLD | | | | | |
| Diámetro | | | | | |
| Media | | 0,79 ± 0,01 ^h | 0,57 ± 0,01 ⁱ | 0,62 ± 0,01 ⁱ | 0,72 ± 0,01 ^h |
| Mediana (Q25 Q75) | | 0,80 ^h (Q25=0,54 Q75=0,99) | 0,56 ⁱ (Q25=0,37 Q75=0,76) | 0,53 ^j (Q25=0,27 Q75=0,87) | 0,65 ^h (Q25=0,53 Q75=0,84) |
| Mín. | | 0,25 | 0,13 | 0,13 | 0,45 |
| Máx. | | 2,40 | 1,55 | 2,56 | 2,50 |
| Volumen | | 0,27 | 0,09 | 0,08 | 0,14 |
| % del Volumen nuclear | | 0,12 | 0,09 | 0,11 | 0,19 |

Tabla 3. (cont.)

| | Matrices nucleares | | | | |
|---|--------------------------|---------------------------------------|---|---------------------------------------|---|
| | Sin tinción | OsO ₄ (O) | Rojo Sudán (S) | OsO ₄ / Rojo Sudán (OS) | Formaldehído / Rojo Sudán (FS) |
| Matriz nuclear | | | | | |
| Diámetro | 8,2 ^{a,b} ± 0,1 | 13,7 ^d ± 0,4 ^d | 8,5 ^{a,b} ± 0,2 ^{a,c} | 11,0 ^c ± 0,3 ^b | 13,7 ^d ± 0,2 ^d |
| Volumen | 288,7 | 1350,7 | 318,8 | 696,9 | 1372,7 |
| nLD por matriz nuclear | | 3 ± 0,5 ^{e,f} | 9 ± 0,7 ^g | 3 ± 0,4 ^{e,f} | 2 ± 0,1 ^e |
| nLD | | | | | |
| Diámetro | | | | | |
| Media | | 0,74 ± 0,04 ⁱ | 0,44 ± 0,01 ^k | 0,84 ± 0,01 ^l | 0,85 ± 0,02 ^{h,j} |
| Mediana (Q25 Q75) | | 0,56 ⁱ (Q25=0,37 Q75=1,11) | 0,42 ^k (Q25=0,27 Q75=0,57) | 0,78 ^j (Q25=0,27 Q75=0,95) | 0,70 ^{h,j} (Q25=0,56 Q75=0,89) |
| Mín. | | 0,13 | 0,13 | 0,50 | 0,46 |
| Máx. | | 2,47 | 1,95 | 2,47 | 2,55 |
| Volumen | | 0,11 | 0,04 | 0,25 | 0,18 |
| % del Volumen de la matriz nuclear | | 0,03 | 0,11 | 0,11 | 0,03 |

Los volúmenes (μm^3) de las diferentes fracciones se calcularon considerando estructuras esféricas. Se midieron los diámetros de las diferentes estructuras. Para el análisis estadístico se utilizó test de ANAVA con comparaciones de medias post-hoc (HSD Tukey's), las diferentes letras (a-g) muestran diferencias significativas con $p < 0,05$. En el caso de los datos no paramétricos se utilizó el test de Kruskal-Wallis, las diferentes letras (h-k) muestran diferencias significativas con $p < 0,05$. Abreviaturas: O, OsO₄; S, Rojo Sudán; F, formaldehído; Q25, primer cuartil; Q75, tercer cuartil; Mín, mínimo; y Máx, máximo. Se analizaron al menos 3 imágenes representativas conteniendo alrededor de 15 núcleos o matrices nucleares por condición.

Si bien mediante las tinciones realizadas y las observaciones al microscopio de campo claro podemos visualizar a las nLD, definir su forma, tamaño, distribución y propiedades tales como su resistencia a detergentes, no podemos aseverar que se encuentren dentro del núcleo. De modo que para precisar su ubicación la siguiente estrategia metodológica utilizada fue la microscopía confocal de fluorescencia.

Como los colorantes utilizados previamente no poseen propiedades fluorescentes, en los siguientes ensayos de microscopía de fluorescencia se utilizó el colorante BODIPY493/503 que dado su carácter hidrofóbico tiñe zonas ricas en LN. Además, el BODIPY493/503 por su bajo peso molecular difunde rápidamente a través de las membranas biológicas en general y por lo tanto llega fácilmente al interior nuclear. Para observar la morfología nuclear se utilizó DAPI (que tiñe ADN). Dado que ambos fluoróforos emiten en el espectro no visible, las imágenes obtenidas debieron ser pseudocoloreadas con diferentes colores por medio de un software de análisis de imágenes.

En la **figura 14** observamos imágenes de núcleos tomadas en la posición central del seccionamiento óptico. Se observan tres gotas en el núcleo del centro. Tomando como base la imagen de contraste diferencial de interferencia (DIC) se puede apreciar claramente que la morfología nuclear no se ve alterada por el protocolo utilizado.

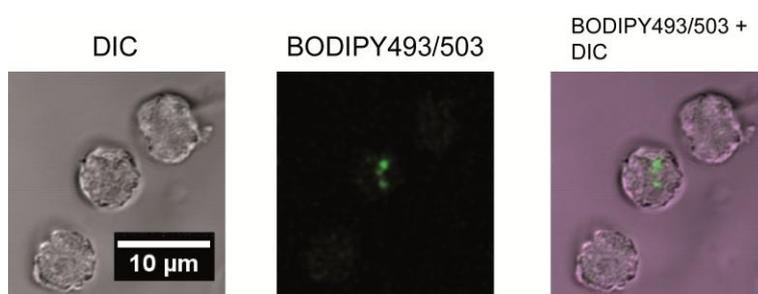
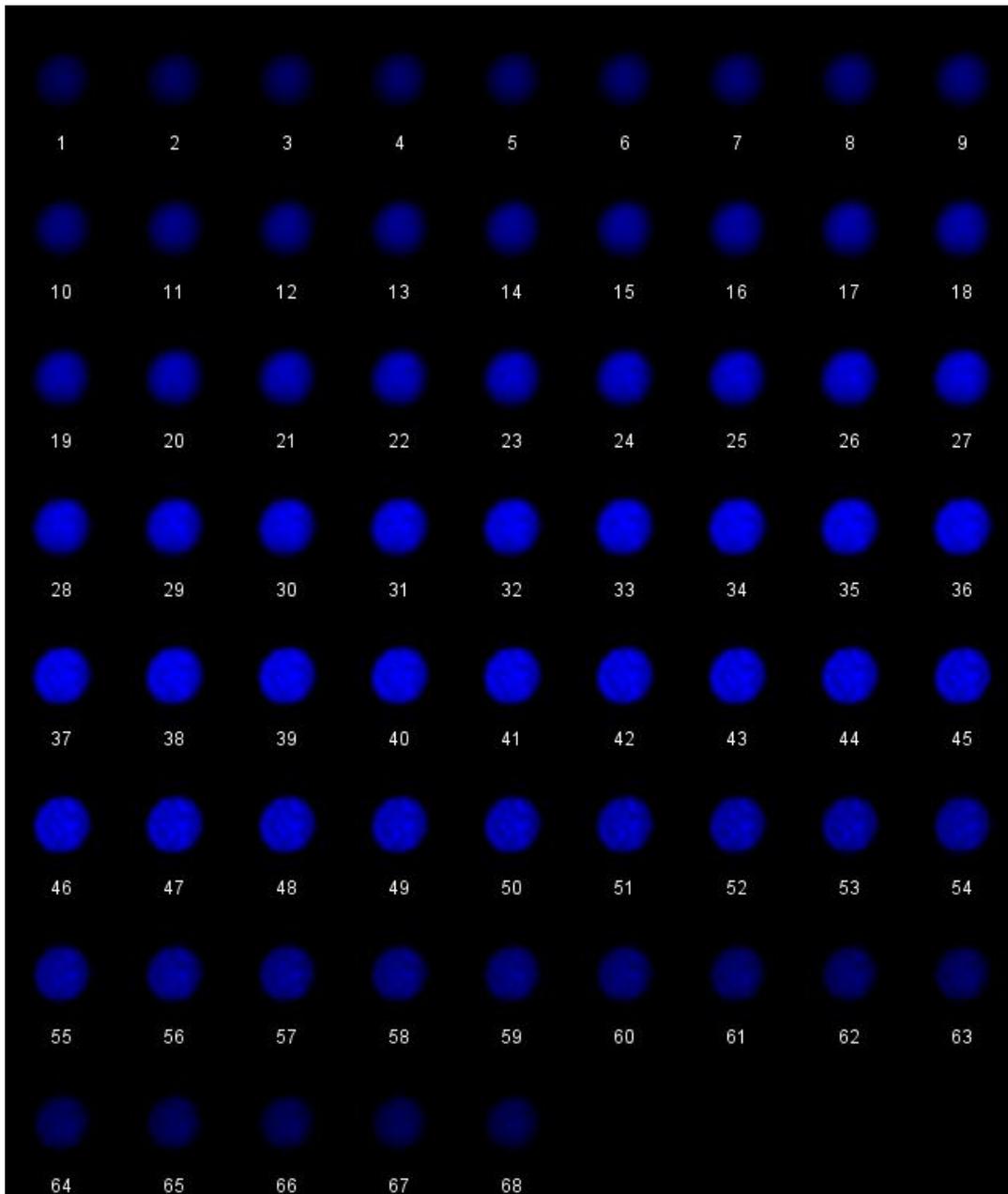


Figura 14. Observación de nLD en núcleos. Imágenes de microscopía confocal de núcleos aislados. En verde se observa la tinción con BODIPY 493/503.

En la **figura 15** se puede observar el resultado del seccionamiento óptico de las muestras de núcleo de células de hígado de rata, donde cada imagen representa un plano xy generado en la dirección z del preparado. La secuencia en color azul corresponde a la marcación con DAPI de los núcleos y la verde a la de BODIPY493/503 de zonas hidrofóbicas (LN). Podemos apreciar por la secuencia del DAPI que el núcleo abarca desde el cuadro 1 hasta el 68, mientras que la señal de BODIPY493/503 aparece entre los cuadros 29 y 60 lo que demuestra la ubicación de las nLD dentro del núcleo.



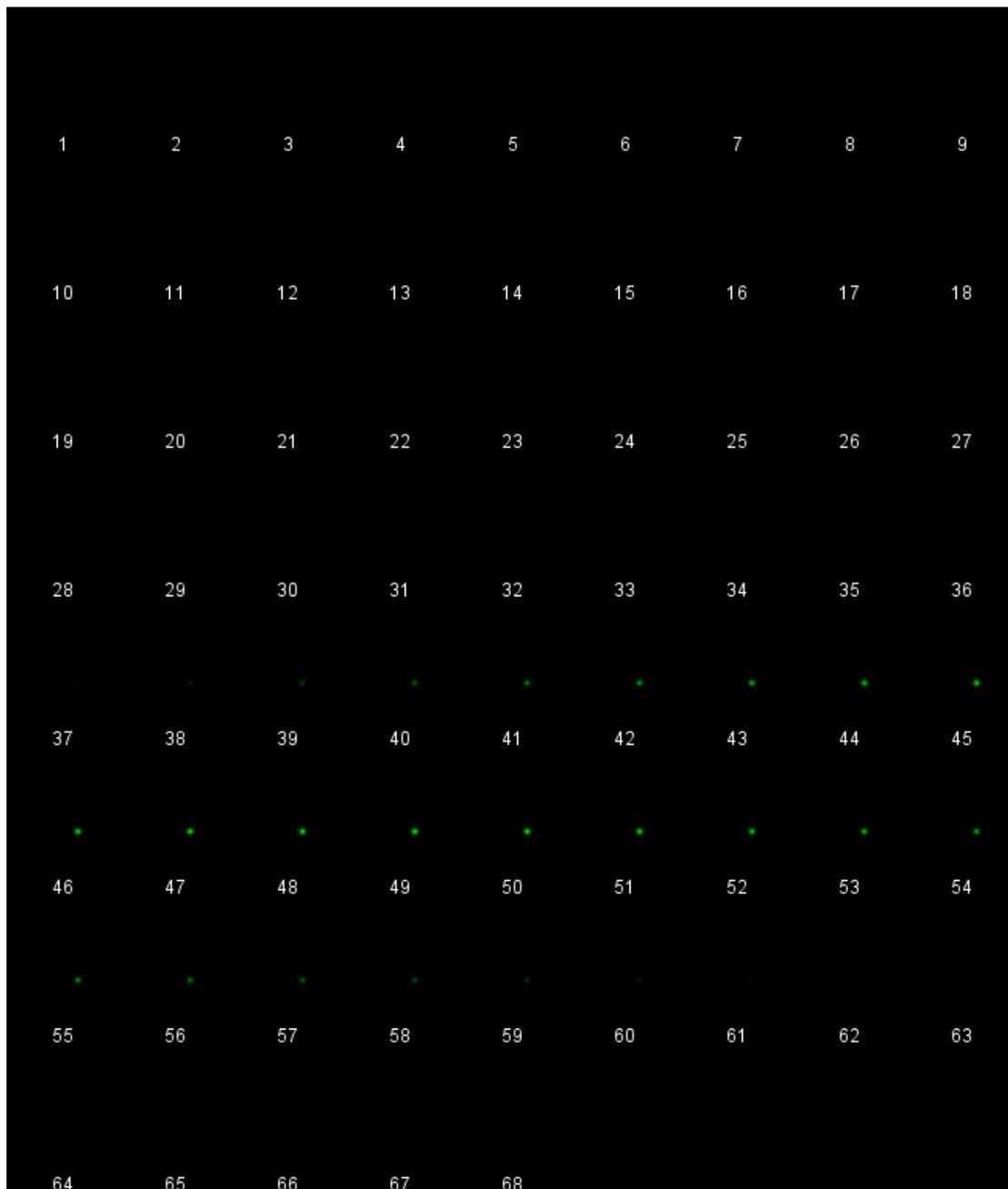


Figura 15. Análisis por microscopía confocal. Seccionamiento óptico realizado mediante microscopía confocal de núcleos aislados, se observa en azul la marcación correspondiente a DAPI (Núcleo) en verde a BODIPY493/503 (LN). Se tomaron 68 secciones de 0,20 μm con una magnificación final de 2000x.

A partir de las imágenes del seccionamiento óptico se puede generar una superposición de las mismas y reconstruir así la imagen proyectada en los planos xz e yz (vistas ortogonales) (Figura 16). Así mismo es posible generar reconstrucciones tridimensionales de los especímenes analizados, como se observa en la figura 16 el núcleo analizado posee una nLD en su interior. Mediante estas

reconstrucciones se observa claramente que las nLD se localizan en el interior nuclear y por lo tanto están confinadas a dominios de la matriz.

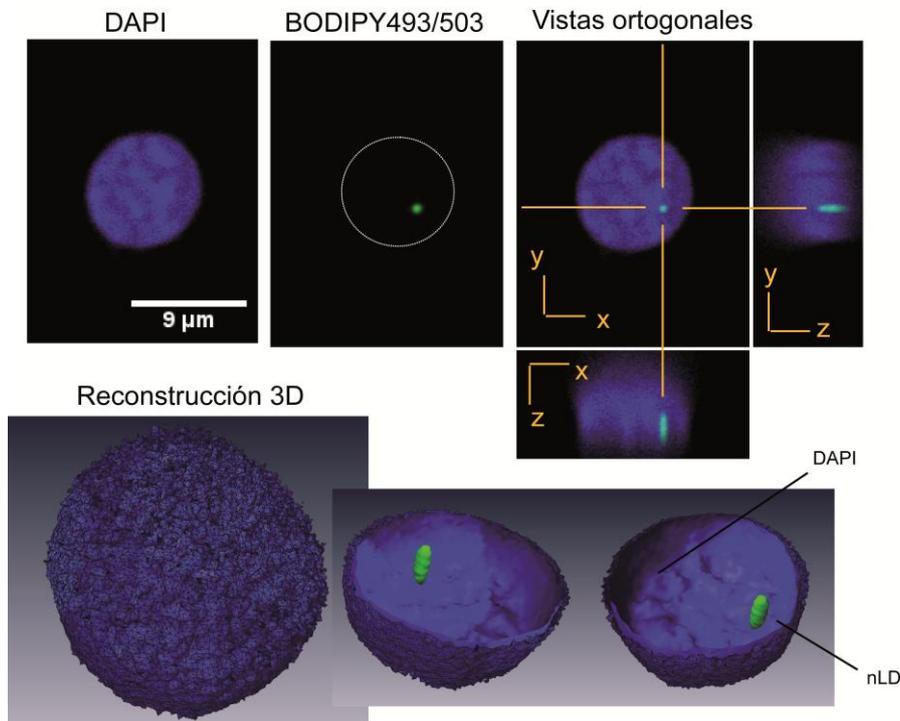


Figura 16. Observación de nLD en núcleo. Reconstrucción de los planos xz e yz a partir de los planos obtenidos mediante el seccionamiento óptico y reconstrucción tridimensional. En azul se observa la tinción para DAPI y en verde para BODIPY 493/503. El núcleo analizado posee una nLD en su interior.

Así mismo se marcaron núcleos y matrices aislados con DAPI, BODIPY 493/503 y por inmunofluorescencia para LAP2 β (proteína asociada a la lámina nuclear) (**Figura 17**). En este caso las imágenes obtenidas fueron pseudocoloreadas a rojo (LAP2 β). Las imágenes de reconstrucción revelan que las nLD se localizan dentro del núcleo, por debajo de la LAP2 β e interactuando con la lámina nuclear. Estos dos ensayos independientes (**Figuras 16 y 17**) indican que las nLD poseen una localización endonuclear y que están confinadas a dominios de la matriz resistentes al Tritón X-100.

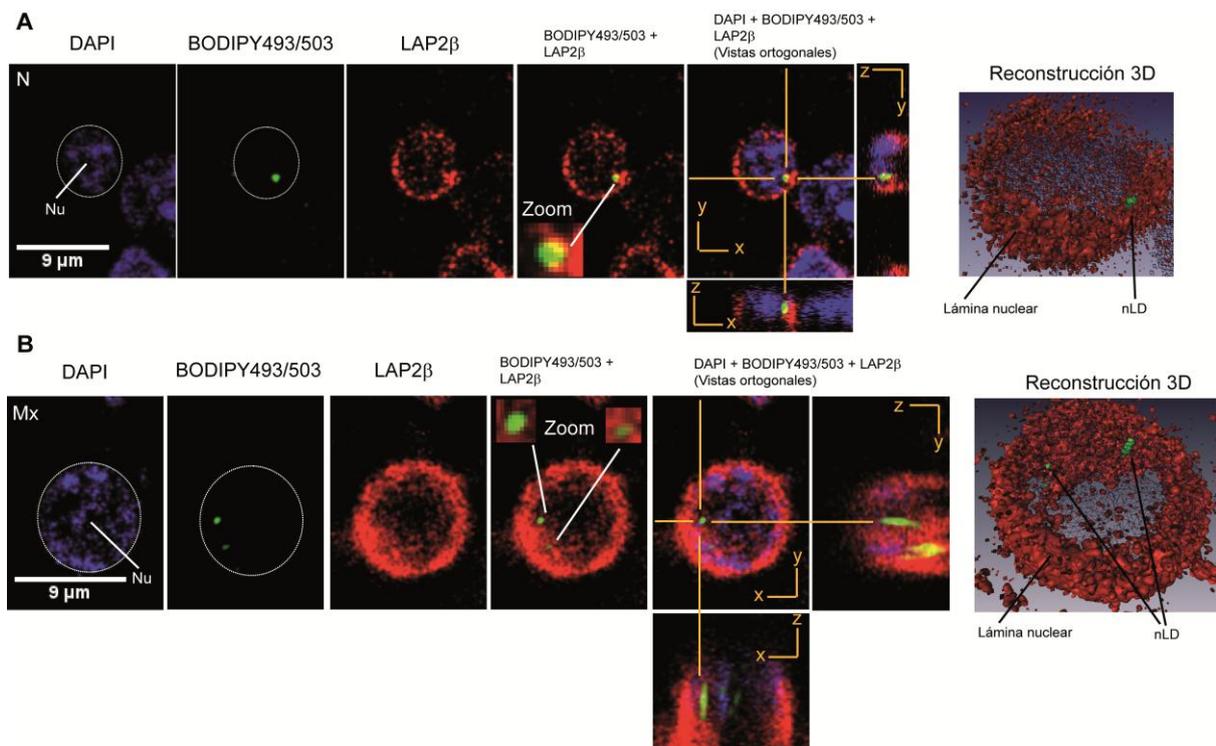


Figura 17. Relación espacial de las nLD con la lámina nuclear. Análisis por inmunofluorescencia indirecta para LAP2 β en A) núcleo y B) matriz nuclear. En rojo se observa la fluorescencia debida a LAP2 β , en azul DAPI y en verde BODIPY 493/503. Se observa una nLD en la muestra de núcleo y dos en la de matriz.

Habiendo demostrado que las nLD son dominios nucleares, el siguiente objetivo fue determinar la relación espacial de la nLD con otros dominios. Con este fin se tiñeron los núcleos y las matrices con las proteínas marcadoras para los cuerpos nucleares *Speckles* y *Paraspeckles* (SC-35 y p54[nrb] respectivamente) por inmunofluorescencia indirecta utilizando microscopía confocal. Como se esperaba por datos de bibliografía [2,3], se observaron numerosas *Speckles* y *Paraspeckles* (Figura 18) dentro del núcleo, pero estos dominios no colocalizan con las nLD. Teniendo en cuenta que a partir de estas imágenes también se puede observar la ubicación del nucléolo dentro del núcleo, podemos inferir que el nucléolo tampoco colocaliza con las nLD.

Nuevamente se observa que las nLD poseen una distribución al azar dentro del núcleo, ya que se las observa en posición periférica cercana a la membrana nuclear (Figura 18A) y en posición central (Figura 18B).

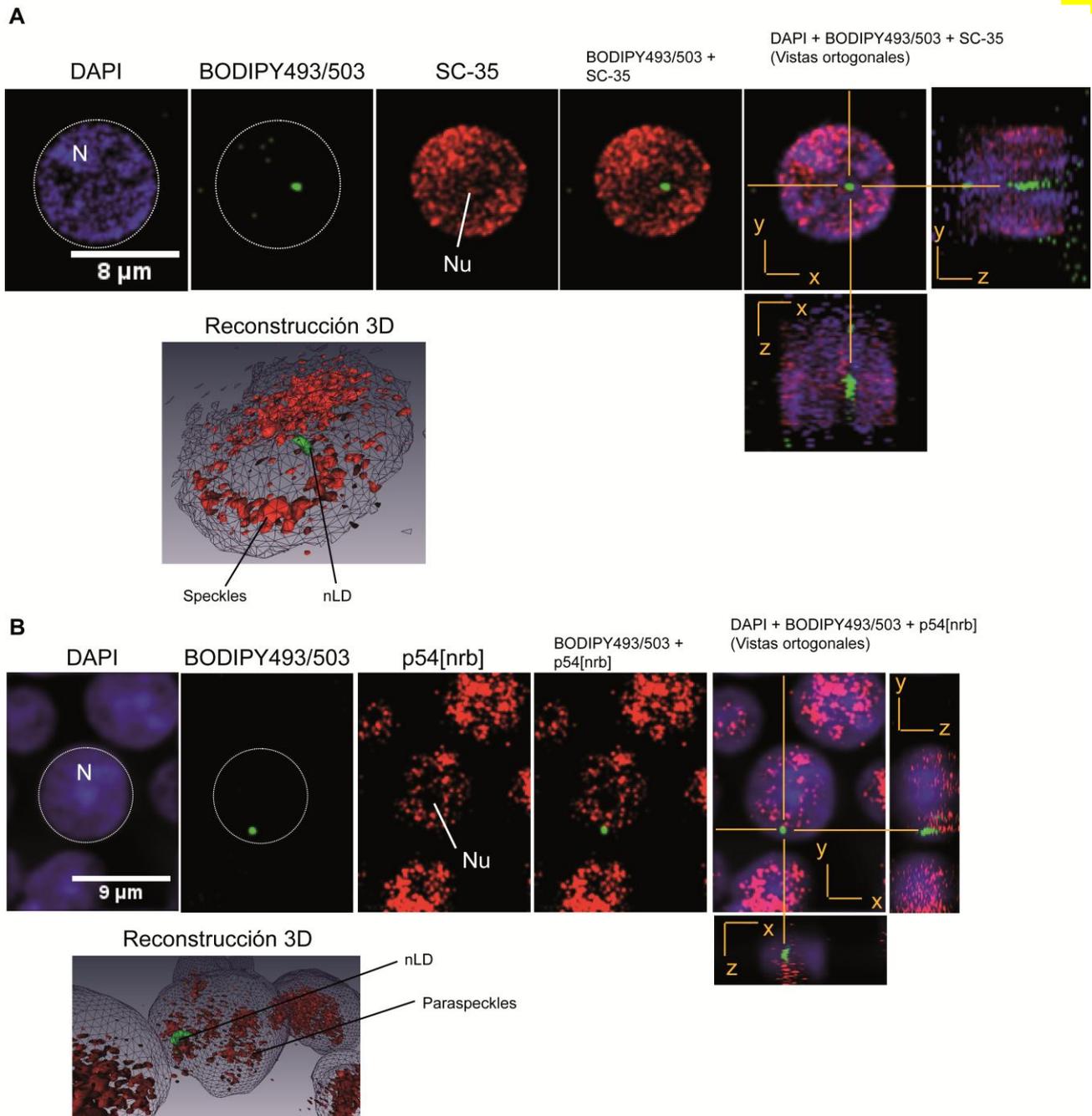


Figura 18. Relación espacial de las nLD con otros dominios nucleares. Inmunofluorescencia indirecta para proteínas marcadoras de dominios nucleares: A) SC-35, marcadora de Speckles nucleares y B) p54[nrb], marcadora de Paraspeckles. En rojo se observa la fluorescencia debida a SC-35 y p54[nrb], en azul DAPI y en verde BODIPY 493/503. Las imágenes para ambos dominios fueron pseudocoloreadas a rojo. Se observa una nLD por núcleo en cada caso y numerosas speckles y paraspeckles.

4.II.1.2. Análisis de nLD en células

Con el fin de corroborar que las nLD no solo se hallan dentro de núcleos y matrices aislados sino también en células enteras, se hicieron observaciones utilizando como modelo experimental células de hígado de ratas mantenidas con una dieta standard y células HepG2 mantenidas en condiciones standard de cultivo.

En una primera etapa las muestras se analizaron mediante técnicas de tinción tradicional de LN para microscopía de campo claro (S y O) y posteriormente por microscopía confocal de fluorescencia (DAPI, BODIPY 493/503).

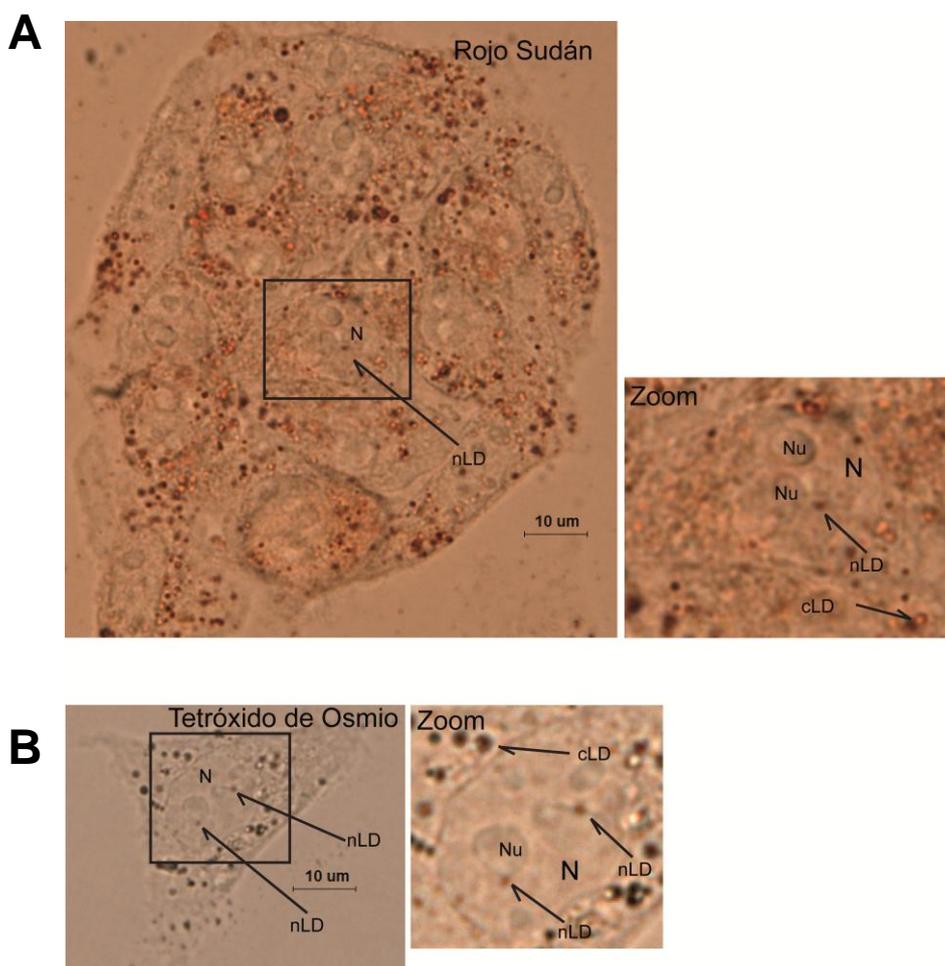


Figura 19. Análisis por microscopía de campo claro de nLD y cLD en células HepG2. Imágenes de microscopía óptica. A) Tinción con Rojo Sudán y B) tinción con OsO₄. Las imágenes se tomaron con una magnificación final de 1000x.

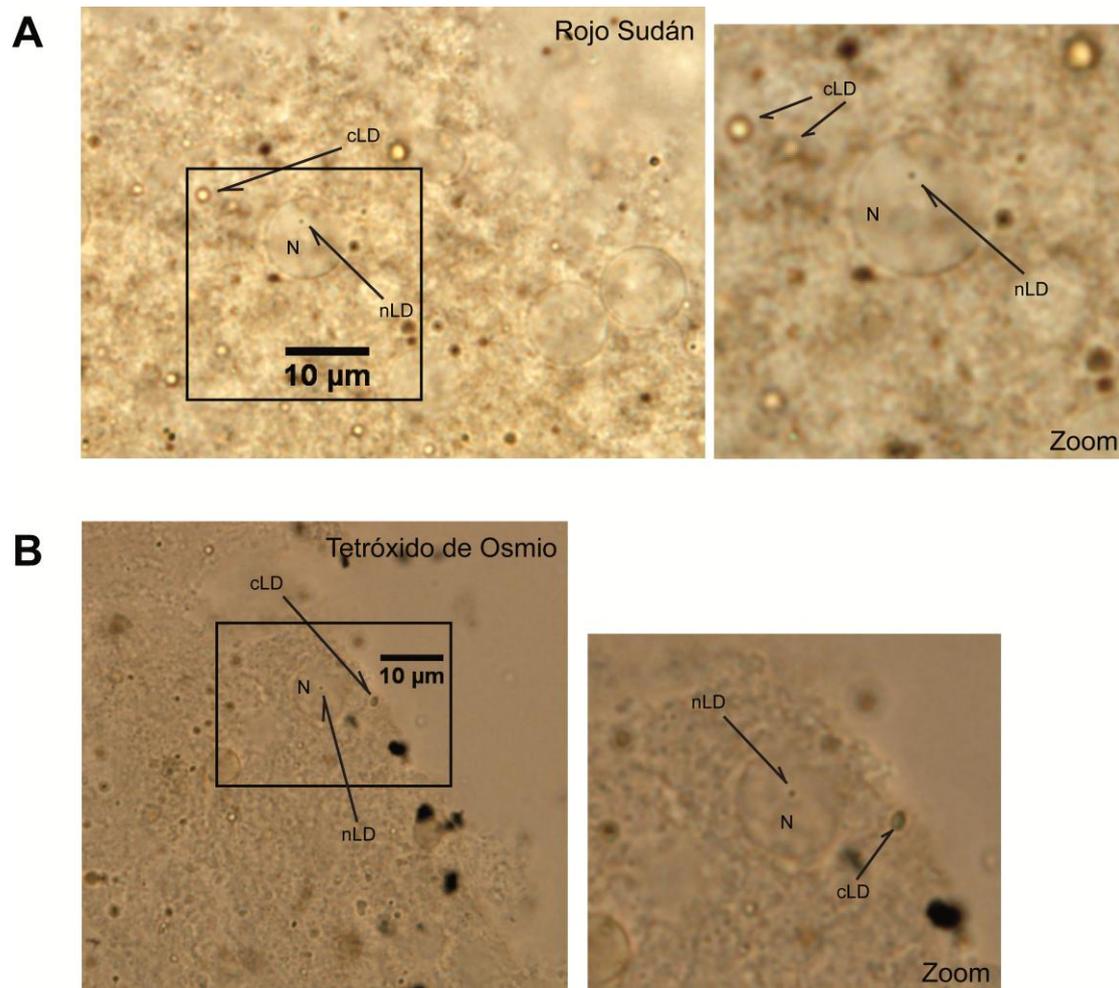


Figura 20. Análisis por microscopía de campo claro de nLD y cLD en hepatocitos de rata. Imágenes de microscopía óptica. A) Tinción con Rojo Sudán y B) tinción con OsO_4 . Las imágenes se tomaron con una magnificación final de 1000x.

Como puede apreciarse en las [figuras 19 y 20](#) en las muestras de células HepG2 y de Hepatocitos se observan gotas lipídicas en el citosol y también en el núcleo. La ubicación nuclear de las nLD se confirmó por microscopía confocal ([Figuras 21 y 22](#)). En este caso se observan nLD dentro del núcleo de células enteras. Nuevamente se observa que las nLD son pocas y poseen una distribución al azar dentro del núcleo.

Uno de los inconvenientes de las tinciones con S o O es que dentro de las células se observa una importante coloración inespecífica de fondo (background) si bien la misma no impide discriminar entre LD y background y por lo tanto, hacer un análisis riguroso. La ventaja de esta metodología es el bajo costo de los colorantes y el poder utilizar un microscopio de campo claro. Este background no está presente cuando las observaciones se realizan mediante microscopía de fluorescencia y utilizando BODIPY 493/503 como colorante de LN. Como se observa en las [tablas 3](#) (Núcleos y Matrices nucleares) y [4](#) (Hepatocitos y células HepG2) con todas las coloraciones seleccionadas los resultados fueron siempre comparables.

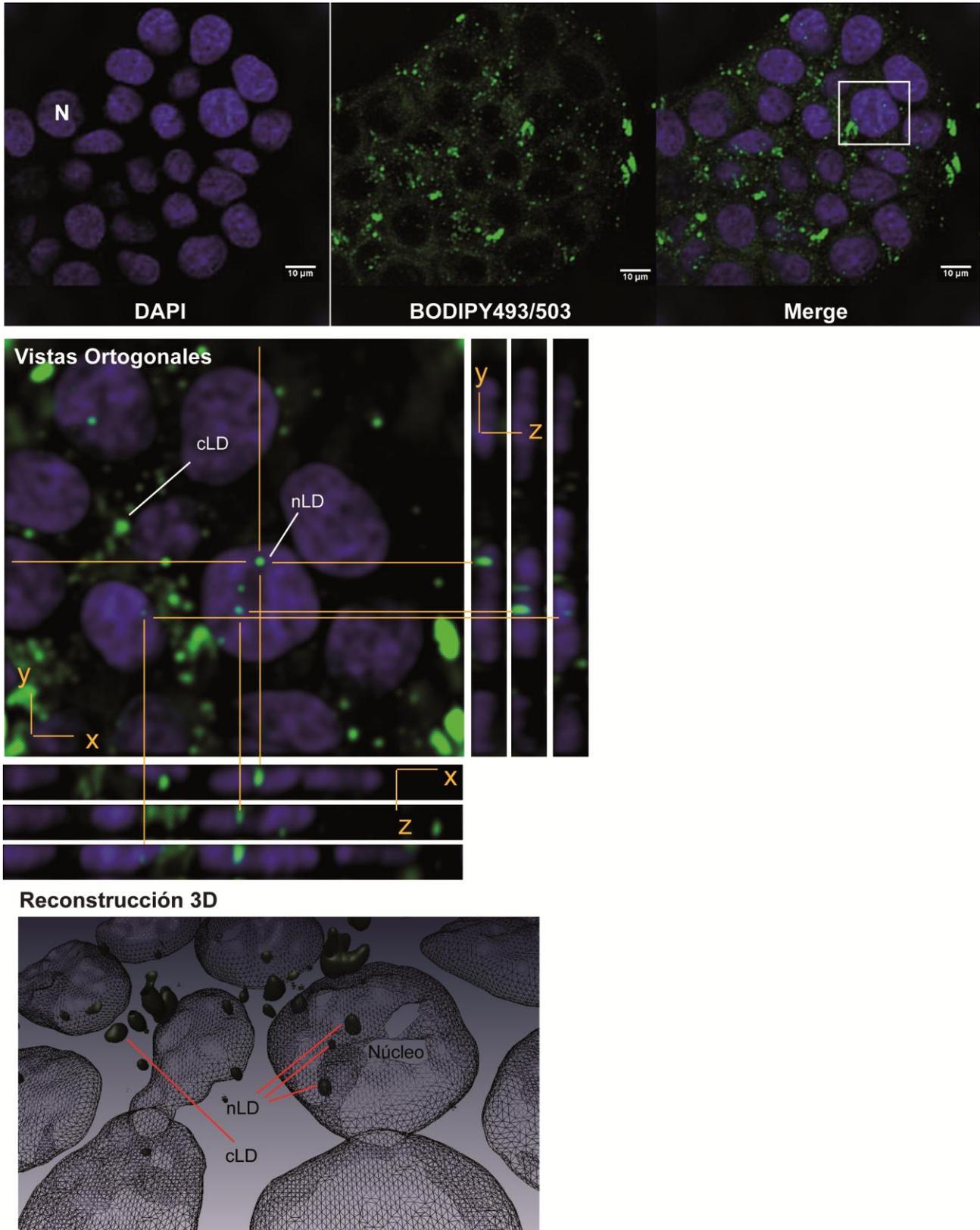
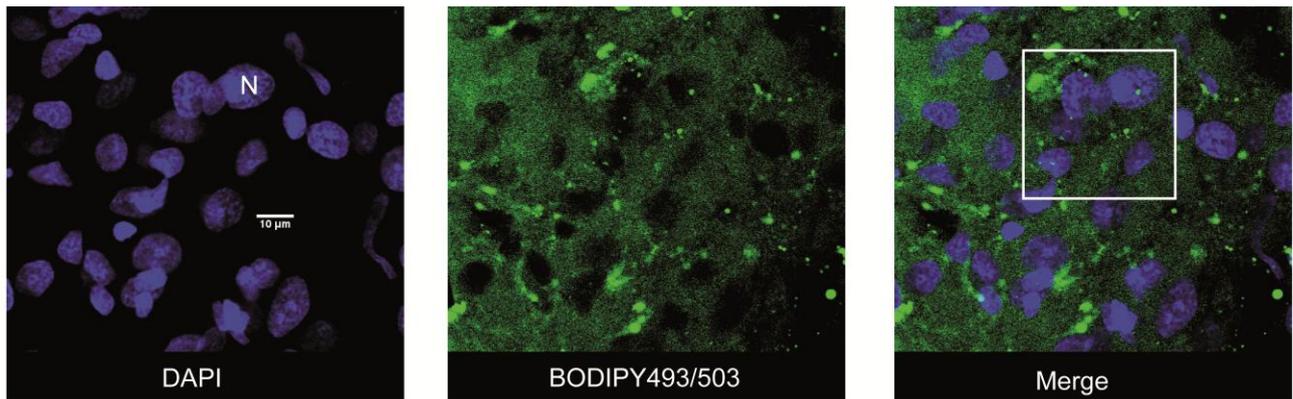


Figura 21. Análisis por microscopía confocal de nLD y cLD en células HepG2. En azul se observa la tinción con DAPI y en verde con BODIPY 493/503. A) Vista general del preparado; B) reconstrucción de los planos xz e yz en una zona seleccionada del preparado; C) Reconstrucción tridimensional. Se observan alrededor de 2-3 nLD por núcleo.



Merge (Vistas ortogonales)

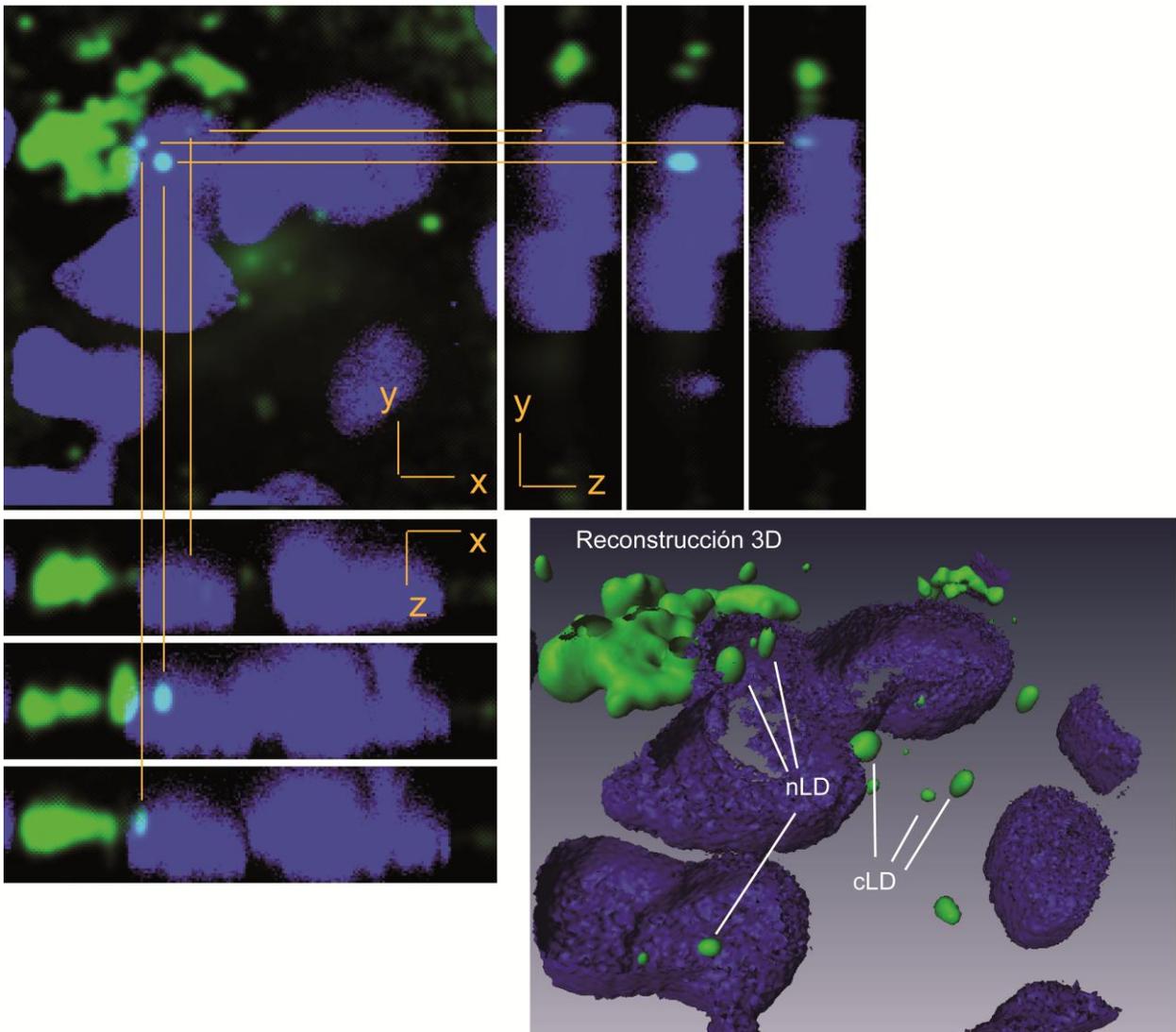


Figura 22. Análisis por microscopía confocal de nLD y cLD en hepatocitos de rata. En azul se observa la tinción con DAPI y en verde con BODIPY 493/503. A) vista general del preparado; B) reconstrucción de los planos xz e yz en una zona seleccionada del preparado; C) Reconstrucción tridimensional. Se observan alrededor de 2-3 nLD por núcleo.

Luego de analizar el tamaño de las LD en las poblaciones de cLD y nLD en células hepáticas (**Tabla 4**), se encontró que las nLD constituyen una población heterogénea sesgada positivamente y estos resultados confirman los encontrados previamente en núcleos aislados. Puede establecerse un rango de diámetros de nLD entre 0,57 y 0,90 μm (considerando las medianas) y como era de esperar, es comparable a los datos obtenidos previamente (**Tabla 3**) para las poblaciones de nLD observados en las muestras de núcleos y matrices aisladas. Si se analizan en forma comparativa las cLD y las nLD, se observa en la **tabla 4** que los máximos de las distribuciones de las cLD son mayores que los de las nLD, lo que implica que las LD citosólicas poseen un mayor tamaño que las nLD. Los mínimos observados en todas las poblaciones analizadas son comparables y esto se debe a que el límite de resolución del microscopio es fijo. Por lo tanto, no podemos descartar que dentro del núcleo y aún en el citosol haya poblaciones de LD cuyos tamaños sean menores a los observados y que debido a la limitación en el límite de resolución del microscopio no puedan ser observadas mediante la metodología utilizada.

Tabla 4. Caracterización morfológica de nLD en hepatocitos de rata y en células HepG2.

| | Hepatocitos de rata | | | | | |
|--------------------------|--|--|--|--|--|--|
| | BODIPY493/503 | | OsO ₄ (O) | | Rojo Sudán (S) | |
| | cLD | nLD | cLD | nLD | cLD | nLD |
| Diámetro | | | | | | |
| Media | 1,19 | 0,85 | 0,90 | 0,67 | 0,89 | 0,59 |
| Mediana (Q25 Q75) | 0,99 ^{a,h,p} (Q25=0,75 Q75=1,48) | 0,81 ^{c,l,p} (Q25=0,53 Q75=1,02) | 0,86 ^{b,j,q} (Q25=0,64 Q75=0,98) | 0,63 ^{c,m,r} (Q25=0,61 Q75=0,71) | 0,73 ^{b,k,s} (Q25=0,57 Q75=0,98) | 0,57 ^{c,n,t} (Q25=0,53 Q75=0,63) |
| Mín. | 0,45 | 0,46 | 0,46 | 0,52 | 0,43 | 0,46 |
| Máx. | 3,28 | 1,49 | 2,39 | 0,97 | 2,67 | 0,84 |
| nLD por Núcleo | | 1,9 ± 0,6 | | 1,0 ± 0,0 | | 1,4 ± 0,2 |
| | | | | | | |
| | Células HepG2 | | | | | |
| | BODIPY493/503 | | OsO ₄ (O) | | Rojo Sudán (S) | |
| | cLD | nLD | cLD | nLD | cLD | nLD |
| Diámetro | | | | | | |
| Media | 0,85 | 0,89 | 0,87 | 0,67 | 0,83 | 0,72 |
| Mediana (Q25 Q75) | 0,76 ^{d,i,u} (Q25=0,58 Q75=0,95) | 0,90 ^{f,l,v} (Q25=0,70 Q75=1,10) | 0,78 ^{e,j,w} (Q25=0,62 Q75=0,99) | 0,66 ^{f,g,m,x} (Q25=0,54 Q75=0,75) | 0,74 ^{d,k,y} (Q25=0,58 Q75=0,93) | 0,67 ^{g,o,y} (Q25=0,58 Q75=0,86) |
| Mín. | 0,30 | 0,46 | 0,45 | 0,52 | 0,13 | 0,45 |
| Máx. | 2,85 | 1,35 | 2,56 | 0,86 | 3,67 | 1,20 |
| nLD por Núcleo | | 2,4 ± 0,3 | | 1,8 ± 0,2 | | 2,1 ± 0,2 |

Se midieron los diámetros de las diferentes gotas lipídicas. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el test de Kruskal-Wallis, las mismas letras indican que no hay diferencias significativas con $p < 0,05$. Abreviaturas: O, OsO₄; S, Rojo Sudán; Q25, primer cuartil; Q75, tercer cuartil; Mín, mínimo; y Máx, máximo. Se analizaron entre 3 y 10 imágenes representativas conteniendo alrededor de 15 células por condición.

En conclusión, las nLD pueden ser visualizadas dentro del núcleo previa coloración como estructuras esféricas con un patrón aleatorio de distribución.

Representan un dominio nuclear muy pequeño.

Las nLD poseen menor tamaño que las cLD, se encuentran en menor número que éstas y se observan en núcleos y matrices aisladas y en hepatocitos y en células HepG2.

4.II.2. Aislamiento de nLD de núcleos celulares de hígado de rata

Las nLD se aislaron de núcleos enteros adaptando el protocolo standard de aislamiento de las cLD que se basa en la separación de las mismas mediante un gradiente de sacarosa [4]. El procedimiento consta de una homogenización de la muestra seguido de una separación por centrifugación en gradiente de sacarosa basada en las diferencias de flotación que poseen las poblaciones de gotas con diferentes tamaños. Como control de la técnica implementada, se aislaron en forma paralela cLD a partir de homogenado de hígado de rata. Como se observa en la **figura 22**, en la muestra de homogenado de hígado se separan 6 bandas de diferente densidad. De acuerdo a Ontko [4] cada banda posee una composición característica tanto lipídica como proteica; estas bandas además poseen diferencias macroscópicas apreciables entre ellas (particulado) y coloración (grisácea, blanca, rojiza).

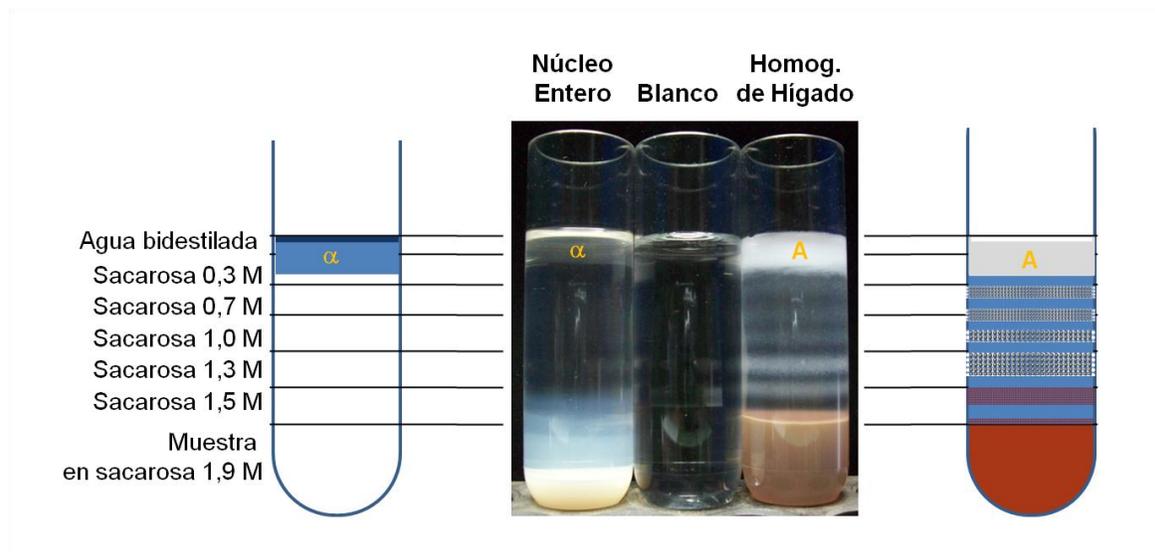


Figura 23. Aislamiento de gotas lipídicas. En la parte central se observa una foto de los tubos luego de 30 minutos de centrifugación del gradiente discontinuo de sacarosa cargado con muestras de núcleo entero, un control sin muestra y el homogenado de hígado. A ambos lados de las fotos se presentan esquemas de tubos con la ubicación de las bandas observadas en el gradiente.

La sonicación fue la técnica más apropiada para lograr un mayor rendimiento de nLD ya que utilizando un homogenizador de tejidos vidrio-vidrio o vidrio teflón la banda α era muy tenue. Luego de la centrifugación se observó una sola banda clara y blanca en la parte superior del tubo (**Figura 23**) análoga a la banda A del homogenado de hígado. A pesar de haber aislado una sola banda, no podemos descartar la posibilidad de la existencia de otras poblaciones de nLD en el núcleo, y debido a la baja concentración de sus componentes no sería posible observarlas ni cuantificarlas mediante este procedimiento.

La banda nuclear α y la citosólica A se analizaron por MET utilizando tinción negativa con ácido fosfotúngstico debido a la imposibilidad de sedimentar la muestra por su baja densidad. En la **figura 24** se observan agrupaciones de estructuras esféricas con diámetros que van desde los 30 a los 80 nm para ambas muestras.

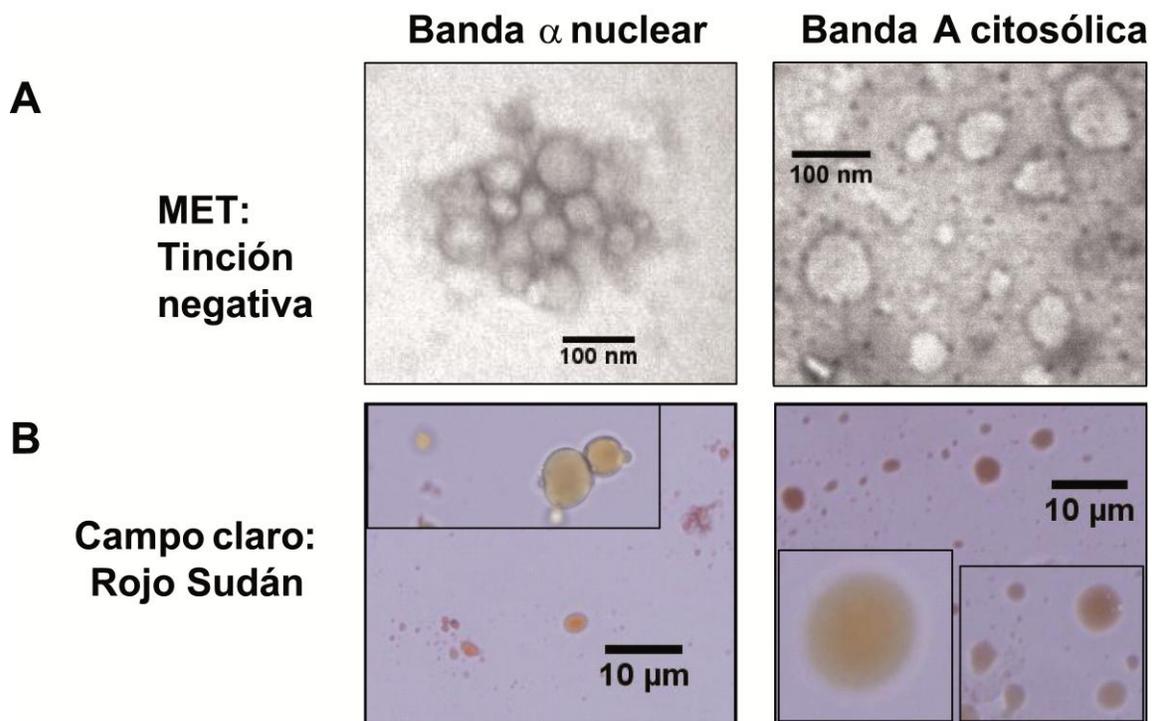


Figura 24. Análisis microscópico de LD aisladas de núcleo (nLD) y de homogenado de hígado (cLD). A) Tinción negativa con ácido fosfotúngstico (Microscopía electrónica de transmisión); y B) Tinción con Rojo Sudán (Microscopía óptica, campo claro).

Para corroborar que las estructuras observadas por MET corresponden a gotas lipídicas, las muestras se analizaron por tinción con Rojo Sudán y se observaron por microscopía de campo claro. Como se ve en la **figura 24** las estructuras esféricas son positivas a la tinción con Rojo Sudán y con diámetros comprendidos entre los 0,5 y los 27 μm . Se observan fenómenos de agrupación (“clustering”) y fusión de LD aisladas en las bandas, lo que explica las diferencias observadas en los diámetros de las mismas respecto de las LD en las estructuras enteras (Ej.: núcleos, matrices nucleares, hepatocitos y células HepG2), donde no se observaron estos fenómenos ya que estas muestras los núcleos conservan sus respectivas estructuras que protegen a las LD de estos eventos. En este sentido está descrito que los alcoholes en los que se disuelven los colorantes serían los responsables de modificaciones en el número y el tamaño de las cLD [5].

Las nLD se pueden aislar mediante centrifugación en gradiente de sacarosa.

4.II.3. Composición de las Gotas lipídicas nucleares

Para determinar la composición lipídica de las nLD, los lípidos de la banda α se extrajeron y separaron por cromatografía en capa delgada (TLC) junto con standards de lípidos (Figura 25). En la muestra analizada se encontraron TAG, C, CE y una baja proporción de FA y LP (GPL + SP). Las distintas clases lipídicas y el contenido proteico de las bandas nuclear α y citosólica A, se analizaron cuantitativamente y los resultados se presentan en la tabla 5.

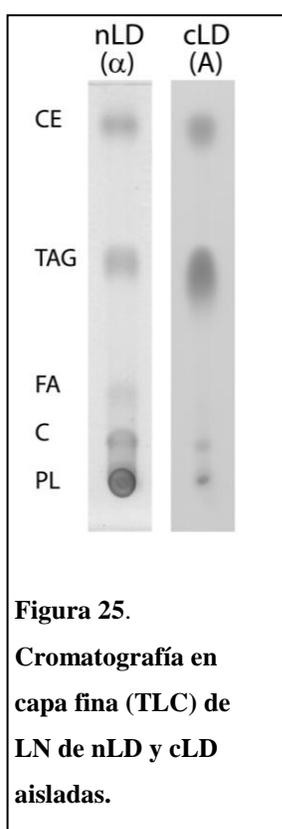


Tabla 5A. Composición de gotas lipídicas nucleares y citosólicas

| Composición | nLD (α) | | | cLD (A) | | |
|-------------------------|---------------------------|-------------|--------|---------------------------|-------------|-------|
| | $\mu\text{g/g de hígado}$ | R (%) | | $\mu\text{g/g de hígado}$ | R (%) | |
| | | %* | H | | %* | H |
| Proteínas | 0.8 ± 0.1 (12) | 62.5 | 0.0004 | 545 ± 110 (7) | 22.1 | 0.29 |
| Lípidos § | 0.6 ± 0.09 | 37.5 | 0.002 | 2326 ± 204 | 77.9 | 9.3 |
| Clases lipídicas | | | | | | |
| Lípidos Polares | nmol/g de hígado | | | nmol/g de hígado | | |
| GP + SP | 0.09 ± 0.02 (7) | 5.5 | 0.0004 | 14.5 ± 1.8 (8) | 0.5 | 0.07 |
| Lípidos Neutros | | 32.0 | | 77.3 | | |
| TAG | 0.12 ± 0.01 (5) | 7.8 | 0.006 | 2044 ± 183 (6) | 71.6 | 103.4 |
| C | 0.17 ± 0.04 (6) | 11.7 | 0.02 | 108.4 ± 5.6 (3) | 1.7 | 4.5 |
| CE | 0.24 ± 0.02 (5) | 12.5 | 0.03 | 159.5 ± 13.5 (5) | 4.1 | 16.9 |

Para los cálculos solo se consideraron lípidos y proteínas. Los resultados representan la media de al menos 3 experimentos \pm SEM; el número de determinaciones se encuentra entre paréntesis; cada determinación corresponden a un pool de 10 a 12 hígados. (*) Los datos en porcentaje se calcularon a partir de los datos en μg por g de hígado-1. H: Homogenado de hígado; nLD: gotas lipídicas nucleares; cLD: gotas lipídicas citosólicas; GP: glicerofosfolípidos; SP: esfingolípidos; TAG: triacilgliceridos; C: colesterol; CE: éster de colesterol; y R: recuperación. § Lípidos = Lípidos Polares + Lípidos Neutros.

Las nLD se componen de un 38% de lípidos y un 62% de proteínas; los lípidos y proteínas de éstas representan tan solo el 0,002% de los respectivos componentes celulares. Los lípidos de las nLD están formados en un 85% por LN y un 15% por LP (Tabla 5). Los LP se cuantificaron por su contenido en fósforo, y no fue posible separar las subclases de LP debido al bajo contenido de las mismas.

Tabla 5B. Distribución de los componentes entre la monocapa y el core de las LD

| | nLD | cLD |
|-----------------|-----------|-----------|
| Monocapa | 80 | 24 |
| Proteínas | 78 | 91 |
| LP | 7 | 2 |
| C | 15 | 7 |
| Core | 20 | 76 |
| TAG | 38 | 94 |
| CE | 62 | 6 |

Los datos se calcularon a partir de los resultados de la Tabla 5A expresados como $\mu\text{g. g hígado}^{-1}$, considerando que la monocapa está compuesta por proteínas, lípidos polares y C, y el core

Las nLD poseen una composición particular de LN rica en CE (45%), C (32%) y TAG (23%) (Tabla 5A). Esta composición es muy diferente de la observada en homogenado total de hígado, núcleo entero, matriz nuclear y la de las cLD.

Como era de esperar, la composición de las cLD (banda A) concuerda con los datos de bibliografía [4] ya que están compuestas por 78% de lípidos y 22% de proteínas; entre los lípidos el 99,4% son LN y solo un 0,6% son LP (Tabla 5A); en particular, el perfil de LN es el siguiente: TAG (88%), C (7%) y CE (5%). Ontko además de analizar la composición de la banda A del gradiente de sacarosa (Figura 23), analizó la composición de las restantes bandas que corresponden a todas las poblaciones de cLD aisladas por ultracentrifugación, y la composición de todas las poblaciones de cLD fue diferente a la de las nLD (banda α).

En los hepatocitos los TAG se localizan mayoritariamente en las cLD (recuperación de aproximadamente 100%), mientras que los TAG de las nLD constituyen un pool cuantitativamente minoritario (recuperación de 0,006), pero con una ubicación celular estratégica.

Es interesante resaltar que la organización de los componentes en la monocapa de las nLD sería similar a la de las cLD, ya que ambas monocapas están constituidas por un 80 – 90 % de proteínas, un 20 – 10% de lípidos (lípidos polares: 20 – 30% y colesterol: 70 – 80%), (Tabla 5B). Como ya se demostrara en la tabla 4, las nLD poseen un menor tamaño (menor mediata) que las cLD, y este hecho explica porqué las nLD poseen mayor proporción de monocapa que las cLD ya que se necesita una mayor área para poder recubrir un core hidrofóbico más chico.

Tabla 6. Composición de ácidos grasos de TAG de gotas lipídicas nucleares y citosólicas de células de hígado de rata

| Ácido graso | TAG | | | |
|--------------------|------------------|---|-------------|-----|
| | nLD (α) | | cLD (A) | |
| 14:0 | 0,7 ± 0,3 | d | 1,07 ± 0,05 | g,h |
| 15:0 | 1,0 ± 0,5 | d | 0,63 ± 0,05 | g,h |
| 16:0 | 19,4 ± 0,4 | b | 25,1 ± 0,5 | f |
| 16:1n-9 | 2,1 ± 0,1 | d | 1,06 ± 0,04 | g,h |
| 16:1n-7 | 1,6 ± 0,2 | d | 2,3 ± 0,2 | c |
| 18:0 | 8,8 ± 0,8 | c | 2,6 ± 0,3 | c |
| 18:1n-9 | 29,5 ± 0,5 | a | 29,6 ± 0,6 | e |
| 18:1n-7 | 3,4 ± 0,3 | d | 2,6 ± 0,2 | c |
| 18:2n-6 | 25,6 ± 0,6 | a | 28,6 ± 0,4 | e |
| 18:3n-3 | 2,0 ± 0,5 | d | 1,6 ± 0,2 | g,h |
| 20:4n-6 | 2,7 ± 1,1 | d | 1,7 ± 0,2 | g,h |
| 22:5n-3 | 2,5 ± 1,0 | d | 1,5 ± 0,3 | g,h |
| 22:6n-3 | 1,9 ± 1,1 | d | 2,5 ± 0,5 | g |
| Σ Saturated | 29,9 ± 2,0 | | 29,4 ± 0,9 | |
| Σ MUFA | 36,6 ± 1,1 | | 35,6 ± 1,0 | |
| Σ n-7 | 5,0 ± 0,5 | | 4,9 ± 0,4 | |
| Σ n-9 | 31,6 ± 0,6 | | 30,7 ± 0,6 | |
| Σ PUFA | 34,7 ± 4,3 | | 35,9 ± 2,0 | |
| Σ n-3 | 6,4 ± 2,6 | | 5,6 ± 1,0 | |
| Σ n-6 | 28,3 ± 1,7 | | 30,3 ± 0,6 | |

Los TAG extraídos de las placas de cromatografía en capa delgada (TLC) (Fig. 25) se transmetilaron y analizaron por cromatografía gas-líquido. Los valores están expresados como porcentaje en peso \pm SEM de 3 y 6 determinaciones independientes para gotas lipídicas nucleares (nLD) y citosólicas (cLD), respectivamente. Los datos se analizaron por ANAVA con comparaciones de medias (HSD Tukey's test). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ambas gotas lipídicas. MUFA: ácidos grasos moinsaturados; y PUFA: ácidos grasos polinosaturados.

Como era de esperar, la composición de FA esterificados en los TAG de las nLD es comparable a la de los TAG determinada previamente en el núcleo aislado [6]. En las dos muestras analizadas (bandas α y A) los TAG están compuestos por porcentajes equivalentes de FA saturados (30-37%), FA monoinsaturados (MUFA) y FA polinosaturados (PUFA). Los MUFA y PUFA de las series n-9 (30-32%) y n-6 (26-33%), respectivamente, son los nosaturados más abundantes. Los principales FA esterificados a TAG son: $18:1n-9 = 18:2n-6 > 16:0$.

Las nLD son estructuras supramoleculares nucleares compuestas principalmente por CE, C, TAG y proteínas, con una baja proporción de lípidos polares.

4.II.4.Discusión

Hipótesis: *Los LN nucleares se organizan en gotas lipídicas nucleares (nLD) similares a las citosólicas, formadas por un core hidrofóbico y rodeados por una monocapa lipoproteica.*

Las nLD constituyen un nuevo dominio nuclear con características propias y diferentes a otros dominios ya descritos en el núcleo como son los CN (Speckles o Paraspeckles, Nucléolo) y la lámina nuclear, ya que las nLD son la primera estructura intranuclear delimitada por una monocapa lipoproteica (Figura 27).

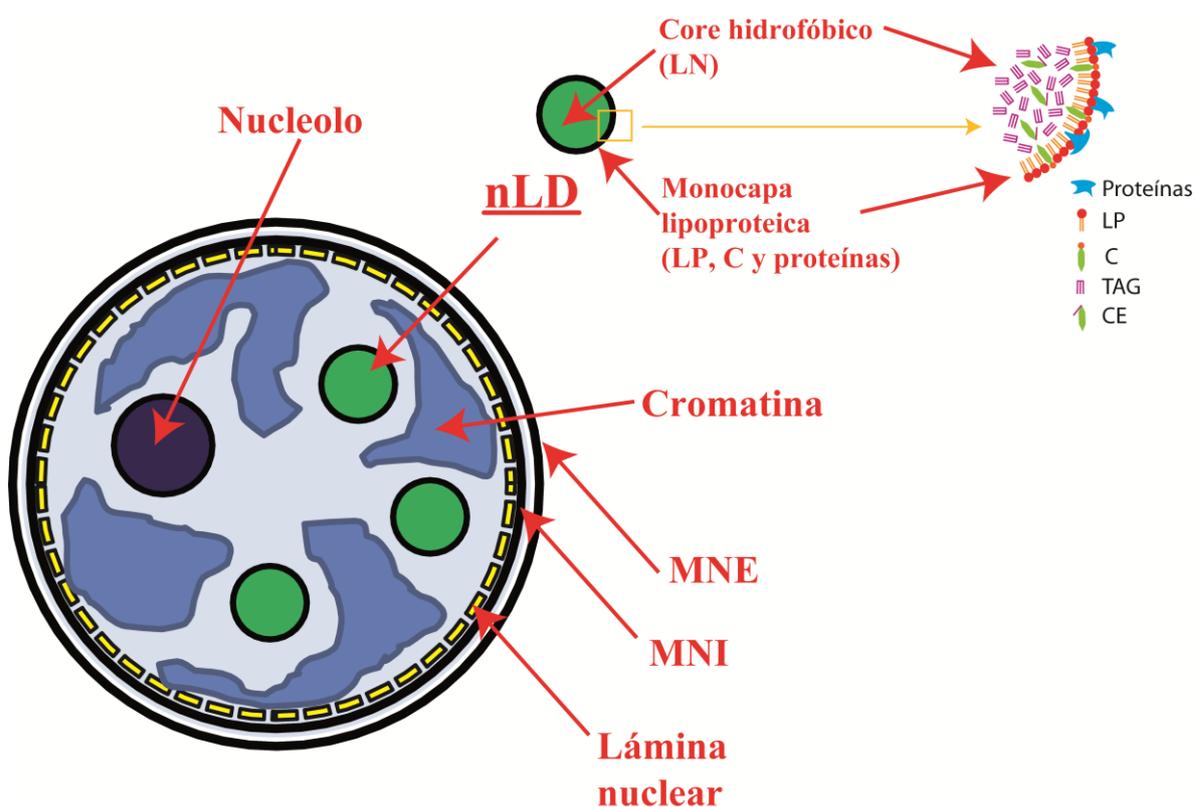


Figura 26. Esquema estructural del núcleo y de las nLD. Representación esquemática del núcleo con los componentes de la envoltura nuclear (Lámina nuclear, Membrana Nuclear Interna (MNI) y externa (MNE) y de las nLD con sus componentes químicos.

El análisis comparativo de estas nLD con las cLD demostró diferencias fundamentales en cuanto al tamaño (son más chicas que las citosólicas) y a composición lipídica (poseen diferente proporción de LN) y proteica (no poseen Plin1 ni ACAT1); no obstante la composición de FA de los TAG de ambos tipos de LD fue similar.

Proponemos que esta organización de los LN nucleares en nLD no es exclusiva de hepatocitos sino que es común a otros tipos celulares, puesto que hemos encontrado esterificación de 20:4n-6 en TAG de núcleos aislados de riñón de rata [7]; este hecho sería una primera evidencia de la existencia de estos LN en núcleos de riñón. No se puede descartar la presencia de este tipo de estructuras en otros órganos y / o especies.

A partir de la existencia y caracterización de las nLD hemos demostrado que los TAG y gran parte del CE nucleares se localizan en las nLD, y ahora surge la pregunta ¿los LP de la matriz se localizan exclusivamente en la monocapa de las nLD?

La relación LP a TAG en las nLD es de 0,75 (datos expresados como nmol por gramo de hígado), y dado que el contenido de TAG de la matriz es de 1,7 nmol, entonces se necesita alrededor de 1,3 nmol de LP de la matriz para formar la monocapa de las nLD, como el contenido total de LP de la matriz es de 4,3 nmol, un remanente de 3 nmol de LP deben estar formando parte de otros dominios lipídicos endonucleares, y estos resultados son concordantes con trabajos previos en los cuales se estudió la asociación entre LP y cromatina [8-10].

A la luz de estos hallazgos surgen nuevas preguntas, tales como:

¿Cómo se originan las nLD?

La génesis de las nLD podría desarrollarse en el núcleo o en el citosol.

❖ En el citosol: las LD se ensamblarían en el citosol con componentes provenientes de la síntesis *de novo* y / o de procesos de hidrólisis, o del exterior celular que incluiría los aportados por la dieta (**Figura 26**).

- Vías de ingreso de las nLD al núcleo:
 - En interfase se incorporaría a través del complejo del poro nuclear.
 - En telofase al finalizar la mitosis y rearmarse la membrana nuclear, las cLD quedarían encerradas dentro de la matriz nuclear y luego su composición se modificaría con las características diferenciales de las nLD.

❖ En el núcleo: las nLD se ensamblarían en el núcleo a partir de componentes:

- Sintetizados en el citosol y luego importados al núcleo, de componentes parcialmente ensamblados en el citosol que completarían su maduración dentro del núcleo.
- Síntesis *de novo* en el núcleo. Esto podría llevarse a cabo en:
 - Dominios específicos dispersos en la matriz nuclear.
 - En asociación con las invaginaciones de la MNI.
 - En asociación con la MNE que posee ribosomas y continuidad con el RE.

Ambos mecanismos podrían no ser excluyentes uno del otro, y las nLD incorporadas al núcleo podrían sufrir modificaciones por ensamblado (citosólico o nuclear), incorporando o liberando al entorno lípidos y proteínas.

En este momento no es posible determinar el origen del CE nuclear almacenado en las nLD, pero de existir esterificación del C dentro del núcleo se realizaría a través de una isoforma diferente a ACAT-1, dado que esta enzima no está presente en el núcleo.

¿Qué funciones desempeñan las nLD en el núcleo?

Las nLD estarían involucradas en la homeostasis lipídica y en el interior nuclear servirían como un sistema buffer capaz de aportar o incorporar en forma rápida proteínas y lípidos involucrados en vías de señalización, aportando ligandos (FA) para los factores de transcripción, y sustratos y enzimas del metabolismo lipídico que se desarrolla dentro del núcleo.

Las nLD no serían estructuras inmóviles nucleares sino que se podrían desplazar dentro del núcleo utilizando actina y miosina, puesto que éstas moléculas han sido descritas en núcleo [11] y actuarían como un sistema de delivery de lípidos y de proteínas dentro del mismo.

Dadas las características de las nLD, éstas brindan en el interior nuclear un sitio adecuado donde pueden reclutarse moléculas hidrofóbicas endonucleares tales como proteínas involucradas en distintos procesos nucleares.

Teniendo en cuenta que las cLD están implicadas en forma directa o indirecta en diferentes procesos de la salud humana (infecciones, procesos patológicos y toxicológicos) las nLD también podrían tener implicancias similares a las que poseen las cLD. A continuación se enumeran algunos de dichos procesos:

- 1) Infecciones:** Las cLD están implicadas en el proceso de infección de los virus de Hepatitis C [12-14] y Dengue [15,16]. En estos procesos ciertas

proteínas virales se acumulan en las LD o en la zona del RE de la que se generan las LD.

En infecciones con *Micobacterium tuberculosis* y *leprae* y con *Chlamydia pneumoniae* los macrófagos infectados acumulan gran cantidad de TAG en sus LD [17].

2) Procesos patológicos:

Cáncer: el núcleo de las células cancerosas está muy modificado, observándose numerosas y amplias invaginaciones; habría que determinar qué ocurre con las nLD en esos casos [18-20].

Síndrome metabólico: se ha encontrado que la falta de proteínas de la familia PAT²

provoca insulinoresistencia y afecta múltiples pasos en la vía de señalización de la insulina [21].

Cirrosis: el aumento en la síntesis de FA en los hígados de enfermos alcohólicos sumado a la disminución en la capacidad del hígado de oxidar estos compuestos puede llevar a una síntesis aumentada de TAG y a la acumulación de éstos en LD. Se encontró en ratas alimentadas con etanol un aumento en la expresión de ADRP¹ en asociación con hepatoesteatosis [22].

3) Toxicológica: los efectos de los contaminantes en los seres vivos están a menudo asociados a un desbalance en el metabolismo de FA y una

² Las proteínas de la familia de las PAT son las principales proteínas marcadoras de LD. Éstas son: Plin1 (Perilipina), Plin2 (ADRP o Adipofilina) y Plin3 (TIP47).

acumulación de LN en forma de cLD que luego son incorporadas en el sistema lisosomal. Esta acumulación se ha observado en las glándulas digestivas de almejas y en hepatocitos de pescados y ha servido como buen biomarcador de stress en estas células [23]. Es posible que esta acumulación también ocurra a nivel nuclear en las nLD.

Es evidente que las nLD conforman una nueva área del conocimiento con vastas implicancias tanto en fisiología como en patología.

4.II.5. Bibliografía de la sección “4.II”

- [1] T Fujimoto, Y. Ohsaki, J. Cheng, M. Suzuki, Y. Shinohara, Lipid droplets: a classic organelle with new outfits, *Histochem. Cell Biol.* 130 (2008) pp. 263-279.
- [2] D L Spector and A.I. Lamond, Nuclear speckles, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3 (2011).
- [3] A H Fox and A.I. Lamond, Paraspeckles, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2 (2010) p.a000687.
- [4] J A Ontko, L.W. Perrin, L.S. Horne, Isolation of hepatocellular lipid droplets: the separation of distinct subpopulations, *J. Lipid Res.* 27 (1986) pp. 1097-1103.
- [5] D DiDonato and D.L. Brasaemle, Fixation methods for the study of lipid droplets by immunofluorescence microscopy, *J. Histochem. Cytochem.* 51 (2003) pp. 773-780.
- [6] S M Mate, R.R. Brenner, A. Ves-Losada, Phosphatidyl choline fatty acid remodeling in the hepatic cell nuclei, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 70 (2004) pp. 49-57.
- [7] S M Mate, J.P. Layerenza, A. Ves-Losada, Arachidonic acid pools of rat kidney cell nuclei, *Mol. Cell Biochem.* 345 (2010) pp. 259-270.
- [8] E Albi, M. Mersel, C. Leray, M.L. Tomassoni, M.P. Viola-Magni, Rat liver chromatin phospholipids, *Lipids* 29 (1994) pp. 715-719.
- [9] E Albi and M.V. Magni, The presence and the role of chromatin cholesterol in rat liver regeneration, *J. Hepatol.* 36 (2002) pp. 395-400.
- [10] E Albi and M.P. Viola Magni, The role of intranuclear lipids, *Biol. Cell* 96 (2004) pp. 657-667.
- [11] N Visa and P. Percipalle, Nuclear functions of actin, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2 (2010) p.a000620.
- [12] M Fukasawa, Cellular lipid droplets and hepatitis C virus life cycle, *Biol. Pharm. Bull.* 33 (2010) pp. 355-359.
- [13] K Moriishi, I. Shoji, Y. Mori, R. Suzuki, T. Suzuki, C. Kataoka, Y. Matsuura, Involvement of PA28gamma in the propagation of hepatitis C virus, *Hepatology* 52 (2010) pp. 411-420.
- [14] R Uzbekov and P. Roingeard, Nuclear lipid droplets identified by electron microscopy of serial sections, *BMC. Res. Notes* 6 (2013) p.386.
- [15] M M Samsa, J.A. Mondotte, N.G. Iglesias, I. Assuncao-Miranda, G. Barbosa-Lima, A.T. Da Poian, P.T. Bozza, A.V. Gamarnik, Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation, *PLoS. Pathog.* 5 (2009) p.e1000632.
- [16] I C Martins, F. Gomes-Neto, A.F. Faustino, F.A. Carvalho, F.A. Carneiro, P.T. Bozza, R. Mohana-Borges, M.A. Castanho, F.C. Almeida, N.C. Santos, A.T. Da Poian, The disordered N-terminal region of dengue virus capsid protein contains a lipid-droplet-binding motif, *Biochem. J.* 444 (2012) pp. 405-415.

- [17] M Stehr, A.A. Elamin, M. Singh, Cytosolic lipid inclusions formed during infection by viral and bacterial pathogens, *Microbes. Infect.* 14 (2012) pp. 1227-1237.
- [18] S Karasaki, Passage of cytoplasmic lipid into interphase nuclei in preneoplastic rat liver, *J. Ultrastruct. Res.* 42 (1973) pp. 463-478.
- [19] S Karasaki, An electron microscope study of intranuclear canaliculi in Novikoff hepatoma cells, *Cancer Res.* 30 (1970) pp. 1736-1742.
- [20] O Kawanami, V.J. Ferrans, J.D. Fulmer, R.G. Crystal, Nuclear inclusions in alveolar epithelium of patients with fibrotic lung disorders, *Am. J. Pathol.* 94 (1979) pp. 301-322.
- [21] M Bell, H. Wang, H. Chen, J.C. McLenithan, D.W. Gong, R.Z. Yang, D. Yu, S.K. Fried, M.J. Quon, C. Londos, C. Sztalryd, Consequences of lipid droplet coat protein downregulation in liver cells: abnormal lipid droplet metabolism and induction of insulin resistance, *Diabetes* 57 (2008) pp. 2037-2045.
- [22] K Rasineni and C.A. Casey, Molecular mechanism of alcoholic fatty liver, *Indian J. Pharmacol.* 44 (2012) pp. 299-303.
- [23] A Viarengo, D. Lowe, C. Bolognesi, E. Fabbri, A. Koehler, The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms, *Comp Biochem. Physiol C. Toxicol. Pharmacol.* 146 (2007) pp. 281-300.

4.III.Metabolismo nuclear de ácidos grasos

4.III.1.Objetivos 3

5. Determinar el proceso mediante el cual los FA citosólicos se internalizan, interaccionan y redistribuyen en los lípidos del núcleo en condiciones fisiológicas.
6. Elucidar el rol de la L-FABP en estos procesos.

Hipótesis planteada

La L-FABP favorece la movilización de FA nucleares. Los FA libres o unidos a L-FABP llegan al núcleo, se incorporan y esterifican en los diferentes pools lipídicos nucleares y son movilizados hacia el exterior nuclear. En el hígado, la esterificación nuclear de FA es acil-CoA dependiente. Dentro del núcleo los FA se desplazan entre los diferentes pools lipídicos, sitios activos de enzimas, factores de transcripción, receptores nucleares, etc, como FA y / o FA:L-FABP.

4.III.1.1. Incorporación de ácidos grasos exógenos al núcleo celular

Se evaluó la incorporación de FA saturados y no saturados en el núcleo. Se utilizaron los FA 16:0, 18:0, 18:1n-9, 18:2n-6 y 20:4n-6 marcados radioactivamente como [1-¹⁴C]FA, ya que son los FA mayoritarios del núcleo (**Tabla 2**). Como se observa en la **figura 27**, la radiactividad se incorporó en forma mayoritaria en los núcleos (80-90%) y solo un 10–20% permaneció en el medio de incubación (MI). Sólo en el caso del 18:2n-6 la incorporación en el núcleo fue alrededor del 50%.

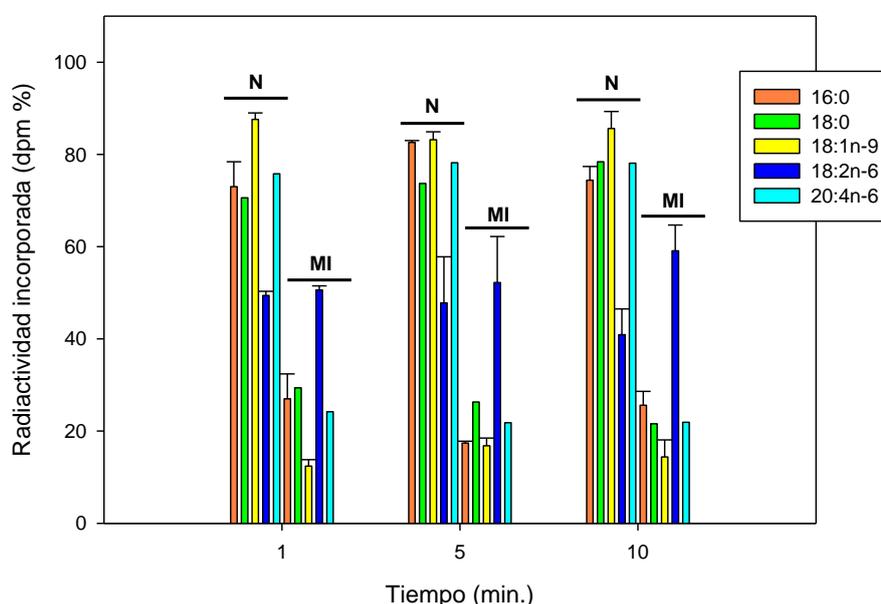


Figura 27. Incorporación de la radiactividad en el núcleo. Las barras representan el porcentaje de radiactividad total incorporada en núcleo (N) respecto de la que permaneció en el medio de incubación (MI) para cada FA ensayado.

El siguiente gráfico (**Figura 28**) muestra los perfiles de distribución de la radiactividad de los distintos FA en las fases clorofórmica (c) y acuosa (a) de la fracción nuclear (N) luego de la extracción con Folch. Se observa que en los núcleos la mayor proporción de la radiactividad se incorporó en los lípidos (Nc) mientras que menos de un 10 % se incorporó en componentes solubles en el medio acuoso (Na). En los

componentes de Na están incluidos los respectivos acil-CoA de los [1-¹⁴C]FA ensayados. La incorporación de los cinco FA ensayados en los lípidos nucleares fue rápida y se saturó a tiempos cortos.

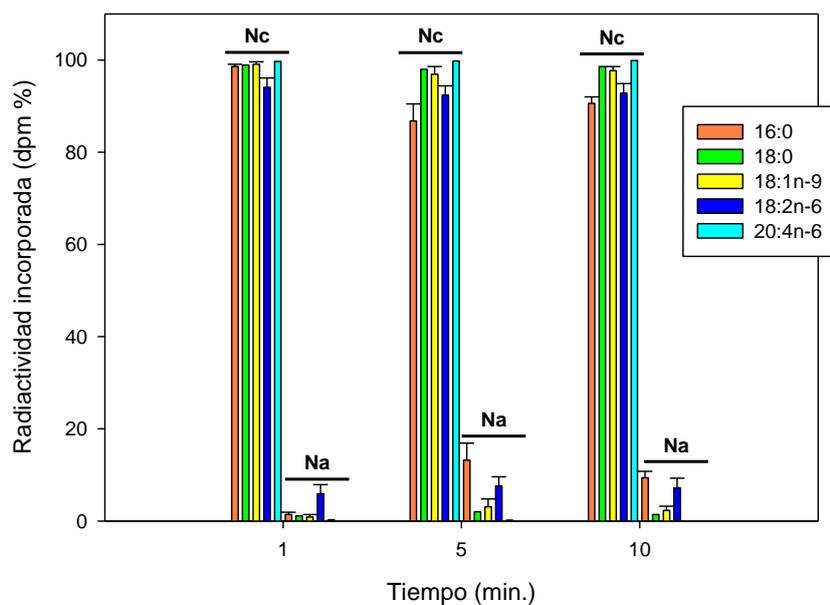


Figura 28. Distribución de la radiactividad nuclear entre la fase clorofórmica y fase acuosa. Las barras representan el porcentaje de la radiactividad incorporada (N de la [figura 27](#)) en las fases clorofórmica (Nc) y acuosa (Na) de la fracción nuclear luego de la extracción de Folch.

4.III.1.2.Mecanismos de esterificación de ácidos grasos en los lípidos del núcleo

En el hígado los procesos de esterificación de FA requieren de la activación de los mismos como acil-CoAs [1]. Resultados previos del laboratorio [2-4] demostraron que la esterificación de los ácidos 18:0, 20:3n-6 y 20:4n-6 en los lípidos nucleares y endonucleares hepáticos es un proceso acil-CoA dependiente en el que participa la *acil-CoA sintetasa* (ACS) y cuyos cofactores son el ATP y la CoA. A partir de estos resultados, el siguiente objetivo fue determinar si este proceso era general y no se restringía solo a los FA mencionados.

A continuación (**Tabla 7**) se muestra que los FA 16:0, 18:1n-9 y 18:2n-6 al igual que los estudiados previamente en el laboratorio (18:0, 20:3n-6 y 20:4n-6), sólo se esterifican en los lípidos nucleares en presencia de los cofactores de la ACS; en ausencia de estos cofactores los FA exógenos si bien se incorporan en el núcleo, permanecen como FA libre (100%). Por lo tanto, los FA exógenos se incorporan al núcleo por un mecanismo acil-CoA independiente.

Tabla 7. Porcentaje de la radiactividad total (Nc) incorporada como FA libre (no esterificada) luego de 10 min de incubación.

| [1- ¹⁴ C] FA | Con ATP y CoA | Sin ATP y CoA |
|-------------------------|---------------|---------------|
| 16:0 | 38,4 % | 100 % |
| 18:0 * | 46,0 % | 100 % |
| 18:1n-9 | 31,1 % | 100 % |
| 18:2n-6 | 24,1 % | 100 % |
| 20:3n-6 * | 32,0 % | 100 % |
| 20:4n-6 * | 30,0 % | 100 % |

Con ATP y CoA los FA además de incorporarse como FA se esterifican en LP, TAG y CE y de ese modo se completa el 100%. * Datos previos del laboratorio [4].

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que:

Los FA saturados y nosaturados exógenos se incorporan como FA y se esterifican en los lípidos nucleares.

Los FA se incorporan por un mecanismo acil-CoA independiente.

Los FA se esterifican en los lípidos nucleares por un mecanismo acil-CoA dependiente.

4.III.1.3. Incorporación y esterificación de ácidos grasos en las clases lipídicas nucleares

Sabiendo que los FA estudiados se esterifican en los lípidos nucleares mediante un proceso acil-CoA dependiente, el siguiente objetivo fue elucidar la cinética de incorporación y esterificación de los mismos en las diferentes clases de LN y LP del núcleo, como se muestra en la **figura 29**.

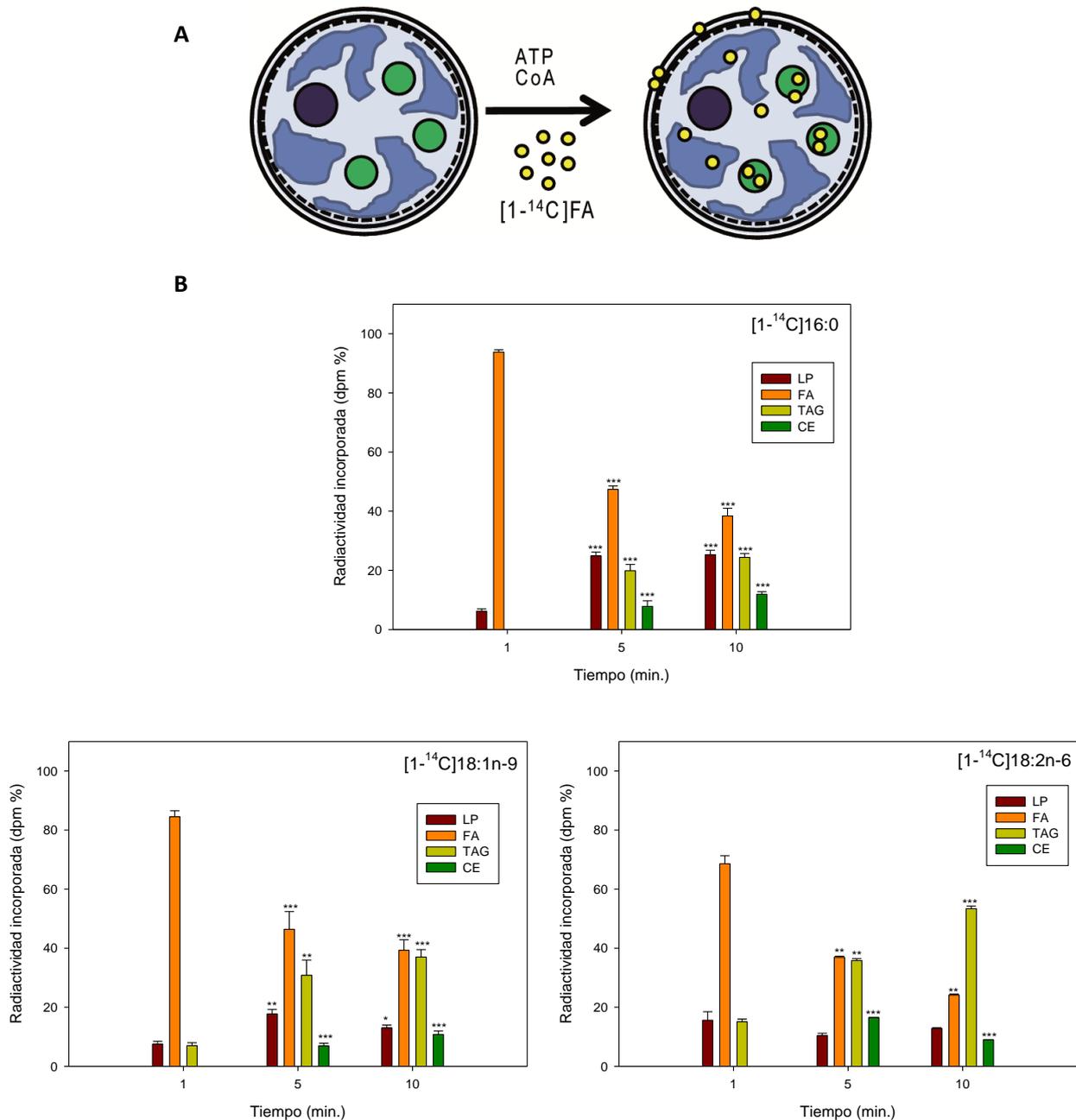


Figura 29. Incorporación de los FA [1-¹⁴C]16:0, [1-¹⁴C]18:1n-9 y [1-¹⁴C]18:2n-6 en los lípidos nucleares en función del tiempo. A: Esquema del protocolo de incubación de núcleos *in vitro*. B: perfiles de distribución de la radiactividad en las clases lipídicas para cada FA ensayado (círculos amarillos). Los resultados corresponden a las medias ± desvío standard de la media (SEM) de al menos 5 experimentos independientes. Dentro de una misma clase lipídica los resultados se compararon respecto del primer tiempo (1 min) mediante el test de Student con: * 0,05 > p > 0,01; ** 0,01 > p > 0,001; *** p < 0,001.

Los datos de incorporación de radioactividad como FA se expresan sólo como radiactividad % y no actividad específica, como en el caso de las restantes clases lipídicas, debido a que el pool nuclear de FA es muy chico y por tanto difícil de cuantificar.

Los FA se incorporan rápidamente como FA libre, luego se movilizan y esterifican en los pools de LN y LP mediante un proceso acil-CoA dependiente, con particularidades según el FA y la clase lipídica. En todos los casos disminuye la radiactividad como FA libre y aumenta como FA esterificado en función del tiempo de incubación.

En esta sección se incorporan los resultados obtenidos en el laboratorio previamente [4] con los FA 18:0 y 20:4n-6 a efectos de poder realizar un análisis comparativo.

El 18:0 y el 20:4n-6 son los FA que se esterifican más activamente en LP respecto de los LN: TAG y CE (AE), mientras que los FA 16:0, 18:1n-9 y el 18:2n-6 se esterificaron más activamente en LN: TAG y CE que en LP. En particular, la esterificación de los FA exógenos 18:0 y 20:4n-6 en CE no fue detectable en las condiciones experimentales ensayadas.

La especificidad con que los FA se esterifican en las diferentes clases lipídicas sería la responsable de la composición final de las mismas, ya que como se presenta en la [tabla 8](#), los FA que se esterifican con mayor actividad específica son a su vez los mayoritarios de esa misma clase lipídica: 18:0 y 20:4n-6 en LP; y 16:0, 18:1n-9 y el 18:2n-6 en LN ([Tabla 2](#)).

Teniendo en cuenta que estos ensayos se realizaron utilizando núcleos aislados de los demás componentes celulares, podemos concluir que la composición de las especies moleculares de los LN nucleares está regulada por el propio núcleo a través de la especificidad de las enzimas involucradas en dichos procesos.

Tabla 8. Incorporación de los FA [1-¹⁴C]16:0, [1-¹⁴C]18:1n-9, [1-¹⁴C]18:2n-6, [1-¹⁴C]18:0 y [1-¹⁴C]20:4n-6 en los lípidos nucleares.**16:0**

| Tiempo (min) | % (dpm) | | | [1- ¹⁴ C]FA esterificado/clase lipídica (pmol/ nmol) | | |
|------------------------|------------|---------------|---------------|---|---------------|---------------|
| | 1 | 5 | 10 | 1 | 5 | 10 |
| FA Libre | 93,8 ± 0,8 | 47,4 ± 1,1*** | 38,4 ± 2,6*** | -- | -- | -- |
| FA Esterificado | 6,2 ± 0,8 | 52,6 ± 5,3*** | 61,6 ± 3,7*** | -- | -- | -- |
| LP | 6,2 ± 0,8 | 24,9 ± 1,3*** | 25,3 ± 1,5*** | 0,12 ± 0,03 | 0,51 ± 0,13* | 0,42 ± 0,04** |
| LN | 0,0 ± 0,0 | 27,7 ± 4,0*** | 36,3 ± 2,2*** | 0,0 ± 0,0 | 27,7 ± 4,1 | 29,0 ± 3,3 |
| TAG | 0,0 ± 0,0 | 19,9 ± 2,1*** | 24,4 ± 1,3*** | 0,0 ± 0,0 | 20,9 ± 1,8*** | 19,7 ± 2,1*** |
| CE | 0,0 ± 0,0 | 7,8 ± 1,9*** | 11,9 ± 0,9*** | 0,0 ± 0,0 | 6,8 ± 2,3** | 9,3 ± 1,2*** |

Tabla 8. (cont.)

18:1n-9

| Tiempo (min) | % (dpm) | | | [1- ¹⁴ C]FA esterificado/clase lipídica (pmol/ nmol) | | |
|------------------------|------------|---------------|---------------|---|--------------|---------------|
| | 1 | 5 | 10 | 1 | 5 | 10 |
| FA Libre | 84,5 ± 2,0 | 46,4 ± 6,0*** | 39,3 ± 3,6*** | -- | -- | -- |
| FA Esterificado | 14,5 ± 2,0 | 53,6 ± 7,7*** | 60,7 ± 4,7** | -- | -- | -- |
| LP | 7,5 ± 1,0 | 17,7 ± 1,6** | 13,0 ± 1,0* | 0,27 ± 0,05 | 0,35 ± 0,02 | 0,35 ± 0,03 |
| LN | 7,0 ± 1,0 | 37,7 ± 6,1*** | 47,8 ± 3,7*** | 11,6 ± 2,4 | 39,0 ± 6,5** | 68,8 ± 3,9*** |
| TAG | 7,0 ± 1,0 | 30,8 ± 5,2** | 37,0 ± 2,5*** | 11,6 ± 2,4 | 32,5 ± 5,5* | 54,8 ± 2,7*** |
| CE | 0,0 ± 0,0 | 6,9 ± 0,9*** | 10,8 ± 1,2*** | 0,0 ± 0,0 | 6,5 ± 1,0*** | 14,0 ± 1,2*** |

Tabla 8. (cont.)

18:2n-6

| Tiempo (min) | % (dpm) | | | $[1-^{14}C]$ FA esterificado/clase lipídica (pmol/ nmol) | | |
|------------------------|------------|---------------|---------------|--|-------------|---------------|
| | 1 | 5 | 10 | 1 | 5 | 10 |
| FA Libre | 68,6 ± 2,7 | 36,9 ± 0,4** | 24,1 ± 0,4** | -- | -- | -- |
| FA Esterificado | 30,7 ± 3,8 | 62,7 ± 1,6** | 75,2 ± 1,3** | -- | -- | -- |
| LP | 15,6 ± 2,9 | 10,4 ± 0,8 | 12,8 ± 0,3 | 0,71 ± 0,11 | 0,29 ± 0,03 | 0,59 ± 0,05 |
| LN | 15,1 ± 0,9 | 52,3 ± 0,8*** | 62,4 ± 1,0*** | 36,7 ± 3,2 | 76,9 ± 17,6 | 148,3 ± 12,2 |
| TAG | 15,1 ± 0,9 | 35,8 ± 0,7** | 53,4 ± 0,9*** | 36,7 ± 3,2 | 55,1 ± 13,0 | 129,3 ± 11,1* |
| CE | ND | 16,5 ± 0,1*** | 9,0 ± 0,1*** | 0,0 ± 0,0 | 21,8 ± 4,6* | 19,0 ± 2,1** |

Tabla 8. (cont.)

18:0

| Tiempo (min) | % (dpm) | | | [1- ¹⁴ C]FA esterificado/clase lipídica (pmol/ nmol) | | |
|------------------------|-----------|---------------|----------------|---|-------------|----------------|
| | 1 | 5 | 10 | 1 | 5 | 10 |
| FA Libre | 100 ± 0,0 | 50,8 ± 0,3*** | 49,9 ± 0,07*** | -- | -- | -- |
| FA Esterificado | ND | 49,3 ± 0,3*** | 50,1 ± 0,3*** | -- | -- | -- |
| LP | ND | 40,4 ± 0,3*** | 43,5 ± 0,2*** | 78,1 ± 19,1 | 110,5 ± 7,6 | 152,4 ± 9,53** |
| LN | ND | 8,9 ± 0,01*** | 6,6 ± 0,1*** | 0,11 ± 0,11 | 0,11 ± 0,11 | 0,11 ± 0,11 |
| TAG | ND | 8,9 ± 0,01*** | 6,6 ± 0,1*** | 0,11 ± 0,11 | 0,11 ± 0,11 | 0,11 ± 0,11 |
| CE | ND | ND | ND | ND | ND | ND |

Tabla 8. (cont.)

| 20:4n-6 | | | | | | |
|------------------------|-------------|----------------|----------------|---|--------------|--------------|
| Tiempo (min) | % (dpm) | | | [1- ¹⁴ C]FA esterificado/clase lipídica (pmol/ nmol) | | |
| | 1 | 5 | 10 | 1 | 5 | 10 |
| FA Libre | 100,0 ± 0,0 | 30,3 ± 0,02*** | 23,3 ± 0,03*** | -- | -- | -- |
| FA Esterificado | ND | 69,7 ± 0,03*** | 76,7 ± 0,2*** | -- | -- | -- |
| LP | ND | 51,5 ± 0,02*** | 54,4 ± 0,08*** | 129,5 ± 26,7 | 152,4 ± 18,7 | 160,0 ± 15,6 |
| LN | ND | 18,2 ± 0,01*** | 22,3 ± 0,1*** | 1,00 ± 0,26 | 1,48 ± 0,11 | 1,85 ± 2,96* |
| TAG | ND | 18,2 ± 0,01*** | 22,3 ± 0,1*** | 1,00 ± 0,26 | 1,48 ± 0,11 | 1,85 ± 2,96* |
| CE | ND | ND | ND | ND | ND | ND |

Los resultados se presentan como radiactividad incorporada (dpm %) y como actividad específica de esterificación (pmol de [^{14}C]FA esterificado / nmol de cada clase lipídica). Los resultados corresponden a las medias \pm desvío standard de la media (SEM) de al menos 5 experimentos independientes. En cada clase lipídica los resultados se compararon respecto del primer tiempo (1 min) mediante el test de Student con: * $0,05 > p > 0,01$; ** $0,01 > p > 0,001$; *** $p < 0,001$. ND: no detectable. La incorporación total en LN calculada como actividad específica, refleja los pmoles de FA esterificado en TAG+CE respecto de los nmoles totales de TAG y CE. Los resultados correspondientes a los ácidos 18:0 y 20:4n-6 corresponden a resultados previos de nuestro laboratorio [4]

Los FA estudiados se esterificaron en los LP nucleares mayoritarios, PC, PE y PI mediante un mecanismo acil-CoA dependiente (**Figura 30**). Sin embargo, ninguno de ellos se esterificó en la SM nuclear en las condiciones ensayadas, indicando que una vez sintetizada la SM, el FA que posee no se remodelaría en el núcleo.

Los FA 16:0, 18:0 y 18:1n-9 se esterificaron en mayor proporción en PE respecto a PC y PI, mientras que por el contrario, los FA 18:2n-6 y 20:4n-6 lo hicieron en mayor proporción en PC respecto de PE y PI.

A su vez, analizando cada clase lipídica en particular se encuentra especificidad respecto del FA y de la clase de LP nuclear, a saber:

PC: 20:4 > 18:0 > 18:2 > 16:0 ≈ 18:1

PE: 18:0 > 20:4 >> 16:0 ≈ 18:2 ≈ 18:1

PI: 20:4 >> 18:0 > 18:2 > 18:1 ≈ 16:0

Estas diferencias en la esterificación de los diferentes FA ensayados en las distintas clases de LP podría estar determinando la composición final de estos lípidos.

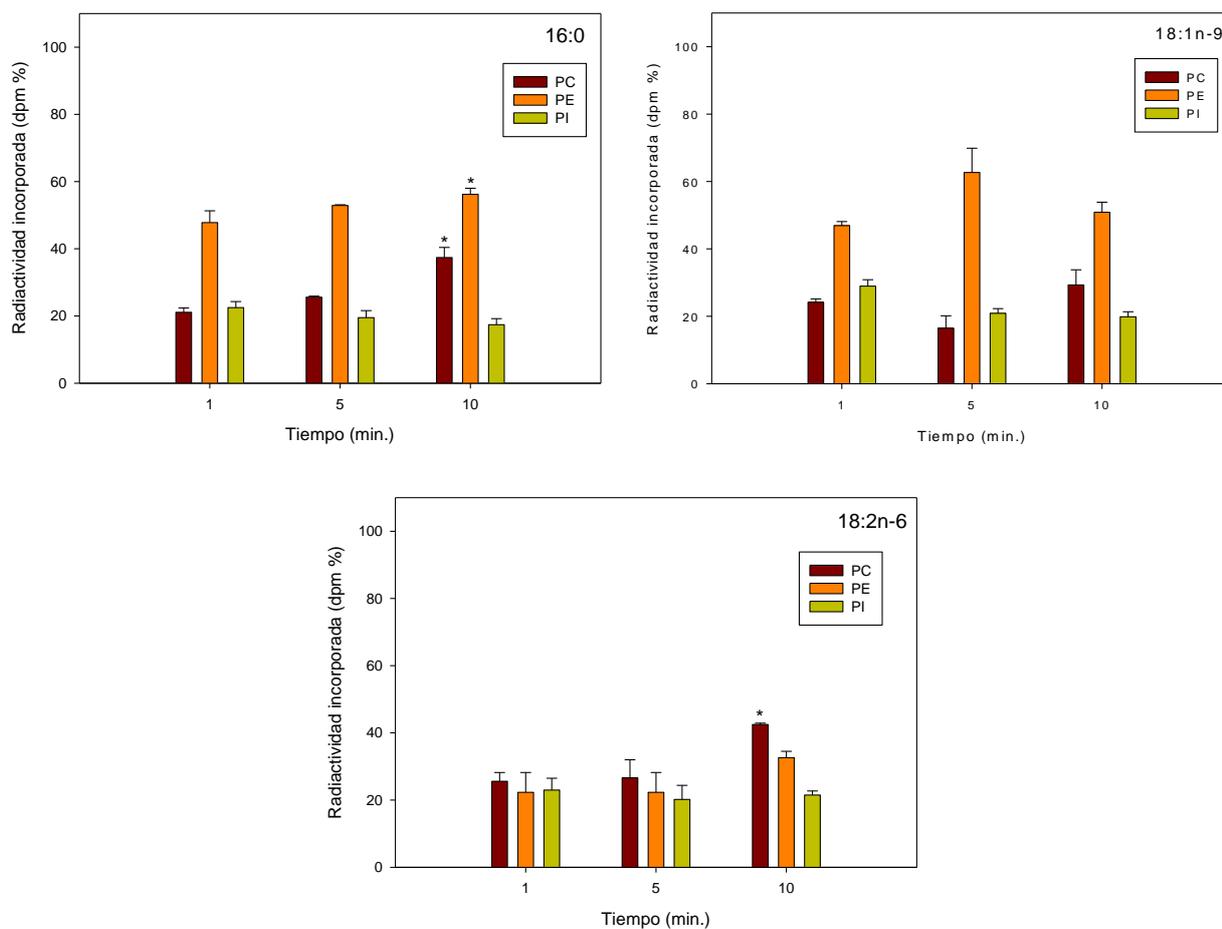


Figura 30. Esterificación de los FA [1-¹⁴C]16:0, [1-¹⁴C]18:1n-9 y [1-¹⁴C]18:2n-6 en los lípidos polares nucleares en función del tiempo. Los resultados corresponden a las medias \pm desvío standard de la media (SEM) de al menos 5 experimentos independientes. Para una misma clase de LP, los resultados se compararon respecto del primer tiempo mediante el test de Student con: * $0,05 > p > 0,01$; ** $0,01 > p > 0,001$; *** $p < 0,001$.

Tabla 9. Esterificación de los FA [$1-^{14}\text{C}$]16:0, [$1-^{14}\text{C}$]18:1n-9, [$1-^{14}\text{C}$]18:2n-6, [$1-^{14}\text{C}$]18:0 y [$1-^{14}\text{C}$]20:4n-6 en los lípidos polares nucleares.**16:0**

| Tiempo (min) | % (dpm) | | | [$1-^{14}\text{C}$]FA esterificado/clase lipídica (pmol/ nmol) | | |
|--------------|------------|------------|-------------|--|--------------|--------------|
| | 1 | 5 | 10 | 1 | 5 | 10 |
| PC | 21,1 ± 1,3 | 25,6 ± 0,3 | 37,4 ± 3,0* | 0,04 ± 0,01 | 0,17 ± 0,04* | 0,25 ± 0,04* |
| PE | 47,8 ± 3,5 | 52,9 ± 0,2 | 56,2 ± 1,8* | 0,31 ± 0,03 | 1,0 ± 0,2* | 1,0 ± 0,1* |
| PI | 22,5 ± 1,8 | 19,5 ± 2,1 | 17,4 ± 1,8 | 0,36 ± 0,04 | 0,36 ± 0,05 | 0,4 ± 0,1 |

18:1n-9

| Tiempo (min) | % (dpm) | | | [$1-^{14}\text{C}$]FA esterificado/clase lipídica (pmol/ nmol) | | |
|--------------|------------|------------|------------|--|-------------|-------------|
| | 1 | 5 | 10 | 1 | 5 | 10 |
| PC | 24,2 ± 1,0 | 16,4 ± 3,7 | 29,3 ± 2,1 | 0,08 ± 0,02 | 0,08 ± 0,02 | 0,13 ± 0,02 |
| PE | 46,9 ± 1,2 | 62,7 ± 7,2 | 50,9 ± 6,0 | 0,5 ± 0,1 | 0,86 ± 0,04 | 0,6 ± 0,1 |
| PI | 28,9 ± 1,9 | 20,9 ± 1,4 | 19,8 ± 1,5 | 0,7 ± 0,2 | 0,67 ± 0,04 | 0,54 ± 0,06 |

Tabla 9 (cont.)

18:2n-6

| Tiempo (min) | % (dpm) | | | [1- ¹⁴ C]FA esterificado/clase lipídica (pmol/ nmol) | | |
|--------------|------------|------------|-------------|---|---------------|--------------|
| | 1 | 5 | 10 | 1 | 5 | 10 |
| PC | 25,6 ± 2,6 | 26,6 ± 5,4 | 42,5 ± 0,4* | 0,30 ± 0,03 | 0,11 ± 0,01* | 0,40 ± 0,02 |
| PE | 22,3 ± 5,9 | 53,2 ± 9,6 | 32,6 ± 1,9 | 0,70 ± 0,09 | 0,7 ± 0,2 | 0,80 ± 0,01 |
| PI | 23,0 ± 3,5 | 20,2 ± 4,2 | 21,5 ± 1,2 | 1,60 ± 0,03 | 0,60 ± 0,05** | 1,30 ± 0,01* |

Tabla 9 (cont.).

18:0

| Tiempo (min) | % (dpm) | | | [1- ¹⁴ C]FA esterificado/clase lipídica (pmol/ nmol) | | |
|--------------|------------|------------|------------|---|-----------|------------|
| | 1 | 5 | 10 | 1 | 5 | 10 |
| PC | 26,1 ± 3,3 | 16,0 ± 0,8 | 12,0 ± 0,7 | 1,1 ± 0,3 | 1,0 ± 0,2 | 1,4 ± 0,3 |
| PE | 56,9 ± 7,9 | 71,3 ± 1,2 | 77,2 ± 0,9 | 5,6 ± 1,7 | 9,1 ± 1,5 | 12,9 ± 1,9 |
| PI | 11,3 ± 4,3 | 7,3 ± 1,2 | 4,8 ± 0,2 | 1,4 ± 0,6 | 2,2 ± 0,4 | 2,3 ± 0,4 |

Tabla 9 (cont.)

| Tiempo (min) | 20:4n-6 | | | | | |
|--------------|------------|------------|------------|---|-----------|-----------|
| | % (dpm) | | | [1- ¹⁴ C]FA esterificado/clase lipídica (pmol/ nmol) | | |
| | 1 | 5 | 10 | 1 | 5 | 10 |
| PC | 51,5 ± 2,2 | 56,8 ± 2,6 | 59,1 ± 8,0 | 2,8 ± 0,7 | 3,6 ± 0,6 | 4,0 ± 0,9 |
| PE | 29,7 ± 1,0 | 28,5 ± 1,4 | 21,9 ± 2,0 | 4,8 ± 1,1 | 5,4 ± 0,9 | 4,4 ± 1,7 |
| PI | 18,1 ± 0,4 | 13,1 ± 1,3 | 16,4 ± 1,9 | 6,8 ± 1,5 | 5,8 ± 1,3 | 7,6 ± 1,6 |

Los resultados se presentan como radiactividad incorporada (dpm %) y como actividad específica de esterificación (pmol de [1-¹⁴C]FA esterificado / nmol de cada LP). Los resultados corresponden a las medias ± desvío standard de la media (SEM) de al menos 5 experimentos independientes. Para una misma clase de LP, los resultados se compararon respecto del primer tiempo (1 min) mediante el test de Student con: * 0,05 > p > 0,01; ** 0,01 > p > 0,001; *** p < 0,001. Los resultados correspondientes a los ácidos 18:0 y 20:4n-6 corresponden a resultados previos de nuestro laboratorio [4].

Analizando la **tabla 9** de actividades específica de esterificación de FA en LP se observa que existe especificidad en el remodelado de FA respecto del tipo de FA y la clase de LP en particular. En PC el 20:4 y el 18:0 (en ese orden) se esterifican activamente (mayores actividades específicas); en PE ocurre el fenómeno inverso es el 18:0 el FA que se esterifica más activamente (mayor actividad específica). En PI los FA se esterificaron (actividad específica) en el siguiente orden $20:4n-6 > 18:0 > 18:2n-6$.

Los TAG y CE nucleares poseen un activo remodelado de los FA que los constituyen.

El remodelado de 16:0, 18:1n-9 y el 18:2n-6 es más activo en LN que en LP nucleares.

El remodelado de 18:0 y 20:4n-6 es mucho más activo en LP que en LN nucleares.

Los FA de la SM nuclear no se remodelan en el núcleo.

Podemos concluir que los diferentes FA saturados, monoinsaturados y polinosaturados se esterifican y remodelan en el núcleo con especificidad respecto de la clase lipídica.

El remodelado de FA de los lípidos nucleares es intrínseco al núcleo y determinaría la composición final de las clases lipídicas que lo constituyen.

4.III.1.4. Incorporación y esterificación de ácidos grasos en las membranas nucleares

Hemos determinado que los FA que constituyen los lípidos nucleares se incorporan y remodelan de las diferentes clases de lípidos nucleares mediante un mecanismo acil-CoA dependiente (*sección 4.III.1.2*), y por resultados previos del laboratorio [4] hemos demostrado que en la matriz nuclear se incorporan y remodelan FA exógenos en forma autónoma e independiente de componentes y /o estructuras de la DMN. El siguiente objetivo fue determinar si en cada una de las membranas nucleares (MNE y MNI) se desarrollan los procesos de incorporación y remodelado sus FA.

Con este fin primeramente se procedió a realizar un fraccionamiento nuclear, y se aisló la MNE, los Nucleoplastos (Núcleos sin la MNE) y finalmente la MNI. Cabe aclarar que las mismas corresponden a fracciones crudas y no purificadas, ya que la recuperación de las diferentes fracciones es muy baja y por lo tanto es muy difícil de obtener una masa crítica de las mismas para su posterior purificación.

Cada fracción nuclear se analizó por microscopía electrónica y las observaciones que se muestran en la [figura 8](#), se corresponden con los datos de bibliografía. La MME y la MMI están constituidas por vesículas que poseen una única membrana, y los Nucleoplastos se caracterizan por mantener el nucléolo, zonas de heterocromatina y eucromatina y una sola membrana nuclear, la MMI [5].

Habiendo aislado las membranas, en una primera etapa se incubaron la MMI y la MNE con FA exógeno ([Figura 31](#)) y posteriormente se determinó en qué clase lipídica se había incorporado la radiactividad ([Figuras 32 y 33](#)).

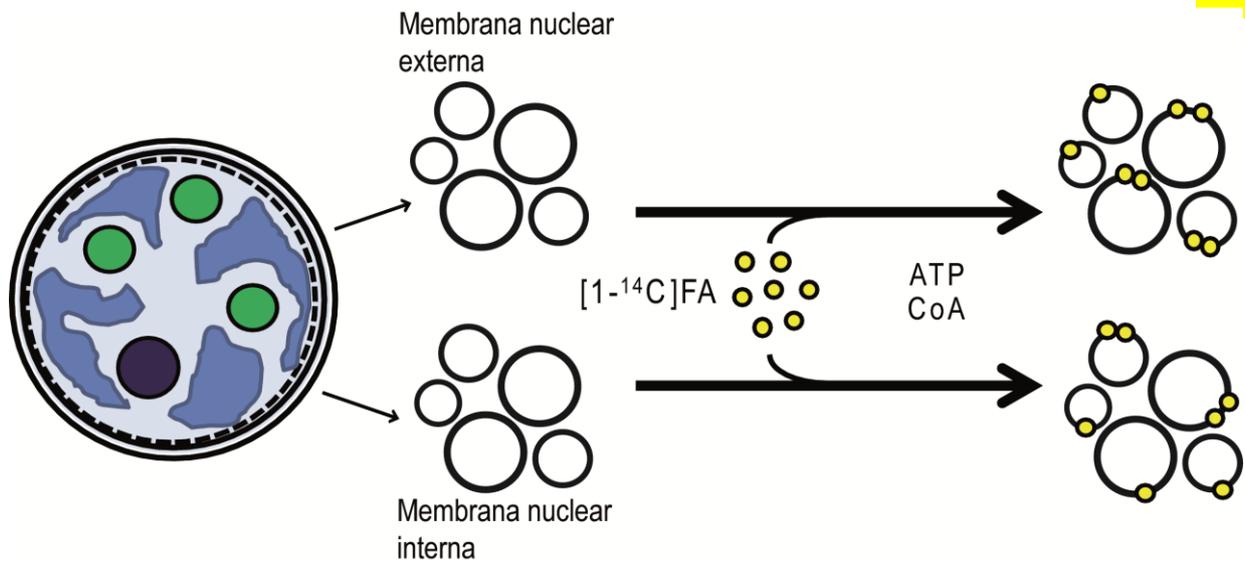


Figura 31. Esquema del protocolo experimental de incubación de MNE y MNI *in vitro*. Se aislaron membranas nucleares como se detalla en Materiales y métodos (*sección 7.3.2.2*). La MNE y la MNI se incubaron con $[1-^{14}\text{C}]20:4n-6$ y se analizó la distribución de la radiactividad incorporada en las diferentes clases de lípidos que las constituyen.

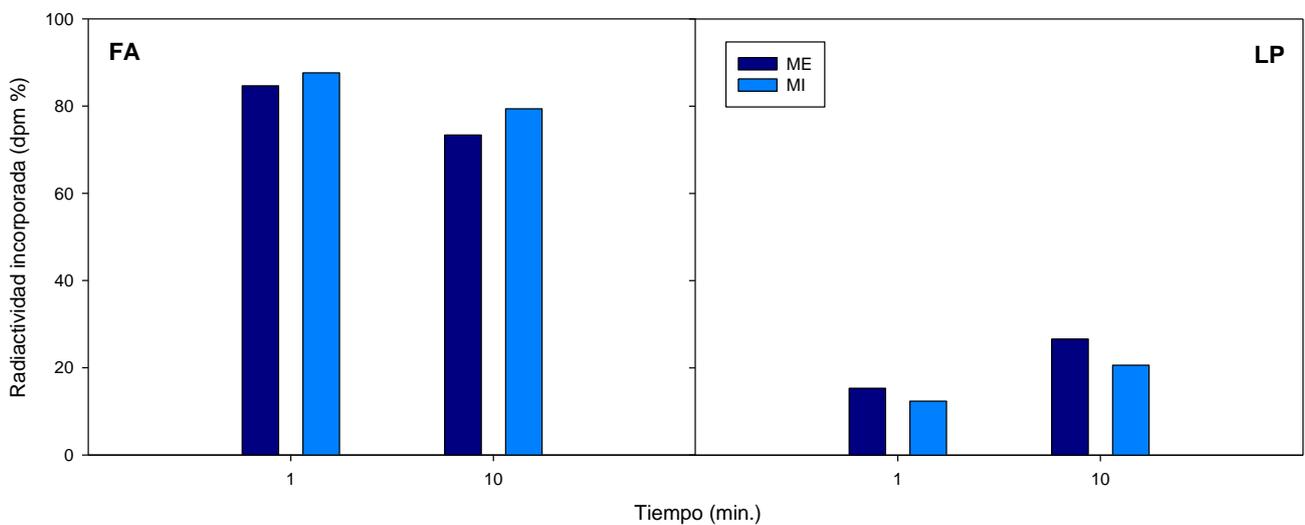


Figura 32. Incorporación y esterificación del ácido $[1-^{14}\text{C}]20:4n-6$ en los lípidos de las MNE y MNI. Al analizar la distribución de la radiactividad incorporada en las diferentes clases de lípidos por TLC, sólo se detectó radiactividad en FA y LP.

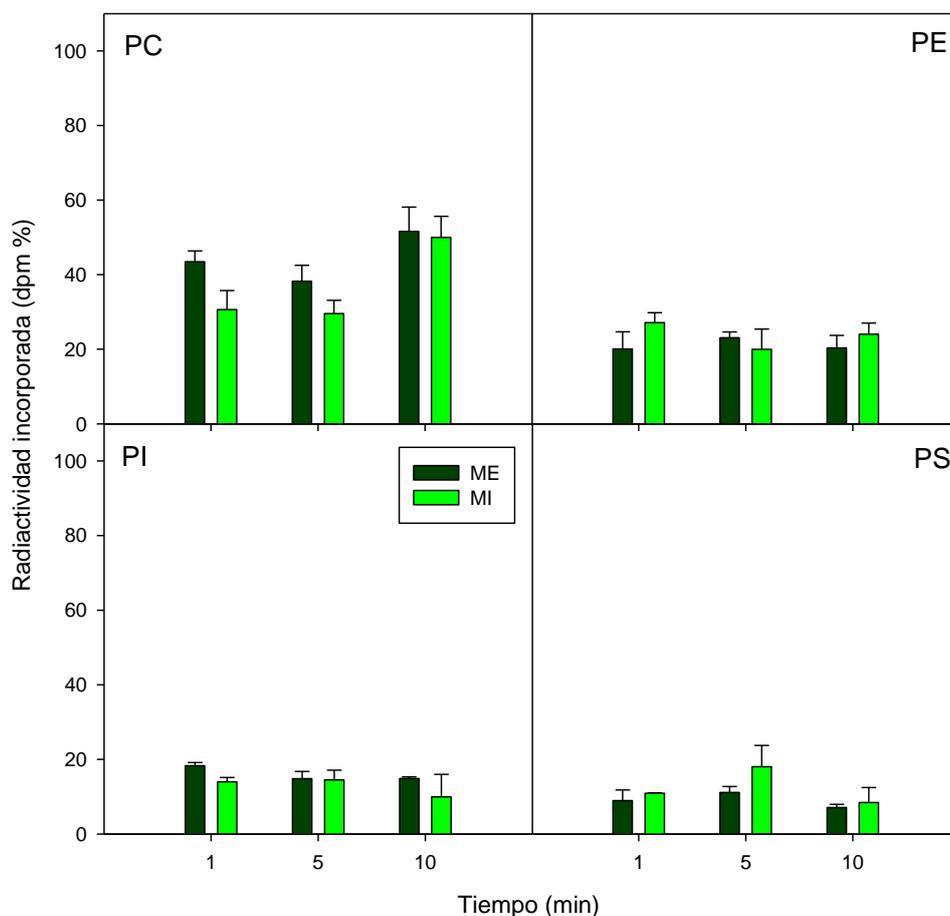


Figura 33. Incorporación y esterificación del ácido [1-¹⁴C]20:4n-6 en los lípidos polares de las MNE y MNI. Los resultados corresponden a las medias \pm desvío standard de la media (SEM) de al menos 3 experimentos independientes.

Los resultados ([Figuras 32 y 33](#)) indican que en ambas membranas nucleares existen los mecanismos necesarios para incorporar y esterificar FA exógenos. En particular la esterificación ocurre por un mecanismo acil-CoA dependiente.

Como era de esperar, no se observó radiactividad esterificada en TAG y CE, y por lo tanto podemos suponer que estos resultados se debieron a que los LN nucleares se concentran y organizan en la matriz nuclear, en las nLD ([sección 4.II](#)) y no en la MN.

Sólo se observó esterificación de 20:4n-6 en LP y no se observaron características diferenciales en el patrón de esterificación entre ambas membranas. En ambas membranas (MNE y MNI) se observó una mayor proporción de la esterificación de 20:4n-6 en PC y PE respecto de PI y PS, lo que concuerda con la abundancia relativa de estos LP en las MN. Como no se determinó la composición química de cada membrana no es posible calcular las respectivas actividades específicas de esterificación. La esterificación fue rápida no observándose aumento con el tiempo de incubación.

Podemos concluir que cada membrana nuclear es autónoma para esterificar FA exógenos mediante un mecanismo acil-CoA dependiente.

No existen TAG y CE en la DMN.

4.III.1.5.Mecanismos de internalización nuclear del 20:4n-6

El protocolo experimental utilizado consiste en incubar núcleos aislados *in vitro* con [1-¹⁴C]FA en condiciones tales que el FA exógeno se incorpora rápidamente como FA y luego se esterifica en LN y LP. El siguiente objetivo fue determinar la localización nuclear del pool de FA incorporado y discernir si el mismo se encuentra asociado a la MN o dentro del núcleo.

Con este fin se incubaron núcleos con [1-¹⁴C]20:4n-6, luego se eliminaron las MN con Tritón X-100 y se aislaron las matrices nucleares utilizando la técnica que se elaboró en el laboratorio [6] (**Figura 34**). Finalmente se analizó la distribución de la radiactividad en las diferentes clases lipídicas de la matriz nuclear (**Figura 35**).

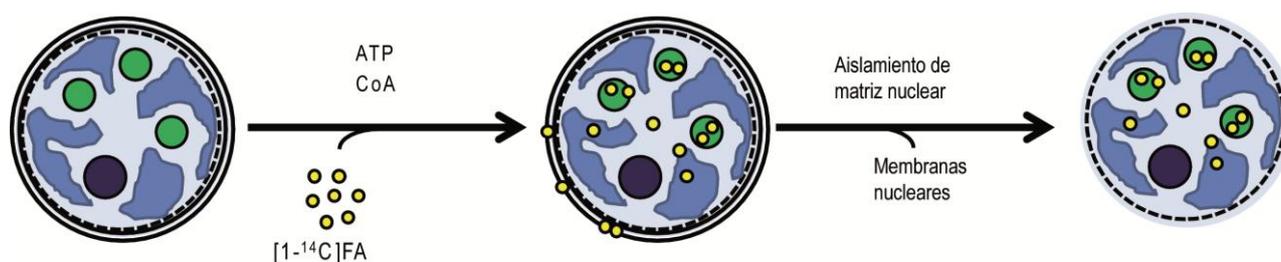


Figura 34. Esquema del protocolo experimental de obtención de matrices nucleares marcadas a partir de núcleos incubados con FA. Se incubaron núcleos con [1-¹⁴C]20:4n-6 luego de la incubación se aislaron las matrices nucleares eliminando las membranas nucleares como se detalla en la sección 7.3.2.1. Luego se analizó la distribución de la radiactividad.

Al cuantificar la radiactividad que se recupera en la matriz respecto de la total inicial, se observó que el 15% (dpm) de la radiactividad se incorpora en la matriz nuclear y el 85% restante se elimina junto con la MN.

En la **tabla 10** se presentan los resultados de la radiactividad incorporada como FA libre de las matrices aisladas luego de incubaciones con y sin ATP y CoA; como control se presentan los resultados correspondientes al núcleo marcado antes que se eliminen las membranas nucleares y se aislen las respectivas matrices.

Tabla 10. Porcentaje de la radiactividad total incorporada como FA libre (no esterificado) luego de 10 min de incubación.

| | Con ATP y CoA | Sin ATP y CoA |
|---------------------------|----------------------|----------------------|
| Núcleos enteros | 30 | 100 |
| Matrices nucleares | 29 | 100 |

Con ATP y CoA los FA además de incorporarse como FA se esterifican en LP, TAG y CE y de ese modo se completa el 100%.

Se observa que en ausencia de ATP y CoA la radiactividad se recupera totalmente como FA libre ya que no se esterificó el FA exógeno en los LN y LP de la matriz. Mientras que, en presencia de ATP y CoA en condiciones en las que el FA se puede activar como acil-CoA, el mismo se esterifica en los pools lipídicos de la matriz en un 71%, quedando un remanente como FA libre (29%).

Por lo tanto, un 15% del FA exógeno se internaliza en el núcleo mediante un mecanismo pasivo y luego dentro del núcleo, si existen las condiciones adecuadas se esterifica mediante un mecanismo acil-CoA dependiente en sus lípidos.

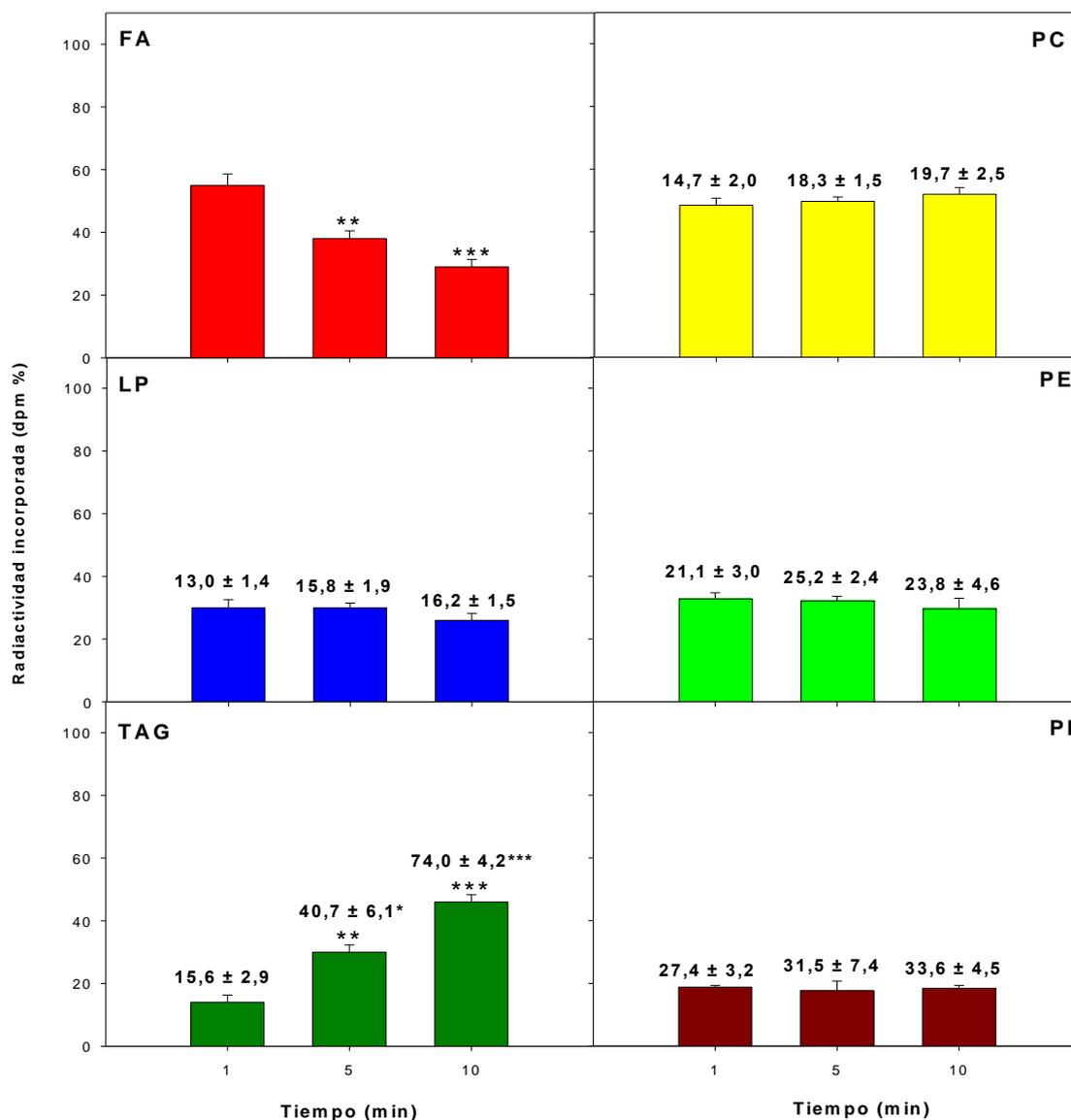


Figura 35. Distribución de la radiactividad incorporada y esterificada en los pools lipídicos de la matriz. Las características de la incubación corresponden a las de la [figura 34](#). Los resultados corresponden a las medias \pm desvío standard de la media (SEM) de al menos 3 experimentos independientes. Los datos encima de las barras corresponden a las actividades específicas de esterificación, calculadas como pmol de FA esterificado por nmol de cada clase lipídica. Los resultados se compararon respecto del primer tiempo (1 min) mediante el test de Student con: * $0,05 > p > 0,01$; ** $0,01 > p > 0,001$; *** $p < 0,001$.

Los perfiles de distribución de la radiactividad (**Figura 35**) indican que el 20:4n-6 se incorporó como FA libre y se esterificó en los pools de LN y LP endonucleares por un mecanismo acil-CoA dependiente. A mayor tiempo de incubación el FA libre se movilizó y esterificó activamente (mayor actividad específica) en el pool de TAG nuclear. En concordancia con resultados previos (**Tabla 9**), la esterificación en LP se saturó aún a tiempos cortos de incubación y , el 20:4n-6 se remodeló más activamente en PI que en PC y PE.

En conclusión, los FA exógenos se incorporan y esterifican en los lípidos de la DMN, se internalizan como FA y dentro del núcleo se movilizan y esterifican en los LN y LP endonucleares. No podemos descartar que además exista un intercambio de LP entre la DMN y la matriz nuclear.

4.III.1.6. Incorporación y esterificación de ácidos grasos en los lípidos de las nLD

Habiendo determinado que los FA exógenos se esterifican en los lípidos nucleares y sabiendo que los LN se localizan en las nLD, el siguiente objetivo fue determinar si los LN marcados radiactivamente con los $[1-^{14}\text{C}]$ FA se localizan en las nLD. Con este fin se aislaron nLD de núcleos previamente marcados con $[1-^{14}\text{C}]$ FA como se detallara en el *sección 4.III.1.3* y se analizaron las clases de lípidos marcados radiactivamente (**Figura 36A**). Estos estudios se realizaron incubando *in vitro* núcleos con los FA mayoritarios que componen los LN: $[1-^{14}\text{C}]16:0$, $[1-^{14}\text{C}]18:1n-9$ y $[1-^{14}\text{C}]18:2n-6$. Los resultados respectivos expresados como radiactividad incorporada (dpm %) y como actividad específica de esterificación, se presentan en la **tabla 11**.

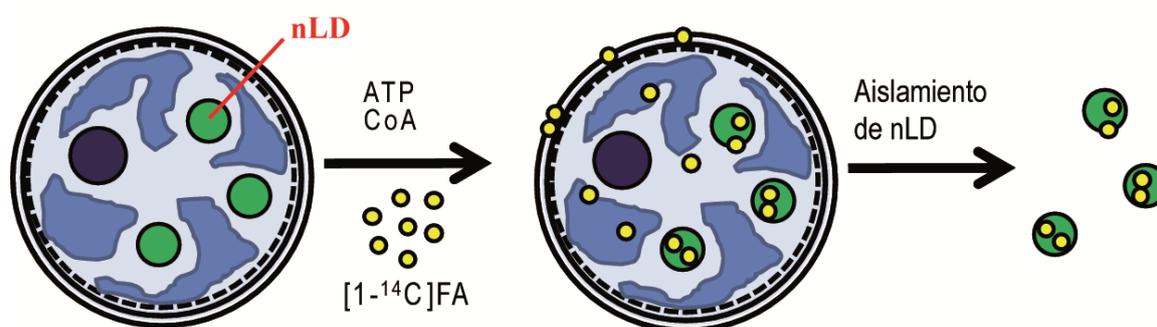


Figura 36A. Esquema del protocolo experimental de incubación de Núcleos *in vitro* y posterior aislamiento de nLD. Los núcleos aislados se incubaron con $[1-^{14}\text{C}]$ FA como se detalla en la *sección 7.10.1* (*Materiales y métodos*). Luego se aislaron las nLD como se detalla en la *sección 7.3.2.3* (*Materiales y métodos*) y se analizó la distribución de la radiactividad en las clases lipídicas de las nLD.

Tabla 11. Incorporación y esterificación de [1-¹⁴C]FA en los lípidos de las nLD.

| | 16:0 | | 18:1n-9 | | 18:2n-6 | |
|------------------------|----------------|-----------------------------|----------------|-----------------------------|----------------|-----------------------------|
| | <i>% (dpm)</i> | <i>Actividad específica</i> | <i>% (dpm)</i> | <i>Actividad específica</i> | <i>% (dpm)</i> | <i>Actividad específica</i> |
| FA Libre | 72,4 | - | 29,3 | - | 40 | - |
| FA Esterificado | 27,5 | 11,1 | 70,7 | 12,6 | 60 | 20,1 |
| LP | 6,5 | 3,5 | 9,9 | 2,4 | 2,5 | 1,4 |
| LN | 21,0 | 7,6 | 60,8 | 10,2 | 57,5 | 18,7 |
| TAG | 17,4 | 6,9 | 49,8 | 9,2 | 46,3 | 16,3 |
| CE | 3,6 | 0,7 | 11,0 | 1,0 | 11,2 | 2,4 |

Los resultados se presentan como radiactividad incorporada (dpm %) y como actividad específica de esterificación (pmol de [1-¹⁴C]FA esterificado / nmol de cada clase de lípido).

A partir de los datos de la **tabla 11** podemos observar que al incubar núcleos *in vitro* con los tres FA mayoritarios de los LN nucleares, los FA se esterificaron en los LN nucleares que se localizan en las nLD. Como era de esperar los resultados observados al aislar las nLD son comparables a los observados previamente al analizar los LN en los núcleos totales (**Tabla 8, figura 29**), ya que en las nLD los FA se esterifican en los LN con mayor actividad específica respecto de los LP.

Los FA estudiados se esterificaron activamente (actividad específica) en los LN de las nLD en el siguiente orden: $18:1n-9 \geq 18:2n-6 > 16:0$.

Puesto que los FA más abundantes en los TAG ($18:1n-9 \geq 18:2n-6 > 16:0$, **tabla 6**), son los que se esterifican más activamente, podemos suponer entonces que el proceso de remodelado es el que está determinando la composición final de los TAG y CE de las nLD.

Los FA 16:0, 18:1n-9 y 18:2n-6 se esterifican en los lípidos de las nLD por un mecanismo acil-CoA dependiente.

Los FA 16:0, 18:1n-9 y 18:2n-6 se remodelan en forma más activa en LN respecto de LP de las nLD.

Existe especificidad en la esterificación de los FA en las nLD que determinaría la composición de las especies moleculares de sus lípidos.

El remodelado de FA de los lípidos nucleares es intrínseco al núcleo y determinaría la composición final de las clases lipídicas que lo constituyen.

4.III.1.7. Incorporación y esterificación de ácidos grasos en nLD aisladas

Habiendo determinado que los FA exógenos se incorporan y esterifican en los lípidos de las nLD, el siguiente objetivo fue determinar si las nLD son estructuras autónomas capaces de incorporar y esterificar FA en sus lípidos. Con este fin, se incubaron *in vitro* nLD aisladas en presencia del FA mayoritario de sus LN, el [1-¹⁴C]18:1n-9 y se analizaron las clases de lípidos marcados radiactivamente (**Figura 36B**).

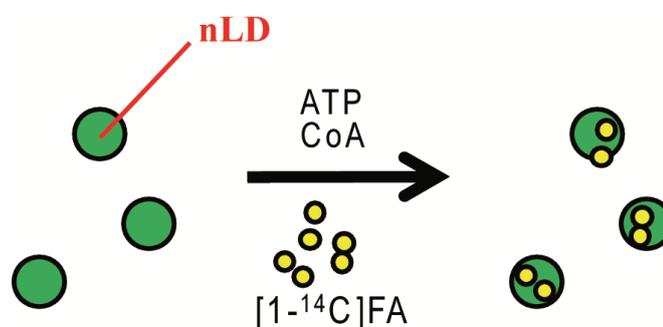


Figura 36B. Esquema del protocolo experimental de incubación de nLD *in vitro*. Las nLD aisladas se incubaron con [1-¹⁴C]18:1n-9. Posteriormente se analizó la distribución de la radiactividad en las clases lipídicas como ya se detallara anteriormente.

En la **figura 37** se observa claramente que el ácido 18:1n-9 se incorporó totalmente como FA, y no se esterificó en ninguna clase lipídica de las nLD aisladas. Teniendo en cuenta que en la **sección 4.III.1.5** demostramos que al incubar núcleos *in vitro* con el ácido oleico, el FA se esterifica en los LN de las nLD. Podemos plantear las siguientes hipótesis para explicar estos resultados:

- 1) Las nLD carecen de algún componente o enzima implicada en el remodelado de los FA de sus lípidos. Los FA se remodelan fuera de las nLD, en la matriz y luego se incorporan y/o intercambian con los lípidos de las nLD. Las nLD podrían carecer de ACS y por lo tanto los FA se incorporarían ya activados en la nLD como acil-CoA

- 2) Las nLD son autónomas pero durante el proceso de aislamiento perdieron o se inactivó algún componente o enzima del metabolismo lipídico.

Estas hipótesis serán validadas o refutadas en un futuro próximo.

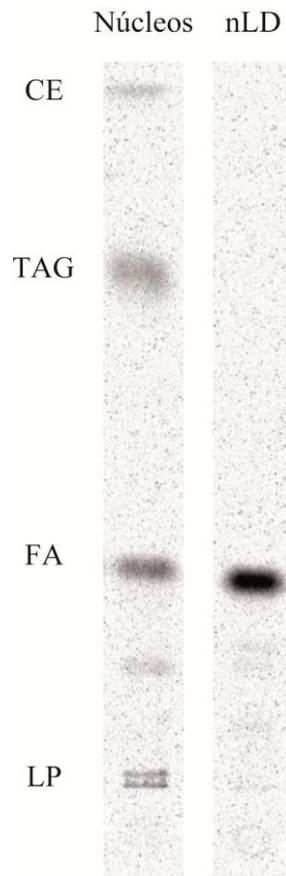


Figura 37. Incorporación de ácido [1-¹⁴C]18:1n-9 en nLD aisladas. Luego de incubar *in vitro* núcleos (control) y nLD con [1-¹⁴C]18:1n-9, ATP y CoA, los lípidos se extrajeron y resolvieron por TLC y se cuantificó la radiactividad como se indicara en la *sección 7.10.1*. LP: lípidos polares, FA: ácidos grasos, TAG: triacilglicéridos y CE: ésteres de colesterol

4.III.2.Efecto de la L-FABP en la incorporación y esterificación de ácidos grasos al núcleo

Resultados previos del laboratorio demostraron que la L-FABP juega un rol importante en la movilización de FA nucleares, ya que en el interior nuclear favorece la movilización del ácido 20:4n-6 dentro del núcleo, su esterificación en PI endonuclear [4] y el remodelado del 18:0 y 20:4n-6 de las especies moleculares de PC que están constituidas por éstos FA [7].

A partir de los resultados presentados en la *sección 4.III.1* donde se demostró que los FA mayoritarios que constituyen los TAG y CE (16:0, 18:1n-9 y 18:2n-6) son remodelados activamente, el siguiente objetivo fue determinar el rol de la L-FABP en estos procesos.

Con este fin se incubaron núcleos *in vitro* en presencia de L-FABP cargada con [1-¹⁴C]FA y se analizó el perfil de distribución de la radiactividad en las clases lipídicas nucleares (**Figura 38**). Se utilizaron los FA mayoritarios de los LN, uno saturado (16:0) y uno no saturado (18:1n-9).

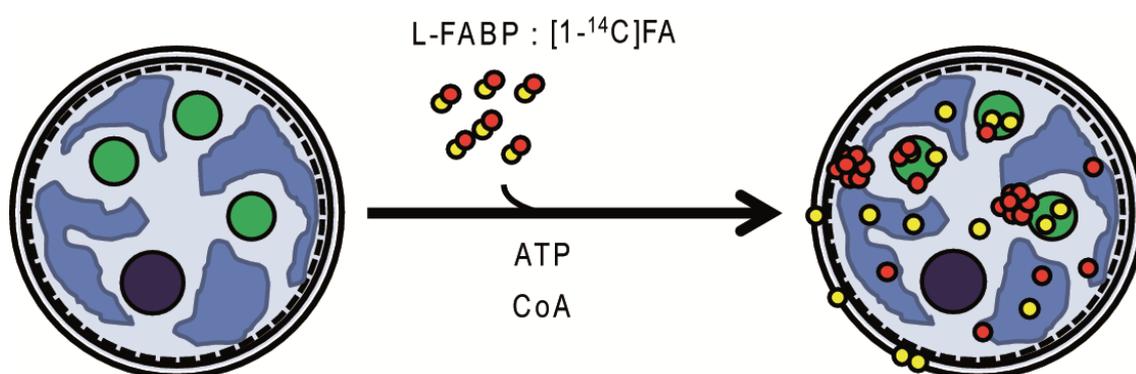


Figura 38. Esquema del protocolo experimental de incubación de núcleos *in vitro*. Los núcleos aislados se incubaron en presencia de [1-¹⁴C]FA (●) unido a L-FABP (●) como se detalla en la [sección 7.11.1](#) (*Materiales y métodos*). Los lípidos se extrajeron y se analizó la distribución de la radiactividad en las clases lipídicas como se detalla en la [sección 7.10.1](#) (*Materiales y métodos*).

4.III.2.1. Internalización de la L-FABP exógena al núcleo

Un primer control que se realizó, fue determinar si la L-FABP se internaliza en los núcleos aislados cuando éstos se incuban *in vitro* con la proteína. Con este fin, se analizó el contenido de L-FABP en los núcleos post-incubación por western blot, por microscopía de 2 fotones y de fluorescencia.

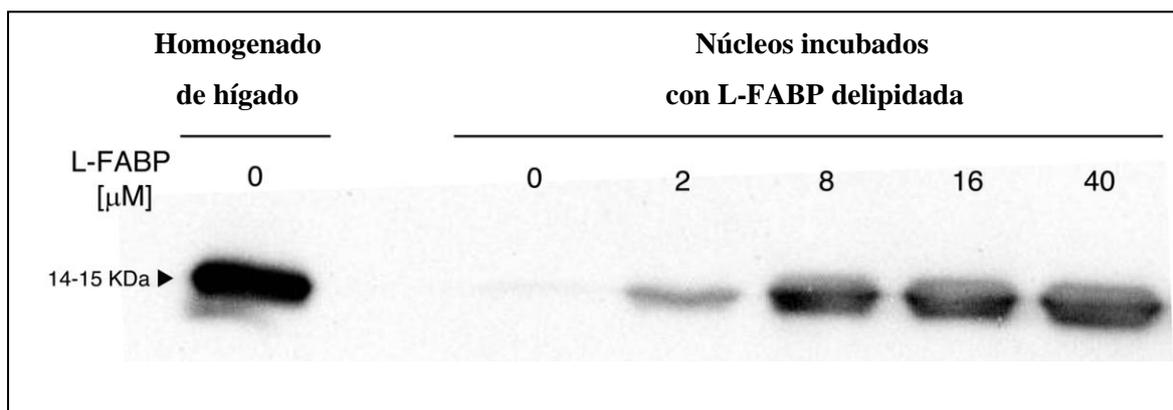


Figura 39. Contenido de L-FABP de núcleos incubados con la proteína.

Western blot de núcleos incubados *in vitro* con concentraciones crecientes de L-FABP. En cada calle se sembraron 50 μg de proteína nuclear. La primera calle representa el control positivo con una muestra de homogenado de hígado de rata.

Como se observa en la [figura 39](#), al incubar núcleos con concentraciones crecientes de L-FABP, las bandas inmunoreactivas de western blot presentaron intensidad proporcional a la concentración de proteína empleada. La banda inmunoreactiva de L-FABP mostró una masa molecular relativa de 14 -15 kDa que es representativa de la masa de 14,18 kDa de la L-FABP.

Es interesante remarcar que bajo estas condiciones experimentales ensayadas, cuando no se agregó L-FABP exógena al medio de incubación (0μM), se observó una tenue banda que corresponde a la L-FABP propia del núcleo y que contrasta con la importante banda inmunoreactiva observada en homogenado. Estos resultados están en concordancia con datos de bibliografía, ya que está descripto que en el núcleo las L-

FABP y ACBP se encuentran en baja concentración [8,9], estos datos contrastan con la alta concentración de estas proteínas en el citosol.

Para determinar si la L-FABP se internalizó en el núcleo o se depositó por fuera del mismo sobre la EN, se realizaron dos ensayos independientes, se incubaron núcleos *in vitro* con L-FABP no marcada y marcada fluorescentemente (Fluo-L-FABP). Luego de la incubación se realizaron observaciones por microscopía, en el primer caso se analizó por inmunofluorescencia indirecta y con un microscopía confocal (**Figura 40**), y en el segundo caso con un microscopio de 2 fotones (**Figura 41**).

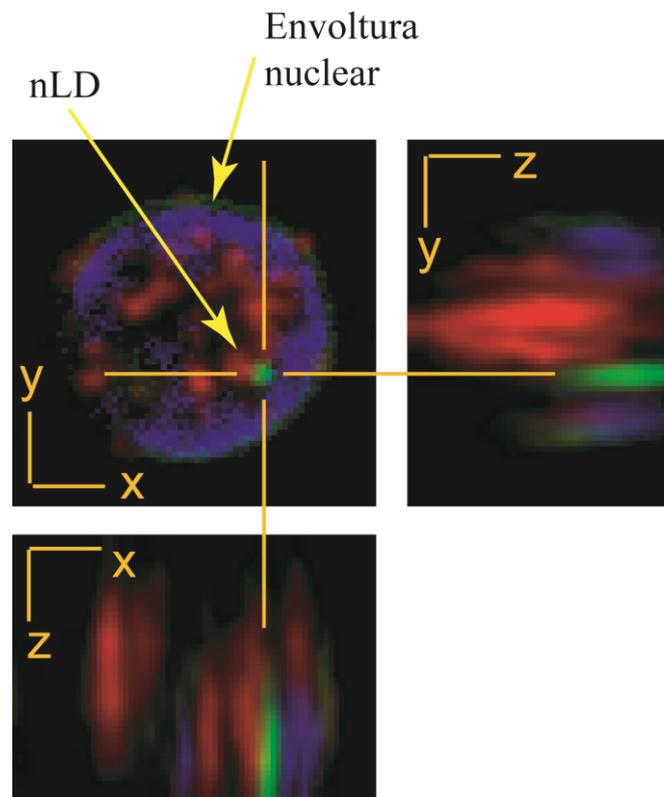


Figura 40. Internalización nuclear de L-FABP. Análisis por inmunofluorescencia indirecta de L-FABP en núcleo. En rojo se observa la fluorescencia debida a L-FABP, en azul DAPI (ADN) y en verde BODIPY 493/503 (nLD). En las imágenes adyacentes se aprecian las vistas ortogonales.

En la **figura 40** se observa que la L-FABP ingresa al núcleo y se localiza en la zona de la matriz nuclear e interacciona fuertemente con ésta puesto que resistió el tratamiento posterior con Tritón X-100 utilizado para lograr la permeabilización de los

preparados y el ingreso de los anticuerpos. Se observa claramente a la L-FABP internalizada, mientras que no se observa fluorescencia significativa en la zona de la EN.

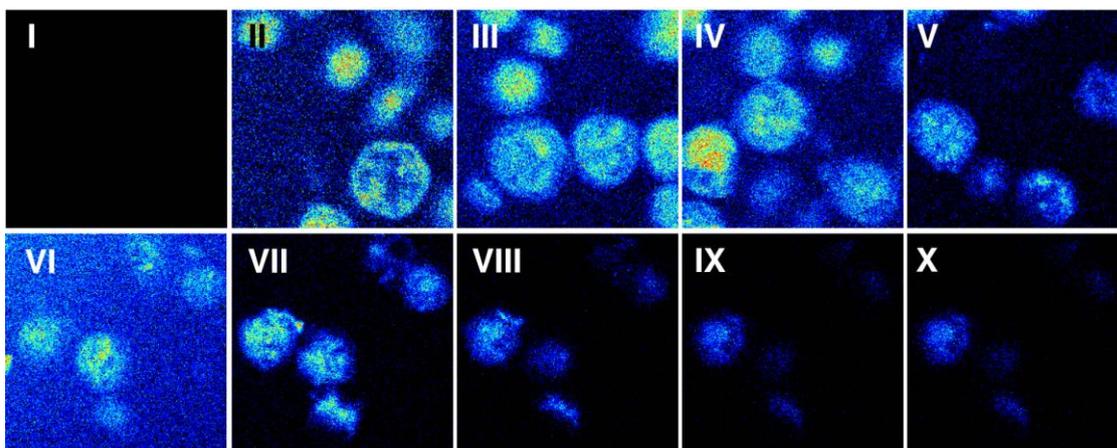


Figura 41. Internalización nuclear de Fluo-L-FABP. Las imágenes se obtuvieron por microscopía de 2 fotones (Laboratory for Fluorescence Dynamics, Univ. California – Irvine) y corresponden a núcleos incubados: I) sin Fluo-L-FABP; II y III) con Fluo-L-FABP 40nM; IV y V) con Fluo-L-FABP y lavados. Las imágenes VI) a X) corresponden al seccionamiento óptico de la muestra a lo largo del eje z.

Para analizar los preparados mediante M2F (**Figura 41**), los núcleos se sedimentaron por gravedad luego de la incubación y éstos permanecieron inmóviles durante la observación microscópica. Como control y para descartar el background debido a efectos de autofluorescencia, se incubaron núcleos sin el agregado de Fluo-L-FABP y no se detectó fluorescencia en el preparado (**Figura 41 I**), y por lo tanto se descarta el fenómeno de autofluorescencia en la muestras.

La adición de Fluo-L-FABP determinó un aumento en la fluorescencia como se observa en la **figura 41 II-X**. Dentro del núcleo se observa un patrón discreto y heterogéneo de fluorescencia y no se observa fluorescencia significativa en la zona de la EN (**Figura 41 II-III**). Para confirmar que la Fluo-L-FABP se internalizó en el núcleo, se tomaron imágenes luego de reemplazar el medio de incubación por un medio fresco sin Fluo-L-FABP, y como se observa en la **figura 41 IV-V** la fluorescencia permanece

dentro de los núcleos. Por último se realizó un seccionamiento óptico a lo largo del eje z de la muestra (**Figura 41 VI-X**), y estas observaciones confirman que la Fluo-L-FABP se internalizó y se mantuvo retenida por estructuras endonucleares ya que al desplazarse hacia la periferia nuclear la intensidad de la fluorescencia disminuye (**Figura 41 VIII-X**). De haber permanecido la Fluo-L-FABP concentrada en el MN, la fluorescencia debería haberse concentrado en zonas de la periferia nuclear.

Podemos suponer que la L-FABP ingresa al núcleo en forma pasiva por el CPN ya que la proteína carece de señal de localización nuclear (NLS) y no posee una masa superior a 60 kDa, ambos factores son imprescindibles para el transporte activo a través del CPN.

Se puede concluir que la L-FABP se internaliza en el núcleo por un mecanismo pasivo.

4.III.2.2. Efecto de la L-FABP en la incorporación y esterificación de ácidos grasos al núcleo.

Con el objetivo de determinar el rol de la L-FABP en la incorporación y esterificación de FA en el núcleo se incubaron núcleos *in vitro* en presencia de L-FABP cargada con [1-¹⁴C]FA (**Figura 38**). A continuación se observan los perfiles de distribución de la radiactividad en las clases lipídicas nucleares cuando se utilizaron los FA 16:0 y 18:1n-9 (**Figuras 42 y 43**).

16:0

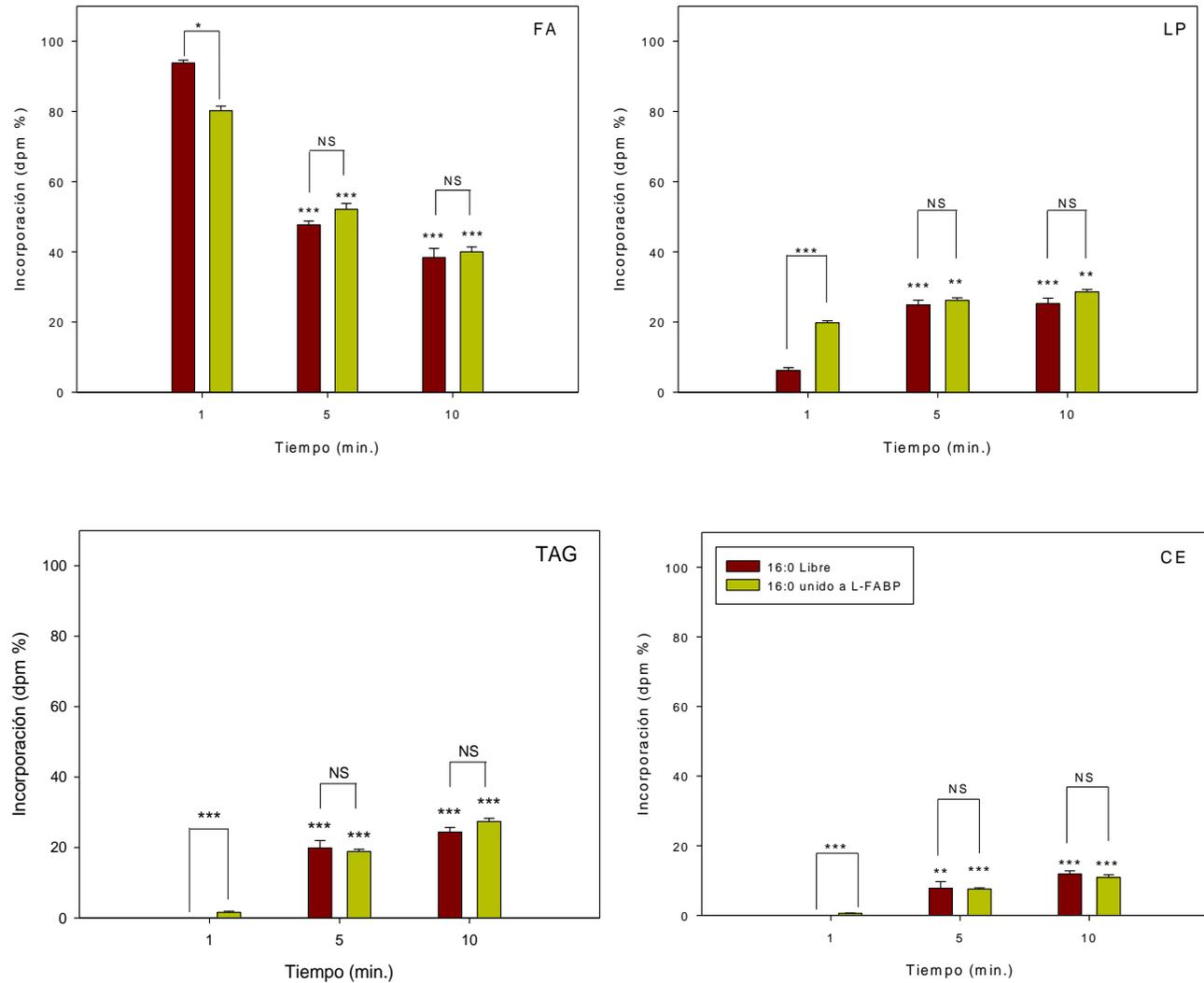


Figura 42. Incorporación y esterificación del ácido [1-¹⁴C]16:0 en los lípidos neutros nucleares en núcleos incubados con FA libre o unido a L-FABP. Los resultados corresponden a las medias ± desvío standard de la media (SEM) de al menos 5 experimentos independientes. Los resultados se compararon respecto del primer tiempo (1 min) o comparando (a un mismo en cada tiempo el efecto del FA libre o unido a L-FABP mediante el test de Student con: * 0,05 > p > 0,01; ** 0,01 > p > 0,001; *** p < 0,001.

18:1n-9

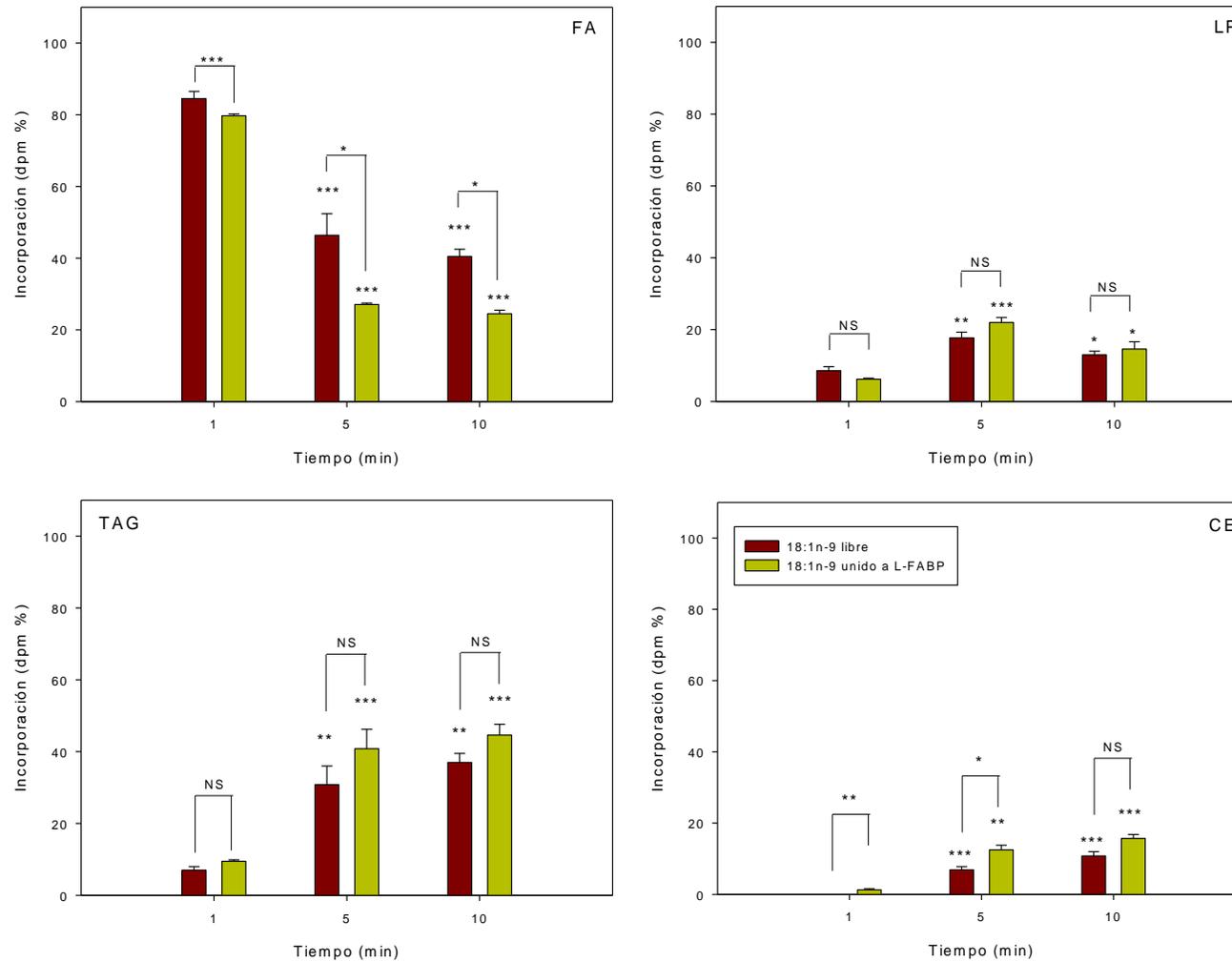


Figura 43. Incorporación y esterificación del ácido [1-¹⁴C]18:1n-9 en los lípidos neutros nucleares en núcleos incubados con FA libre o unido a L-FABP. Los resultados corresponden a las medias ± desvío standard de la media (SEM) de al menos 5 experimentos independientes. Los resultados se compararon respecto del primer tiempo (1 min) o comparando en cada tiempo el efecto del FA libre o unido a L-FABP mediante el test de Student con: * 0,05 > p > 0,01; ** 0,01 > p > 0,001; *** p < 0,001.

A tiempos cortos de incubación (1 minuto) la L-FABP favorece la movilización de 16:0 desde el pool de FA, donde se incorpora inicialmente en forma masiva, hacia los pools de LN (TAG y CE) y LP donde se esterifica mediante un proceso acil-CoA dependiente (**Figura 42**).

Como se observa en la **figura 43**, la L-FABP favorece la movilización de 18:1n-9 desde el pool de FA donde se incorpora inicialmente en forma masiva, hacia el pool de LN de CE (1 y 5 min) y LP (1 min) donde se esterifica mediante un proceso acil-CoA dependiente.

Tabla 12. Incorporación de los FA [$1-^{14}\text{C}$]16:0, [$1-^{14}\text{C}$]18:1n-9, [$1-^{14}\text{C}$]18:0 y [$1-^{14}\text{C}$]20:4n-6 en los lípidos neutros nucleares.

| 16:0 | | | | | | |
|------------------------|------------|---------------|---------------|-------------------------|---------------|---------------|
| % (dpm) | | | | | | |
| Tiempo (min) | FA libre | | | FA:L-FABP | | |
| | 1 | 5 | 10 | 1 | 5 | 10 |
| FA libre | 93,8 ± 0,8 | 47,7 ± 1,1*** | 38,4 ± 2,6*** | 80,2 ± 1,3 ^a | 52,1 ± 1,7*** | 40 ± 32,2*** |
| FA Esterificado | 6,2 ± 0,8 | 52,6 ± 5,3** | 61,6 ± 3,7*** | 22,0 ± 0,9 ^c | 52,7 ± 1,6** | 66,9 ± 2,4** |
| LP | 6,2 ± 0,8 | 24,9 ± 1,3*** | 25,3 ± 1,5*** | 19,8 ± 0,6 ^c | 26,2 ± 0,7** | 28,6 ± 0,7** |
| LN | ND | 27,7 ± 4,0** | 36,3 ± 2,2*** | 2,2 ± 0,3 ^c | 26,5 ± 0,9*** | 38,3 ± 1,7*** |
| TAG | ND | 19,9 ± 2,1*** | 24,4 ± 1,3*** | 1,6 ± 0,3 ^c | 18,9 ± 0,6*** | 27,4 ± 0,9*** |
| CE | ND | 7,8 ± 1,9** | 11,9 ± 0,9*** | 0,6 ± 0,07 ^c | 7,6 ± 0,3*** | 10,9 ± 0,8*** |

Tabla 12 (Cont.)

16:0

| <i>[1-¹⁴C]FA esterificado/clase lipídica (pmol/ nmol)</i> | | | | | | |
|--|-----------------|---------------|---------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|
| Tiempo (min) | <i>FA libre</i> | | | <i>FA:L-FABP</i> | | |
| | <i>1</i> | <i>5</i> | <i>10</i> | <i>1</i> | <i>5</i> | <i>10</i> |
| FA Esterificado | 0,12 ± 0,03 | 28,2 ± 4,1* | 29,4 ± 3,3** | 3,5 ± 0,6 ^c | 20,9 ± 0,4 | 34,7 ± 2,9 ^a |
| LP | 0,12 ± 0,03 | 0,51 ± 0,13* | 0,42 ± 0,04** | 0,59 ± 0,05 ^c | 0,47 ± 0,01 | 0,67 ± 0,10 ^a |
| LN | ND | 27,7 ± 4,1 | 29,0 ± 3,3 | 2,9 ± 0,6 | 20,4 ± 0,4 | 34,0 ± 2,8 |
| TAG | ND | 20,9 ± 1,8*** | 19,7 ± 2,1*** | 2,0 ± 0,4 ^b | 13,7 ± 0,3*** ^a | 21,3 ± 0,1*** |
| CE | ND | 6,8 ± 2,3** | 9,3 ± 1,2*** | 0,9 ± 0,2 ^b | 6,7 ± 0,1*** | 12,7 ± 2,7** |

Tabla 12 (cont.)

| 18:1n-9 | | | | | | |
|------------------------|-----------------|---------------|---------------|------------------------|----------------------------|----------------------------|
| <i>% (dpm)</i> | | | | | | |
| Tiempo (min) | <i>FA libre</i> | | | <i>FA:L-FABP</i> | | |
| | <i>1</i> | <i>5</i> | <i>10</i> | <i>1</i> | <i>5</i> | <i>10</i> |
| FA libre | 84,5 ± 2,0 | 46,4 ± 6,0*** | 40,5 ± 2,0*** | 79,7 ± 0,5 | 27,1 ± 0,4*** ^a | 24,5 ± 1,0*** ^a |
| FA Esterificado | 15,6 ± 2,1 | 55,4 ± 7,7** | 58,8 ± 4,7** | 17,0 ± 1,0 | 75,3 ± 8,1*** | 74,9 ± 6,1*** |
| LP | 8,6 ± 1,1 | 17,7 ± 1,6** | 13,9 ± 1,6* | 6,2 ± 0,3 | 22,0 ± 1,4*** | 14,6 ± 2,0* |
| LN | 7,0 ± 1,0 | 37,7 ± 6,1** | 45,9 ± 3,7** | 10,8 ± 0,7 | 53,3 ± 6,7** | 60,3 ± 4,1*** |
| TAG | 7,0 ± 1,0 | 30,8 ± 5,2** | 33,7 ± 2,9** | 9,5 ± 0,4 | 40,8 ± 5,4*** | 44,6 ± 3,0*** |
| CE | ND | 6,9 ± 0,9*** | 12,2 ± 1,4*** | 1,3 ± 0,3 ^b | 12,5 ± 1,3*** ^a | 15,7 ± 1,1*** |

Tabla 12 (Cont.)

18:1n-9

| Tiempo (min) | <i>[1-¹⁴C]FA esterificado/clase lipídica (pmol/ nmol)</i> | | | | | |
|------------------------|--|--------------|---------------|------------------------|--------------|---------------|
| | <i>FA libre</i> | | | <i>FA:L-FABP</i> | | |
| | <i>1</i> | <i>5</i> | <i>10</i> | <i>1</i> | <i>5</i> | <i>10</i> |
| FA Esterificado | 11,9 ± 2,4 | 39,4 ± 6,5** | 69,2 ± 3,9*** | 11,4 ± 0,7 | 33,5 ± 4,2** | 41,2 ± 2,7*** |
| LP | 0,27 ± 0,05 | 0,35 ± 0,02 | 0,35 ± 0,03 | 0,13 ± 0,01 | 0,22 ± 0,06 | 0,2 ± 0,03 |
| LN | 11,6 ± 2,4 | 39,0 ± 6,5** | 68,8 ± 3,9*** | 11,3 ± 0,7 | 33,3 ± 4,2** | 41,0 ± 2,7*** |
| TAG | 11,6 ± 2,4 | 32,5 ± 5,5* | 40,7 ± 5,6*** | 9,9 ± 0,4 | 25,5 ± 3,4** | 30,3 ± 2,0*** |
| CE | ND | 6,5 ± 1,0*** | 14,0 ± 1,2*** | 1,4 ± 0,3 ^b | 7,8 ± 0,8** | 10,7 ± 0,7*** |

Tabla 12 (Cont.)

18:0

| <i>[1-¹⁴C]FA esterificado/clase lipídica (pmol/ nmol)</i> | | | | | | |
|--|-----------------|-------------|---------------|------------------|-------------|---------------|
| Tiempo (min) | <i>FA libre</i> | | | <i>FA:L-FABP</i> | | |
| | <i>1</i> | <i>5</i> | <i>10</i> | <i>1</i> | <i>5</i> | <i>10</i> |
| FA Esterificado | 0,5 ± 0,2 | 0,7 ± 0,1 | 0,9 ± 0,08** | 0,5 ± 0,1 | 0,7 ± 0,1 | 0,9 ± 0,1** |
| LP | 0,4 ± 0,1 | 0,58 ± 0,04 | 0,80 ± 0,05** | 0,41 ± 0,10 | 0,62 ± 0,06 | 0,79 ± 0,04** |
| LN | 0,11 ± 0,11 | 0,11 ± 0,11 | 0,11 ± 0,037 | 0,11 ± 0,07 | 0,11 ± 0,07 | 0,11 ± 0,07 |
| TAG | 0,11 ± 0,11 | 0,11 ± 0,11 | 0,11 ± 0,037 | 0,11 ± 0,07 | 0,11 ± 0,07 | 0,11 ± 0,07 |
| CE | ND | ND | ND | ND | ND | ND |

Tabla 12 (cont.)

20:4n-6

| Tiempo (min) | % (dpm) | | | | | |
|------------------------|-----------------|------------|------------|------------------|---------------|------------|
| | <i>FA libre</i> | | | <i>FA:L-FABP</i> | | |
| | <i>1</i> | <i>5</i> | <i>10</i> | <i>1</i> | <i>5</i> | <i>10</i> |
| FA libre | 44,6 ± 4,1 | 36,3 ± 3,6 | 30,0 ± 1,2 | 45,7 ± 1,3 | 37,0 ± 1,7 | 26,7 ± 0,8 |
| FA Esterificado | 55,3 ± 11,7 | 63,6 ± 6,8 | 68,5 ± 8,5 | 54,3 ± 5,5 | 62,8 ± 7,9 | 73,2 ± 5,6 |
| LP | 39,5 ± 7,9 | 42,3 ± 5,2 | 43,0 ± 4,2 | 43,9 ± 5,4 | 51,6 ± 4,8 | 56,0 ± 4,5 |
| LN | 15,8 ± 3,8 | 21,3 ± 1,6 | 25,5 ± 4,3 | 10,4 ± 0,1 | 11,2 ± 3,1 | 17,2 ± 1,1 |
| TAG | 15,8 ± 33,8 | 21,3 ± 1,6 | 25,5 ± 4,3 | 10,4 ± 0,1 | 11,2 ± 3,1*** | 17,2 ± 1,1 |
| CE | ND | ND | ND | ND | ND | ND |

Tabla 12 (Cont.)

20:4n-6

| Tiempo (min) | <i>[1-¹⁴C]FA esterificado/clase lipídica (pmol/ nmol)</i> | | | | | |
|------------------------|--|--------------|--------------|------------------|--------------------------|-----------------------------|
| | <i>FA libre</i> | | | <i>FA:L-FABP</i> | | |
| | <i>1</i> | <i>5</i> | <i>10</i> | <i>1</i> | <i>5</i> | <i>10</i> |
| FA Esterificado | 130,0 ± 26,9 | 153,9 ± 18,8 | 161,8 ± 15,8 | 135,8 ± 17,1 | 168,3 ± 15,4 | 172,4 ± 13,3 |
| LP | 129,5 ± 26,7 | 152,4 ± 18,7 | 160,0 ± 15,6 | 135,2 ± 17,1 | 167,6 ± 15,2 | 171,4 ± 13,3 |
| LN | 1,00 ± 0,26 | 1,48 ± 0,11 | 1,85 ± 0,29* | 0,63 ± 0,07 | 0,70 ± 0,19 ^b | 1,04 ± 0,07*** ^a |
| TAG | 1,00 ± 0,26 | 1,48 ± 0,11 | 1,85 ± 0,29* | 0,63 ± 0,07 | 0,70 ± 0,19 ^b | 1,04 ± 0,07*** ^a |
| CE | ND | ND | ND | ND | ND | ND |

Los resultados se presentan como actividad específica de esterificación (pmol de [1-¹⁴C]FA esterificado / nmol de cada pool lipídico). Los resultados corresponden a las medias ± desvío standard de la media (SEM) de al menos 5 experimentos independientes. Los resultados se compararon respecto del primer tiempo (1 min) mediante el test de Student con: * 0,05 > p > 0,01; ** 0,01 > p > 0,001; *** p < 0,001 respecto del primer tiempo; y .^a 0,05 > p > 0,01; ^b 0,01 > p > 0,001; ^c p < 0,001 comparando los efectos del ácido libre respecto al unido a L-FABP para un mismo tiempo. Los resultados correspondientes a los ácidos 18:0 y 20:4n-6 corresponden a resultados previos de nuestro laboratorio [4].

16:0

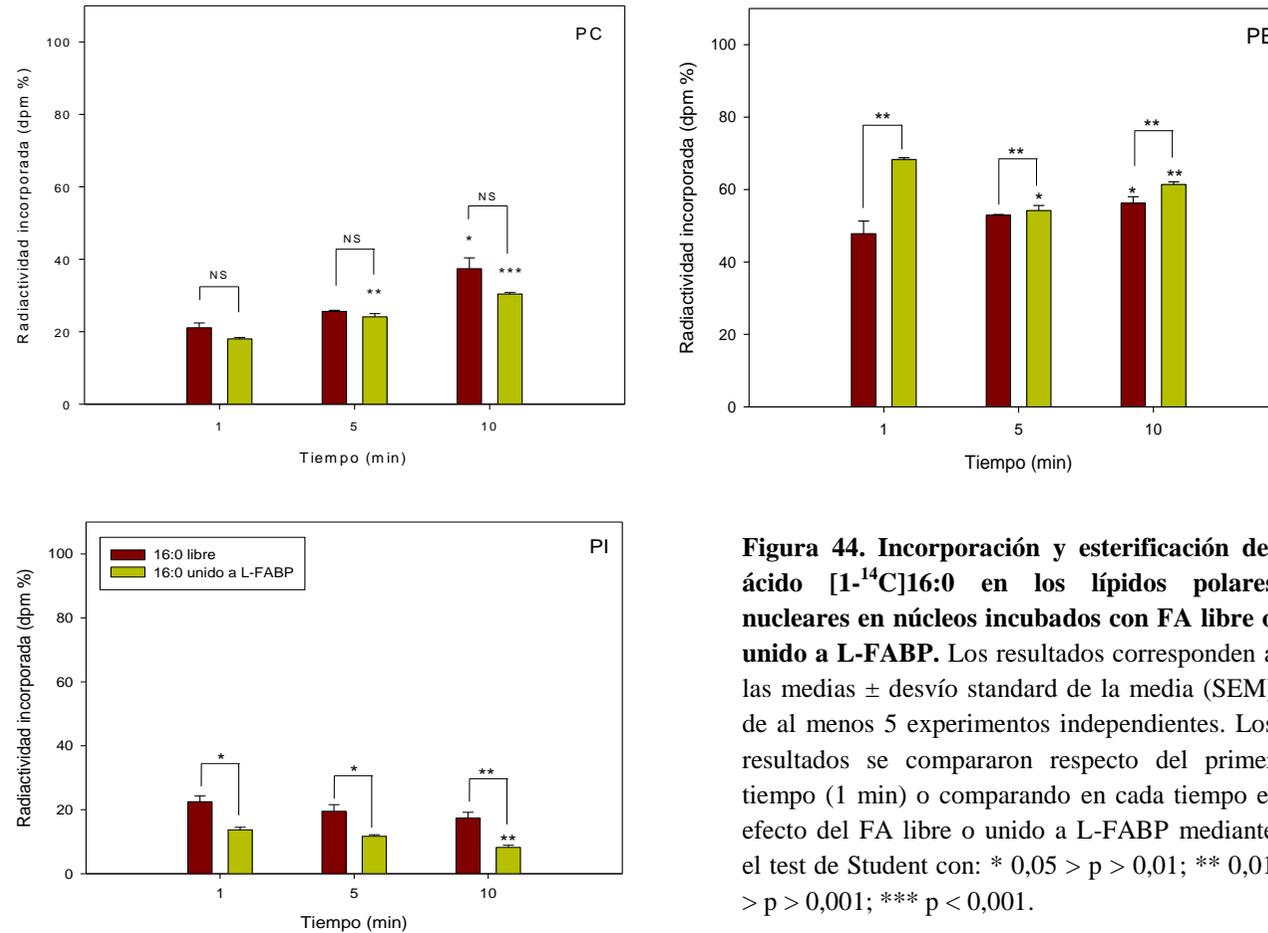


Figura 44. Incorporación y esterificación del ácido $[1-^{14}\text{C}]16:0$ en los lípidos polares nucleares en núcleos incubados con FA libre o unido a L-FABP. Los resultados corresponden a las medias \pm desvío standard de la media (SEM) de al menos 5 experimentos independientes. Los resultados se compararon respecto del primer tiempo (1 min) o comparando en cada tiempo el efecto del FA libre o unido a L-FABP mediante el test de Student con: * $0,05 > p > 0,01$; ** $0,01 > p > 0,001$; *** $p < 0,001$.

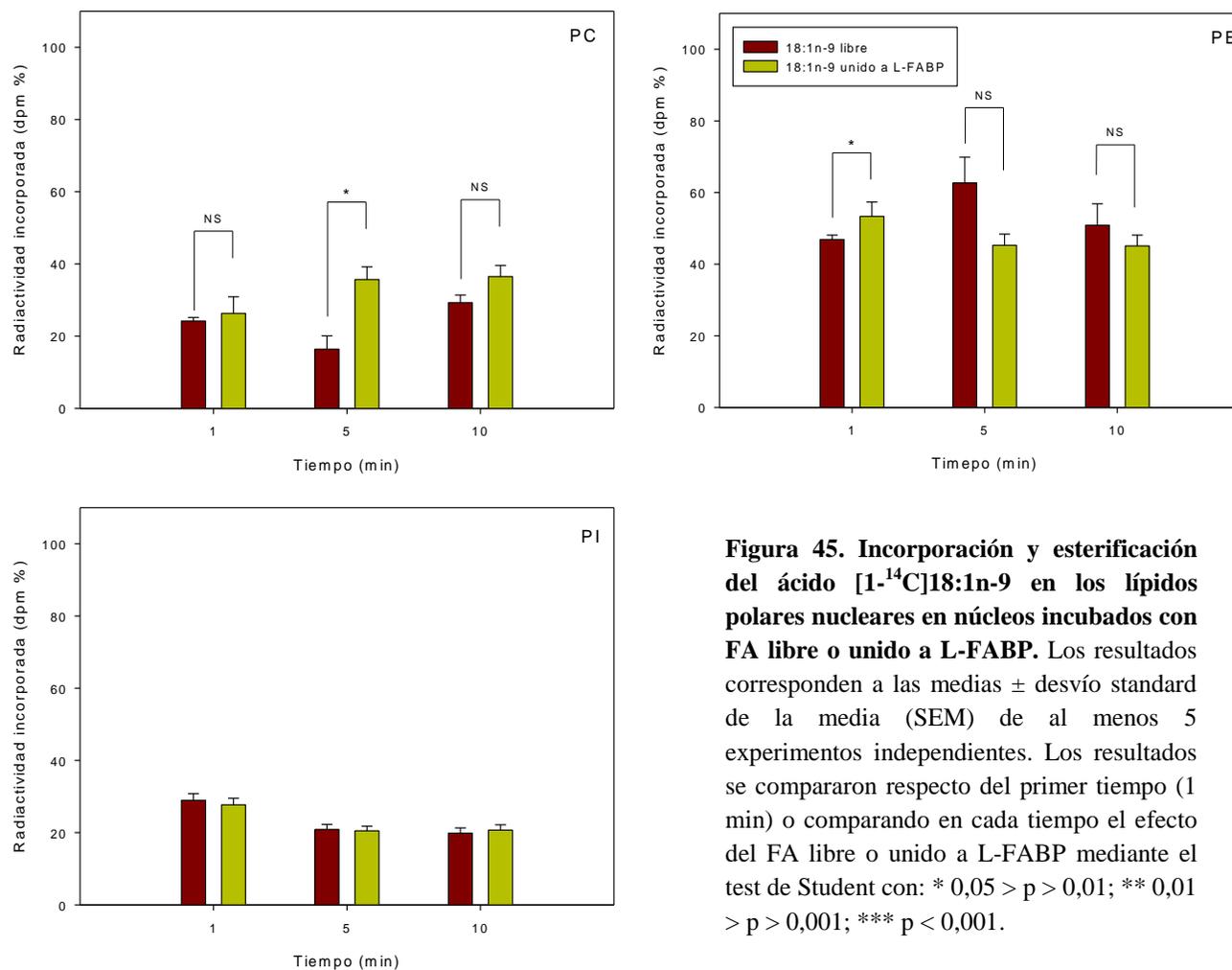
18:1n-9

Figura 45. Incorporación y esterificación del ácido [1-¹⁴C]18:1n-9 en los lípidos polares nucleares en núcleos incubados con FA libre o unido a L-FABP. Los resultados corresponden a las medias \pm desvío standard de la media (SEM) de al menos 5 experimentos independientes. Los resultados se compararon respecto del primer tiempo (1 min) o comparando en cada tiempo el efecto del FA libre o unido a L-FABP mediante el test de Student con: * $0,05 > p > 0,01$; ** $0,01 > p > 0,001$; *** $p < 0,001$.

Como ya se demostró en la sección **4.III.1**, los FA exógenos se incorporan inicialmente en forma mayoritaria como FA en el núcleo y luego en función del tiempo, se movilizan desde ese pool al de LP y LN donde se esterifican en los mismos en forma específica según el tipo de FA y clase lipídica.

Cuando el 16:0 llega al núcleo unido a la L-FABP se incorpora rápidamente como FA y la L-FABP a tiempos cortos promueve una mayor esterificación en LP y LN (**tablas 12 y 13**); hay una activa esterificación de 16:0 en TAG, CE y PE y disminución en PI. El 16:0 se esterifica en forma mucho más activa en LN que en LP.

Cuando el 18:1 llega al núcleo unido a la L-FABP se incorpora rápidamente como FA y la L-FABP a tiempos cortos promueve una mayor esterificación en CE; hay una muy activa esterificación de 18:1 en CE (**tablas 12 y 13**). Si bien aumenta la esterificación en TAG y CE a todos los tiempos ensayados, no llega a ser un cambio estadísticamente significativo.

Tabla 13. Incorporación de los FA [1-¹⁴C]16:0, [1-¹⁴C]18:1n-9, [1-¹⁴C]18:0 y [1-¹⁴C]20:4n-6 en los lípidos polares nucleares.

| 16:0 | | | | | | |
|--------------|-----------------|------------|-------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Tiempo (min) | <i>FA libre</i> | | | <i>FA:L-FABP</i> | | |
| | % (dpm) | | | % (dpm) | | |
| | <i>1</i> | <i>5</i> | <i>10</i> | <i>1</i> | <i>5</i> | <i>10</i> |
| PC | 21,1 ± 1,3 | 25,6 ± 0,3 | 37,4 ± 3,0* | 18,0 ± 0,4 | 24,1 ± 0,9** | 30,4 ± 0,4*** |
| PE | 47,8 ± 3,5 | 52,9 ± 0,2 | 56,2 ± 1,8* | 68,3 ± 0,5 ^b | 54,2 ± 1,4* ^b | 61,4 ± 0,7** ^b |
| PI | 22,5 ± 1,8 | 19,5 ± 2,1 | 17,4 ± 1,8 | 13,7 ± 0,8 ^a | 11,7 ± 0,5 ^a | 8,2 ± 0,7** ^b |

| 16:0 | | | | | | |
|--------------|-----------------------------|--------------|--------------|-----------------------------|------------------------|------------------------|
| Tiempo (min) | <i>FA libre</i> | | | <i>FA:L-FABP</i> | | |
| | <i>Actividad específica</i> | | | <i>Actividad específica</i> | | |
| | <i>1</i> | <i>5</i> | <i>10</i> | <i>1</i> | <i>5</i> | <i>10</i> |
| PC | 0,0 ± 0,0 | 0,17 ± 0,04* | 0,25 ± 0,04* | 0,16 ± 0,02 | 0,18 ± 0,01 | 0,31 ± 0,05* |
| PE | 0,3 ± 0,0 | 1,0 ± 0,2* | 1,0 ± 0,1* | 0,37 ± 0,05 | 0,25 ± 0,01 | 0,24 ± 0,02 |
| PI | 0,4 ± 0,0 | 0,4 ± 0,05 | 0,4 ± 0,1 | 4,2 ± 0,4 ^c | 3,2 ± 0,2 ^c | 4,6 ± 1,1 ^c |

Tabla 13 (Cont.)

| 18:1n-9 | | | | | | |
|---------------------|-----------------|------------|------------|-------------------------|-------------------------|------------|
| Tiempo (min) | <i>FA libre</i> | | | <i>FA:L-FABP</i> | | |
| | <i>%(dpm)</i> | | | <i>%(dpm)</i> | | |
| | <i>1</i> | <i>5</i> | <i>10</i> | <i>1</i> | <i>5</i> | <i>10</i> |
| PC | 24,2 ± 1,0 | 16,4 ± 3,7 | 29,3 ± 2,1 | 26,3 ± 4,6 | 35,7 ± 3,5 ^a | 36,5 ± 3,1 |
| PE | 46,9 ± 1,2 | 62,7 ± 7,2 | 50,9 ± 6,0 | 53,4 ± 4,0 ^a | 45,3 ± 3,1 | 45,1 ± 3,0 |
| PI | 28,9 ± 1,9 | 20,9 ± 1,4 | 19,8 ± 1,5 | 27,7 ± 1,8 | 20,5 ± 1,3 | 20,7 ± 1,5 |

| 18:1n-9 | | | | | | |
|---------------------|-----------------------------|-------------|-------------|-----------------------------|-------------|-------------|
| Tiempo (min) | <i>FA libre</i> | | | <i>FA:L-FABP</i> | | |
| | <i>Actividad específica</i> | | | <i>Actividad específica</i> | | |
| | <i>1</i> | <i>5</i> | <i>10</i> | <i>1</i> | <i>5</i> | <i>10</i> |
| PC | 0,1 ± 0,0 | 0,08 ± 0,02 | 0,13 ± 0,02 | 0,06 ± 0,01 | 0,13 ± 0,03 | 0,13 ± 0,02 |
| PE | 0,5 ± 0,1 | 0,86 ± 0,04 | 0,6 ± 0,1 | 0,35 ± 0,03 | 0,5 ± 0,2 | 0,5 ± 0,07 |
| PI | 0,7 ± 0,2 | 0,7 ± 0,04 | 0,5 ± 0,06 | 0,6 ± 0,2 | 0,7 ± 0,05 | 0,6 ± 0,04 |

Tabla 13 (Cont.)

| 18:0 | | | | | | |
|---------------------|-----------------------------|------------|------------|-----------------------------|------------|------------|
| Tiempo (min) | <i>FA libre</i> | | | <i>FA:L-FABP</i> | | |
| | <i>% (dpm)</i> | | | <i>% (dpm)</i> | | |
| | <i>1</i> | <i>5</i> | <i>10</i> | <i>1</i> | <i>5</i> | <i>10</i> |
| PC | 32,9 ± 2,5 | 20,4 ± 0,8 | 21,4 ± 2,7 | 27,0 ± 2,1 | 20,3 ± 0,2 | 19,3 ± 3,3 |
| PE | 57,2 ± 3,3 | 65,6 ± 5,8 | 68,0 ± 5,7 | 63,0 ± 1,8 | 68,0 ± 5,0 | 67,8 ± 4,8 |
| PI | 6,0 ± 1,2 | 7,0 ± 0,7 | 5,3 ± 0,5 | 5,2 ± 0,5 | 5,3 ± 0,9 | 6,0 ± 0,7 |
| PS | 3,9 ± 1,1 | 7,0 ± 0,05 | 5,3 ± 0,4 | 2,8 ± 0,6 | 6,4 ± 1,6 | 6,9 ± 1,0 |
| 18:0 | | | | | | |
| Tiempo (min) | <i>FA libre</i> | | | <i>FA:L-FABP</i> | | |
| | <i>Actividad específica</i> | | | <i>Actividad específica</i> | | |
| | <i>1</i> | <i>5</i> | <i>10</i> | <i>1</i> | <i>5</i> | <i>10</i> |
| PC | 1,1 ± 0,3 | 1,0 ± 0,2 | 1,4 ± 0,3 | 0,9 ± 0,4 | 1,0 ± 0,2 | 1,2 ± 0,3 |
| PE | 5,6 ± 1,7 | 9,1 ± 1,5 | 12,9 ± 1,9 | 6,1 ± 1,6 | 9,9 ± 1,6 | 12,7 ± 1,5 |
| PI | 1,4 ± 0,6 | 2,2 ± 0,4 | 2,3 ± 0,4 | 1,2 ± 0,4 | 1,8 ± 0,5 | 2,6 ± 0,4 |

Tabla 13 (Cont.)

| 20:4n-6 | | | | | | |
|---------------------|-----------------------------|------------|------------|-----------------------------|------------|------------|
| Tiempo (min) | <i>FA libre</i> | | | <i>FA:L-FABP</i> | | |
| | <i>% (dpm)</i> | | | <i>% (dpm)</i> | | |
| | <i>1</i> | <i>5</i> | <i>10</i> | <i>1</i> | <i>5</i> | <i>10</i> |
| PC | 51,5 ± 2,2 | 56,8 ± 2,6 | 59,1 ± 8,0 | 45,4 ± 1,6 | 64,0 ± 5,0 | 59,3 ± 0,5 |
| PE | 29,7 ± 1,5 | 28,5 ± 1,4 | 21,9 ± 6,3 | 35,4 ± 2,0 | 20,9 ± 7,6 | 22,3 ± 1,8 |
| PI | 18,0 ± 0,4 | 13,1 ± 1,3 | 16,4 ± 1,9 | 17,7 ± 0,6 | 7,9 ± 1,8 | 17,7 ± 0,9 |
| PS | 1,2 ± 0,2 | 1,4 ± 0,05 | 2,6 ± 0,1 | 1,3 ± 0,05 | 2,0 ± 0,2 | 2,0 ± 0,05 |
| 20:4n-6 | | | | | | |
| Tiempo (min) | <i>FA libre</i> | | | <i>FA:L-FABP</i> | | |
| | <i>Actividad específica</i> | | | <i>Actividad específica</i> | | |
| | <i>1</i> | <i>5</i> | <i>10</i> | <i>1</i> | <i>5</i> | <i>10</i> |
| PC | 2,8 ± 0,7 | 3,6 ± 0,6 | 4,0 ± 0,9 | 2,6 ± 0,4 | 4,6 ± 1,2 | 4,3 ± 0,7 |
| PE | 4,8 ± 1,1 | 5,4 ± 0,9 | 4,4 ± 1,7 | 6,0 ± 0,9 | 4,4 ± 0,9 | 4,8 ± 0,8 |
| PI | 6,8 ± 1,5 | 5,8 ± 1,3 | 7,6 ± 1,6 | 6,9 ± 1,1 | 3,8 ± 1,2 | 8,8 ± 1,2 |

Los resultados se presentan como actividad específica de esterificación (pmol de [$1\text{-}^{14}\text{C}$]FA esterificado / nmol de cada pool lipídico). Los resultados corresponden a las medias \pm desvío standard de la media (SEM) de al menos 5 experimentos independientes. Los resultados se compararon respecto del primer tiempo (1 min) mediante el test de Student con: * $0,05 > p > 0,01$; ** $0,01 > p > 0,001$; *** $p < 0,001$. Los resultados correspondientes a los ácidos 18:0 y 20:4n-6 corresponden a resultados previos de nuestro laboratorio [4].

Para hacer un análisis comparativo del efecto de la L-FABP en la incorporación de FA en los lípidos nucleares, en la **tabla 12** se recopilaron los datos de esta tesis junto con resultados previos del laboratorio con los ácidos 18:0 y 20:4n-6 [4]. Al hacer esta comparación se observa claramente que los FA 16:0 y 18:1n-9 se esterifican en forma mucho más activa en LN que los FA 18:0 y 20:4n-6.

Al expresar los resultados como actividades específicas (**Tabla 12**) se puede observar que los FA 16:0 y 18:1n-9 se esterifican en forma más activa en TAG seguido de CE y luego en LP; en cambio los FA 18:0 y 20:4n-6 se esterifican más en LP que en TAG y no se esterifican en CE.

Como ya hemos demostrado en la sección 4.III.1 los FA estudiados se esterificaron en los LP nucleares mayoritarios, PC, PE y PI mediante un mecanismo acil-CoA dependiente (**Tabla 12**). Cuando los FA están unidos a L-FABP, ninguno de ellos se esterificó en la SM nuclear en las condiciones ensayadas, indicando que la SM una vez sintetizada en el citosol, no remodelaría sus FA en el núcleo. Estos mismos resultados se obtuvieron cuando los FA estaban libres (*sección 4.III.1*).

Los FA 16:0, 18:0 y 18:1n-9 unidos a L-FABP se esterificaron en mayor proporción (%) en PE respecto a PC y PI, mientras que por el contrario, el 20:4n-6:L-FABP se esterificó en mayor proporción en PC respecto de PE y PI (**Tabla 13**).

Cuando se analiza la actividad específica de esterificación en LP (**Tabla 13**) se observan diferencias contrastantes, el 16:0:L-FABP posee mayor actividad específica en PI que el 16:0 libre. No se observaron diferencias en la esterificación de los FA 18:0 y 20:4n-6 cuando el FA está libre o unido a L-FABP.

A su vez, analizando cada clase lipídica en particular se encuentra especificidad respecto del FA cuando el mismo está unido a L-FABP y también respecto de la clase de LP nuclear, a saber:

PC: 20:4 > 18:0 > > 16:0 ≈ 18:1

PE: 18:0 > 20:4 >> 16:0 ≈ 18:1

PI: 20:4 > 16:0 > 18:0 > 18:1

Es interesante remarcar que la cuando los FA están unidos a L-FABP se esterifica en PI más activamente el 16:0 respecto a los FA 18:0 y 18:1 (Actividad específica), mientras que cuando el FA está libre el ácido 18:0 es el que se esterifica en forma más activa en PI respecto de 16:0 y 18:1 (*sección 4.III.1*).

Por lo tanto, estas diferencias en la esterificación de los diferentes FA:L-FABP en las distintas clases de LP podría estar determinando la composición final de estos lípidos.

La L-FABP favorece la movilización de los ácidos 16:0 y 18:1n-9 desde el pool de FA hacia los pools de LN y LP del núcleo.

La L-FABP favorece la movilización y esterificación de 16:0 y 18:1n-9 a CE

La esterificación de estos FA unidos a L-FABP en los LP presenta particularidades según el ácido.

El 16:0:L-FABP se esterifica en PE probablemente movilizado a partir del pool de PI.

El 18:1n-9:L-FABP se esterifica en forma alternada entre PC y PE.

4.III.3. Transporte reverso de ácidos grasos desde el núcleo hacia el citosol

Habiendo demostrado que la L-FABP favorece la movilización de FA exógenos hacia el núcleo donde los FA se esterifican en los lípidos que se localizan en los diferentes compartimentos nucleares (DMN, Matriz nuclear y nLD), con especificidad respecto del FA y la clase lipídica, el siguiente objetivo fue determinar si existe un transporte reverso de FA desde el núcleo hacia el citosol y el rol de la L-FABP en el mismo.

Con este propósito en una primera etapa se marcaron con $[1-^{14}\text{C}]$ FA las diferentes clases lipídicas nucleares (N^*) y luego los N^* se incubaron con L-FABP delipidada. Finalmente, se analizó la radiactividad incorporada en los lípidos nucleares y la liberada al medio de incubación. El esquema general se presenta en la [figura 46](#).

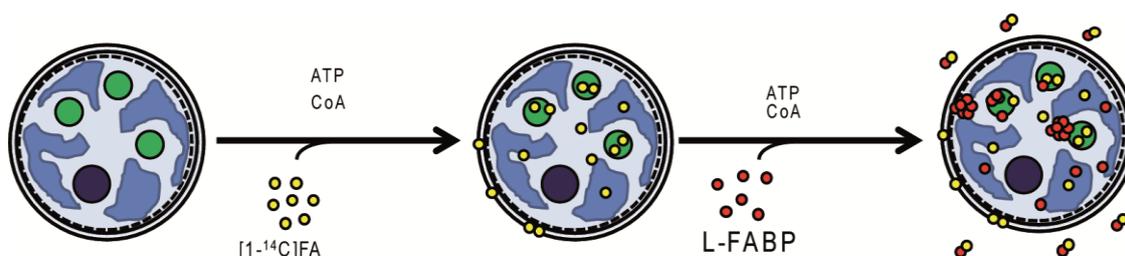


Figura 46. Esquema del protocolo experimental para determinar el transporte reverso de FA nucleares mediado por la L-FABP. Se incubaron núcleos aislados con $[1-^{14}\text{C}]$ FA posteriormente con L-FABP delipidada. Se analizó en forma comparativa la distribución de la radiactividad en los núcleos y en el medio de incubación como se detalla en la *sección 7.11.2 (Materiales y métodos)*.

4.III.3.1. Efecto de la L-FABP en la movilización y liberación de ácidos grasos nucleares

Para realizar las incubaciones que se detallan en la [figura 46](#) se eligieron los FA 18:0, 18:1n-9 y 20:4n-6 ya que son los mayoritarios de LP y LN. Las incubaciones se realizaron con L-FABP y con seroalbúmina bovina (BSA) delipidadas, ya que si bien la BSA no se encuentra en el citosol como sí lo está la L-FABP, el objetivo de los ensayos con BSA fue determinar si los FA nucleares se movilizan en forma específica por la L-FABP o por otra proteína que una lípidos.

Al marcar los núcleos con $[1-^{14}\text{C}]$ FA durante 10 minutos de incubación y sin adición de L-FABP o BSA la radiactividad se recuperó mayoritariamente en la fracción nuclear (N) (76 - 99 % de total) y sólo el 34 % permaneció en el incubación (MI) (**Figura 47**). La radiactividad en el núcleo correspondía mayoritariamente a la fracción lipídica (Nc) (75 - 99%), mientras que una pequeña fracción se transformó en componentes solubles en medio acuoso (Na) (0,1 - 25 %). En el MI el 50-90 % de la radiactividad se recuperó en la fracción lipídica (MIc) y entre un 10 - 50 % en la fracción acuosa (MIa).

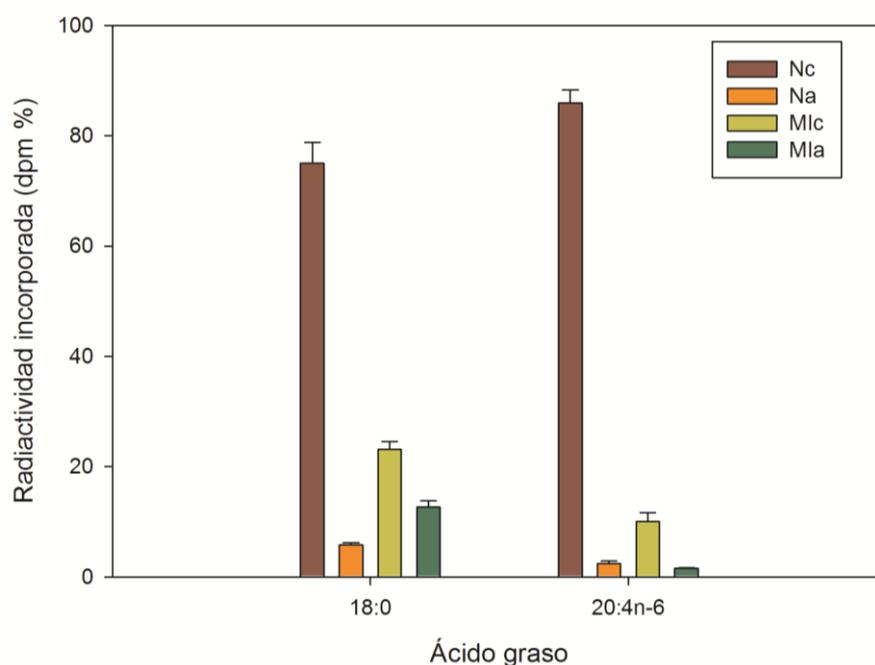


Figura 47. Distribución de la radiactividad incorporada.

Radiactividad incorporada en las distintas fracciones luego de 10 min de incubación en ausencia de L-FABP o BSA. N: núcleos; MI: medios de incubación; “c”: fase clorofórmica; y “a”: fase acuosa.

Para evaluar la hipótesis de que la L-FABP promueve la liberación de FA desde el núcleo hacia el citosol, se analizó por TLC en qué clases lipídicas se había incorporado la radiactividad en la fracción MIc. Como se observa en la **figura 48** la L-FABP promovió la liberación de FA al MI en función de la concentración, dado que toda la radiactividad se recuperó como FA libre. Debido al bajo contenido de radiactividad de la fracción MIa los componentes solubles en agua no pudieron cuantificarse. Podemos considerar que los compuestos solubles en medio acuoso corresponden a acil-CoAs.

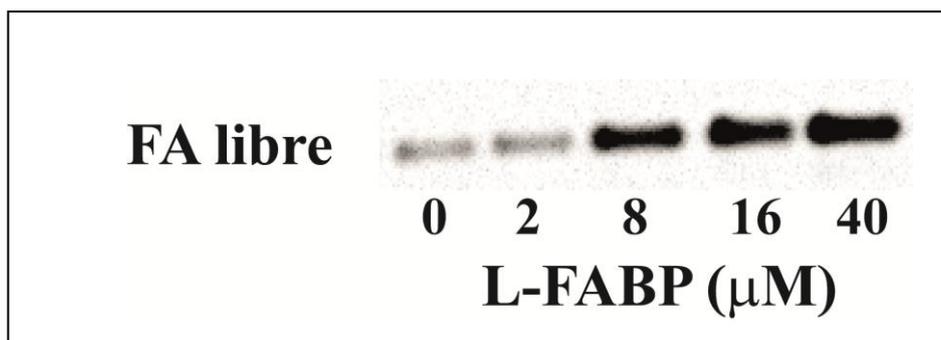


Figura 48. Cromatografía en capa fina (TLC) de LN de medios de incubación (MIc). Se incubaron núcleos aislados con $[1-^{14}\text{C}]$ FA y posteriormente con concentraciones crecientes de L-FABP delipidada. Luego de la incubación los lípidos del medio de incubación (MI) se extrajeron y resolvieron por TLC y se cuantificó la radiactividad como se indicara en la *sección 7.10.1*. Sólo se muestra la sección de la placa de TLC que correspondiente a los FA libres ya que fue donde se observó marca radiactiva (100%).

Para cuantificar la liberación de FA por la L-FABP, se definió el parámetro “Liberación %”, definido como:

$$\text{Liberación (\%)} = \frac{\text{Radiactividad incorporada en MI}}{(\text{Radiactividad incorporada en N} + \text{Radiactividad incorporada en MI})} \times 100$$

En la [figura 49](#) se representa la “Liberación %” en función de la concentración de L-FABP.

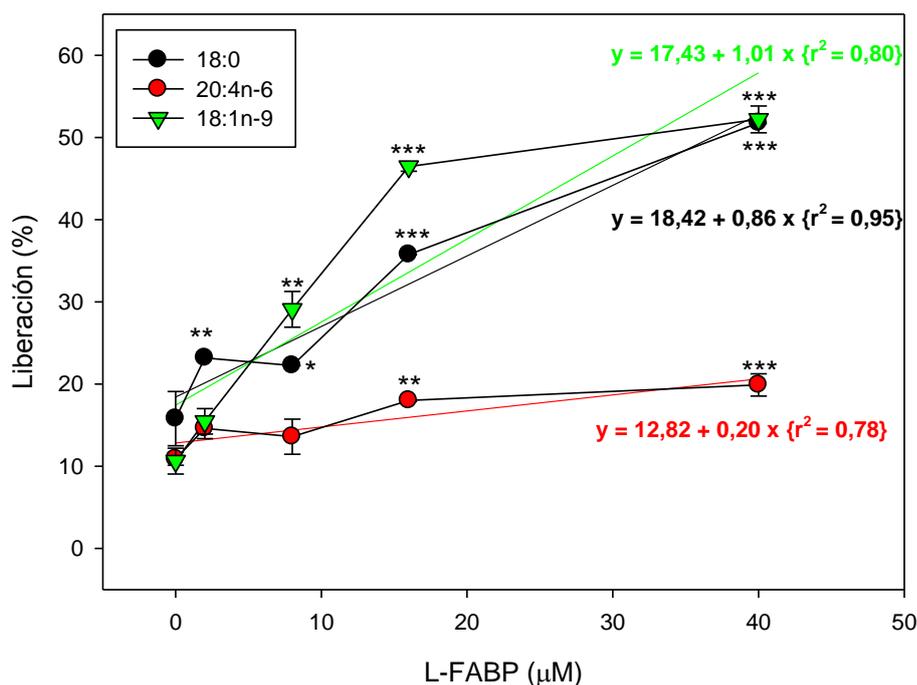


Figura 49. Efecto de la L-FABP en la Liberación de FA fuera del núcleo. Núcleos marcados previamente con $[1-^{14}\text{C}]\text{FA}$ se incubaron con L-FABP y se cuantificó la liberación de FA al MI. Los resultados se compararon respecto de la concentración $0\mu\text{M}$ mediante el test de Student con: * $0,05 > p > 0,01$; ** $0,01 > p > 0,001$; *** $p < 0,001$.

La L-FABP promueve la liberación de los tres FA estudiados desde el núcleo (N) al medio de incubación (MI).

Es interesante notar que la liberación de 18:0 y 18:1n-9 no se satura con ninguna de las concentraciones de L-FABP estudiadas, como sí ocurre en el caso del 20:4n-6. Ahora bien, al comparar las pendientes de las curvas de liberación de los tres FA estudiados por L-FABP, se observa que la liberación fue entre 4 y 5 veces mayor en el caso del 18:1n-9 y 18:0 respecto del 20:4n-6. Estos resultados son consistentes con las constantes de disociación (K_D) de la L-FABP para los diferentes FA [10], puesto que para en el caso de 18:0 y 18:1n-9 la K_D es de 9 nM mientras que para 20:4n-6 es de 48 nM, y por lo tanto la mayor afinidad de la L-FABP por los dos primeros FA posibilita una mayor movilización de estos FA al MI donde permanecerían unidos a la L-FABP y explicaría por qué la liberación de estos FA no se satura y sí lo hace la de 20:4n-6..

La L-FABP habilitaría un pool soluble de FA sumado a los otros pools lipídicos en los cuales los FA se encuentran esterificados.

El siguiente objetivo fue determinar si el proceso de liberación de FA del N al MI era un proceso específico de la L-FABP. Para este fin se realizaron experimentos análogos pero esta vez con BSA en lugar de L-FABP y los FA 18:0 y 20:4n-6.

En la **figura 50** se recopilan los resultados obtenidos cuando se incubaron *in vitro* N previamente marcados con $[1-^{14}\text{C}]18:0$ y $20:4n-6$ con concentraciones crecientes de BSA y se presentan en forma comparativa con los respectivos ensayos con L-FABP y los mismos FA..

La BSA promueve la liberación desde el N al MI de los dos FA estudiados y dicha liberación se satura a bajas concentraciones incluso para el caso del 18:0. Por lo tanto la liberación de FA desde el N al MI no sería un proceso promovido en forma específica por la L-FABP ya que la BSA que posee varios sitios de unión para FA también lo favorece [11].

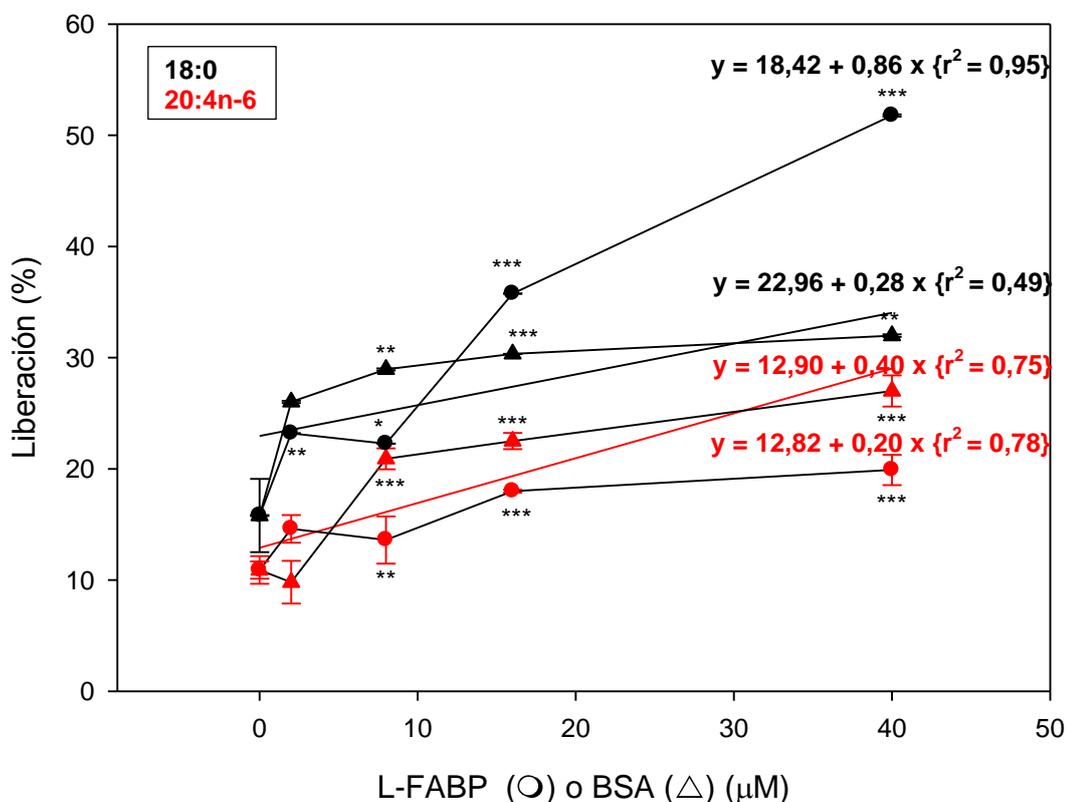


Figura 50. Efecto de la L-FABP y BSA en la Liberación de FA fuera del núcleo. Núcleos marcados previamente con $[1-^{14}\text{C}]$ FA se incubaron con L-FABP o BSA y se cuantificó la liberación de FA al MI. . Los resultados se compararon respecto de la concentración $0\mu\text{M}$ mediante el test de Student con: * $0,05 > p > 0,01$; ** $0,01 > p > 0,001$; *** $p < 0,001$.

4.III.3.2.Efecto de la L-FABP en la movilización y distribución nuclear de 18:0, 18:1n-9 y 20:4n-6

Habiendo demostrado en la sección anterior que la L-FABP exógena, se internaliza en el núcleo y favorece la liberación FA del núcleo al medio de incubación, el siguiente objetivo fue determinar el origen de los FA movilizados hacia el exterior por la L-FABP. Con este fin, siguiendo el esquema experimental de la sección anterior, se determinó en qué clase lipídica se había incorporado la radiactividad en función de la concentración de L-FABP utilizada.

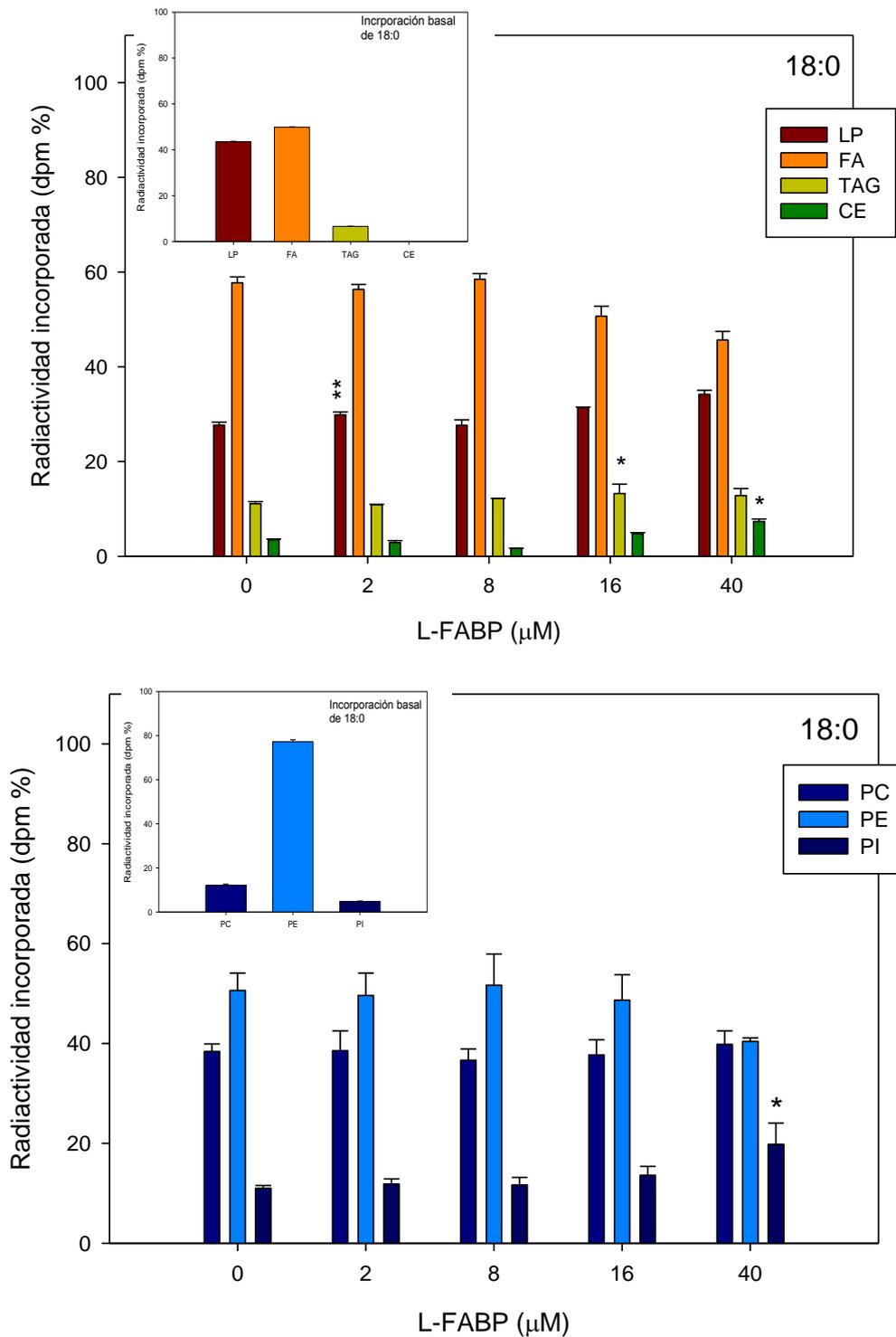


Figura 51. Movilización y distribución nuclear de 18:0. Perfiles de distribución de la radiactividad de los distintos FA en los pools de LN y LP del núcleo luego de la incubación con concentración crecientes de L-FABP. Los insertos representan los datos de incorporación basal de 18:0 en el N luego de 10 min de incubación (*Tablas 8 y 9 - sección 4.III.1.3*), estos N luego se incubaron con L-FABP. Los resultados se compararon respecto de la concentración 0μM mediante el test de Student con: * 0,05 > p > 0,01; ** 0,01 > p > 0,001; *** p < 0,001.

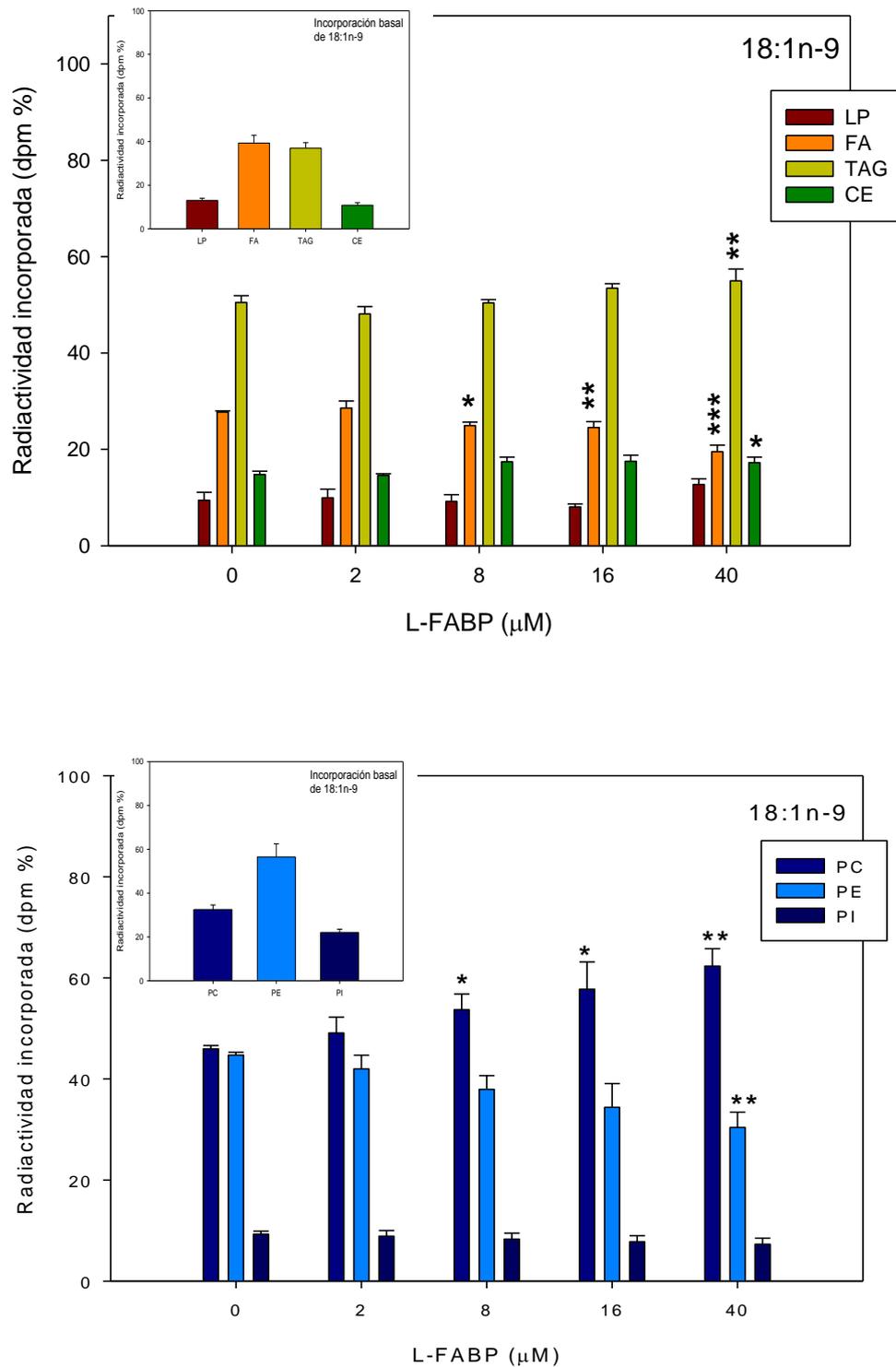


Figura 52. Movilización y distribución nuclear de 18:1n-9. Perfiles de distribución de la radiactividad de los distintos FA en los pools de LN y LP del núcleo luego de la incubación con concentración crecientes de L-FABP. Los insertos representan los datos de incorporación basal de 18:1n-9 en el N luego de 10 min de incubación (*Tablas 8 y 9 - sección 4.III.1.3*), previo a la incubación con L-FABP. Los resultados se compararon respecto de la concentración 0 μM mediante el test de Student con: * 0,05 > p > 0,01; ** 0,01 > p > 0,001; *** p < 0,001.

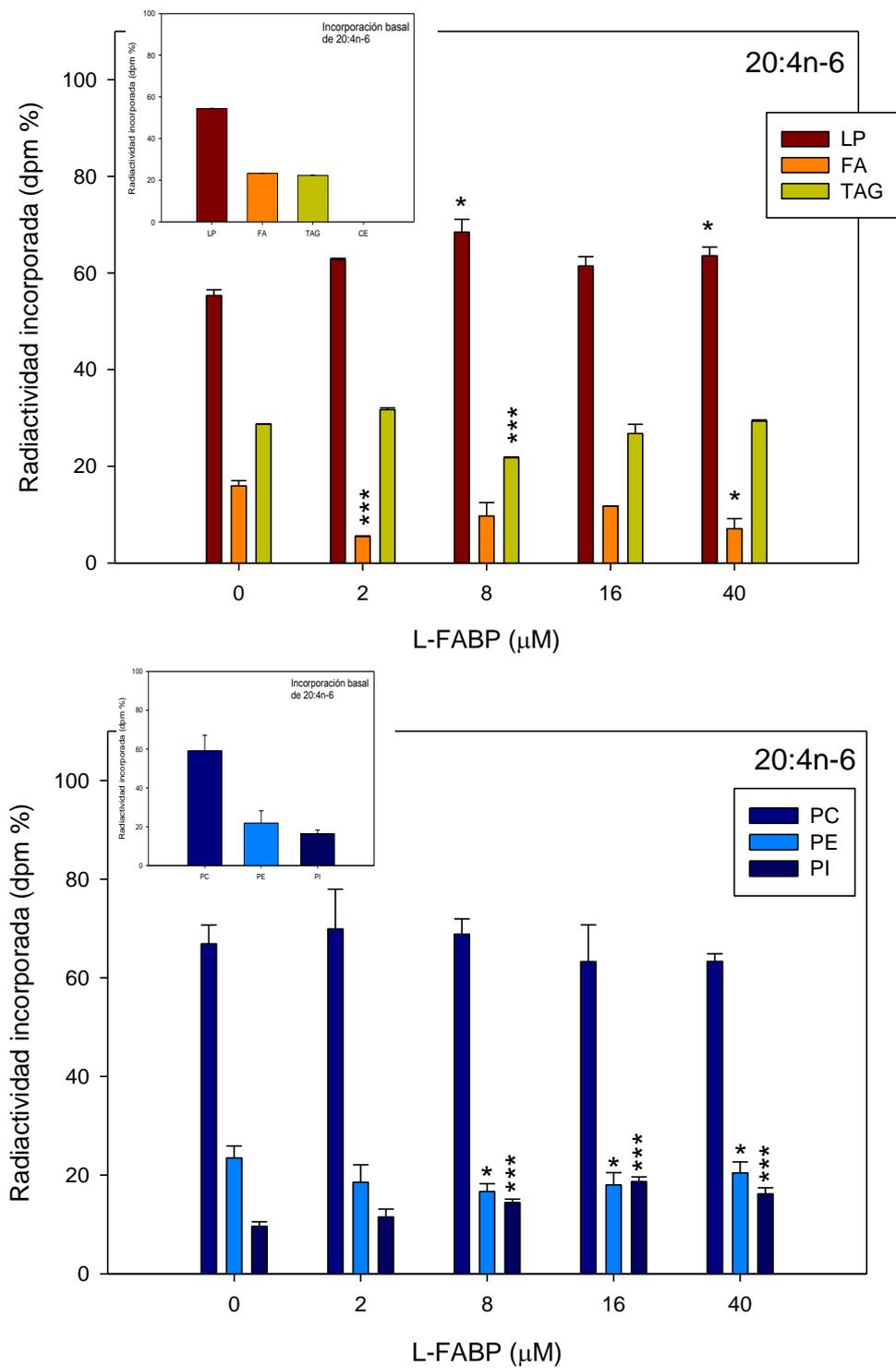


Figura 53. Movilización y distribución nuclear de 20:4n-6. Perfiles de distribución de la radiactividad de los distintos FA en los pools de LN y LP del núcleo luego de la incubación con concentración crecientes de L-FABP. Los insertos representan los datos de incorporación basal de 20:4n-6 en el N luego de 10 min de incubación (*Tablas 8 y 9 - sección 4.III.1.3*), previo a la incubación con L-FABP. Los resultados se compararon respecto de la concentración 0μM mediante el test de Student con: * 0,05 > p > 0,01; ** 0,01 > p > 0,001; *** p < 0,001.

La L-FABP promueve la movilización y redistribución de los tres FA ensayados en los pools lipídicos nucleares.

La L-FABP promueve la movilización del 18:1n-9 nuclear que se encuentra como FA y esterificado en PE hacia los pools de PC, TAG y CE donde se esterifica en los mismos (**Figuras 51, 52 y 53**).

La L-FABP promueve la movilización del 20:4n-6 entre LP y LN dependiendo de la concentración de L-FABP; se observaron aumentos en la esterificación en LP (PI) y un descenso en TAG a concentraciones intermedias y un descenso en el pool de FA y PE.

La L-FABP promueve la movilización del 18:0, estos resultados son difíciles de explicar ya que no se observa una disminución significativa del pool de FA, mientras que se observó un aumento en la esterificación en LP (PI), y aumentos en TAG y CE a altas concentraciones.

La L-FABP favorece la movilización de FA de los distintos pools lipídicos con características propias según el FA

La L-FABP favorece la movilización de FA provenientes de LN y LP fuera del núcleo

4.III.3.3.Efecto comparativo de la BSA en la movilización de ácidos grasos nucleares

Con el fin de determinar si Los FA nucleares solo son movilizados por la FABP, se realizaron experimentos análogos pero esta vez con BSA en lugar de L-FABP. En este caso sólo se utilizaron los ácidos 18:0 y 20:4n-6. En la [figura 54](#) se recopilan los resultados obtenidos para BSA en forma comparativa con los antes analizados para L-FABP.

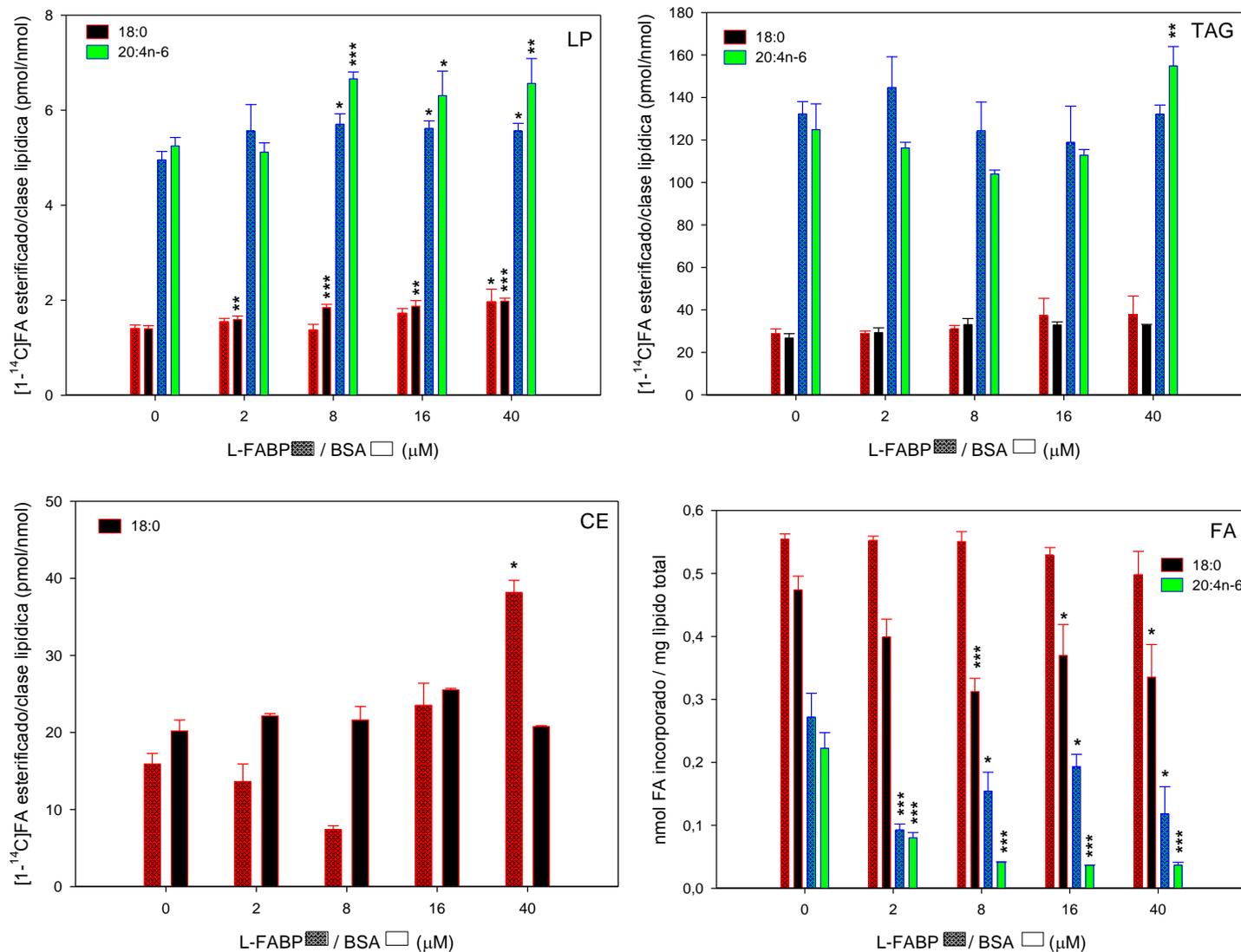


Figura 54. Efecto de la proteína transportadora sobre la incorporación y esterificación de FA en los lípidos neutros nucleares. Luego de incubar N 10 min en presencia de 18:0 o 20:4n-6, estos N se incubaron con L-FABP o BSA. Los resultados corresponden a las medias \pm desvío standard de la media (SEM) de al menos 5 experimentos independientes. Los resultados se compararon respecto de la concentración 0 μM mediante el test de Student con: * 0,05 > p > 0,01; ** 0,01 > p > 0,001; *** p < 0,001.

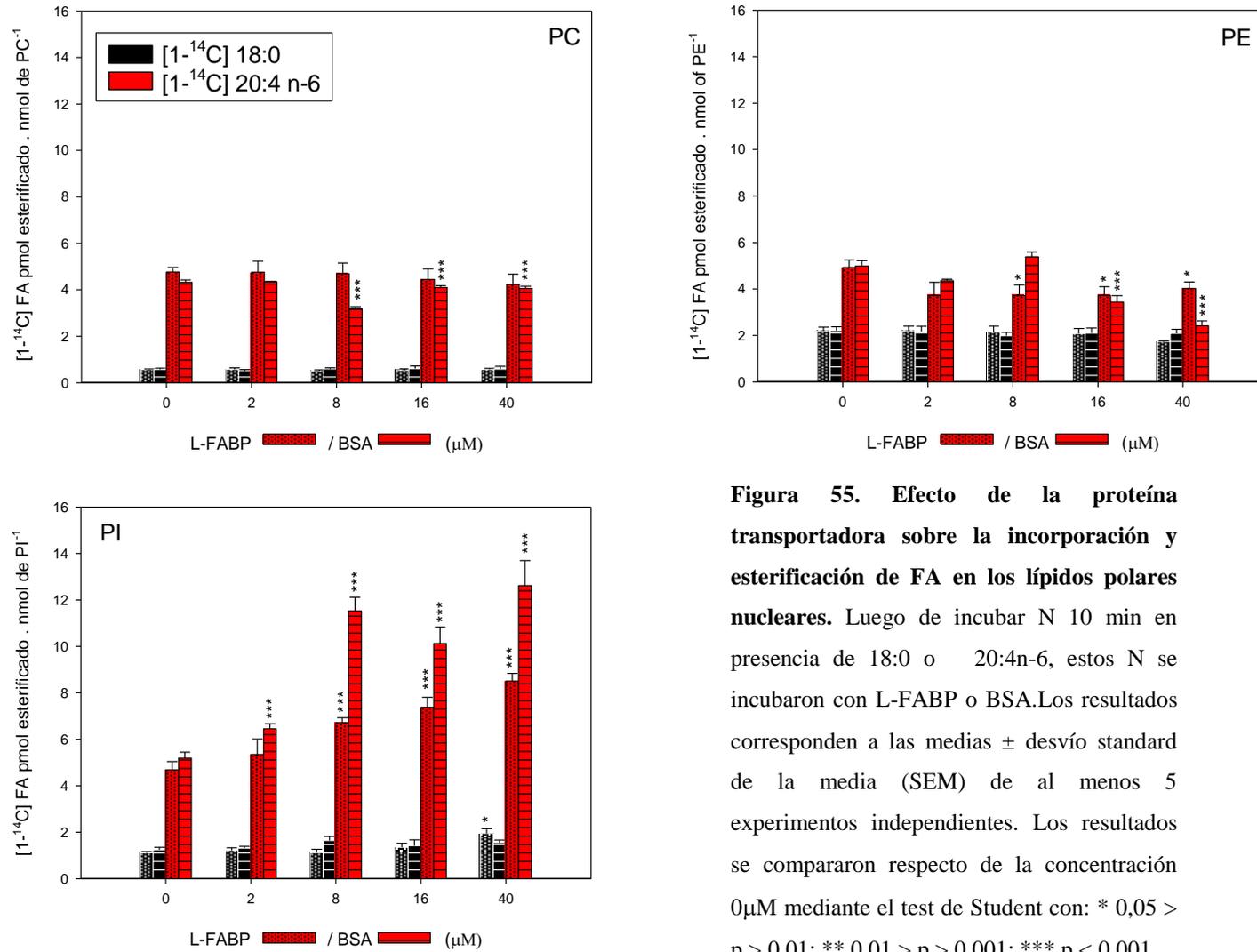


Figura 55. Efecto de la proteína transportadora sobre la incorporación y esterificación de FA en los lípidos polares nucleares. Luego de incubar N 10 min en presencia de 18:0 o 20:4n-6, estos N se incubaron con L-FABP o BSA. Los resultados corresponden a las medias ± desvío standard de la media (SEM) de al menos 5 experimentos independientes. Los resultados se compararon respecto de la concentración 0μM mediante el test de Student con: * 0,05 > p > 0,01; ** 0,01 > p > 0,001; *** p < 0,001.

La BSA también movilizó los FA nucleares en forma equivalente a la L-FABP y por lo tanto la movilización de FA desde el núcleo al citosol no es específica de L-FABP.

En términos generales la BSA movilizó los FA nucleares con un mismo perfil que la L-FABP y en algunos casos los efectos fueron mayores y más significativos. Ambas proteínas promueven la movilización de los los FA 20:4n-6 y 18:0 desde el pool de FA libre nuclear hacia los LP donde se esterifican .

La L-FABP favorece la movilización y remodelado de los FA de las diferentes clases lipídicas nucleares.

Este efecto no es específico de la L.FABP sino que la BSA también lo produce con características comparables.

4.III.3.4.Efecto de la L-FABP en la movilización de ácidos grasos

endonucleares

Habiendo determinado que la L-FABP favorece la movilización de FA dentro del núcleo y hacia el exterior, el siguiente objetivo fue determinar si en ausencia de la membrana nuclear, la L-FABP promueve la movilización de los FA endonucleares con las mismas características que cuando el núcleo está completo. Para ello se marcaron radiactivamente las clases lipídicas endonucleares incubando matrices nucleares con $[1-^{14}\text{C}]20:4n-6$ y posteriormente con concentraciones crecientes de L-FABP (Figura 56).

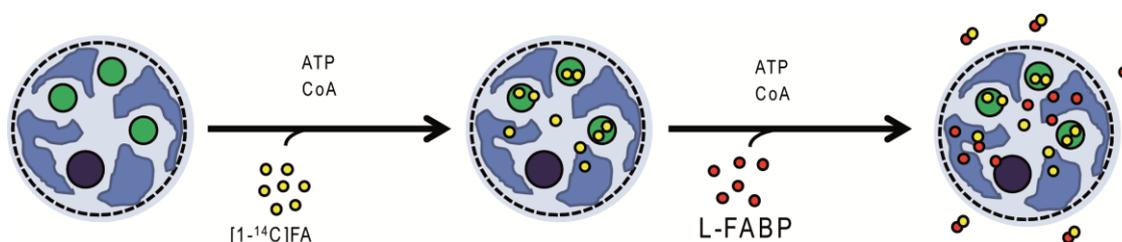


Figura 56. Esquema del protocolo experimental para determinar el transporte reverso de FA endonucleares mediado por la L-FABP. Se incubaron matrices nucleares aisladas con $[1-^{14}\text{C}]$ FA y luego con L-FABP delipidada. Finalmente se analizó la distribución de la radiactividad en matrices nucleares y medios de incubación.

Luego de la incubación se analizó la distribución de la radiactividad incorporada y/o esterificada (Figuras 57 y 58). En estas condiciones se observó que la L-FABP moviliza el 20:4n-6 que se encuentra como FA, favorece su esterificación tanto en LP como en LN (TAG y CE) y su liberación al medio de incubación.

La L-FABP promueve la esterificación del 20:4n-6 en PC, PE y PI a todas las concentraciones ensayadas. Es llamativo que no favoreció la esterificación en PS que es un componente cuantitativamente importante de los LP de la matriz.

La **figura 59** se presentan los resultados del efecto de concentraciones crecientes de L-FABP en la liberación de FA desde el núcleo y la matriz nuclear al medio de incubación (datos de la **sección 4.III.3.1**) Estos resultados demuestran claramente que cuando la MN no está presente, la L-FABP libera mucho más 20:4n-6 al medio de incubación, ya que la liberación de FA desde lamatriz nuclear es mucho mayor comparada con la del núcleo entero. Por lo tanto podemos inferir que la MN está regulando y limitando el tránsito de FA al MI.

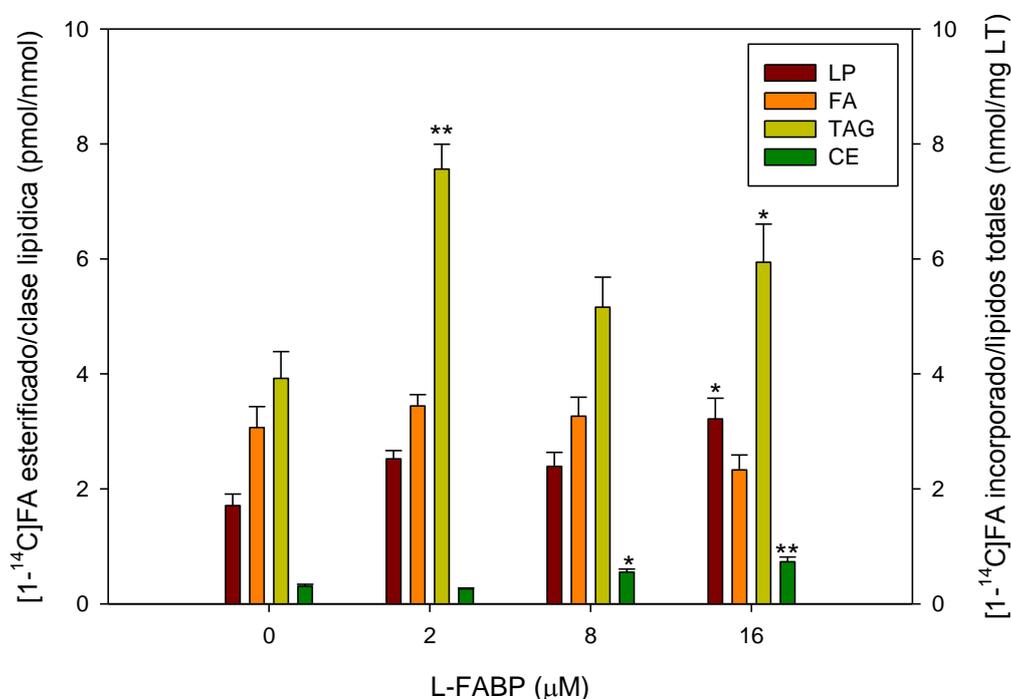


Figura 57. Movilización y distribución endonuclear de 20:4n-6. Perfiles de distribución de la radiactividad de 20:4n-6 en los pools de LN de la matriz nuclear luego de la incubación con concentraciones crecientes de L-FABP. Los resultados para LP, TAG y CE se expresaron como pmol de FA esterificado por nmol de cada clase lipídica; los resultados de FA se expresaron como nmol de FA incorporado por mg. de lípido total (LT). Los resultados se compararon respecto de la concentración 0μM mediante el test de Student con: * 0,05 > p > 0,01; ** 0,01 > p > 0,001; *** p < 0,001.

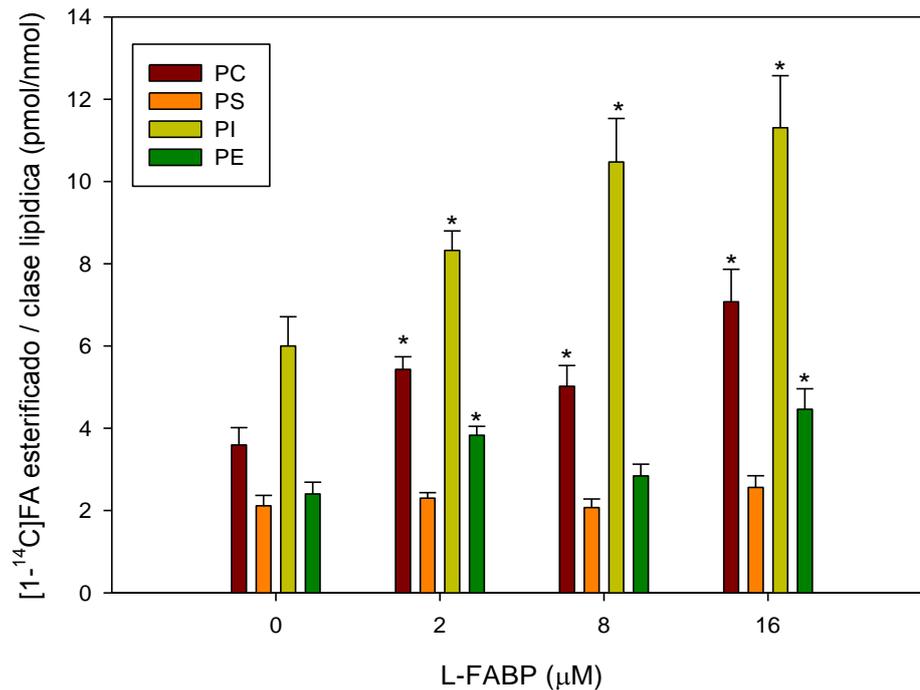


Figura 58. Movilización y distribución endonuclear de 20:4n-6. Perfiles de distribución de la radiactividad de 20:4n-6 en los pools de LP de la matriz nuclear luego de la incubación con concentraciones crecientes de L-FABP. Los resultados se compararon respecto de la concentración 0μM mediante el test de Student con: * 0,05 > p > 0,01; ** 0,01 > p > 0,001; *** p < 0,001.

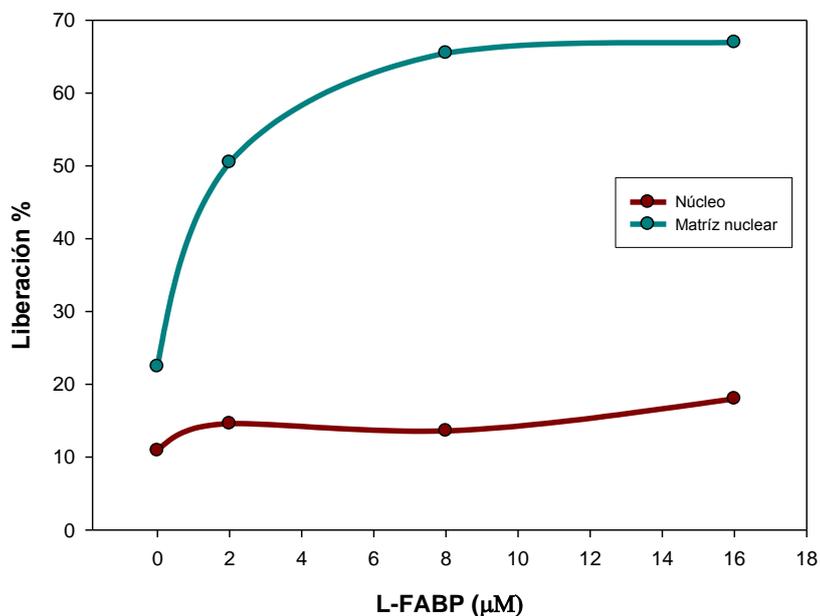


Figura 59. Efecto de L-FABP y BSA en la proteína transportadora sobre la liberación de FA desde el núcleo y la matriz nuclear al medio de incubación. Junto a los resultados de la presente sección se graficaron los resultados de liberación de 20:4n-6 en núcleo previamente analizados en la *sección 4.III.3.1*.

La L-FABP moviliza el 20:4n-6, el 18:0 y el 18:1n-9 nucleares hacia otros compartimentos celulares.

La L-FABP estimula la movilización y redistribución del 20:4n-6, 18:0 y 18:1n-9 dentro del núcleo entre los diferentes pools lipídicos.

L-FABP estimula la esterificación de 20:4n-6 y 18:0 en PI.

El PI localizado en la matriz nuclear forma parte del activo sistema de transducción de señales del núcleo, y la L-FABP estaría favoreciendo la adecuada composición de las especies moleculares de PI.

El efecto de la L-FABP no sería específico de ésta proteína ya que la BSA también moviliza a los ácidos 20:4n-6 y 18:0 nucleares entre los diferentes pools lipídicos y fuera del núcleo. Sin embargo, en condiciones fisiológicas la L-FABP es la que se encuentra en el citosol y no la BSA.

El L-FABP desempeña un activo rol en la movilización del 20:4n-6 de los pools endonucleares

Dentro del núcleo la L-FABP movilizaría FA hacia factores de transcripción, a sitios activos de enzimas de la matriz nuclear, DMN y nLD.

4.III.4.Discusión

Trabajos previos del laboratorio han demostrado que el núcleo se caracteriza por poseer una elevada proporción de PUFA, principalmente 20:4n-6 y 22:6n-3 esterificados en sus lípidos [12]. Estos resultados revirtieron lo que proponía Hunt et al. [13] y se aceptaba en bibliografía, que en la matriz nuclear se concentraban LP, principalmente especies moleculares de PC ricas en FA saturados y 18:1n-9. Esta composición lipídica endonuclear solo es válida en líneas celulares que se caracterizan por poseer una activa $\Delta 9$ desaturasa que explica la alta proporción de 18:1n-9 en estas células [6,14]. Más aún, los cultivos primarios de hepatocitos poseen disminuidas las actividades enzimáticas de las $\Delta 5$ y $\Delta 6$ desaturasas [6,15], que participan en la síntesis de FA insaturados, siendo la $\Delta 6$ desaturasa la enzima reguladora del proceso. Estos hechos explicarían la alta proporción de 18:1n-9 y la baja proporción de FA de las series n-6 y n-3 observados en los lípidos de las células neoplásicas en general, y por lo tanto la composición de los FA observada por Hunt et al. en las matrices de estas células es propia de las mismas, y no es una característica general del núcleo celular. Más aún, en la sección 4.I.2 demostramos que en la matriz nuclear de células de hígado, existen especies moleculares ricas en 18:1n-9 pero las mismas corresponden a especies moleculares de TAG y de CE de las nLD y no de especies moleculares de PC como proponía Hunt et al.

Habiendo demostrado que los LN nucleares se encuentran en las nLD y con 18:1n-9, el siguiente objetivo fue determinar las características de los procesos de incorporación y esterificación de los FA mayoritarios que constituyen los LN nucleares (16:0, 18:1n-9 y 18:2n-6). Hemos encontrado que estos FA se incorporan por un mecanismo acil-CoA independiente en el núcleo (que podría ser mediado o no) y se esterifican por un mecanismo acil-CoA dependiente; la esterificación de FA se

caracteriza por ser más activa (mayor actividad específica) en LN que en LP. Resultados equivalentes se observaron al aislar nLD de núcleos previamente marcados luego de incubarlos con estos FA, ya que los LN nucleares se localizan en las nLD. Estos resultados contrastan con resultados previos del laboratorio en los que se había observado que los FA 18:0 y 20:4n-6 se esterifican en LP más activamente (mayor actividad específica) que en LN.

La SM es el SL mayoritario de las células de hígado de rata[6]. Se sintetiza en el citosol en el RE y no remodela el FA que posee esterificado en su molécula cuando se encuentra constituyendo la MN, la matriz nuclear y /o la monocapa de las nLD. Estos resultados están de acuerdo con datos previos del laboratorio [2-4,7].

Hemos demostrado que los FA exógenos se esterifican en los LN y LP (a excepción de la SM) mediante un mecanismo acil-CoA dependiente que es intrínseco del núcleo y que además está presente en todas las fracciones nucleares ensayadas, que incluye a los núcleos aislados, matrices nucleares, membranas nucleares y nLD.

Hemos demostrado que las nLD poseen un activo metabolismo lipídico ya que los FA esterificados en los LP y LN de las mismas se remodelan con especificidad respecto de la clase lipídica y el tipo de FA. Sin embargo, debido a limitaciones metodológicas, no podemos precisar aún si las nLD poseen todas las estructuras y componentes requeridos en estos procesos y por lo tanto poseen autonomía respecto a los demás componentes nucleares. De todas formas, los lípidos provenientes de otras zonas del núcleo se podrían incorporar en las nLD, o las propias nLD se desplazarían por el interior nuclear hasta la zona de síntesis o remodelado de FA con la participación de la actina y miosina nuclear [16].

El destino de los TAG nucleares no sería el de proveer energía como en el caso de los TAG de las cLD, si no que podrían ser fuente de DAG (como segundos mensajeros)

y / o FA que actuarían como ligandos de factores de transcripción. Está descrito que el DAG y el PA son importantes segundos mensajeros generados en el núcleo en respuesta a determinados estímulos [18,19] y la fuente de los mismos podría ser las nLD.

Con respecto a la relación que existe entre el tamaño y las funciones de las LD, el tejido adiposo blanco totalmente diferenciado es el caso extremo en el que los TAG presentes en la cLD gigante (que ocupa casi todo el citoplasma de la célula), actúan como moléculas de depósito con poca o nula posibilidad de actividad metabólica. En el caso del tejido adiposo pardo (BAT) que posee un activo catabolismo de FA, las cLD de este tejido son mucho más pequeñas que las del blanco y un caso intermedio lo constituye el tejido adiposo blanco cuando sufre un proceso de “amarronado” (browning) que implica un proceso de diferenciación celular que involucra cLD de menor tamaño y con un activo catabolismo de los FA [17]. En términos generales, se postula que el tamaño de las cLD es inversamente proporcional a la actividad metabólica de las mismas [17], por lo tanto, teniendo en cuenta que las nLD son más pequeñas que las cLD, podemos suponer que dentro del núcleo el metabolismo de los LN sería más activo que en el citosol.

En resumen

El modelo que proponemos mediante el cual los FA se incorporan al núcleo, implica una primera etapa en la que los FA provenientes del citosol llegan al núcleo y se incorporan en la DMN o bien ingresan como FA al interior nuclear (matríz nuclear) mediante un proceso pasivo. El pool de FA de la matríz nuclear puede aportar FA que actuarían como ligandos de factores de transcripción, de sustratos para la COX1 y 2 (síntesis de eicosanoides), de sustratos que se unirían a la ACS y el acil- CoA resultante se esterificaría en las distintas clases lipídicas nucleares, ya sean los LP y/o los LN de

las nLD o bien en otros dominios que contengan LP presentes en la matriz y / o en la DMN.

Un mismo FA constituyendo especies moleculares de diferentes clases lipídicas permitiría que existan en el núcleo pools alternativos de FA con diferente localización, composición química, propiedades fisicoquímicas, metabolismo, regulación y funciones biológicas.

¿Cuál es el rol de la L-FABP en la movilización de FA nucleares?

Se postula que la L-FABP se desplaza por difusión simple dentro de la célula y que ingresa al núcleo en forma pasiva por el CPN ya que la proteína carece de señal de localización nuclear (NLS) que es un factor imprescindible para el transporte activo a través del CPN [20]. Más aún, se acepta que las moléculas que poseen una masa superior a 60 kDa son las que entran al núcleo por el CPN en forma activa, mientras que las de menor tamaño lo hacen en forma pasiva, y la L-FABP posee una masa de 14kDa aproximadamente.

Hemos demostrado que la L-FABP ingresa al núcleo y se distribuye en la matriz nuclear no en forma homogénea sino formando focos en diferentes zonas de la misma. Estos resultados contrastan con lo que ocurre en células que sobreexpresan L-FABP en las que la proteína se acumula en la zona perinuclear [21], las diferencias entre los resultados podría deberse a la alteración en la homeostasis celular debido al aumento intracelular de la proteína.

Hemos demostrado que la L-FABP promueve la movilización de FA nucleares, la redistribución de FA en las diferentes clases lipídicas y finalmente la liberación de FA al citosol. El remodelado de los FA de las distintas especies moleculares determinaría la composición final de éstas y el transporte reverso de FA, sería un mecanismo de exportación de FA desde el núcleo hacia el citosol y hacia otras organelas. Estos resultados concuerdan con los estudios realizados en hepatocitos en

condiciones normales por Petrescu et al., ya que en respuesta a determinados estímulos (ligandos lipídicos), la L-FABP citosólica transloca al núcleo por un tiempo corto y luego regresa al citosol [21].

La L-FABP favorece la movilización de FA proveniente de los distintos pools lipídicos con especificidad respecto al FA; en particular favorece la movilización y posterior esterificación del 20:4n-6 en PI y de 18:1n-9 en CE. Esto implica una acción muy selectiva de la L-FABP respecto al FA y al destino final del mismo.

La movilización de FA ya sea exógenos (provenientes del citosol) o nucleares (producto de hidrólisis de lípidos nucleares), puede considerarse como el aporte de FA para el “encendido” de una vías de señalización mediante la unión del FA a un factor de transcripción específico. Mientras que los fenómenos de esterificación y movilización de FA fuera del núcleo, serían los procesos de “apagado” de esa misma señal, ya que se eliminan de la circulación nuclear los FA que se desprendieron de esos factores de transcripción.

En conclusión postulamos un mecanismo de llegada de FA exógenos al núcleo (Figura 60), libres o unidos a L-FABP, en el núcleo (DMN y/o matriz nuclear) el FA se une al sitio activo de la ACS, se activan como acil-CoA y son remodelados por los FA de los LP localizados en la EN y/o ingresar al núcleo a través del poro nuclear, mediante un mecanismo pasivo mediado. Una vez en la matriz, los FA libres o unidos a L-FABP, se unen como ligandos a factores de transcripción y / o, se activan a ésteres de CoA por la ACS. Una vez activados pueden ser nuevamente transportados a través de la matriz nuclear probablemente por las ACBPs, hacia sitios donde se unen como ligandos a factores de transcripción y / o, son remodelado por los FA de los lípidos nucleares por las diferentes acil transferasas.

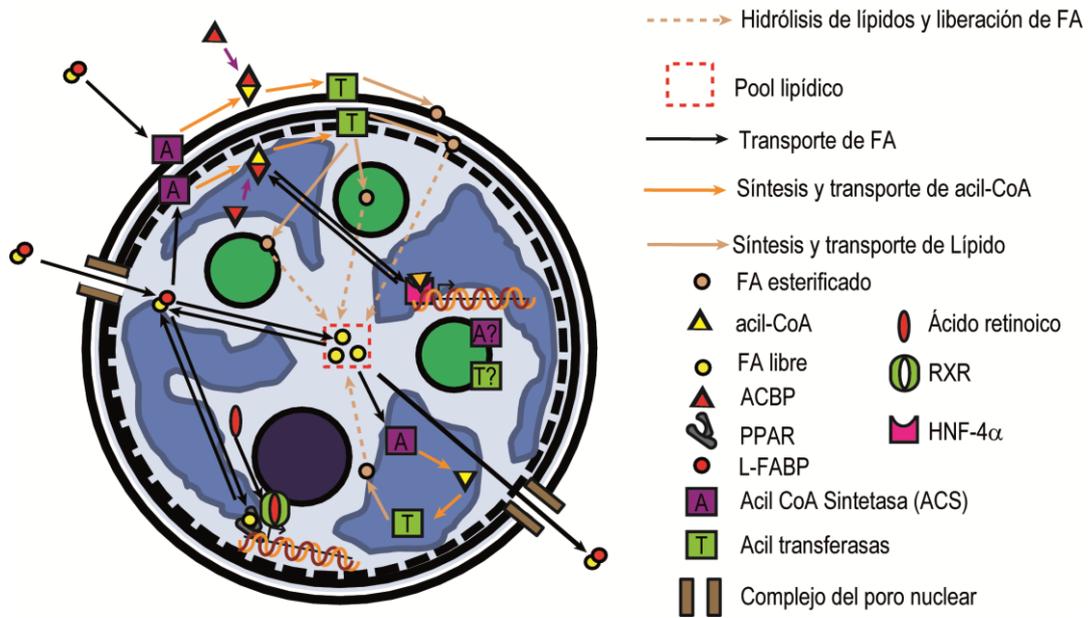


Figura 60. Mecanismo propuesto para el metabolismo nuclear de ácidos grasos.

4.III.5. Bibliografía de la sección “4.III.”

- [1] K Waku, Origins and fates of fatty acyl-CoA esters, *Biochim. Biophys. Acta* 1124 (1992) pp. 101-111.
- [2] L A Ves and R.R. Brenner, 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 (1998) pp. 39-47.
- [3] A Ves-Losada, S.M. Mate, R.R. Brenner, Incorporation and distribution of saturated and unsaturated fatty acids into nuclear lipids of hepatic cells, *Lipids* 36 (2001) pp. 273-282.
- [4] S M Mate, J.P. Layerenza, A. Ves-Losada, Incorporation of arachidonic and stearic acids bound to L-FABP into nuclear and endonuclear lipids from rat liver cells, *Lipids* 42 (2007) pp. 589-602.
- [5] J P Humbert, N. Matter, J.C. Artault, P. Koppler, A.N. Malviya, Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is located to the inner nuclear membrane vindicating regulation of nuclear calcium signaling by inositol 1,4,5-trisphosphate. Discrete distribution of inositol phosphate receptors to inner and outer nuclear membranes, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) pp. 478-485.
- [6] S M Mate, R.R. Brenner, A. Ves-Losada, Endonuclear lipids in liver cells, *Can. J. Physiol Pharmacol.* 84 (2006) pp. 459-468.
- [7] S M Mate, R.R. Brenner, A. Ves-Losada, Phosphatidyl choline fatty acid remodeling in the hepatic cell nuclei, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 70 (2004) pp. 49-57.
- [8] U Bordewick, M. Heese, T. Borchers, H. Robenek, F. Spener, Compartmentation of hepatic fatty-acid-binding protein in liver cells and its effect on microsomal phosphatidic acid biosynthesis, *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 370 (1989) pp. 229-238.
- [9] M Elholm, A. Garras, S. Neve, D. Tornehave, T.B. Lund, J. Skorve, T. Flatmark, K. Kristiansen, R.K. Berge, Long-chain acyl-CoA esters and acyl-CoA binding protein are present in the nucleus of rat liver cells, *J. Lipid Res.* 41 (2000) pp. 538-545.
- [10] G V Richieri, R.T. Ogata, A.M. Kleinfeld, 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 (1994) pp. 23918-23930.
- [11] A A Spector, Fatty acid binding to plasma albumin, *J. Lipid Res.* 16 (1975) pp. 165-179.

- [12] J L James, G.A. Clawson, C.H. Chan, E.A. Smuckler, Analysis of the phospholipid of the nuclear envelope and endoplasmic reticulum of liver cells by high pressure liquid chromatography, *Lipids* 16 (1981) pp. 541-545.
- [13] A N Hunt, G.T. Clark, G.S. Attard, A.D. Postle, Highly saturated endonuclear phosphatidylcholine is synthesized in situ and collocated with CDP-choline pathway enzymes, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) pp. 8492-8499.
- [14] C A Marra and M.J. de Alaniz, Incorporation and metabolic conversion of saturated and unsaturated fatty acids in SK-Hep1 human hepatoma cells in culture, *Mol. Cell Biochem.* 117 (1992) pp. 107-118.
- [15] A Pawar and D.B. Jump, Unsaturated fatty acid regulation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha activity in rat primary hepatocytes, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) pp. 35931-35939.
- [16] I A Olave, S.L. Reck-Peterson, G.R. Crabtree, Nuclear actin and actin-related proteins in chromatin remodeling, *Annu. Rev. Biochem.* 71 (2002) pp. 755-781.
- [17] D Barneda, A. Frontini, S. Cinti, M. Christian, Dynamic changes in lipid droplet-associated proteins in the "browning" of white adipose tissues, *Biochim. Biophys. Acta* 1831 (2013) pp. 924-933.
- [18] V L Gaveglio, S.J. Pasquare, N.M. Giusto, Metabolic pathways for the degradation of phosphatidic acid in isolated nuclei from cerebellar cells, *Arch. Biochem. Biophys.* 507 (2011) pp. 271-280.
- [19] V L Gaveglio, S.J. Pasquare, N.M. Giusto, Phosphatidic acid metabolism in rat liver cell nuclei, *FEBS Lett.* 587 (2013) pp. 950-956.
- [20] C Wolfrum, C.M. Borrmann, T. Borchers, F. Spener, 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 (2001) pp. 2323-2328.
- [21] A D Petrescu, A.L. McIntosh, S.M. Storey, H. Huang, G.G. Martin, D. Landrock, A.B. Kier, F. Schroeder, High glucose potentiates L-FABP mediated fibrate induction of PPARalpha in mouse hepatocytes, *Biochim. Biophys. Acta* 1831 (2013) pp. 1412-1425.

5. Conclusiones

Objetivos específicos e hipótesis de trabajo

1. Determinar la composición, topología y propiedades físicoquímicas de los pools de LN y LP del núcleo.
2. Proponer un modelo de organización espacial de los lípidos nucleares.
3. Determinar el proceso mediante el cual los FA citosólicos se internalizan, interaccionan y redistribuyen en los pools lipídicos del núcleo en condiciones fisiológicas.
4. Elucidar el rol de la L-FABP en estos procesos.

Se pueden aislar fracciones subnucleares puras

A partir de núcleos aislados se pueden aislar en forma pura matrices y nLD. Las MME y MNI solo se pueden aislar como fracciones crudas.

Los lípidos nucleares están compartamentalizados.

Los lípidos nucleares se encuentran en dos localizaciones muy contrastantes, la envoltura nuclear más fluida que el interior nuclear y compuesta de GPL, SL y C. Dentro del núcleo, en las nLD, se encuentran concentrados todos los TAG y CE nucleares, organizados en un core hidrofóbico rodeado de una monocapa de LP, C y proteínas asociadas. Existe un remanente de LP en la matriz nuclear formando complejos con cromatina.

Los LP nucleares se caracterizan por contener mayoritariamente 20:4n-6 y 18:0, mientras que los LN poseen más 16:0, 16:1n-7, 18:2n-6 y 18:1n-9.

Las nLD se observan en preparados coloreados en el interior de núcleos y matrices aislados, y dentro de los núcleos de células hepáticas; en todos los casos previa coloración se distinguen como estructuras esféricas y con un patrón aleatorio de distribución. Las nLD poseen menor tamaño y se encuentran en menor número que las cLD. Son una estructura celular descrita por primera vez en esta tesis y por sus características debe ser considerada diferente a los conocidos cuerpos nucleares, ya que es la primera estructura delimitada por lípidos.

El metabolismo lipídico nuclear es muy activo y autónomo

Los ácidos grasos exógenos (citosólicos) se incorporan al núcleo celular en forma pasiva

Los FA saturados y no saturados exógenos se incorporan como FA y se esterifican en los lípidos nucleares. Se incorporan en el núcleo mediante un mecanismo acil-CoA independiente (en muestras de MN, matriz nuclear y nLD) y se esterifican en los lípidos nucleares (MN, matriz nuclear y nLD) por un mecanismo acil-CoA dependiente.

Los diferentes FA saturados, monoinsaturados y polinsaturados se esterifican y remodelan en el núcleo con especificidad respecto de la clase lipídica. El remodelado de FA de los lípidos nucleares es un proceso intrínseco al núcleo y determina la composición final de las especies moleculares de las clases lipídicas que lo constituyen.

El remodelado de 16:0, 18:1n-9 y el 18:2n-6 es más activo en los lípidos de las nLD que en la MN, donde se localizan en forma mayoritaria los LN y LP respectivamente. El remodelado de 18:0 y 20:4n-6 es mucho más activo en LP que en LN nucleares.

La L-FABP favorece la movilización de los FA nucleares

La L-FABP se internaliza en el núcleo por un mecanismo pasivo (mediado) y promueve la movilización de los ácidos 16:0 y 18:1n-9 desde el pool de FA hacia las diferentes clases de LN y LP del núcleo.

La esterificación de estos FA unidos a L-FABP en los LP presenta particularidades según el ácido graso.

La L-FABP favorece la movilización y esterificación de 16:0 y 18:1n-9 a CE

Cuando el 16:0 está unido a L-FABP, se moviliza y esterifica principalmente en PE probablemente movilizado a partir del pool de PI.

La L-FABP favorece la movilización y esterificación de 18:1n-9 en forma alternada entre PC y PE nuclear.

Transporte reverso de ácidos grasos desde el núcleo hacia el citosol

La L-FABP favorece la movilización de FA desde el núcleo al citosol con características propias según el FA.

Favorece la movilización y remodelado de los FA de las diferentes clases lipídicas nucleares, junto con la movilización de FA provenientes de LN y LP fuera del núcleo hacia otros comportamientos celulares.

L-FABP favorece la esterificación de 20:4n-6 y 18:0 en PI. El PI de la matriz nuclear forma parte del activo sistema de transducción de señales del núcleo, y la L-FABP estaría favoreciendo la adecuada composición de las especies moleculares de PI involucradas en este proceso.

Este efecto no es exclusivo de la L-FABP sino que la BSA también lo produce con características comparables. Sin embargo, en condiciones fisiológicas la L-FABP es la que se encuentra en el citosol en contacto con el núcleo y no la BSA.

Dentro del núcleo la L-FABP movilizaría FA hacia factores de transcripción donde los FA actúan como ligandos, a sitios activos de enzimas o al exterior nuclear.

6.Perspectivas

Cómo producto de este trabajo de tesis surgen nuevas preguntas:

Cuál es la función de los lípidos nucleares

¿Qué funciones poseen las distintas especies moleculares de cada clase lipídica?

¿Cuál es el origen de las nLD?

¿Existe síntesis *de novo* de los LN nucleares?

¿Cómo se comportan a lo largo del ciclo celular?

¿Cómo es la regulación del tamaño? ¿Poseen movimiento?

¿Están presentes en otros tipos celulares y en otros organismos?

¿Cuál es la composición proteica y de LP?

¿Existen otros dominios lipídicos además de las membranas nucleares y las nLD?

7.1. Muestras biológicas

7.1.1. Animales

Los animales fueron provistos por el Bioterio General de la Facultad de Ciencias Médicas, de la Universidad Nacional de La Plata. Los protocolos en los que se utilizaron animales (vertebrados) en investigaciones biomédica fueron supervisados por el Comité Interno de Bienestar Animal integrado por personal del INIBIOLP y del CIC (Centro de Investigaciones Cardiovasculares) y cumplieron con las normas de ética vigentes

Se utilizaron ratas macho endocriadas y jóvenes (60-70 días de edad) de la cepa Wistar, con un peso entre 180-200g. Se optó por trabajar con ratas macho ya que estos animales no presentan las variaciones hormonales que se observa en las hembras y, por lo tanto, se evita la necesidad de sincronizar a los animales en una misma etapa.

Los animales estuvieron alojados en jaulas compartidas por 4-5 ratas, en un ambiente con la temperatura controlada en 24 ± 2 °C y sujetos a períodos de 12 hs de luz y 12 hs de oscuridad, siendo la medianoche el punto medio del período de oscuridad.

Las ratas se alimentaron con una dieta comercial para roedores [Alimento para Ratas y Ratones Cargill (Pilar, Argentina) 50% p/p y Alimento para Ratas y Ratones ACAI (San Nicolás, Argentina) 50% p/p]. El alimento y el agua se les administraron *ad libitum*. La composición de la dieta fue la siguiente: 20% de proteínas y 4 % de lípidos totales, con una composición de ácidos grasos (peso %) de 15,6% de 16:0, 1,1% de 16:1, 6,3% de 18:0, 26,9% de 18:1n-9, 1,6% de 18:1n-7, 42,7% de 18:2n-6, 5,7% de 18:3n-3, y trazas de 14:0, 20:4n-6 y 22:6n-3.

Los experimentos se realizaron de acuerdo a la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (Guide for Care and Use of Laboratory Animals (1996), National Academy Press). 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 estuvo a cargo del personal del Bioterio, y se realizó a las 8 a.m. para evitar variaciones en los datos debidas a ritmos circadianos propios de los animales [1].

7.1.2. Cultivo celular

Las células HepG2 de hepatoma humano (ATCC HB-8065) se crecieron y mantuvieron a 37°C en confluencia adheridas a botellas de 95 cm² y/o cubreobjetos [2] en medio mínimo Eagle (MEM) conteniendo L-Glutamina 2 mM, bicarbonato de Sodio 2,2 g/L, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, piruvato de sodio 1 mM, suero fetal bovino inactivado por calor al 10 % (Gibco, Grand Island, NY) y estreptomycin 0,1 g/L.

7.2. Purificación de L-FABP recombinante

La L-FABP recombinante se obtuvo según el método de Hsu [3]. Se incubaron 20 ml de cultivo de *Escherichia coli* BL21 (DE3) transformadas con plásmidos conteniendo el gen para la L-FABP de rata (prestados por los Dres. Alan Kleinfeld and Ron Ogata [4] y el Dr. David Wilton [5]) en medio líquido LB con ampicilina (100µg/ml) durante toda la noche a 37°C. Luego el cultivo se diluyó 100 veces con el mismo medio de cultivo y se incubó hasta llegar a una $DO_{600nm} = 0,60$ y se indujo la expresión de la L-FABP con IPTG 0,4 mM (concentración final). Luego de 4 horas de inducción se recolectaron las bacterias por centrifugación a 6000 xg durante 5 min y a 4 °C (rotor de ángulo fijo JLA16.250 Beckman). El pellet de bacterias se resuspendió en Buffer A [Tris 10 mM, EDTA 1 mM, KCl 40 mM - pH: 7,70] y se sonicó. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 41100 xg en un rotor de ultracentrifuga de ángulo fijo durante 45 min a 4°C. Se realizó para una precipitación fraccionada de proteínas incubando el sobrenadante a 4°C con una solución sobresaturada de (NH₄)₂SO₄; luego la muestra se centrifugó a 10000 xg en una centrífuga refrigerada durante 30 min a 4°C. El sobrenadante se incubó 10 min a temperatura ambiente con [1-¹⁴C]16:0 (300000 cpm) con el objetivo de hacer un seguimiento a lo largo de la purificación de la L-FABP, ya que el FA se une a la proteína. La muestra marcada se sembró en una columna de exclusión molecular Sephadex G-50 (Pharmacia/GE Healthcare), y se eluyó con Buffer B [buffer fosfatos 10 mM, KCl 150 mM, NaN₃ 3mM – pH: 7,40]; se recolectaron fracciones de 10 ml utilizando un flujo de la fase móvil de 2ml/min mediante un colector de fracciones (GE healthcare), se identificó la fracción en la que se encontraba la proteína por medidas de absorbancia a 280nm, radiactividad (centelleo líquido) y por SDS-PAGE. Las fracciones de interés se concentraron mediante un dispositivo concentrador de presión positiva (Millipore). Finalmente, la muestra se delipidizó para extraer los AG endógenos de *E. coli* y el [1-¹⁴C]16:0 utilizando una columna rellena con Lipidex-1000 (hidroxialcoxi-propil-dextran Tipo IV, Sigma), este relleno retiene los sustratos hidrofóbicos [6]. La corrida se realizó a un flujo de 0,5 ml/min con Buffer B. La operación se repitió hasta que la delipidación fue del 95% en base a la radioactividad recuperada. Para eliminar las impurezas de ADN que pudieran estar presentes se realizó una precipitación con sulfato de protamina (Sigma) [7] a una concentración final de 1 mg/ml seguido de una

centrifugación en ultracentrífuga a 50.000 xg durante 20 min a 4°C. La pureza de las proteínas se constató mediante una corrida de SDS-PAGE con geles al 15%. La cuantificación de las proteínas se realizó por Lowry (Sección 3.6.4.1) y por absorbancia a 280 nm (coeficiente de extinción molar = 6000 M⁻¹ cm⁻¹).

7.2.1. Marcación fluorescente de L-FABP

La L-FABP recombinante aislada de *E. coli*, se marcó fluorescentemente usando la sonda 5-iodoacetamidofluoresceína siguiendo el protocolo de Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA; la sonda se une a grupos tiol de la proteína a pH fisiológico. La sonda libre se separó de la unida a la L-FABP mediante dos eluciones a través de una columna NAP 5 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) seguida por diálisis overnight contra Sacarosa 0,25 M en Buffer C [KCl 1, M, N-acetil-cisteína 1,6 mM, buffer fosfato de potasio 4,7 mM – pH: 7,4]. Bajo estas condiciones la sonda libre fue completamente eliminada y la eficiencia de la marcación fue de una molécula de sonda por molécula de L-FABP (Fluo-L-FABP).

7.3. Fraccionamiento celular

7.3.1. Aislamiento de núcleos

Se aislaron núcleos altamente purificados a partir de homogenado de hígado por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa de acuerdo con el método de Blobel y Potter [8], modificado inicialmente por Kasper [9] y posteriormente en el laboratorio [10]: todos los pasos se llevaron a cabo a 4°C y utilizando diferentes soluciones de sacarosa en buffer D [Tris-HCl 0,05 M - pH: 7,5; MgCl₂ 5 mM y KCl 2,5 mM].

Los núcleos obtenidos se resuspendieron en un homogeinizador vidrio-vidrio de 1 ml con Glicerol 25% en Buffer E [Tris-HCl 0,01 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.

7.3.2. Fraccionamiento nuclear

7.3.2.1. Aislamiento de matrices nucleares

Las matrices nucleares se aislaron siguiendo la técnica de Vann y colaboradores [11], ligeramente adaptada en el laboratorio [12]. Se incubaron núcleos enteros de células de hígado de rata en presencia de un detergente no iónico, Tritón X-100, a fin de desorganizar la doble membrana nuclear. Luego de dicha incubación se procedió a la separación de las matrices de la membrana nuclear. En los casos en que las matrices aisladas no fueron inmediatamente utilizadas se procedió al agregado de Glicerol 25% en Buffer E para su conservación a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior utilización.

7.3.2.2. Aislamiento de membranas nucleares

Las membranas nucleares, interna y externa se aislaron de acuerdo al método de Humbert [13].

Los pellets de membrana nuclear interna pura se resuspendieron en Glicerol 25% en Buffer E. Todas las fracciones se congelaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior utilización.

7.3.2.3. Aislamiento de Gotas Lipídicas Nucleares

En el laboratorio se elaboró una técnica para aislar Gotas Lipídicas Nucleares [10] adaptando la técnica descrita por Ontko et al [14] para el aislamiento de las Gotas Lipídicas Citosólicas. Con este propósito, se resuspendieron núcleos aislados a partir de un pool de 8 a 10 hígados (200 mg de proteína nuclear total) en un volumen final de 2,5 ml en Sacarosa 1 M en Buffer D. Se agregó PMSF (Fluoruro de fenilmetilsulfonilo) a una concentración final de 1 mM, para inhibir la actividad de serin y cistein proteasas.

Como control del método de aislamiento de las Gotas Lipídicas Nucleares, se aislaron Gotas Lipídicas Citosólicas bajo las mismas condiciones. En este caso, el homogenado de hígado obtenido en Sacarosa 0,25 M en Buffer D como se describió previamente, se diluyó con sacarosa 2,3 M en Buffer D a un volumen final de 7,5 ml y una concentración final de Sacarosa 1,9 M.

A continuación el lisado obtenido por sonicación nuclear y el homogenado hepático se sometieron a un gradiente de sacarosa como se detalla a continuación: se agregaron 1,5 ml de agua bidestilada a tubos del rotor SW 32 Ti, luego se incorporaron en forma sucesiva en el fondo del tubo 2,5 ml de sacarosa 0,3 M, 2,5 ml de Sacarosa 0,7 M, 3 ml de Sacarosa 1 M, 3 ml de Sacarosa 1,3 M y 3 ml de Sacarosa 1,5 M en Buffer D. Por último se inyectaron en el fondo

del tubo 7,5 ml del lisado nuclear, homogenato de hígado o sacarosa 1,9 M (blanco). Los tubos se centrifugaron en una ultracentrífuga Beckman Optima LE-80K con un rotor SW32Ti a 25.770 xg a 4 °C durante 30 min. Las bandas fueron colectadas con jeringa Hamilton y almacenadas a -70 °C hasta su uso.

7.4.Análisis por microscopía

La integridad y la pureza de las células, núcleos y fracciones subnucleares se determinó mediante observaciones utilizando diferentes técnicas de microscopía y por proteínas marcadoras adaptadas para cada muestra en particular.

7.4.1.Microscopía electrónica

Las muestras que se observaron por MET se fijaron previamente con glutaraldehído al 2,5% en Buffer F [Buffer fosfato 0,1 M – pH: 7,2] durante 2 horas, se post-fijaron con tetróxido de osmio al 1% y se embebieron en una resina epoxi. Secciones delgadas de las muestras se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo, y se observaron con un microscopio JEM-1200 EXII.

7.4.1.1.Tinción negativa

Las muestras de las Gotas Lipídicas aisladas se fijaron colocando una gota de la muestra sobre una grilla con film de Colodion, luego de 2 a 3 minutos el líquido en exceso se removió usando papel de filtro, pero evitando el secado completo de la muestra. Las muestras fijadas se colorearon depositando varias gotas de Fosfotungstato de sodio al 1% en Buffer G [NaH_2PO_4 1.4 mM, Na_2HPO_4 8 mM, NaCl 150 mM, - pH: 7,4], durante 20 seg, transcurrido dicho período el colorante se removió con papel de filtro.

Las muestras fijadas y coloreas se examinaron en forma inmediata en un Microscopio Electrónico de Transmisión JEM-1200 EXII.

7.4.2.Squash de tejido hepático

Se hicieron preparados de hepatocitos mediante la técnica de squash aprovechando las características del hígado de ser un órgano compuesto por tejido blando que permite la aplicación de este tipo de técnicas [15]. Una porción pequeña de tejido cortada con bisturí se fijó en paraformaldehído al 4% p/v en Buffer D durante 16 hs en heladera. Luego la muestra se lavó con Sacarosa 0,25 M en Buffer D y se depositó entre porta y cubreobjetos, se ejerció una pequeña presión, cuidando de no romper los vidrios. Luego ambos vidrios fueron separados y el exceso de líquido se removió para realizar las diferentes tinciones.

7.4.3. Microscopía de campo claro

En una primera etapa las muestras se fijaron al aire colocando gotas de las mismas sobre portaobjetos, sobre hielo durante 10 min; luego se colorearon mediante la adición de una solución de Rojo Sudán al 0,5 mg/ml en etanol 70% durante 10min, o bien se adicionó OsO₄ 2,5 % p/v en Buffer G y se mantuvo en la oscuridad 10 min.

Los preparados se observaron en un microscopio de campo claro Olympus BX51 (Japan) y se capturaron imágenes con el software de adquisición Image-Pro plus versión 5.1.

7.4.4. Microscopía de fluorescencia confocal

Las muestras a ser observadas se fijaron incubandolas durante 16 hs con paraformaldehído 4% p/v en Sacarosa 0,25 M en Buffer C. Luego se lavaron 3 veces con Sacarosa 0,25 M en Buffer C (10 minutos cada vez). Las muestras se permeabilizaron incubandolas durante 20 min con Tritón X-100 0,08 % p/v en Buffer C. Luego de 3 lavados con Sacarosa 0,25 M en Buffer C (10 minutos cada vez) se procedió a incubar durante 48 hs con los anticuerpos primarios (Tabla 1) disueltos en seroalbúmina bovina al 1 % en Sacarosa 0,25 M en Buffer C. Luego de 3 lavados con Sacarosa 0,25 M en Buffer C (10 minutos cada vez) se procedió a incubar durante 1 hs con los anticuerpos secundarios y marcadores de estructura (Tablas 2 y 3) disueltos en seroalbúmina bovina (BSA) al 1 % en Sacarosa 0,25 M en Buffer C. Las muestras se lavaron 3 veces más como se mencionó más arriba y se montaron sobre portaobjetos para su observación.

Tabla 14. Anticuerpos primarios utilizados en los ensayos de inmufluorescencia

| Anticuerpo Primario | Marcador | Especie | Dilución | Marca comercial |
|----------------------------|-----------------------|----------------|-----------------|------------------------|
| SC-35 | Speckles nucleares | Cabra | 1:25 | Santa Cruz® |
| P54[nrb] | Paraspekles nucleares | Ratón | 1:250 | BD Biosciences® |
| LAP2 β | Lamina nuclear | Ratón | 1:250 | BD Biosciences® |
| L-FABP | L-FABP | Conejo | 1:200 | Santa Cruz® |

Tabla 15. Anticuerpos secundarios conjugados con sondas fluorescentes utilizados en los ensayos de inmunofluorescencia

| Anticuerpo Secundario | Especie | Dilución | Fluoróforo (Absorción – Emisión) | Marca comercial |
|------------------------------|----------------|-----------------|---|------------------------|
| Anti ratón | Gallina | 1:250 | 594nm-617nm | Invitrogen® |
| Anti cabra | Mono | 1:250 | 550nm-570nm | Jackson IR® |
| Anti conejo | Cabra | 1:250 | 555nm-565nm | Invitrogen® |

Tabla 16. Marcadores de estructura fluorescentes utilizados en los ensayos de inmunofluorescencia

| Marcadores de Estructura | Especificidad | Concentración | Fluoróforo (Absorción – Emisión) | Marca comercial |
|---------------------------------|----------------------|----------------------|---|------------------------|
| DAPI | ADN | 1 μ g/ml | 358nm-461nm | Sigma® |

BODIPY493/503 Lípidos neutros 1 µg/ml 493nm-503nm Invitrogen®

7.4.5. Microscopía de Dos Fotones

La microscopía de excitación de dos fotones permite realizar un seccionamiento óptico que induce un mínimo de fenómenos de bleaching de la muestra y se evita el solapamiento de los espectros de excitación y emisión [16,17]. Las observaciones de las muestras se realizaron en un microscopio invertido (Axiovert 35, Zeiss, Thornwood, NY). Se usó un objetivo LD-Achroplan20 long working distance 60X air (Zeiss, Holmdale, NJ), 0,4 de apertura numérica, y un láser de titanio-safiro (Mira 900, Coherent, Palo Alto, CA) estimulado por un láser de Nd:vanadato (Verdi, Coherent). La fluorescencia fue observada a través de un filtro paso amplio de 350 a 600 nm (BG39 filter, Chroma Technology, Brattleboro, VT). Las observaciones se realizaron en Laboratory for Fluorescence Dynamics, Univ. California – Irvine, USA, con la colaboración de la Dra. Alejandra Tricerri del INIBIOLP.

7.5. Marcación de membranas con Laurdan

El Laurdan (6-lauril-2-(dimetilamino) naftaleno; Molecular Probes - Eugene, OR, USA) es una sonda fluorescente que se utiliza para el estudio de membranas lipídicas, ya que la cola hidrofóbica del ácido láurico permite su solubilización estable en la bicapa fosfolipídica, mientras que la región fluorescente de la sonda se orienta y localiza hacia el medio acuoso. El máximo de emisión de la sonda es cercano a 440 nm cuando la misma se ubica en dominios lipídicos en fase gel y de 490 nm cuando se encuentra en dominios líquido-cristalino. Una ventaja adicional de esta sonda es que permite observar selectivamente la fluorescencia asociada a bicapas sin interferencia de la sonda que no fue incorporada, ya que el rendimiento cuántico de la emisión de la sonda es mínimo en medio acuoso.

El corrimiento en la emisión de la sonda se puede cuantificar midiendo intensidades de fluorescencia y aplicando la siguiente relación: $GP = (I_{440} - I_{490}) / (I_{440} + I_{490})$ donde I_{440} e I_{490} corresponden a las intensidades de emisión a 440 y 490 nm, respectivamente.

Las muestras que se utilizaron en el microscopio de 2 fotones y/o espectrofluorómetro, se marcaron con la sonda incubando suspensiones de Núcleos y Matrices nucleares con Laurdan 1µM (Laurdan:Lípidos, en una relación molar de 1:100) a 37°C.

En el microscopio de 2 fotones se excitó la muestra con 2 fotones de 780 nm y se obtuvieron dos imágenes de fluorescencia, una a 440 nm y otra a 490 nm, mientras que en el espectrofluorómetro se excitó la muestra a 350 nm y se registraron los respectivos espectros de emisión.

Con las imágenes de 2 fotones se calculó el valor de GP pixel a pixel obteniendo así una tercera imagen de GP, donde en una escala de -1 (azul) a +1 (rojo) los valores negativos indican mayor fluidez y los positivos mayor rigidez, respectivamente. Con los espectros de emisión medidos en el espectrofluorómetro también se realizaron los correspondientes cálculos del valor de GP. Estos ensayos se realizaron con la colaboración de la Dra. Alejandra Tricerri (INIBIOLP).

7.6. Análisis de imágenes

Para obtener imágenes a partir de los preparados de inmunofluorescencia se utilizó un microscopio confocal de epifluorescencia Olympus Fluoview FV1000 (modelo BX61), equipado con lasers de 405, 473 y 559 nm. Las imágenes presentadas se tomaron usando un objetivo UPLSAPO 40X (apertura numérica de 0,95) y un zoom digital de 2-3. La captura de imágenes se realizó a través del software FluoView versión 1.7.3.0. Se observaron al menos 10 campos representativos y se tomaron imágenes con espesores de sección entre 0,20 y 0,68 μm . Las imágenes se guardaron en formato .oib (“Original Imaging Format”: formato de archivos de Olympus) para su posterior análisis.

Las imágenes obtenidas se procesaron y, se realizaron reconstrucciones en el eje Z y tridimensionales (3D). Con este propósito el stack (“pila”) de imágenes fue procesado con el uso de dos programas con el programa ImageJ las imágenes se deconvolucionaron, pseudocolorearon y de la integración de los diferentes planos focales se obtuvieron las vistas ortogonales en los planos XZ e YZ; y con el programa Resolve RT version 4.0 se confeccionaron las reconstrucciones 3D.

Para realizar las reconstrucciones 3D se utilizó la representación mediante “isosuperficies” generadas tomando como base la fluorescencia de las distintas sondas usadas. Las mejores reconstrucciones se obtuvieron utilizando superficies lisas en el caso de las gotas lipídicas, los dominios nucleares y la lámina nuclear, y una superficie basada en líneas entrecruzadas para la representación del espacio ocupado por los núcleos (fluorescencia del DAPI).

7.7. Análisis proteico

7.7.1. Cuantificación de proteínas

7.7.1.1. Método de Lowry

El contenido de proteínas de las distintas fracciones celulares y subnucleares se cuantificó utilizando el método de Lowry y colaboradores [18]. Para ello, alícuotas de diferentes volúmenes, según la fracción subcelular en estudio se ajustaron a una determinada dilución y se les agregó 1 ml de una solución formada por Na_2CO_3 2 % en NaOH 0,1 M, tartrato de Na y K 2 % en H_2O y CuSO_4 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 BSA cristalizada como standard.

7.7.1.2. Método de Bradford

El contenido de proteínas de las distintas fracciones celulares se determinó utilizando el método de Bradford [19]. Para ello, a 50 μl de las diluciones de las diferentes muestras se les agregó 2,5 ml de reactivo (Coomassie Brilliant Blue G-250 0,01 % p/v en etanol 4,70 % p/v y ácido fosfórico 8,50 % p/v). El cromóforo Coomassie Brilliant Blue G-250 existe en dos formas. La forma roja se convierte en azul cuando liga proteínas. El complejo azul colorante-proteína se cuantificó espectrofotométricamente a 595 nm después de 2 minutos y antes de los 20 minutos. Este complejo tiene un coeficiente de extinción tal que confiere gran sensibilidad al método (es 4 veces más sensible que el Lowry). Por otro lado el complejo se establece muy rápidamente (en solo 1-2 minutos) y permanece disperso en solución por una hora. El máximo de absorbancia ocurre a 595 nm. La calibración del método colorimétrico se realizó utilizando BSA cristalizada como standard.

7.7.2. SDS-PAGE de fracciones celulares

Muestras de homogenado de hígado, núcleos aislados y matrices nucleares con una concentración de 2 mg/ml con Buffer H [Tris 125 mM – pH: 6,8, glicerol 20% p/v, SDS 4% p/v y 2-mercaptoetanol 2% p/v, más azul de bromofenol], y se desnaturalizaron incubándolas a 100

°C durante 6 minutos. Las muestras (50 µg de proteínas por pocillo) se resolvieron electroforéticamente por SDS-PAGE mediante geles de 0,75 mm de espesor al 10% y con una corriente de 120 V, usando Buffer I de corrida [Tris base 25 mM – pH: 8,3, Glicina 192 mM y Dodecil sulfato de Sodio 3,5 mM].

7.7.3. Western blot

Los geles obtenidos luego de la electroforesis se transfirieron a membranas PVDF (BioRad) usando Buffer J de transferencia [Tris base 25 mM – pH: 8,3, Glicina 192 mM y metanol 20% v/v]. Los sitios de unión no específicos en la membrana de PVDF se bloquearon por incubación overnight con leche descremada al 5% p/v más Tween-20 0,1% v/v en Buffer G. Posteriormente, las tiras de membrana PVDF se incubaron con un anticuerpo primario (Tabla 4) diluído en leche descremada al 1% p/v más Tween-20 0,1% v/v en Buffer G durante una hora a temperatura ambiente y con agitación suave.

Las membranas se lavaron 6 veces durante 5 min con Buffer J. Finalmente los inmunoblots se revelaron usando los siguientes anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa (HRP) (Tabla 5) diluídos en leche descremada al 1% más Tween-20 0,1% v/v en Buffer G durante una hora a temperatura ambiente y con agitación suave.

Las membranas se lavaron 6 veces 5 min cada vez usando Tween-20 0,1% v/v en Buffer G. La actividad peroxidasa se reveló usando el sustrato Pierce ECL para Western Blot (Pierce, Rockford, IL) y se analizó con ImageQuant 350 (GE Health Care).

Tabla 17. Anticuerpos primarios utilizados en los ensayos de Western blot

| Anticuerpo Primario | Especie | Especificidad | Dilución | Marca comercial |
|--|---------|-----------------------|----------|--------------------|
| Anti ACAT-1 (sterol O-acyltransferase 1) | Conejo | Retículo Endoplásmico | 1:200 | Santa Cruz® |
| anti VDAC(Voltage Dependent Anion selective Channel protein) | Conejo | Mitocondria | 1:1.000 | Thermo Scientific® |
| Anti Na ⁺ /K ⁺ -ATPasα | Conejo | Membrana Plasmática | 1:1.000 | Santa Cruz® |
| Anti Perilipina | Cabra | Citosol | 1:200 | Santa Cruz® |
| Anti Lamina A | Cabra | Lámina nuclear | 1:200 | Santa Cruz® |
| Anti LAP2β | Ratón | Lámina Nuclear | 1:2.000 | BD Biosciences® |
| Anti L-FABP | Conejo | L-FABP | 1:200 | Santa Cruz® |

Tabla 18. Anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa (HRP) utilizados en los ensayos de Western blot

| Anticuerpo Secundario | Especie | Dilución | Marca comercial |
|-----------------------|---------|----------|--------------------|
| anti Conejo | Cabra | 1:5.000 | Thermo Scientific® |
| anti Cabra | Conejo | 1:3.000 | Santa Cruz® |
| anti Ratón | Cabra | 1:5.000 | Santa Cruz® |

7.8.Análisis lipídico

7.8.1.Extracción de lípidos totales

Los lípidos totales (LT) de las distintas fracciones obtenidas se extrajeron por el procedimiento de Folch y colaboradores [20]. La muestra se homogenizó en un homogenizador vidrio-teflón con cloroformo:metanol (2:1, v/v) en una relación de una parte de muestra a 20 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 metanólico-acuosa y una inferior, clorofórmica). La fase superior se separó por succión y la inferior, con el extracto lipídico, se secó mediante corriente de N₂. Dicho extracto se conservó en un pequeño volumen de cloroformo:metanol (2:1, v/v) a -20 °C en atmósfera de N₂ para su posterior análisis.

7.8.2. Separación de clases lipídicas

Las diferentes clases de lípidos se separaron por TLC, utilizando placas comerciales de vidrio de 20 x 20 cm con zona de concentración de 2,5 x 20 cm y silicagel G como fase estacionaria. Las placas se activaron previamente durante 1 hora a 120 °C. Para lípidos polares (LP) se utilizó como fase móvil la siguiente mezcla de solventes: cloroformo: metanol: AcH: agua (50:37,5:3,5:2, v/v/v/v). 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 LP en el siguiente orden desde el punto de siembra: lisoPC, SM, PC, PS, PI y PE (Coeficientes de Retención – R_f – de: 0,04; 0,08; 0,16; 0,30; 0,37 y 0,54). En el caso de los lípidos neutros (LN) se utilizó como fase móvil la siguiente mezcla de solventes: hexano : éter etílico : AcH (80:20:1, v/v/v) y el tiempo de desarrollo de la corrida cromatográfica fue de 60 min. La fracción correspondiente a LP permaneció en el punto de siembra, mientras que los LN corrieron en mayor o menor medida con la fase móvil según su polaridad, a saber: MAG (monoacilglicéridos), 1,2 y 1,3-DAG, C, FA, TAG y CE (R_f de: 0,06; 0,13; 0,18; 0,27; 0,60 y 0,96). 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 standards que se siembran en forma simultánea en la misma placa.

7.8.3. Cuantificación de clases lipídicas

7.8.3.1. Lípidos polares

Los LP se rasparon del punto de siembra de la TLC y se cuantificaron midiendo el contenido de fósforo en la muestra mediante el método de Chen y colaboradores [21]. Este procedimiento para la determinación de fósforo es una modificación del de Fiske y Subbarow [22]. La zona correspondiente a LP se raspó y recogió 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 Subbarow. 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 standard.

7.8.3.2. Lípidos neutros

El colesterol libre y los ésteres de colesterol se cuantificaron aplicando un spray de FeCl_3 en H_2SO_4 sobre las placas de TLC desarrolladas y carbonizando en estufa a 100 °C durante 2-3 min. La aparición de coloración rojo-violácea indica la presencia de C y CE. Las manchas se cuantificaron con un software de análisis de imágenes digitales (ImageJ) [23].

Los TAG se rasparon de las placas de TLC, se extrajeron con cloroformo y se cuantificaron utilizando el Kit comercial TGCColor de Wiener (Rosario, Argentina), basado en la cuantificación del glicerol liberado por acción de una triacilglicérido lipasa.

7.9. Composición de Ácidos Grasos (FA)

La composición de FA se determinó por cromatografía gas-líquido (GLC) de los respectivos ésteres metílicos. Si bien los FA 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 FA de cadena corta, sino también de cadena media y larga, saturados y no saturados. Es así que es necesario transformar a los FA en sus ésteres metílicos que son más volátiles, debido a una reducción en su polaridad al formarse el éster y relativamente más estables que los FA libres.

La obtención de los FA totales requiere la saponificación previa de las muestras tratándolas con álcali para hidrolizar los FA de los ésteres de colesterol, acilglicéridos, glicerfosfolípidos y esfingolípidos. 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 gramo de lípido, se gasearon con N₂ para evitar oxidaciones y se calentaron en tubos tapados a 80 °C durante 45 min. 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 FA, los cuales fueron extraídos por agitación de la fase alcohólica con 2 ml de éter de petróleo y la operación se repitió tres veces. Los FA libres provenientes de la saponificación de los LT se metilaron de acuerdo a la metodología desarrollada por Morrison y Smith [24]. Las muestras a esterificar se cargaron en tubos de vidrio con tapa esmerilada a los que se les agregó 2 ml de BF₃ 10% p/v en metanol. 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 resuspendieron con n-hexano y se conservaron a -20 °C, bajo atmósfera de N₂, hasta el momento de ser utilizados.

Los EMAG se analizaron 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 y dependiente de la columna utilizada, de la fase móvil y de la temperatura, e independiente de otras condiciones experimentales. Los picos del cromatograma fueron identificados comparando sus tiempos de retención con los de una mezcla de standards de EMAG conocidos.

7.10. Metabolismo de FA nucleares

7.10.1. 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, [1-¹⁴C]FA 2 μM (16:0, 18:0, 18:1n-9, 18:2 n-6 o 20:4n-6), Sacarosa 0,25 M en Buffer C, CoA (sal sódica) 60 μM

y ATP 1,3 mM en un volumen final de 1,6 ml. Las incubaciones se realizaron con los tubos abiertos, a 37 °C, con agitación constante. Transcurrido el tiempo de incubación los núcleos (N) se separaron del medio de incubación (MI) mediante centrifugación a 4.100 xg, a 4°C, durante 10 min.

Los lípidos correspondientes al N y al MI se extrajeron por el procedimiento de Folch y col. [20] y la radioactividad correspondiente a las fases clorofórmica (c) y metanólico-acuosa (a) se cuantificó por centelleo líquido. La cuantificación de la radioactividad se efectuó en viales de plástico, conteniendo 3 ml de líquido de centelleo. Se utilizó líquido de centelleo comercial (Hissel 3 Perkin Elmer). 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 MIc) y se separaron en las diferentes clases lipídicas por TLC, como se describiera en la sección 3.7.3. La radioactividad incorporada en cada fracción se determinó por escaneo de la placa de TLC en Storm840 (Amersham).

7.11. Rol de la L-FABP en el metabolismo de FA nucleares

7.11.1. Incorporación de FA unidos a L-FABP

Para proceder al ligado del FA a la L-FABP (FA:L-FABP) se incubaron los FA con L-FABP en Buffer C a 25°C durante 1 min. Posteriormente se incubaron núcleos en presencia de FA:L-FABP como se indicara en la sección 3.8.1. Las concentraciones de FA 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 16:0, 18:0, 18:1n-9 y 20:4n-6 son de 23, 9, 9 y 48 nM, respectivamente [25]. Por lo tanto, al incubar 2 μ M de FA con 2 μ M de L-FABP, todo el FA estará ligado a L-FABP.

7.11.2. Transporte reverso de FA nucleares

En estos ensayos luego de la incubación standard (sección 3.8.1) se procedió a incubar los núcleos marcados radiactivamente con medio de incubación frío conteniendo Sacarosa 0,25 M en Buffer C, CoA (sal sódica) 60 μ M y ATP 1,3 mM en un volumen final de 1,6 ml, y concentraciones crecientes de L-FABP o BSA delipidadas según el caso.

7.12. Análisis de los datos

Los análisis bioquímicos fueron realizados por duplicado. Debido a la baja recuperación, los Núcleos y las Matrices nucleares se aislaron a partir de pooles de hígados de 10 y 80 animales, respectivamente, las nLD a partir de pooles de núcleos provenientes de 10 a 12 hígados y las cLD a partir de pooles de homogenados de 5 hígados.

Para comparar las composiciones lipídicas de las diferentes fracciones celulares los datos se normalizaron considerando la masa de hígado (en gramos) de la que se aisló cada fracción en particular. Por lo tanto, dependiendo del tipo de normalización, los datos se expresaron como $\mu\text{g/g}$ hígado o como nmol/g hígado.

Los volúmenes de los núcleos, matrices y LD se calcularon considerando que estas estructuras poseen una forma de esferas ideales.

Los resultados experimentales se expresaron como el promedio de 3 a 10 determinaciones \pm el error standard de la media (SEM), dependiendo del caso en particular.

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 α por debajo de 0,001 se consideraron altamente significativas (***) para valores entre 0,01 y 0,001 significativas (**); entre 0,05 y 0,01 poco significativas (*) y para valores de $\alpha > 0.05$ no significativas.

Los datos paramétricos se analizaron mediante ANAVA con comparaciones de medias (Test HSD de Tukey). En aquellos casos en que los datos fueron no paramétricos se recurrió al Test de Kruskal-Wallis seguido de un test de comparación de medias [26]. Se consideraron significativas aquellas comparaciones con $p > 0,05$.

Los cálculos estadísticos se realizaron con SPSS 15.0 para Windows (IBM Corp. (2006), Somers, NY, USA).

7.13. Bibliografía de la sección “7.”

- [1] S M Actis Dato, A. Catala, R.R. Brenner, Circadian rhythm of fatty acid desaturation in mouse liver, *Lipids* 8 (1973) pp. 1-6.
- [2] M P Polo, R. Crespo, M.G. de Bravo, Geraniol and simvastatin show a synergistic effect on a human hepatocarcinoma cell line, *Cell Biochem. Funct.* 29 (2011) pp. 452-458.
- [3] K T Hsu and J. Storch, Fatty acid transfer from liver and intestinal fatty acid-binding proteins to membranes occurs by different mechanisms, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) pp. 13317-13323.
- [4] G V Richieri, R.T. Ogata, A.M. Kleinfeld, A fluorescently labeled intestinal fatty acid binding protein. Interactions with fatty acids and its use in monitoring free fatty acids, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) pp. 23495-23501.
- [5] A F Worrall, C. Evans, D.C. Wilton, Synthesis of a gene for rat liver fatty-acid-binding protein and its expression in *Escherichia coli*, *Biochem. J.* 278 (Pt 2) (1991) pp. 365-368.
- [6] J F Glatz, F.A. van Nieuwenhoven, J.J. Luiken, F.G. Schaap, G.J. van der Vusse, Role of membrane-associated and cytoplasmic fatty acid-binding proteins in cellular fatty acid metabolism, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 57 (1997) pp. 373-378.
- [7] L M Chang, E. Rafter, C. Augl, F.J. Bollum, Purification of a DNA polymerase-DNA primase complex from calf thymus glands, *J. Biol. Chem.* 259 (1984) pp. 14679-14687.
- [8] G Blobel and V.R. Potter, Nuclei from rat liver: isolation method that combines purity with high yield, *Science* 154 (1966) pp. 1662-1665.
- [9] C B Kasper, Isolation and properties of the nuclear envelope, *Methods Enzymol.* 31 (1974) pp. 279-292.
- [10] J P Layerenza, P. Gonzalez, M.M. Garcia de Bravo, M.P. Polo, M.S. Sisti, A. Ves-Losada, Nuclear lipid droplets: A novel nuclear domain, *Biochim. Biophys. Acta* 1831 (2013) pp. 327-340.
- [11] L R Vann, F.B. Wooding, R.F. Irvine, N. Divecha, Metabolism and possible compartmentalization of inositol lipids in isolated rat-liver nuclei, *Biochem. J.* 327 (Pt 2) (1997) pp. 569-576.
- [12] S M Mate, R.R. Brenner, A. Ves-Losada, Endonuclear lipids in liver cells, *Can. J. Physiol Pharmacol.* 84 (2006) pp. 459-468.
- [13] J P Humbert, N. Matter, J.C. Artault, P. Koppler, A.N. Malviya, Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is located to the inner nuclear membrane vindicating regulation of nuclear calcium signaling by inositol 1,4,5-trisphosphate. Discrete distribution of

- inositol phosphate receptors to inner and outer nuclear membranes, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) pp. 478-485.
- [14] J A Ontko, L.W. Perrin, L.S. Horne, Isolation of hepatocellular lipid droplets: the separation of distinct subpopulations, *J. Lipid Res.* 27 (1986) pp. 1097-1103.
- [15] O E Al, *Medical Laboratory Science : Theory And Practice*, McGraw-Hill Education (India) Pvt Ltd, 2000.
- [16] L A Bagatolli and E. Gratton, Two-photon fluorescence microscopy observation of shape changes at the phase transition in phospholipid giant unilamellar vesicles, *Biophys. J.* 77 (1999) pp. 2090-2101.
- [17] M A Tricerri, S.A. Sanchez, C. Arnulphi, D.M. Durbin, E. Gratton, A. Jonas, Interaction of apolipoprotein A-I in three different conformations with palmitoyl oleoyl phosphatidylcholine vesicles, *J. Lipid Res.* 43 (2002) pp. 187-197.
- [18] O H Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) pp. 265-275.
- [19] M M Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) pp. 248-254.
- [20] J Folch, M. Lees, G.H. Sloane Stanley, A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues, *J. Biol. Chem.* 226 (1957) pp. 497-509.
- [21] P.S. Chen, T.Y. Toribara, H. Warner, *Microdetermination of Phosphorus*, 1956, pp. 1756-1758.
- [22] C.H. Fiske and Y.P. Subbarow, *The Colorimetric Determination of Phosphorus*, 1925, pp. 375-400.
- [23] W W Christie and X. Han, *Lipid Analysis: Isolation, Separation, Identification and Lipidomic Analysis*, Oily Press, The, Bridgwater, 2010.
- [24] W R Morrison and L.M. Smith, Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride--methanol, *J. Lipid Res.* 5 (1964) pp. 600-608.
- [25] G V Richieri, R.T. Ogata, A.M. Kleinfeld, 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 (1994) pp. 23918-23930.
- [26] S Siegel and N.J. Castellan, *Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences*, McGraw-Hill, 1988.

Abreviaturas

BSA: seroalbúmina bovina

C: colesterol

CE: ésteres de colesterol

cLD: gota/s lipídica/s citosólica/s

CN: cuerpos nucleares (“Nuclear Bodies”)

CPN: complejo del poro nuclear

DAG: diacilglicéridos

DIC: contraste diferencial de interferencia

DMN: doble membrana nuclear

ec: eucromatina

EN: envoltura nuclear

F: formaldehído

FA: ácido/s graso/s

GPL: glicerofosfolípidos

hc: heterocromatina

L-FABP: Proteína transportadora de FA de hígado (Liver Fatty Acid Binding Protein)

LP: lípidos polares

LN: lípidos neutros

M2F: microscopía de 2 fotones

MAG: monoacilglicéridos

MET: microscopía electrónica de transmisión

MI: medio de incubación

MNE: membrana nuclear externa

MNI: membrana nuclear interna

MO: microscopía óptica de campo claro

MUFA: FA monoenoicos

N: fracción nuclear

nLD: gota/s lipídica/s nuclear/es

Nu: nucleolo

O: tetróxido de osmio

PC: fosfatidilcolina

PE: fosfatidiletanolamina

PI: fosfatidilinositol

PS: fosfatidilserina

PUFA: FA polinosaturados

r: ribosoma/s

RE: retículo endoplásmico

S: rojo sudán

SL: esfingolípidos

SM: esfingomielina

TAG: triacilglicéridos

TLC: cromatografía en capa delgada